

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

分光光度法 50 管/48 样

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	50T/48S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	4°C
试剂二：液体	1 瓶	4°C
试剂三：液体	1 瓶	4°C避光
说明书	一份	

自备仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

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。8000xg，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 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 8000xg，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 1ml 玻璃比色皿，依次加入 **100μl 蒸馏水**，700μl 试剂二，200μl 试剂三，混匀静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A1。

4. 测定管：取 1ml 玻璃比色皿，依次加入 **100μl 上清液**，700μl 试剂二，200μl 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， $\mu\text{mol/ml}$ ；y 为吸光值)

GSH 计算：

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(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

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

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，100μl=0.1 ml；W：样品质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/ml；

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 0.01mmol/L。