

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-S0602

Size: 50T/48S

还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*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:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

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 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 42mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 12mL × 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℃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。

六、GSH 测定操作：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃ 中预热 10min。
3. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μ L 蒸馏水，700 μ L 试剂二，200 μ L 试剂三，混匀，静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A1。
4. 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μ L 上清液，700 μ L 试剂二，200 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。

六、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)

● GSH 计算：

(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) 按样本鲜重计算

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

(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

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

$V_{\text{样总}}$: 上清液总体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 100 μL =0.1mL; W : 样品质量, g; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL;

七、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 0.01mmol/L。