

还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(DTNB 微板法)

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，常简称为 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)能可逆的转变成为氧化型谷胱甘肽(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 微板法)(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(酶标仪)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：

名称	编号	TO1036	Storage
试剂(A): GSH 标准(1mM)		100T	
试剂(A): GSH 标准(1mM)		1ml	-20°C 避光
试剂(B): GSH 提取液(3 \times)		50ml	RT 避光
试剂(C): GSH Assay Buffer		10ml	RT
试剂(D): DTNB		8mg	4°C
试剂(E): DTNB 稀释液		10ml	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、96 孔板、酶标仪

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: 取 5mlDTNB 稀释液, 将 8mg 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(μl)	管号					
	0	1	2	3	4	5
GSH 标准(100μM)	0	20	40	60	80	100
去离子水	100	80	60	40	20	0
GSH Assay Buffer	100	100	100	100	100	100
DTNB 显色液	50	50	50	50	50	50
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 0.5g 样品于研钵中, 加入 0.5~1ml 经 4℃预冷的 GSH 提取液(1×), 在冰浴条件下研磨匀浆后, 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, 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, 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, 离心 20min, 收集上清液, 用于 GSH 测定。对于处理好的样品通常需用蛋白沉淀工作液进行适当稀释后再进行测定, 稀释倍数通常为 5~

20 倍。

- 5、GSH 加样及检测：取 96 孔板，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。以空白孔调零，用酶标仪 412nm 测定各孔吸光度值。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(μl)	空白孔	空白对照孔	样品测定孔
去离子水	100	—	—
上清液	—	100	100
GSH Assay Buffer	100	100	100
DTNB 稀释液	—	50	—
DTNB 显色液	50	—	50

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)。

$$\text{组织细胞样品 GSH}(\mu\text{mol/g}) = C \times V_T \times N / W$$

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)

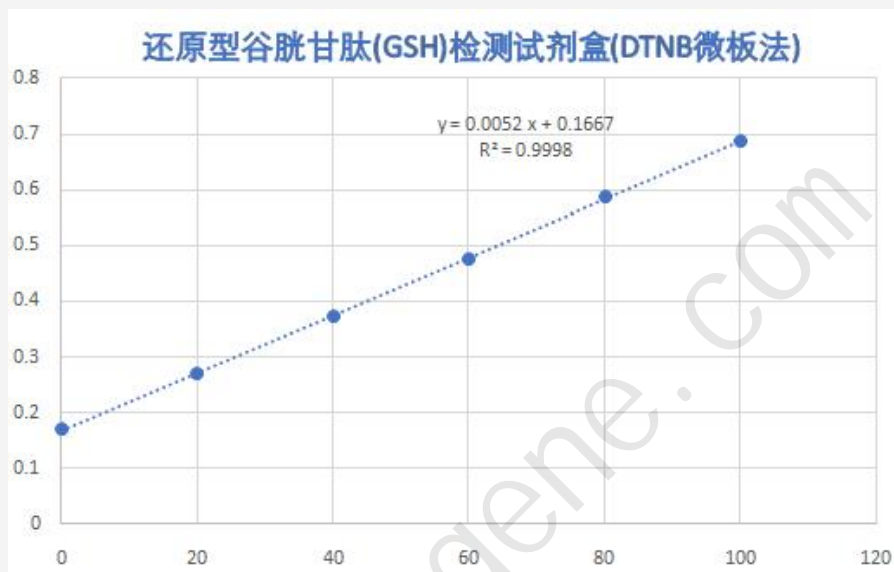
N=稀释倍数

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：Leagene 在室温条件下按说明书操作，系列 GSH 标准(0、20、40、60、80、100 μ mol/L)和 GSH Assay Buffer 各 1ml，再加入 0.5ml DTNB 显色液，混匀，25 $^{\circ}$ C保温反应 10min，分别抽取 280ul 于 96 孔板中，用酶标仪 420nm 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：



相关产品：

产品编号	产品名称
DC0032	Masson 三色染色液
DM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
DP0013	GUS 染色液(即用型)
NR0001	DEPC 处理水(0.1%)
PW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
TC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
TO1061	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素比色法)