



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(微量法)

货号: R41817

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
R41817-A	100ml×1瓶	2-8℃避光保存
R41817-B	20ml×1瓶	2-8℃保存
R41817-C	8ml×1瓶	2-8℃避光保存
R41817-标准品	粉剂10mg×1支	2-8℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

还原型谷胱甘肽 (Reduced Glutathione, GSH) 是细胞内最主要的抗氧化巯基物质, 在抗氧化、蛋白质巯基保护和氨基酸跨膜运输等中具有重要作用。还原型与氧化型比值 (GSH/GSSG) 是细胞氧化还原状态的主要动态指标。因此, 测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量以及 GSH/GSSG 比值, 能够很好地反映细胞所处的氧化还原状态。DTNB 与 GSH 反应生成复合物, 在 412nm 处有特征吸收峰; 其吸光度与 GSH 含量成正比。

自备用品:

低温离心机、匀浆器/研钵、水浴锅、可调节移液器、酶标仪、微量玻璃比色皿或微孔板和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 血液样品制备:



血浆: 将收集的抗凝血于 4℃, 600g 离心 10 分钟, 吸取上层血浆到另一支试管中, 加入等体积的 R41817-A, 4℃, 8000g 离心 10 分钟, 将上清移入新的试管中放置于 4℃待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80℃保存 (可保存 10 天)。

血细胞: 将收集的抗凝血于 4℃, 600g 离心 10 分钟, 弃去上层血浆用 3 倍体积的 PBS 清洗 3 次 (用 PBS 重悬血细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入等体积 R41817-A, 混匀后 4℃放置 10 分钟, 8000g 离心 10 分钟, 吸取上清放于 4℃待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80℃保存 (可保存 10 天)。

2. 细胞或组织样品的制备:

细胞: 收集不少于 10⁶ 个细胞, 首先用 PBS 清洗细胞 2 次 (PBS 重悬细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入 3 倍细胞沉淀体积的 R41817-A 重悬细胞, 反复冻融 2-3 次 (可在液氮中冻结, 37℃水浴中溶解), 8000g 离心 10 分钟, 收集上清于 4℃待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80℃保存 (可保存 10 天)。

组织: 新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次, 然后称取动物组织或者植物组织 0.1g。加入用 R41817-A 润洗过的匀浆器中 (匀浆器提前放冰上预冷); 然后加入 1mL R41817-A (组织/R41817-A 比例保持不变即可), 迅速冰上充分研磨 (使用液氮研磨效果更好); 8000g, 4℃离心 10min; 取上清液放置于 4℃待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80℃保存 (可保存 10 天)。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。
2. R41817-B 置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中保温 30min。
3. 制作标准曲线:

称取 1mg 标准品用 1mL 蒸馏水溶解, 浓度为 1mg/mL (现配现用); 用 R41817-A 稀释标准品到浓度为 100μg/mL、75μg/mL、50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL、6.25μg/mL、0μg/mL。在微量玻璃比色皿或微孔板中依次加入 20μL 各浓度标准品, 140μL R41817-B, 40μL R41817-C, 混匀后静置 2min, 检测 412nm 处吸光度, 根据吸光度 (x) 和浓度 (y, μg/mL) 做标准曲线。

4. 在微量玻璃比色皿或微孔板中加入下列试剂:

试剂名称	对照管(ul)	测定管(ul)
------	---------	---------



上清液		20
蒸馏水	20	
R41817-B	140	140
R41817-C	40	40
分别混匀静置2min,测定412nm吸光度, A对照管记为A1,A测定管记为 A2 , $\Delta A=A2-A1$ 。		

注: 对照管只需要测定 1-2 次

计算公式:

根据标准曲线, 将样本 ΔA 带入公式中 (x), 计算出样本浓度 y ($\mu\text{g/mL}$)。

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSH } (\mu\text{g/mg prot}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = y \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH } (\mu\text{g/g 质量}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = y \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

(4) 按血浆 (血细胞) 体积计算

$$\text{GSH } (\mu\text{g/mL}) = 2y$$

V 样总: 上清液总体积, 1mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积,

20 μL =0.02mL; W: 样本质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10^6 为单位计量; 2: 血浆 (血细胞) 体积被稀释一倍。

注意事项

1. R41817-A 中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定; 若测定蛋白含量, 需另取组织。
2. 样本处理需匀浆完全, 若当天不能完成测量, 可放-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 不超过10d.
3. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。