

## 还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 含量试剂盒说明书 (货号: G0206F 分光法 48 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  |                |
|------|-------------|-------|----------------|
| 提取液  | 液体 50mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                |
| 试剂一  | 液体 24mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                |
| 试剂二  | 液体 8mL×1 瓶  | 4℃ 保存 |                |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂 |

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调节移液器

### 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℃×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, 可按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取

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 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂在使用前需在 25℃ 水浴中保温 10min。

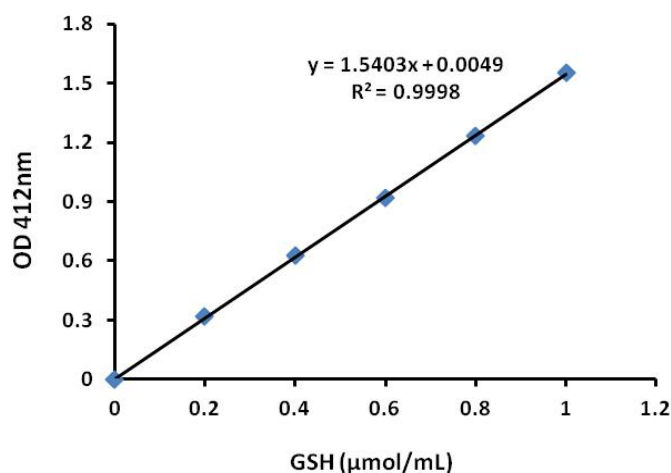
③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                              | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|----------------------------------------|-----|------------|
| 样本                                     | 80  |            |
| 蒸馏水                                    |     | 80         |
| 试剂一                                    | 480 | 480        |
| 试剂二                                    | 160 | 160        |
| 立即混匀, 静置 2min 后, 在 412nm 波长下分别读取吸光值 A, |     |            |

$$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}。$$

## 五、结果计算：

1、标准曲线为  $y = 1.5403x + 0.0049$ ；x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 为  $\Delta A$ 。



2. 按蛋白浓度计算

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/ mg prot}) = [(\Delta A - 0.0049) \div 1.5403 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 0.65 \times (\Delta A - 0.0049) \div \text{Cpr}$$

3. 按样本鲜重计算

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0049) \div 1.5403 \times V1] \div (W \times V1 \div V) = 0.65 \times (\Delta A - 0.0049) \div W$$

4. 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{GSH } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0049) \div 1.5403 \times V1] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 0.65 \times (\Delta A - 0.0049) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5. 按液体体积计算

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/ mL}) = [(\Delta A - 0.0049) \div 1.5403 \times V1] \div V1 = 0.65 \times (\Delta A - 0.0049)$$

V----上清液总体积，1mL； V1----加入反应体系中上清液体积，80 $\mu\text{L}$ =0.08 mL；

W----样品质量，g；

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 ( $1\mu\text{mol/mL}$ )：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.  $\mu\text{mol/mL}$ 。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。