



谷胱甘肽(GSH)含量检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器有限公司	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC

2、主要实验耗材

耗材	品牌	货号
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
5ml 离心管	科兔生物	KTL-50-P
50ml 尖底离心管	科兔生物	KTL-500-P
200μL 吸头	科兔生物	KTX-H200-W
1000μL 吸头	科兔生物	KTX-H1000-W
1250μL 吸头	科兔生物	KTX-H1200-W
单道移液枪 2-20μL	科兔生物	KTY-20
单道移液枪 5-50μL	科兔生物	KTY-50
单道移液枪 10-100μL	科兔生物	KTY-100
单道移液枪 20-200μL	科兔生物	KTY-200
单道移液枪 100-1000μL	科兔生物	KTY-1000



二、实验步骤

试剂盒：谷胱甘肽(GSH)定量检测试剂盒

货号：m1063305M

1. 样本处理：

用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 $5000\times g$ 离心 5-10 分钟，取上清检测。

2. 试剂准备

(1) 使用前将所有试剂置于室温平衡 30 分钟左右。

(2) 洗涤液/稀释液配置：如果洗涤液/稀释液 ($20\times$) 有晶体析出，需在 37°C 下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释 (例如：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水)。

(3) 标准品配置：试剂盒中取出标准品，准备 7 个试管，先从 200ng/mL 标准品 (200uL) 按需吸取一定量用 $1\times$ 稀释液稀释 10ng/mL (例：50uL 的标准品母液+950uL 的 $1\times$ 稀释液，制备得到 1000 μL 的 10ng/mL 浓度标准品)，随后在 6 个试管中分别加入 500 μL 的 $1\times$ 稀释液，在这 6 个单独的试管中 10ng/mL 标准品依次 2 倍倍比稀释至 6 个梯度，共配制 7 个浓度的标准品，依次为：10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.312ng/mL、0.156ng/mL、从最高浓度标准品溶液中吸取 500 μL 标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释， $1\times$ 稀释液用作零浓度标准品 (0ng/mL)。

(4) 抗体工作液配置：使用前 10 分钟，用 $1\times$ 稀释液将 $100\times$ 生物素化抗体稀释成 $1\times$ 生物素化抗体工作液，根据所需用量配置。

(5) 酶结合物工作液配置：使用前 10 分钟，用 $1\times$ 稀释液将 $100\times$ SA-HRP 稀释成 $1\times$ SA-HRP 工作液，根据所需用量配置。

备注：如待测样本中 GSH 浓度高于标准品最高值，请根据实际情况选择适当的稀释倍数 (建议：将待测样本用样品稀释液最低稀释 1 倍，在正式实验之前做预实验，以确定具体稀释倍数)；标准品母液、 $100\times$ 生物素化抗体溶液及 $100\times$ SA-HRP 溶液请根据实验所需酶标板孔数吸取一定量配置工作液，剩余溶液应放回 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存。

3. 实验流程

(1) 酶标板准备：确定试验所需要的孔数，取下未使用的酶标条放回装有干燥剂的铝箔袋。



(2) 样本孵育：每孔分别加入 100 μ L 不同浓度的标准品以及预处理过的待测样品，盖上封板胶纸，37℃避光反应 1.5h。孵育结束后，每孔加入 300 μ L 1×洗涤缓冲液，轻轻晃动 30 秒，甩干并在纸上拍干，以这种方式清洗 3 次。

(3) 抗体孵育：每孔加入 100 μ L 生物素化抗体工作液，轻轻混匀，盖上封板胶纸，37℃避光反应 1h。孵育结束后，重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次。

(4) 酶标孵育：每孔加入 100 μ L 1×SA-HRP 工作液，盖上封板胶纸，37℃避光反应 30 分钟，清洗 4 次，拍干。

(5) 底物显色：每孔首先加入 50 μ L 显色液 A，随后加入 50 μ L 显色液 B，轻轻混匀，盖上封板胶纸，37℃避光反应 15 分钟。（根据样品和对照抗体的颜色，自行控制显色时间）。

(6) 终止反应：待显色反应结束后，每孔加入 50 μ L 终止液，轻轻混匀，5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

4. 结果计算

计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线（作图时去掉空白组的值）。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

计算出各样本 GSH 含量，以 EXCLE 表发送结果。