

还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒

简介:

谷胱甘肽是由谷氨酸(Glu)、半胱氨酸(Cys)和甘氨酸(Gly)组成的天然三肽,是一种含巯基(-SH)的化合物,广泛存在于动物组织、植物组织、微生物和酵母中。

试剂盒组分:

试剂名称	规格: 96T	保存条件
试剂一	液体×3瓶	2-8℃保存
试剂二	液体×1瓶	2-8℃保存
试剂三	液体×1瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1瓶	2-8℃保存
酶标板	96T	

本试剂盒可用于检测细胞、组织、血浆、血清、红血球、等样品。

样本处理:

- 血清样品:将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置2小时或4℃过夜,然后1,000×g 离心15分钟,取上清即可,将上清置于≤-20℃冷冻保存,避免反复冻融。
- 血浆样品:用 EDTA或肝素钠抗凝管采集标本,并将标本在采集后的 30 分钟内于 4℃冰箱,1,000×g 离心15分钟,取上清即可检测,或将上清置于≤-20℃冷冻保存,避免反复冻融。
- 组织匀浆:
 - 在预冷 PBS(0.01mol/L, pH=7.0-7.2)中清洗去除血液,低温切割标本后,准确称取组织重量。
 - 按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的匀浆介质PBS。用手工或匀浆器将标本充分匀浆。
 - 3000 ×g离心15分钟,仔细收集匀浆上清,弃沉淀,(如需要可取部分进行BCA蛋白定量),≤-20℃以下保存。
- 细胞裂解液:在分析试验之前,细胞需利用以下方法处理:
 - 贴壁细胞应该用冷 PBS 轻轻清洗,然后用胰蛋白酶消化,于 1,000×g 离心 5 分钟后收集,(悬浮细胞通过离心直接收集),将收集到的细胞用冷 PBS 洗3次。
 - 用 PBS 稀释细胞悬液,细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过超声破碎或反复冻融方式,以使细胞破坏并放出细胞内成份。3000 ×g离心15分钟,仔细收集上清,≤-20℃冷冻保存。
- 细胞培养上清或其它生物体液标本:请 3,000×g 离心15分钟,取上清即可检测,或将上清置于≤-20℃冷冻保存,避免反复冻融。

二、检测步骤:

Webset: www.jinhengnuo.com

Tel.: 18968009509,18968000935,18969978509

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至412nm，分光光度计蒸馏水调零。
 - 2、标准品：10mg还原型谷胱甘肽。临用前加入1mL蒸馏水，充分溶解，浓度为10mg/mL。
 - 3、标准品稀释：吸取10mg/mL标准品，用蒸馏水稀释至 300ug/mL、200ug/mL、100ug/mL、50ug/mL、25ug/mL。
- 1、在EP管按下表步骤加样：

序号	标准品体积 (ul)	蒸馏水体积 (ul)	稀释后浓度 (ug/mL)
1	30	970	300
2	500	250	200
3	200	200	100
4	200	200	50
5	200	200	25

- 2、操作步骤：（在1.5ml的EP管/96孔板加样内加入下列试剂。）

试剂名称 (ul)	测定管	标准管	空白管
样本	20		
标准品		20	
蒸馏水			20
试剂二	140	140	140
试剂三	40	40	40

混匀后常温静置 2min 后分别在412nm处测定，测定管、标准管和空白管的吸光度，分别记为A测定、A标准和A空白，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。标准曲线和空白管只需做1-2次。

三、计算方法：

1、标准曲线的绘制

据标准管的浓度(x, $\mu\text{g/mL}$)和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A(y, \Delta A)$ 带入公式计算样本浓度(x, $\mu\text{g/mL}$)。

2、GSSG 含量计算：

- (1)按蛋白浓度计算： $\text{GSH含量}(\mu\text{g/mg prot}) = X \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = X \div C_{\text{pr}}$
- (2)按样本质量计算： $\text{GSH含量}(\mu\text{g/g质量}) = X \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = X \div W$
- (3)按细胞/细菌数量计算： $\text{GSH含量}(\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = X \times V \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = X \div N$
- (4)按液体体积计算： $\text{GSH含量}(\mu\text{g/mL}) = 2x$

V样总：上清液总体积，1mL； V样：加入反应体系中上清液体积，20L=0.02mL；
W：样本质量，g； Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；
N：细胞/细菌数量，以10计； 2：血浆(血细胞)稀释一倍。

注意事项：

- 1、若不确定样本中 GSH 含量的高低，可稀释几个梯度后再进行测量。
- 2、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样云量或者稀释样本后再进行测定。
- 3、因为试剂一中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量，需另取组织。