还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(DTNB 比色法)

产品简介：

谷胱甘肽(glutathione，GSH)广泛存在于动物组织、植物组织、微生物和酵母中，参与组织细胞的许多功能活动，能够帮助保持正常的免疫系统功能，是一种氧自由基消除剂，保护组织细胞免受氧化损伤，并具有抗氧化作用和整合解毒作用。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种由谷氨酸(Glu)、半胱氨酸(Cys)和甘氨酸(Gly)残基组成的含γ-酰胺键和巯基(-SH)的天然三肽，相对分子量为 307，半胱氨酸上的巯基为其活性基团，常简写为 G-SH 或 GSH。GSH 与某些药物(如扑热息痛)、毒素(如自由基、碘乙酸、铅、汞、砷等)等结合，具有整合解毒作用，在延缓衰老、增强免疫力、抗肿瘤等功能性食品广泛应用。谷胱甘肽是研究活性氧和自由基的重要指标，亦是机体氧化物牵累的重要指标。还原型谷胱甘肽(GSH)能可逆的转变为氧化型谷胱甘肽(GSSG)，其存在形式会随着细胞内代谢的情况而发生相互转变。

还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(DTNB 比色法)(Glutathione Assay Kit)是一种简单易行的检测还原型谷胱甘肽的试剂盒，其检测原理是待测样品中的还原型谷胱甘肽(GSH)与发色底物 DTNB 反应，产生稳定黄色的 TNB 和 GSSG，通过分光光度法(分光光度计)测定 412nm 处吸光度，与相应处理的 GSH 标准比较，获得样品的 GSH 含量。该试剂盒可用于检测植物组织、血浆、血清、动物组织、培养细胞等样品中还原型谷胱甘肽的含量。本产品仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	R22074 100T	Storage
试剂(A): GSH 标准(1mM)	1ml	-20℃ 避光
试剂(B): GSH 提取液(3×)	100ml	RT 避光
试剂(C): GSH Assay Buffer	100ml	RT
试剂(D): DTNB	80mg	4℃
试剂(E): DTNB 稀释液	100ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、 蒸馏水或去离子水、PBS 或生理盐水

2、 电子天平、匀浆器或研钵、低温离心机、离心管或小试管

3、 水浴锅或恒温箱、分光光度计、比色皿

操作步骤(仅供参考)：

1、配制 GSH 提取液(1×)：取一份 GSH 提取液(3×)加入 2 份去离子水，即成。

2、配制 DTNB 显色液：量取 25mlDTNB 稀释液，将 40mg DTNB 加入稀释液中并充分溶解，即为 DTNB 显色液。也可以用精密天平称取 DTNB 粉末，配成终浓度为 1.6%的 DTNB 显色液。配制好的 DTNB 显色液宜-20℃保存，建议 1 个月内用完。

3、配制 GSH 标准梯度并制作标准曲线：将 GSH 标准(1mM)用去离子水稀释成 0.1mM 的 GSH 标准溶液即 GSH 标准(100μM)，然后按下表依次加入去离子水、GSH Assay Buffer 和 DTNB 显色液，混匀，25℃保温反应 10min。以 0 号管调零，用酶标仪 412nm 测定各管吸光度值。以还原型谷胱甘肽(GSH)的浓度(μM)为横坐标，以吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

项目(ml)	管号					
	0	1	2	3	4	5
GSH 标准(100μM)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
去离子水	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
GSH Assay Buffer	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DTNB 显色液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
相当于 GSH 的浓度(μM)	0	20	40	60	80	100

4、准备样品：

①植物组织样品：称取 1g 样品于研钵中，加入 1~2ml 经 4℃预冷的 GSH 提取液(1×)，在冰浴条件下研磨匀浆后，于 4℃ 12000r/min 离心 20min，收集上清液，用于 GSH 测定，并记录上清液总体积。

②动物组织样品：称取 0.2g 样品于研钵中，加入 1ml 经 4℃预冷的 GSH 提取液(1×)，在冰浴条件下研磨匀浆后，于 4℃ 12000 r/min 离心 20min，收集上清液，用于 GSH 测定，并记录上清液总体积。也可以用液氮研磨匀浆。

③红细胞或血浆样品：取新鲜血液，600 r/min 离心 10min，沉淀为红细胞，上清为血浆。对于红细胞，用 PBS 洗涤两次，取约 50μl 红细胞沉淀或血浆，加入 50μl GSH 提取液(1×)，充分 Vortex 振匀。冰浴放置 30min，4℃ 12000 r/min 离心 20min，收集上清液，用于 GSH 测定。对于处理好的红细胞样品最后需用 GSH 提取液稀释 10 倍后再进行测定，而对于血浆样品，应直接取样测定。

④细胞样品：PBS 洗涤细胞 1 次，离心收集细胞，吸尽上清，加入细胞沉淀 3 倍体积的 GSH 提取液(1×)，充分 Vortex 振匀(收集细胞前后分别对离心管进行称重，从而就可以计算出细胞沉淀的重量，10mg 细胞沉淀的体积可以粗略地看作 10μl)，对样品进行快速的冻融后，4℃或冰上孵育 5min，4℃ 12000 r/min 离心 20min，收集上清液，用于 GSH 测定。

5、GSH 加样及检测：取 5ml 一次性离心管，按照下表顺序依次加入试剂，混匀，并注意

避免产生气泡，25℃保温反应 10min。1cm 比色杯，以空白孔调零，用分光光度计 412nm 测定各管吸光度值。如果样品中的 GSH 浓度过高，可减少样品用量或用 GSH 提取液(1×)适当稀释后再进行测定。

加入物(ml)	空白孔	空白对照孔	样品测定孔
去离子水	1	—	—
上清液	—	1	1
GSH Assay Buffer	1	1	1
DTNB 稀释液	—	0.5	—
DTNB 显色液	0.5	—	0.5

计算：

根据还原型谷胱甘肽(GSH)标准曲线和样品的吸光度值(样品测定孔吸光值-空白对照孔吸光值)，可计算出样品中 GSH 的浓度(μmol/L)和含量(μmol/g)。

组织细胞样品 GSH(μmol/g)=C×V_T×N /W

式中：C=从标准曲线上查得的 GSH 浓度(μmol/L)

V_T=提取液总体积(L)

W=样品质量(g)

N=稀释倍数

注意事项：

1、 建议第一次测定时先做 2~3 个样品的本底对照(空白对照)，如果样本空白对照与空白管非常接近，则说明样品液中不存在干扰物质，可以不再检测样本本底对照。如果样本空白对照与空白管有显著差异，则在测定每个样本时都需要做样本空白对照。

2、 GSH 比较稳定，血液样品以 ACD 抗凝后 4℃冰箱保存，3 周内稳定。

3、 尽量使用新鲜的细胞或血液进行测定，而不要使用冻存的细胞或血液进行测定，避免使 GSH 活性下降。轻度溶血样本对 GSH 测定无影响。

4、 全血 GSH 与吸烟量、体育锻炼成正比，与乙醇节制程度呈反比。成年人全血 GSH 的参考区间为 1.02±0.17mmol/L。

5、 动植物样品不能立即测定，应先加入 GSH 提取液匀浆处理，沉淀后去除蛋白质，防止蛋白质所含巯基及相关酶对测定结果产生影响。处理后的提取液可放入低温冰箱-70℃保存，但不宜超过 10 天。

6、 测定各管时，各孔温度均需达到室温或 25℃，否则影响测定结果。

7、 测定时建议选用 412nm，亦可选用 405~425nm。

8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 6 个月有效。低温运输，按要求保存。

附：标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，系列 GSH 标准(0、20、40、60、80、100μmol/L)和 GSH Assay Buffer，再加入 DTNB 显色液，混匀，25℃保温反应10min，用分光光度计 412nm 对各管进行吸光度的测定。测定结果及标准曲线如下图所示，仅供参考：

