

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

（货号：BP10460W-196 微板法 196 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	注意事项
提取液	液体 200mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 56mL×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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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（10⁴ 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 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：

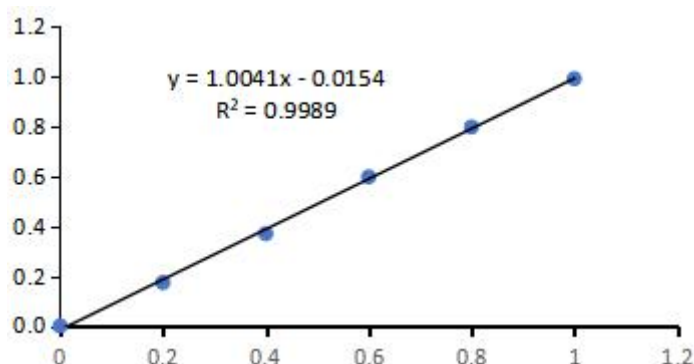
试剂组分（μL）	测定管	对照管
----------	-----	-----

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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

- 【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 60 μ L，试剂一相应减少）。

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y = 1.0041x - 0.0154$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0154) \div 1.0041 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 0.996 \times (\Delta A + 0.0154) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0154) \div 1.0041 \times V1] \div (W \times V1 \div V) = 0.996 \times (\Delta A + 0.0154) \div W$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0154) \div 1.0041 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) = 0.996 \times (\Delta A + 0.0154) \div 500$$

5、按液体体积计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0154) \div 1.0041 \times V1] \div V1 = 0.996 \times (\Delta A + 0.0154)$$

V---上清液总体积，1mL； V1---加入反应体系中上清液体积，20 μ 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 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 1 $\mu\text{mol/mL}$ 。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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
------	---	-----	-----	-----	-----	---

$\mu\text{mol/mL}$						
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	20	
蒸馏水		20
试剂一	120	120
试剂二	40	40
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。		