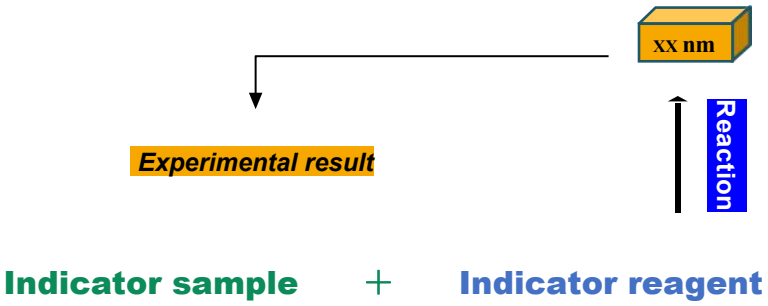
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0602　　规格：50管/48样

还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒说明书
可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	-
标准品	粉剂 10mg×1 支	4℃避光保存	-

产品说明：

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。谷胱甘肽能和 5,5’- 二硫代-双-（2-硝基苯甲酸）（5,5’-dithiobis-2-nitrobenoic acid，DTNB）反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸和谷胱甘肽二硫化物（GSSG）。2-硝基-5-巯基苯甲酸为黄色产物，在波长 412nm 处具有最大光吸收。

自备仪器和用品：

分析天平、微量匀浆器（规格 2mL）、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计，1mL 玻璃比色皿。

一、样品的处理

1、组织处理：

新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次，然后称取动物组织或者植物组织 0.1g。加入用试剂一润洗过的匀浆器中（匀浆器提前放冰上预冷）；然后加入 1mL 试剂一（组织/试剂一比例保持不变即可），迅速冰上充分研磨（使用液氮研磨效果更好）；8000g 4℃离心 10min；取上清液放置于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

2、血液处理

血浆：将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10 分钟，吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的试剂一，4℃，8000g 离心 10 分钟，将上清移入新的试管中放置于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

血细胞：将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10 分钟，弃去上层血浆用 3 倍体积的 PBS 清洗 3 次（用 PBS 重悬血细胞，600g 离心 10 分钟），加入等体积试剂一，混匀后 4℃放置 10 分钟，8000g 离心 10 分钟，吸取上清放于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

3、细胞处理

收集不少于 10^6 个细胞，首先用 PBS 清洗细胞 2 次（PBS 重悬细胞，600g 离心 10 分钟），加入 3 倍细胞沉淀体积的试剂一重悬细胞，反复冻融 2-3 次（可在液氮中冻结，37℃水浴中溶解），8000g 离心 10 分钟，收集上清于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

二、操作步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，分光光度计调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2、试剂二放置 37℃（哺乳动物）或 25℃（一般物种）水浴中保温 30min。

3、空白管检测：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100μL 蒸馏水，700μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀，放置 2min 后测定 412nm 吸光度 A1。

4、制作标准曲线

称 1mg 标准品用 1mL 蒸馏水溶解，浓度为 1mg/mL。取适当溶液配制浓度为 200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL 的标准品（试剂一十倍稀释后进行稀释）。取 1.5mLEP 管依次加入 100μL 标准品，700μL 试剂二，200μL 试剂三，每管混匀后静置 2min，检测 412nm 处吸光度，吸光度减去空白孔（A1）为横坐标，根据吸光度（x）和浓度（y，μg/mL） 做出标准曲线。

5、样品管测定：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100μL 样品，700μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀后静置 2min 检测 412nm 处吸光度 A2，△A= A2- A1。

三、GSH 含量计算

根据标准曲线，将样品△A 带入公式中（x），计算出样品浓度 y（μg/mL）。

a. 按蛋白浓度计算

GSH（μg / mg prot）=y×V 样÷V 样÷Cpr =y÷Cpr

b. 按样本质量计算

GSH（μg /g）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×W)= y ÷W

c. 按细胞数量计算

GSH（μg /10^4 cell）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×细胞数量)= y ÷细胞数量

d. 按液体体积计算

GSH（μg / mL）= 2y

V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，100μL=0.1 mL；W：样品质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量：以 10^6 为单位计量；2：血浆（血细胞） 体积被稀释一倍。

注意事项：

1、样品处理需匀浆完全，若当天不能完成测量，可放-80℃保存。

2、标准品：还原型谷胱甘肽现配现用。

3、若不确定样品中 GSH 含量的高低，可稀释几个梯度后再进行测量。

4、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。