

还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒说明书

Reduced Glutathione Assay Kit

微量法

货号: AK103

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK103-A	100ml×1 瓶	4℃避光保存
AK103-B	20ml×1 瓶	4℃保存
AK103-C	8ml×1 瓶	4℃避光保存
AK103-标准品	粉剂 10mg×1 支	4℃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 AK103-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 AK103-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 AK103-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 AK103-A 润洗过的匀浆器中 (匀浆器提前放冰上预冷); 然后加入 1mL AK103-A (组织/Ak103-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)。

检测步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。
- AK103-B 置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中保温 30min。
- 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AK103-A稀释标准品到浓度为200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、12.5 μg/mL、0 μg/mL。

在微量玻璃比色皿或微孔板中依次加入20 μL 各浓度标准品，140 μL AK103-B，40 μL AK103-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	
AK103-B	140	140
AK103-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（μg/mL）。

（1）按蛋白浓度计算

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

（2）按样本质量计算

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

（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

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

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 10⁶ 为单位计量；2：血浆（血细胞）体积被稀释一倍。

注意事项：

1. AK103-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℃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。