

还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A006-1-1) 比色法 100 管/96 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

二硫代二硝基苯甲酸与巯基化合物反应时能产生一种黄色化合物, 可进行比色定量测定。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 甲粉×1 瓶, 乙液 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

甲液: 1 瓶甲粉加双蒸水 172mL, 加热至 90~100℃ 完全溶解; **试剂一应用液配制:** 将已配好的甲液与乙液充分混合。此为过饱和溶液, 室温静置冷却后, 如有结晶, 则取上清进行实验, 室温保存。

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存, 用时加双蒸水至 200mL 溶解, 用我所赠送的塑料瓶室温保存。

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存, 用时加双蒸水至 50mL 溶解, 避光 4℃ 保存。

试剂四: 粉剂×4 支, 4℃ 保存, 用时每支加双蒸水 10mL 溶解, 避光冷藏可保存 5 天。

试剂五: 标准品溶剂贮备液, 10mL×1 瓶 (温度较低时可能会有结晶产生, 此时可将试剂 37℃ 融化后使用), 4℃ 保存; 临用前将标准品溶剂贮备液: 双蒸水=1:9 稀释成 **GSH 标准品溶剂应用液**。

试剂六: GSH 标准品粉剂, 3.07mg/支×3 支, 4℃ 保存。测定前将一支 GSH 标准品用 10mL 标准品溶剂应用液溶解, 配成 **1mmol/LGSH 标准液** (2℃~8℃ 可保存 1~2 周); 再取此 1mmol/LGSH 标准液 0.2mL 加标准品溶剂应用液 9.8mL 配成 **20μmol/LGSH 标准液** (现用现配)。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 405~420nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、电炉 (配试剂加热用)、300mL 烧杯、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)、血红蛋白测定试剂 (全血及红细胞用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

血清 (浆): 直接取样 0.25mL, 加试剂一应用液 1mL 混匀, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

细胞培养液: 先 4000 转/分离心 5 分钟后, 取上清 0.5mL, 加试剂一应用液 0.5mL 混匀, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

组织: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 0.5mL 加试剂一应用液 0.5mL 混匀, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。(或者称重后直接加 9 倍体积的试剂一应用液冰水浴匀浆, 然后 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液直接进行显色反应)

细胞: 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好) 加入 0.5mL 的生理盐水 (或者 PBS), 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 取其中 0.4mL 加试剂一应用液 0.4mL 混匀 (剩余匀浆用 BCA 等试剂盒测定其蛋白浓度), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液 1mL 进行显色反应。(或者将生理盐水换成试剂一应用液, 破碎后, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液直接进行显色反应)

全血: 取 0.1mL 肝素抗凝全血加双蒸水 0.9mL, 充分混匀, 直至透亮为止, 此为溶血液; 再取此溶血液 0.25mL,

加试剂一应用液 1mL 混匀, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

2、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
试剂一应用液 (mL)	0.8		
20μmol/LGSH 标准液 (mL)		0.8	
上清液 (mL)			0.8
试剂二 (mL)	1	1	1
试剂三 (mL)	0.2	0.2	0.2
试剂四 (mL)	0.04	0.04	0.04
混匀, 静置 5 分钟, 420nm (405~420nm) 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。			

3、计算方式:

①、按标准品计算:

$$\text{液体样本 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N$$

mgGSH/L

组织或细胞用生理盐水或 PBS 匀浆:

$$\text{GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div \text{Cpr}$$

mgGSH/gprot

组织用试剂一应用液匀浆:

$$\text{组织中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

mgGSH/g组织

细胞用试剂一应用液匀浆:

$$\text{细胞中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

mgGSH/万个细胞

全血除了按液体样本计算还可以按下公式计算:

$$\text{全血中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div C_{\text{Hb}}$$

gGSH/gHb

C_{标准}: 标准品浓度, 20×10⁻³mmol/L;

307: GSH 相对分子质量, 307g/mol (mg/mmol);

N: 样本显色反应前稀释倍数, (等于) 上清液制备时稀释倍数, 血清 (浆) 为 5, 细胞培养液、组织、细胞均为 2, 全血为 50。

Cpr: 待测匀浆蛋白浓度, gprot/L; (蛋白浓度测定试剂盒本所有售)

W: 组织样本质量, g;

V_{样总}: 组织或细胞用试剂一应用液匀浆 (或破碎) 时样本的总体积 (约等于加入的试剂一应用液的总体积), mL;

细胞总数: 收取的细胞的数量 (在加入试剂一应用液前就需计数), 万个;

C_{Hb}: 全血中血红蛋白浓度, gHb/L。

②、按标准曲线法查表:

取 1mmol/L GSH 标准溶液, 按 1:9 的比例 (10 倍) 加标准品溶剂应用液进行稀释配成 100μmol/L GSH 标准液, 再按下表进行稀释:

稀释管	1	2	3	4	5	6
标准品溶剂应用液(μL)	1000	800	600	400	200	0
100μmol/L 标准溶液(μL)	0	200	400	600	800	1000
标准品浓度(μmol/L)	0	20	40	60	80	100

将稀释后的 GSH 标准液按操作表标准管操作, 空白管调零, 420 nm 处, 1cm 光径, 测定各管吸光度值, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 做标准曲线, 将测定管的吸光度查曲线上相对应的浓度。

五、注意事项：

- 1、血液中的 GSH 几乎全部存在于红细胞内,可以用每升全血中 GSH 的克数来表示,也可用每克 Hb 中 GSH 的含量来表示。
- 2、计算时应用消光系数,故比色计要校正波长。用标准管计算较方便、准确。
- 3、吸取上清时,最好用带刻度的 5mL 滴管,或者用移液器,避开表面的一层薄膜,插到上清液中吸取 2mL 做显色反应。
- 4、最好每批试验做 2 个标准管、空白管,以减少操作误差。
- 5、组织中 GSH 相关酶(如 GSH-PX)浓度较高(特别是一些大小鼠等动物的肝脏)时,样本匀浆后需尽快测定 GSH 含量,否则可能会因为样本内部的酶分解反应,导致 GSH 测得值过低;如果样本量充足,可以考虑将样本直接用试剂一应用液来匀浆,效果会比较好。
- 6、加试剂一应用液后处理得到的上清假如比较浑浊或者不完全澄清透亮,可以在上清液中加入 0.2~0.3mL 的氯仿,涡旋 60 秒左右后,再进行离心,收集上清进行显色反应,计算公式不变(氯仿是有机溶剂,与水溶液不互溶,所以不影响反应体系的体积)。

六、测定意义：

谷胱甘肽(GSH)是一种低分子清除剂,它可清除 O_2^- 、 H_2O_2 、 $LOOH$ 。谷胱甘肽是谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种三肽,是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物,并且是 GSH—PX 和 GST 两种酶类的底物,为这二种酶分解氢过氧化物所必需,它并且能稳定含巯基的酶和防止血红蛋白及其它辅因子受氧化损伤,最近还证明 GSH 也参与使维生素 E 恢复到还原态的作用,缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用或加重其中毒作用,这可能与增加氧化损伤有关,因而 GSH 的量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。