

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

(货号: G0206W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|-------|-----------------------------|
| 提取液 | 液体 100mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 28mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 4mL×1 瓶 | 4°C保存 | 若凝固, 可在 25°C水浴温育片刻至全部融解后使用。 |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4°C保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、蒸馏水。

四、还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

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°C×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°C×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、上机检测

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm。

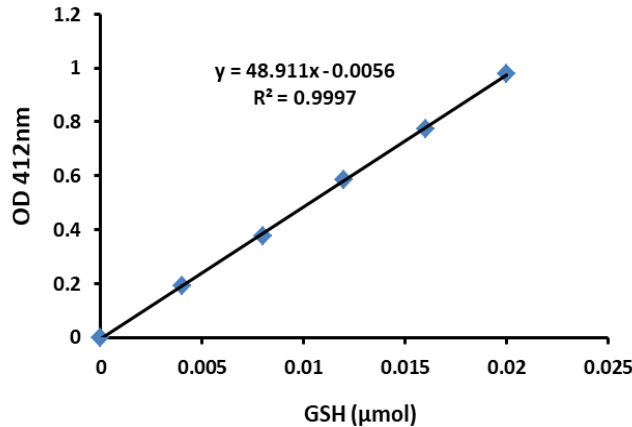
② 所有试剂在使用前需在 25°C水浴中保温 10min。在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (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,
 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y = 48.911x - 0.0056$ ；x 为标准品摩尔质量 (μmol)，y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (W \times V1 \div V) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div W$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div (500 \times V1 \div V) = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056) \div 500$$

5、按液体体积计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 48.911] \div V1 = 1.022 \times (\Delta A + 0.0056)$$

V---上清液总体积，1mL； V1---加入反应体系中上清液体积，20 μL =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 制备标准品母液（10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：标准品溶于 4mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。