

组织及血液还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA3-M96	组织及血液还原型谷胱甘肽（GSH）试剂盒	96T	微量法

产品说明：

谷胱甘肽是由谷氨酸（Glu）、半胱氨酸（Cys）和甘氨酸（Gly）组成的天然三肽，是一种含巯基（-SH）的化合物，广泛存在于动物组织、植物组织、微生物和酵母中。谷胱甘肽能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)（5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB）反应产生2-硝基-5-巯基苯甲酸和谷胱甘肽二硫化物（GSSG）。2-硝基-5-巯基苯甲酸为黄色产物，在波长412nm 处具有最大光吸收。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃保存

操作步骤：

一、样本处理

- 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（匀浆器/研钵提前放冰上预冷）。12000g，4℃离心 10min，取上清液放置于4℃待测。若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3 天）。
- 细菌、细胞：**按照细胞数量（10⁶ 个）：**试剂一**体积（mL）为5~10：1 的比例（建议5 百万细胞加入 1mL **试剂一**），反复冻融2-3 次（可在液氮中冻结、37℃水浴中溶解）或者冰浴超声波破碎细胞（功率200w，超声3s，间隔 10s，重复 30 次），12000g，4℃离心 10 分钟，取上清置于冰上待测。若暂时不能完成测试可放于-80℃ 保存（可保存3 天）。
- 血液处理**

血浆：将收集的抗凝血于4℃，600g 离心 10 分钟，吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的**试剂一**，沸水浴 5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 12000g，4℃离心 10 分

钟，将上清移入新的试管中放置于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3天）。

血细胞：将收集的抗凝血于4℃，600g离心10分钟，弃去上层血浆用3倍体积的PBS清洗3次（用PBS重悬血细胞，600g离心10分钟），加入等体积试剂一，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后12000g，4℃离心10分钟，吸取上清放于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3天）。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至412nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准品的准备：吸取10mg/mL标准溶液，用蒸馏水稀释至300μg/mL、200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/mL。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度(μg/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μg/mL)
1	10000(即10mg/mL)	30	970	300
2	300	500	250	200
3	200	200	200	100
4	100	200	200	50
5	50	200	200	25

备注：下述实验中每个标准管需20μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

- 4、加样表：在1.5mL EP管/96孔板中分别加入下列试剂

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
试剂二	140	140	140
试剂三	40	40	40

混匀后常温静置2min后分别测定测定管、标准管和空白管在412nm处的吸光度，分别记为A_{测定}、A_{标准}和A_{空白}，计算ΔA=A_{测定}-A_{空白}，ΔA_{标准}=A_{标准}-A_{空白}。标准曲线和空白管只需做1-2次。

三、GSH含量计算

1. 标准曲线的绘制

据标准管的浓度 (x, $\mu\text{g/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y, ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA (y, ΔA) 带入公式计算样本浓度 (x, $\mu\text{g/mL}$)。

2. GSH 含量计算:

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = x \div W$$

(3) 按细胞/细菌数量计算

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = x \div N$$

(4) 按血浆

(血细胞) 体积计算

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = 2x$$

V 样总: 上清液总体积, 1mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$; W: 样本质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; N: 细胞/细菌数量, 以 10^6 为单位计; 2: 稀释倍数, 血浆(血细胞) 体积被稀释一 倍。

注意事项:

- 1、若不确定样本中GSH 含量的高低, 可稀释几个梯度后再进行测量。
- 2、因为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。如需测定蛋白含量, 需另取组织。
- 3、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。