

还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（分光光度法）

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 60ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 42ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 12ml×1 瓶，4℃ 避光保存。

粗酶液提取：

- 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。
- 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。
- 血清等液体：**直接测定。

GSH 测定步骤：

- 分光光度计预热 30min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
- 试剂二置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴中保温 30min。
- 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 **100μL 蒸馏水**，700μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A1。
- 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 **100μL 上清液**，700μL 试剂二，200μL 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, $\mu\text{mol}/\text{mL}$; y 为吸光值)

GSH 计算:

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{GSH } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

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, $100\mu\text{L}=0.1\text{ mL}$;

W: 样品质量, g ;

Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL ;

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 $0.01\text{mmol}/\text{L}$ 。