

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

微量法 100T/96S

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。

### 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。

### 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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体×1瓶，4℃避光保存。

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（ $10^4$ 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20μL蒸馏水，140μL试剂二，40μL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20μL上清液，140μL试剂二，40μL试剂三，混匀静置2min后测定412 nm吸光度A2。

还原型谷胱甘肽（reduced glutathione, GSH）试剂盒说明书注意：空白管只需要测定一次。

GSH含量计算公式：

GSH标准曲线公式： $y=1.5 \times x$ （x为GSH浓度， $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(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, 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,  $\mu\text{ mol/mL}$ ; 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

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

(3) 按细胞数量计算

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

(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。