

还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒说明书

(货号: A006-1-1 比色法 100管/96样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测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、测定原理:

二硫代二硝基苯甲酸与巯基化合物反应时能产生一种黄色化合物, 可进行比色定量测定。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 甲粉×1 瓶, 乙液 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一应用液配制: 将 1 瓶甲粉加蒸馏水 172mL, 边搅拌边加热至沸腾, 使其完全溶解, 立即与 1 瓶乙液充分混合配成, 冷却至室温后使用 (此为过饱和溶液, 室温静置冷却后, 如有结晶, 则取上清进行实验, 室温保存, 可提前配制好)。

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存, 用时 1 瓶粉剂加到 200mL 蒸馏水中, 室温 (或可 37℃ 加热) 溶解, 可用赠送的塑料瓶配制, 室温保存 (可提前配制好)。

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存, 用时 1 支粉剂加到 50mL 蒸馏水中, 室温溶解, 避光 4℃ 保存。

试剂四: 粉剂×4 支, 4℃ 保存, 用时将 1 支粉剂加蒸馏水 10mL, 室温溶解, 避光冷藏可保存 5 天。

试剂五: GSH 标准品粉剂, 3.07mg/支×3 支, 4℃ 保存。测定前将一支 GSH 标准品粉剂用 1mL 蒸馏水溶解, 配成 10mmol/LGSH 标准液 (2℃~8℃ 可保存 15~20 天, -20℃ 保存时间更长, 避免反复冻融); 再取此 10mmol/LGSH 标准液 0.1mL 加蒸馏水 4.9mL (或按 1:49 比例配制) 配成 200μmol/LGSH 标准液 (做标曲时能用到), 不做标曲时, 只需将 200μmol/LGSH 标准液按 1:9 的比例加试剂一应用液稀释配成 20μmol/LGSH 标准液作显色反应标准液用。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (405~420nm) 及 96 孔板), 离心机, 涡旋混匀器, 蒸馏水, 电炉, 烧杯及玻璃棒, 蛋白测定试剂 (组织及细胞用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

血清 (浆): 直接取样 0.25mL, 加试剂一应用液 1mL (或按 1:4 的比例混合) 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

细胞培养液: 样本 1000 转/分, 离心 5 分钟后, 取上清 0.5mL, 加试剂一应用液 0.5mL (或按 1:1 的比例混合) 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

组织: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 0.5mL 加试剂一应用液 0.5mL (或按 1:1 的比例混合) 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。 (或者组织称重后直接加 9 倍体积的试剂一应用液, 冰水浴匀浆, 然后 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应)

细胞: 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好) 加入 0.5mL 的生理盐水 (或者 PBS), 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 取其中 0.45mL 加试剂一应用液 0.45mL (或按 1:1 的比例混合) 混匀 (剩余匀浆用 BCA 等试剂盒测定其蛋白浓度), 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。 (或者将生理盐水换成试剂一应用液, 破碎后, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液直接进行显色反应, 但这种方法需提前细胞计数才行)

全血: 取 0.1mL 肝素抗凝全血加蒸馏水 0.9mL, 充分混匀,

直至透亮为止, 此为溶血液; 再取此溶血液 0.25mL, 加试剂一应用液 1mL (或按 1:4 的比例混合) 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行显色反应。

注: 以上取得的上清假如还是比较浑浊 (或高脂), 可在上清中加入 0.2mL 氯仿 (三氯甲烷), 涡旋混匀 60 秒后, 再离心取上清做显色反应。

2、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
试剂一应用液 (mL)	0.8		
20μmol/LGSH 标准液 (mL)		0.8	
上清液 (mL)			0.8
试剂二 (mL)	1	1	1
试剂三 (mL)	0.2	0.2	0.2
试剂四 (mL)	0.04	0.04	0.04

混匀, 静置 5 分钟, 420nm (405~420nm) 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A (或是每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 420nm 处读数)。

3、计算方式:

①、按单浓度标准计算:

$$\text{液体样本 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N$$

mgGSH/L

组织或细胞用生理盐水或 PBS 匀浆按蛋白浓度计算:

$$\text{GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div \text{Cpr}$$

mgGSH/g 蛋白

组织用试剂一应用液匀浆按重量计算:

$$\text{组织中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

mgGSH/g 组织

细胞用试剂一应用液匀浆按细胞数计算:

$$\text{细胞中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

mgGSH/万个细胞

全血除了按液体样本计算还可以按下公式计算:

$$\text{全血中 GSH 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 307 \times N \div C_{\text{Hb}}$$

gGSH/gHb

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 20×10⁻³ (0.02) mmol/L;

307: GSH 相对分子质量, 307g/mol (mg/mmol);

N: 样本显色反应前稀释倍数, (等于) 上清液制备时稀释倍数, 血清 (浆) 为 5, 细胞培养液、组织、细胞均为 2, 全血为 50。 (若是在此基础上还有稀释 (不包括匀浆破碎操作), 稀释倍数也要算进去)

Cpr: 匀浆上清蛋白浓度, g/L;

W: 组织样本质量, g;

V_{样总}: 组织或细胞用试剂一应用液匀浆 (或破碎) 时样本的总体积 (约等于加入的试剂一应用液的总体积), mL;

细胞总数: 收取的细胞的数量 (在加入试剂一应用液前就需计数), 万个;

C_{Hb}: 全血中血红蛋白浓度, gHb/L。

注: 若需制作标准曲线, 则计算时可用测定孔吸光值减去空白孔吸光值后的绝对吸光值代入标曲计算, 得到的值, 代替

以上公式的 $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}}$ 进行计算即可得最终结果。

②、标准曲线制作:

取 200μmol/L GSH 标准溶液, 按下表进行稀释:

稀释管	1	2	3	4	5	6
200 μ mol/L 标准溶液(μ L)	0	100	200	300	400	500
蒸馏水(μ L)	1000	900	800	700	600	500
标准品浓度(μ mol/L)	0	20	40	60	80	100

将稀释后的 GSH 标准液按操作表标准管操作，空白管调零，420 nm 处，1cm 光径，测定各管吸光度值，以标准品浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，做标准曲线，将测定管的吸光度值减去空白管吸光度值后代入标曲计算。

六、注意事项：

- 1、血液中的 GSH 几乎全部存在于红细胞内，可以用每升全血中 GSH 的克数来表示，也可用每克 Hb 中 GSH 的含量来表示。
- 2、吸取上清作显色反应时，注意避开沉淀及表面脂质，若是不好吸或脂质含量较高影响上清吸取，可考虑在加完试剂一应用液后再加入 0.2~0.5mL 的三氯甲烷，涡旋混匀 1 分钟后，再去离心，此时上清就会澄清透亮了（而此时计算公式不变（三氯甲烷是有机溶剂，与水溶液不互溶，所以不影响反应体系的体积）。
- 3、最好每批试验做 2 个标准管、空白管，以减少操作误差。
- 4、组织中 GSH 相关酶(如 GSH-PX)浓度较高(特别是一些大小鼠等动物的肝脏)时,样本匀浆后需尽快测定 GSH 含量,否则可能会因为样本内部的酶分解反应,导致 GSH 测得值过低;如果样本量充足,可以考虑将样本直接用试剂一应用液来匀浆,效果会比较好。

五、测定意义：

谷胱甘肽 (GSH) 是一种低分子清除剂，它可清除 O_2^- 、 H_2O_2 、 $LOOH$ 。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 GST 两种酶类的底物，为这二种酶分解氢过氧化物所必需，它并且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，最近还证明 GSH 也参与使维生素 E 恢复到还原态的作用，缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用或加重其中毒作用，这可能与增加氧化损伤有关，因而 GSH 的量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。