

# 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
PYHA3-C48	还原型谷胱甘肽（GSH）试剂盒	48T	常量法

## 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 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

1. 标准品：10mg 还原型谷胱甘肽（GSH）。临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，浓度为 10mg/mL。2-8℃可以保存 6 周。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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（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）。

2. 细菌、细胞：按照细胞数量（ $10^6$  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）。

### 3. 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、分光光度计预热30min以上，调节波长至412nm，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200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/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)	20	980	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5

备注：下述实验中每个标准管需100μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准品	-	100	-
蒸馏水	-	-	100
试剂二	700	700	700
试剂三	200	200	200

混匀后常温静置2min后分别检测测定管、标准管和空白管在412nm处的吸光度，分别记为A<sub>测定</sub>、A<sub>标准</sub>和A<sub>空白</sub>，计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。标准曲线和空白管只需做1-2次。

4、加样表：在1.5mL EP管中分别加入下列试剂

## 三、GSH含量计算

1. 标准曲线的绘制

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

2. GSH含量计算：

(1) 按蛋白浓计算

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

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

(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，100 $\mu$ L=0.1mL；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<sup>6</sup> 为单位计量；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。