还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(DTNB 微板法)

产品编号：MA1513　　规格：100T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1513-1 100T	保存条件	有效期	运输条件
GSH 标准(1mM)	1mL	-20℃，避光	自生产之日起 6 个月	湿冰运输
GSH 提取液(3×)	50mL	RT，避光		
GSH Assay Buffer	10mL	RT		
DTNB	8mg	2-8℃		
DTNB 稀释液	10mL	RT		
说明书	1 份			

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，常简写为 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中广泛应用。谷胱甘肽是研究活性氧和自由基的重要指标，亦是机体氧化损伤的重要指标。还原型谷胱甘肽(GSH)能可逆的转变为氧化型谷胱甘肽(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)(GSH 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，通过酶标仪(分光光度法)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。

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

使用方法(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，即为 GSH 提取液(1×)。

2.**配制 DTNB 显色液：**取 5mL DTNB 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 0.16%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.样品制备：

① 组织样本：

(a) 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。

(b) 12000rpm，4℃离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；

(b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；

(c) 12000rpm，4℃离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】若增加样本量，可按照每 $0.5\sim1\times10^7$ 个细菌或细胞加入 1mL 提取液体积的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

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 10min。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

6. 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)。

组织细胞样品 GSH(μmol/g)=C×V_T×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 2-8℃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. 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
10. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用