

## 还原型谷胱甘肽 ( reduced glutathione, GSH ) 试剂盒说明书

### 微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义：

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。

#### 组成：

产品名称	GSH002-100T/96S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	4℃
试剂二：液体	1 瓶	4℃
试剂三：液体	1 瓶	4℃避光
说明书	一份	

#### 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。

#### 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℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个)：试剂一体积 (ml) 为 500~1000：1 的比例（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℃，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℃（一般物种）或者 37℃（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

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mg prot}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) = 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/g 鲜重}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) = 0.667 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol} / 10^4 \text{ cell}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量}) = 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ ml}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} = 0.667 \times (A2 - A1)$$

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

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

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ mg prot}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \div \text{Cpr} = 1.334 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/g 鲜重}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) = 1.334 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol} / 10^4 \text{ cell}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量}) = 1.334 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSH } (\mu \text{ mol/ ml}) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} = 1.334 \times (A2 - A1)$$

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，g。

### 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 0.011mmol/L。