

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0329

Size: 100T/96S

还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 18mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4°C 避光保存	

五、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。

六、GSH 测定操作：

- (1) 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 412 nm。
- (2) 试剂二置于 37°C 水浴中预热 10min。
- (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。

七、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)

- 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

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

$$= 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

(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

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

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 =0.02mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量

- 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

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(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

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

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。

八、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。

