

## 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。

**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， $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

$GSH (\mu mol / mL) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{样} \div V_{样} = 0.667 \times (A2 - A1)$

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， $\mu mol / mL$ ；y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

$GSH (\mu mol / mg prot) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{样} \div V_{样} \div Cpr = 1.334 \times (A2 - A1) \div Cpr$

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

$GSH (\mu mol / mL) = (A2 - A1) \div 0.75 \times V_{反总} \div V_{样} = 1.334 \times (A2 - A1)$

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。