

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

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	GSH002-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	1 瓶	4°C
试剂二: 液体	1 瓶	4°C
试剂三: 液体	1 瓶	4°C避光
说明书	一份	

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。

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°C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°C, 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°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 水浴中保温 30min。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



3. 空白管：取微量玻璃比色皿或 96 孔板，依次加入 20 μ l 蒸馏水，140 μ l 试剂二，40 μ l 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 20 μ l 上清液，140 μ l 试剂二，40 μ l 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， μ 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 μ 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， μ 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 μ 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。

