

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

(货号: BP10460F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 若凝固, 可在 25℃水浴温育片刻至全部融解后使用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

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、检测步骤

① 分光光度计预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂在使用前需在 25℃水浴中保温 10min。

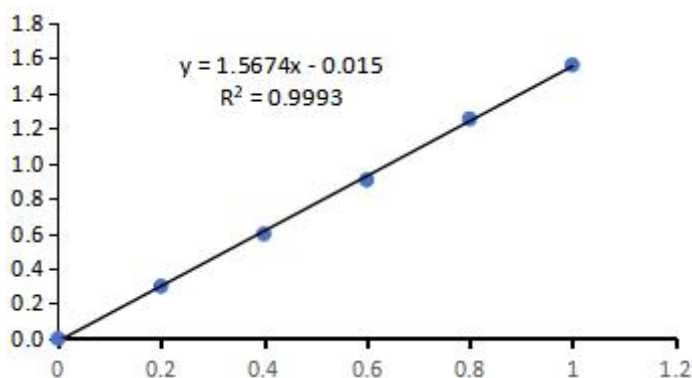
③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	480	640
试剂二	160	
立即混匀，静置5min后，在412nm波长下读取吸光值A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

- 【注】1. 若是同一批样本检测，样本对照管做一个即可。
2. 若 ΔA 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 160μL，试剂一相应减少）。

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y = 1.5674x - 0.015$ ；x 为标准品浓度（μmol/mL），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.015) \div 1.5674 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 0.638 \times (\Delta A + 0.015) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.015) \div 1.5674 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) = 0.638 \times (\Delta A + 0.015) \div W$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0049) \div 1.5674 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) = 0.638 \times (\Delta A + 0.015) \div 500$$

5、按液体体积计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.015) \div 1.5674 \times V_1] \div V_1 = 0.638 \times (\Delta A + 0.015)$$

V---上清液总体积，1mL； V1---加入反应体系中上清液体积，80μL=0.08 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：

- 标准品溶于 2mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 1μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μmol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂一	480	480
试剂二	160	160
立即混匀，静置 5min 后，在 412nm 波长下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		