

M5 Hiper 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 Hiper 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒	100T/96S	MF1140-01

【保存温度】 2-8°C保存

【产品简介】

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。

需要的仪器，耗材: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。

【产品组成】

试剂名称	100T
试剂一	液体 110 mL
试剂二	液体 20 mL
试剂三	液体 5 mL
标准品	粉剂



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°C可以保存 6 周。

【需自备的仪器和用品】

可见分光光度计或酶标仪、分析天平、匀浆器/研钵/细胞超声破碎仪、低温离心机、水浴锅、移液器、微量玻璃比色皿或 96 孔板、冰和蒸馏水。

【技术指标】：

最低检出限：3.763 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围：12.5-400 $\mu\text{g/mL}$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

【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°C离心 10min, 取上清液放置于 4°C待测。若暂时不能完成测试可放于-80°C保存（可保存 3 天）。

2. 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°C 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°C 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°C 保存 (可保存 3 天)。

3. 血液处理

血浆: 将收集的抗凝血于 4°C, 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°C 离心 10 分钟, 将上清移入新的试管中放置于 4°C 待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80°C 保存 (可保存 3 天)。

血细胞: 将收集的抗凝血于 4°C, 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°C 离心 10 分钟, 吸取上清放于 4°C 待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80°C 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 300 μ g/mL、200 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL、25 μ g/mL。

3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度 (μ g/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ g/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 20 μ L 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 (μ L)	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 $\Delta A = A$ 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

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞/细菌数量计算

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: GSH 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x$

$V_{\text{样总}}$: 上清液总体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 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; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; N : 细胞/细菌数量, 以 106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。

【实验实例】

1、取 0.1002g 大鼠肝脏加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.573 - 0.097 = 0.476$, 标准曲线 $y = 0.0031x - 0.0117$, $R^2 = 0.9989$, $x = 157.323$, 按样本质量计算得:

GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 1570.09 \mu\text{g/g 质量}$ 。

2、取 0.1014g 韭菜叶片加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.117 - 0.097 = 0.020$, 标准曲线 $y = 0.0031x - 0.0117$, $R^2 = 0.9989$, $x = 10.226$, 按样本质量计算得:

GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 100.85 \mu\text{g/g 质量}$ 。

3、取 0.5mL 鸡血清按前处理步骤操作, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.127 - 0.097 = 0.03$, 标准曲线 $y = 0.0031x - 0.0117$, $R^2 = 0.9989$, $x = 13.452$, 按样本体积计算得:

GSH 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x = 26.90 \mu\text{g/mL}$ 。