

# 微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒说明书

(货号: BC030 微板法 96T)

测试前请仔细阅读说明书,预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、试剂组成与配制 (96T) :

试剂一: 沉淀剂, 20mL×1瓶, 室温可保存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: 缓冲液, 20mL×1瓶, 2~8℃可保存6个月。

试剂三: 显色剂, 5mL×1瓶, 2~8℃避光可保存6个月。

试剂四: GSH标准品(标准品粉剂, 3.07mg×3支; 标准品溶剂贮备液, 10mL×1瓶), 2~8℃可保存6个月。

GSH标准品溶剂应用液配制: 临用前将标准品溶剂贮备液: 双蒸水=1: 9稀释, 按所需量现用现配。

1mmol/LGSH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10mLGSH的溶剂应用液中, 混匀, 2℃~8℃可保存48小时。

20μmol/LGSH标准品溶液配制: 取1mmol/LGSH标准溶液0.2mL加GSH标准溶剂应用液9.8mL, 现用现配。

另赠送酶标板一块。

## 二、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): 体积(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, 取匀浆上清液待处理。

上清液制备: 取10%组织匀浆上清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。

## 三、操作步骤:

不同样本用试剂一处理后取得的上清液按下表进行操作:

	空白孔	标准孔	测定孔
试剂一(μL)	100		
20μmol/LGSH标准品(μL)		100	
上清液(μL)			100
试剂三(μL)	25	25	25
试剂二(μL)	100	100	100
轻轻震荡孔板混匀, 静置5分钟, 405nm处, 酶标仪测定各孔吸光度值			

#### 四、计算公式：

##### 1、全血计算公式：

$$\text{全血中GSH含量} \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 5 \times 10$$

( $\mu\text{mol/L}$ )

5为样本前处理稀释倍数， 10为样本测试前稀释倍数

##### 2、细胞及组织计算公式：

$$\text{细胞及组织中GSH含量} \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 2 \div \text{Cpr}$$

( $\mu\text{mol/gprot}$ )

2为样本前处理稀释倍数

Cpr: 样本蛋白浓度, gprot/L (prot指蛋白)

##### 3、血清(浆)计算公式：

$$\text{血清(浆)中GSH含量} \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 5$$

( $\mu\text{mol/L}$ )

5为样本前处理稀释倍数; C标准为标准液浓度,  $20\mu\text{mol/L}$ 。

##### 4、计算举例：

取大鼠肝10%匀浆, 按操作步骤测定, 测得测定孔OD值为0.1109, 标准孔OD值为0.1502, 空白孔OD值为0.0782,10%匀浆液蛋白浓度为8.866gprot/L; 计算为:

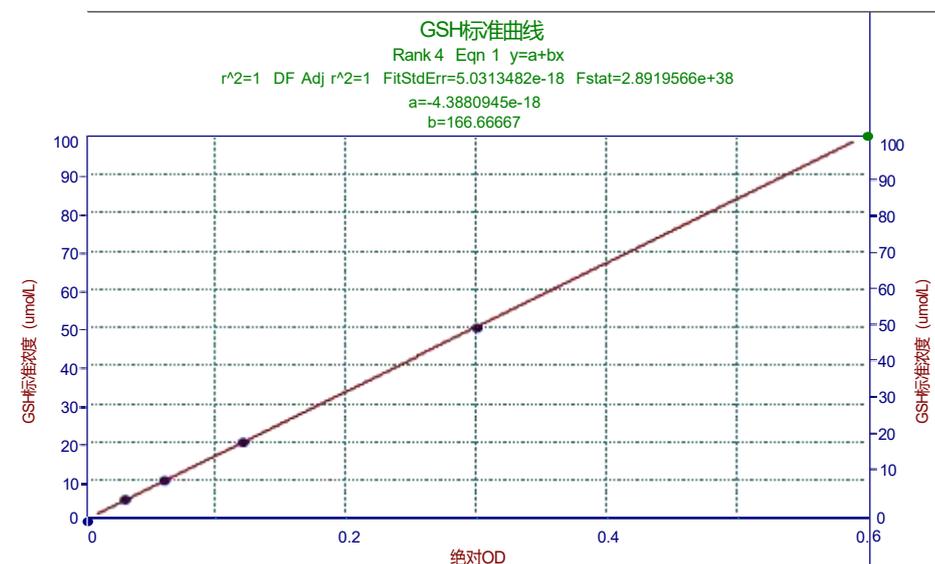
$$\begin{aligned} \text{大鼠肝中GSH含量} &= \frac{0.1109 - 0.0782}{0.1502 - 0.0782} \times 20 \times 2 + 8.866 \\ (\mu\text{mol/gprot}) &= 6.147\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

取大鼠血浆按操作步骤测定, 测得测定孔OD值为0.1212, 标准孔OD值为0.1502, 空白孔OD值为0.0782,计算为:

$$\begin{aligned} \text{大鼠血浆GSH含量} &= \frac{0.1212 - 0.0782}{0.1502 - 0.0782} \times 20 \times 4 \\ (\mu\text{mol/L}) &= 47.778\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

#### 五、标准曲线：(试剂盒灵敏度为 $1.5\mu\text{mol/L}$ )

取一定量的 $1\text{mmol/L}$  GSH标准品用溶剂应用液配制成不同浓度的GSH标准制作标准曲线： $100\mu\text{mol/L}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $0\mu\text{mol/L}$ 。



#### 六、测定原理：

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。

#### 七、检测意义：

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<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、LOOH，因而GSH量的多少是衡量机体抗氧化能力的重要因素。