

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 100ml×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 18ml×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 5ml×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， $\mu\text{mol/mL}$ ； 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

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

(2) 按样本质量计算

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

(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

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

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 μL =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， $\mu\text{mol/mL}$ ； y 为吸光值）

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

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

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 μL =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。