

还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

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 100ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 18ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5ml×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/酶标仪预热 30min，调节波长到 412 nm。
- 试剂二置于 37℃ 水浴中预热 10min。
- 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。
- 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, $\mu\text{mol/mL}$; 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

$$\begin{aligned}\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (A_2 - A_1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.667 \times (A_2 - A_1) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= (A_2 - A_1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.667 \times (A_2 - A_1) \div W\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

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

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, $\mu\text{mol/mL}$; y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本鲜重计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

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

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。

GSH 测定步骤:

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 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℃ 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 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。**