

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

（微板法 96 样）

## 一、产品简介：

还原型谷胱甘肽 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。

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

## 二、试剂盒组分与配制：

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求 | 备注                        |
|------|--------------|------|---------------------------|
| 提取液  | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃保存 |                           |
| 试剂一  | 液体 28mL×1 瓶  | 4℃保存 |                           |
| 试剂二  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃保存 | 若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支    | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。            |

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、蒸馏水。

## 四、还原型谷胱甘肽（GSH）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

## 1、样本制备

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：① 根据实验室条件，可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆。

② 根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$  个）：提取液（mL）为 500~1000：1 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。

## 2、上机检测

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm。

② 所有试剂在使用前需在 25℃水浴中保温 10min。在 96 孔板中依次加入：

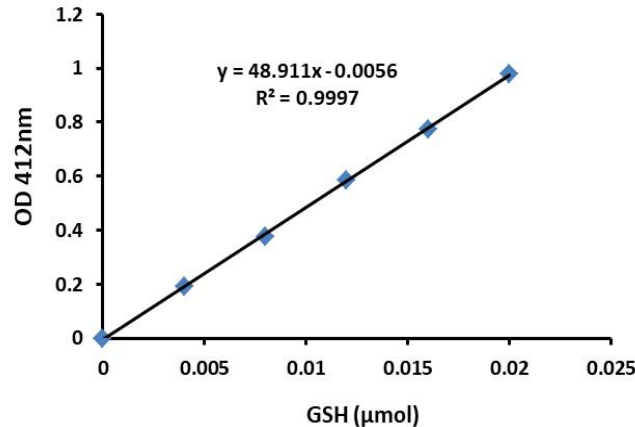
| 试剂名称（ $\mu$ L）                                                                       | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                   | 20  | 20  |
| 试剂一                                                                                  | 120 | 160 |
| 试剂二                                                                                  | 40  |     |
| 立即混匀，静置 5min 后，在 412nm 波长下读取吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。 |     |     |

【注】1. 若是同一批样本检测，样本对照管做一个即可。

2. 若 $\Delta A$  值在零附近徘徊，可以增加样本取样质量（如增至 0.2g）或加大上样量（如增至 60 $\mu$ L，试剂一相应减少）。

## 五、结果计算：

- 1、标准曲线为  $y = 48.911x - 0.0056$ ； $x$  为标准品摩尔质量（ $\mu$ mol）， $y$  为 $\Delta A$ 。



- 2、按蛋白浓度计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div \text{Cpr}$$

- 3、按样本鲜重计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (W \times V1 \div V) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div W$$

- 4、按细胞数量计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (500 \times V1 \div V) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div 500$$

- 5、按液体体积计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div V1 = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056)$$

V---上清液总体积，1mL； V1---加入反应体系中上清液体积，20 $\mu$ L=0.02 mL；

W---样品质量，g； 500---细菌/细胞数量，万； GSH 分子量---307.3；

Cpr---蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量检测试剂盒。

**注意事项：** 上清液不能用于蛋白质浓度测定。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10 $\mu$ mol/mL）：标准品溶于 4mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。