

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 (10⁴ 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，μmol/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

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

(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

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/10^4\text{ cell}) = (A_2 - A_1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = 0.667 \times (A_2 - A_1) \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (A_2 - A_1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = 0.667 \times (A_2 - A_1)$

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, $\mu\text{mol}/\text{mL}$; y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = (A_2 - A_1) \div 0.75 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div \text{Cpr} = 1.334 \times (A_2 - A_1) \div \text{Cpr}$

(2) 按样本鲜重计算

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = (A_2 - A_1) \div 0.75 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 1.334 \times (A_2 - A_1) \div W$

(3) 按细胞数量计算

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/10^4\text{ cell}) = (A_2 - A_1) \div 0.75 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = 1.334 \times (A_2 - A_1) \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (A_2 - A_1) \div 0.75 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 1.334 \times (A_2 - A_1)$

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。