

还原型谷胱甘肽（reduced glutathione, GSH）含量试剂盒说明书 （微板法 96 样）

一、产品简介：

还原型谷胱甘肽 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。

还原型谷胱甘肽 GSH 与 DTNB 与反应生成复合物，在 412nm 处有特征吸收峰；其吸光度与 GSH 含量成正比。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 28mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	若凝固，可在 25℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、蒸馏水。

四、还原型谷胱甘肽（GSH）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：① 根据实验室条件，可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆

② 根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm。

② 所有试剂在使用前需在 25℃ 水浴中保温 10min。

③ 在 96 孔板中依次加入：

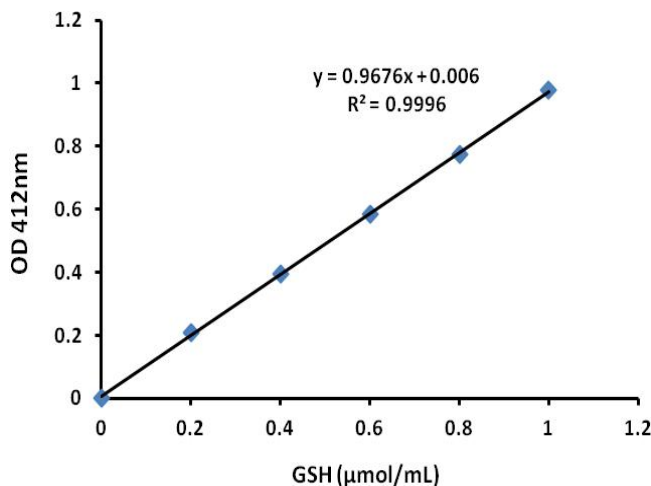
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	120	160
试剂二	40	
立即混匀，静置 5min 后，在 412nm 波长下分别读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

【注】1. 若是同一批样本检测，样本对照管做一个即可。

2. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可以增加样本取样质量（如增至 0.2g）或加大上样量（如增至 60 μ L，试剂一相应减少）。

五、结果计算：

1、标准曲线为 $y=0.9676x+0.006$ ；x 为标准品浓度（ μ mol/mL），y 为 ΔA 。



2. 按蛋白浓度计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mg prot})=[(\Delta A-0.006)\div 0.9676\times V1]\div (V1\times \text{Cpr})=1.033\times (\Delta A-0.006)\div \text{Cpr}$$

3. 按样本鲜重计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A-0.006)\div 0.9676\times V1]\div (W\times V1\div V)=1.033\times (\Delta A-0.006)\div W$$

4. 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{GSH}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A-0.006)\div 0.9676\times V1]\div (\text{细胞数量}\times V1\div V) \\ &= 1.033\times (\Delta A-0.006)\div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

5. 按液体体积计算：

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mL})=[(\Delta A-0.006)\div 0.9676\times V1]\div V1=1.033\times (\Delta A-0.006)$$

V----上清液总体积，1mL；

V1----加入反应体系中上清液体积，20 μ L=0.02 mL；

W----样品质量，g；

Cpr----蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量检测试剂盒。

注意事项：上清液不能用于蛋白质浓度测定。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1 μ mol/mL）：标准品溶于 4mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且 -20℃ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。