

# 还原型谷胱甘肽(GSH) 含量检测试剂盒说明书

## 微量法

货号：AM0111

### 产品规格

100T/96S

### 产品内容

使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 18 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4°C避光保存

**注意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

### 产品简介

GSH 是细胞内最主要的抗氧化巯基物质，在抗氧化、蛋白质巯基保护和氨基酸跨膜运输等中具有重要作用。还原型与氧化型比值（GSH/GSSG）是细胞氧化还原状态的主要动态指标。因此，测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量以及 GSH/GSSG 比值，能够很好地反映细胞所处的氧化还原状态。

### 测定原理：

DTNB 与 GSH 反应生成复合物，在 412nm 处有特征吸收峰；其吸光度与 GSH 含量成正比。

### 自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ $10^4$  个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

### GSH 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）水浴中保温 30min。

3. 空白管：取微量玻璃比色皿或 96 孔板，依次加入 20 $\mu$ L 蒸馏水，140 $\mu$ L 试剂二，40 $\mu$ L 试剂三，混匀静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A1。

4. 测定管：取微量玻璃比色皿或 96 孔板，依次加入 20 $\mu$ L 上清液，140 $\mu$ L 试剂二，40 $\mu$ L 试剂三，混匀静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A2。

注意：空白管只需要测定一次。

### GSH 含量计算公式：

GSH 标准曲线公式： $y=1.5x$ （x 为 GSH 浓度， $\mu$  mol/mL；y 为吸光值）

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mg prot}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div \text{Cpr} = 6.67 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/g}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 6.67 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol} / 10^4 \text{ cell}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = 6.67 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mL}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 6.67 \times (A2 - A1)$$

V 反总：反应总体积，0.2mL； 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，20 $\mu$ L=0.02 mL； Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

GSH 标准曲线公式： $y=0.75x$ （x 为 GSH 浓度， $\mu$  mol/mL；y 为吸光值）

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mg prot}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div \text{Cpr} = 13.34 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/g}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 13.34 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol} / 10^4 \text{ cell}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = 13.34 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mL}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 6.67 \times (A2 - A1)$$

V 反总：反应总体积，0.2mL； V 样总：上清液总体积，1mL； V 样：加入反应体系中上清液体积，20 $\mu$ L=0.02 mL； Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量

### 注意事项：

1. 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。
2. 最低检出限为 1mmol/L。