

氧化型谷胱甘肽含量(荧光法)试剂盒

规格：微量法 48 样

检测原理：荧光法

编号：ml301003

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，加入还原试剂后，GSSG 被还原成 GSH，从而测定样本中总的谷胱甘肽含量。总的谷胱甘肽含量减去 GSH 含量即为 GSSG 含量。

自备仪器和用品：

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

试剂的组成和配制：

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°C (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-

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°C) 。

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

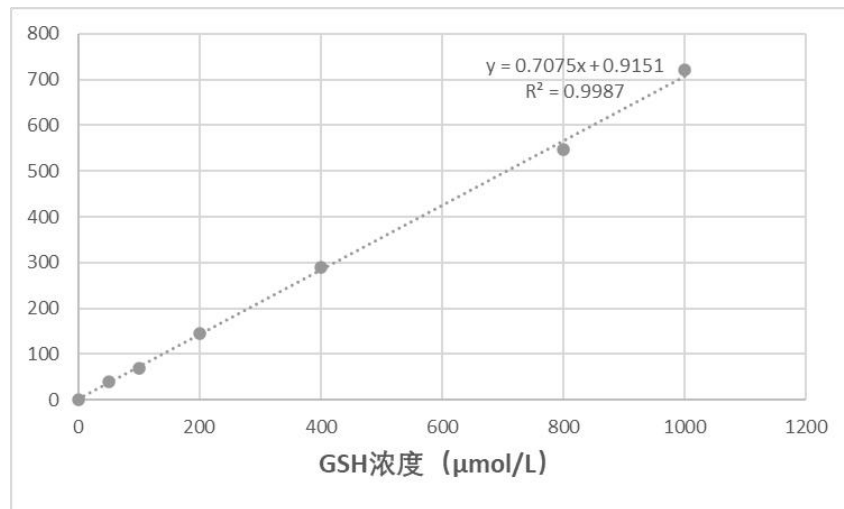
将试剂一: 试剂四=100: 1 体积比混匀, 避光待用, 现配现用, 2h 内有效。9.5 (取 1μL 样品用 pH 试纸进行检测) 。

加样表:

试剂名称	T-GSH 测定管	GSH 测定管	空白管
样本 (μL)	10	10	-
试剂一 (μL)	-	-	10
T-GSH 工作液 (μL)	50	-	50
GSH 工作液 (μL)	-	50	-
37°C 孵育 10min			
显色工作液	100	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。ΔF=F 测定管-F 空白管。			

TGSH 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 μmol/L, y 为 ΔF。



血清、血浆样本中 T-GSH 或 GSH 含量计算公式：

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

组织样本中 T-GSH 或 GSH 含量计算公式：

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

细胞样本中 T-GSH 或 GSH 含量计算公式：

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

注：氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量=(T-GSH 含量-GSH 含量)/2 (GSSG 在还原试剂作用下转化成 2×GSH) 。

ΔF ：样本测定孔荧光值：F 测定-F 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/ 10^6 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最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。