

还原型谷胱甘肽含量(荧光法)试剂盒

规格：微量法 48样

检测原理：荧光法

编号：JLC_K14885

检测波长：390/490nm

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

谷胱甘肽 (Glutathione) 是一种生物体内广泛存在的含硫醇三肽化合物，参与多种重要的生理过程，可保护细胞免遭氧化损伤，解除药物代谢产物的毒性。谷胱甘肽在细胞中主要以还原型谷胱甘肽 (Reduced Glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (Oxidized Glutathione, GSSG) 两种形式存在。

测定原理

GSH可以与单氯二胺反应生成荧光物质，所测荧光值代入标准曲线可计算GSH含量。

需自备的仪器和用品

低温离心机、可调节移液器、和蒸馏水、pH试纸、荧光酶标仪（激发波长390nm，发射波长490nm）、恒温箱。

试剂组成和配制

生理盐水：液体60ml×1瓶，4℃保存。

酸性提取液：液体10ml×1瓶，4℃保存。

碱性提取液：液体10ml×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体60ml×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体×2支，-20℃避光保存。每支临用前加入1.2mL蒸馏水混匀。未使用完的试剂二可-20℃避光保存7天。

试剂三：粉剂×2支，-20℃避光保存。每支临用前加入1.2mL蒸馏水混匀。未使用完的试剂三可-20℃避光保存7天。

试剂四：液体×1支，-20℃避光保存。

标准品：粉剂×1瓶，-20℃避光保存。

黑色96孔酶标板×1

样本准备

血清、血浆样本：按照血清、血浆：酸性提取液（40:1）比例混合，立即涡旋混匀至少30s，4℃（或冰浴）静置5min。10000×g，离心10 min，取上清液加入碱性提取液调pH至7-9.5（取1μL样品用pH试纸进行检测）。

组织样本：按组织样本质量（g）：生理盐水（0.9%NaCl）体积（mL）=1：9的比例进行匀浆，例如，0.1g组织，加入0.9mL生理盐水。4℃，10000×g，离心10min，取上清，按照上清：酸性提取液=40:1的比例加入，立即涡旋混匀至少30s，4℃（或冰浴）静置5min。10000×g，离心10min，取上清液加入碱性提取液调pH至7-9.5（取1μL样品用pH试纸进行检测。）（小鼠肝脏组织推荐比例：上清液：碱性提取液=45:1，具体比例根据实际样本进行调节）

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200μL生理盐水（0.9%NaCl）进行匀浆，4℃，10000×g离心10min，取上清，按照上清：酸性提取液=40:1的比例加入，立即涡旋混匀至少30s，4℃（或冰浴）静置5min。10000×g，离心10min，取上清液加入碱性提取液调pH至7-9.5（取1μL样品用pH试纸进行检测）。

GSH测定操作

1. 荧光酶标仪预热30min，调节激发波长到390nm，发射波长490nm，蒸馏水调零。

2. 检测前所有试剂平衡至室温（25℃）。

3. T-GSH工作液的配制

将试剂一：试剂二：试剂三=3：1：1体积比混匀，避光待用，2h内有效。

4. GSH工作液的配制

将试剂一：试剂三=4：1体积比混匀，现配现用，避光待用，2h内使用有效。

5. 显色工作液的配制

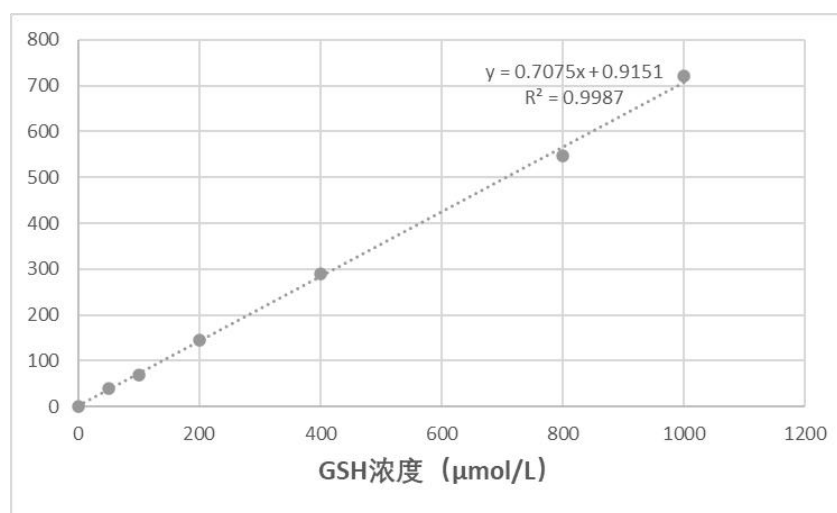
将试剂一：试剂四=100：1体积比混匀，避光待用，现配现用，2h内有效。

加样表

试剂名称	GSH测定管	空白管
样本 (μL)	10	-
试剂一 (μL)	-	10
T-GSH工作液 (μL)	-	50
GSH工作液 (μL)	50	-
37℃ 孵育10min		
显色工作液	100	100
振板5s, 37℃孵育20min, 荧光酶标仪设置激发波长390nm, 发射波长490nm, 测定各孔荧光值。ΔF=F测定管-F空白管。		

GSH含量计算公式

GSH标准曲线公式: $y = 0.7075x + 0.9151$, $R^2 = 0.9987$, x 为GSH浓度 $\mu\text{mol/L}$, y 为 ΔF 。



血清、血浆样本中GSH含量计算公式:

$$\text{GSH含量}(\mu\text{mol/L}) = (\Delta F + 0.9151) \div 0.7075 \times D$$

组织样本中GSH含量计算公式:

$$\text{GSH含量}(\mu\text{mol/g wet weight}) = (\Delta F + 0.9151) \div 0.7075 \times V \div m \div 1000 \times D$$

细胞样本中GSH含量计算公式:

$$\text{GSH含量}(\text{nmol}/10^6) = (\Delta F + 0.9151) \div 0.7075 \times V \div n \times 1000 \times D$$

ΔF : 样本测定孔荧光值: $F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$

V : 加入的生理盐水体积, mL

m : 样本质量, g

n: 细胞样本的个数/10⁶个

D: 样本稀释倍数

1000: 1L = 1000mL

附：标准曲线制作过程

1. 制备标准品母液（1000 μ mol/L）：从标准品管中称量取出1.54mg至一新5mL黑色瓶中，再加5mL试剂一混匀溶解即得1000 μ mol/L GSH。
2. 把1000 μ mol/L GSH用试剂一稀释成以下浓度梯度的标准品：0，50，100，200，400，600，800 μ mol/L也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据下列加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

试剂名称	标准管	空白管
标准品（ μ L）	10	-
试剂一（ μ L）	-	10
T-GSH工作液（ μ L）	50	50
37°C 孵育10min		
显色工作液	100	100
振板5s，37°C孵育20min，荧光酶标仪设置激发波长390nm，发射波长490nm，测定各孔荧光值。 $\Delta F = F_{\text{标准管}} - F_{\text{空白管}}$ 。		

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。