北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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 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：

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。

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。

GSH 含量计算公式：

GSH 标准曲线公式：y=1.5 x（x 为 GSH 浓度，μ 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

GSH（μ mol/ mg prot）=(A2－A1) ÷1.5×V 样÷（V 样×Cpr） =0.667×(A2－A1) ÷Cpr

（2）按样本质量计算

GSH（μ mol/g 鲜重）=(A2－A1) ÷1.5×V 样÷(V 样÷V 样总×W)=0.667×(A2－A1) ÷W

（3）按细胞数量计算

GSH（μ mol /10^4 cell）=(A2－A1) ÷1.5×V 样÷(V 样÷V 样总×细胞数量)=0.667×(A2－A1) ÷细胞数量

（4）按液体体积计算

GSH（μ mol/ mL）=(A2－A1) ÷1.5×V 样÷V 样 =0.667×(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，20μL=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，μ mol /mL；y 为吸光值）

（1）按蛋白浓度计算

GSH（μ mol/ mg prot）=(A2－A1) ÷0.75×V 样÷V 样÷Cpr =1.334×(A2－A1) ÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

GSH（μ mol/g 鲜重）=(A2－A1) ÷0.75×V 样÷(V 样÷V 样总×W)=1.334×(A2－A1) ÷W

（3）按细胞数量计算

GSH（μ mol /10^4 cell）=(A2－A1) ÷0.75×V 样÷(V 样÷V 样总×细胞数量)=1.334×(A2－A1) ÷细胞数量

（4）按液体体积计算

GSH（μ mol/ mL）=(A2－A1) ÷0.75×V 反总÷V 样 =1.334×(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，20μL=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。

