

微量还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒

(货号: BC030 微板法)

一、测定意义及原理

还原型谷胱甘肽 (GSH) 可与二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 反应, 生成一种黄色化合物, 可在 405nm 下进行比色定量测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量。

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是机体内最重要的非酶性抗氧化物, 具有清除自由基、解毒、促进铁质吸收及维持红细胞膜的完整性、维持脱氧核糖核酸的生物合成、细胞的正常生长发育及细胞免疫等多种重要生理功能。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 GSH-ST 两种酶类的底物, 为这二种酶分解氢过氧化物所必需, 并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。GSH 是一种低分子清除剂, 可清除 O_2^- 、 H_2O_2 、 $LOOH$, 因而 GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力的重要因素。

二、试剂组成及配制 (96T)

试剂组成	规格	组份	浓度	保存条件
试剂一	20ml*1 瓶	沉淀剂		室温保存 6 个月
此为过饱和溶液, 如有结晶, 则取上清进行实验。				
试剂二	20ml*1 瓶	缓冲液		2~8°C 保存 6 个月
试剂三	5ml*1 瓶	显色剂		2~8°C 避光保存 6 个月
试剂四	3.07mg*3 支	GSH 标准品粉剂		2~8°C 保存 6 个月
	10ml*1 瓶	标准品溶解贮备液		2~8°C 保存 6 个月
GSH 标准品溶剂应用液配制: 临用前将标准品溶解贮备液: 双蒸水=1: 9 稀释.按所需量现用现配。				
1mmol/L GSH 标准品溶液配制: GSH 的分子量为 307.每次测定前将 3.07mg 的 GSH 标准品加到 10ml GSH 的溶剂应用液中。混匀, 2°C~8°C 保存 48 小时。				
20μmol/L GSH 标准品溶液配制: 取 1mmol/L GSH 标准溶液 0.2ml 加 GSH 标准溶剂应用液 9.8ml。				

三、样本前处理

1、培养细胞: 将收集好的细胞.用 PBS 清洗 1~2 次后, 低速离心收集沉淀细胞, 再加入 0.3-0.5ml, 0.1M PH 7.4 的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞。超声或手动研磨破碎细胞后待测。
上清液制备: 取破碎后的细胞悬液 0.1ml。加 0.1ml 试剂一混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

2、组织样本:

10%匀浆液的制备: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体 (ml) =1:9 的比例, 加入 9 倍的生理盐水制成组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。
上清液制备: 取 10%组织匀浆 0.1ml, 加 0.1ml 试剂一混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。



3、血清（浆）样本：

取血清（浆）0.05ml，加试剂一 0.2ml 混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。

4、全血样本：

10 倍溶血液的制备：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。

上清液制备：取 10 倍溶血液 0.05ml，加 0.2ml 试剂一混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。

四、操作过程：

不同样本用试剂一处理后取得的上清液，按照下表进行操作（详见样本前处理）

	空白孔	标准孔	测定孔
试剂一 (ul)	100		
20μmol/L GSH 标准品(μl)		100	
上清液 (μl)			100
试剂二 (μl)	100	100	100
试剂三 (μl)	25	25	25

混匀，静置 5 分钟，405nm 处，酶标仪测定各孔吸光度值。

五、计算公式：

1、全血计算公式：

$$\text{全血中GSH含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{样品OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准品OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本前处理稀释倍数}}{(5\text{倍})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}} \times \text{稀释倍数} (10\text{倍})$$

2、细胞及组织计算公式：

$$\text{细胞及组织GSH含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{样品OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准品OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本前处理}}{\text{稀释倍数}} \div \frac{\text{待测匀浆蛋白}}{\text{浓度}} \times \text{浓度} (\text{gprot/L})$$

3、血清（浆）计算公式：

$$\text{血清（浆）GSH含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{样品OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准品OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本前处理稀释倍数}}{(5\text{倍})}$$

六、标准曲线绘制：

（试剂盒灵敏度：1.5μmol/L）

取一定量的 1mmol/L GSH 标准品溶液用溶剂应用液配制成不同浓度的 GSH 标准，制作成标准曲线，100μmol/L、50μmol/L、20μmol/L、10μmol/L、5μmol/L、0μmol/L。

