

## 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒 (分光光度计法) (本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0245	还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒	50 管/48 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 50mL ×1 瓶	4°C
试剂二	液体 50mL ×1 瓶	4°C
试剂三	液体 15mL ×1 瓶	4°C, 避光
标准品	粉剂 10mg ×1 支	4°C, 避光

### 一、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。

### 二、自备材料

分析天平、微量匀浆器 (规格 2mL)、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计, 1mL 玻璃比色皿。

### 三、样品制备

1、组织: 新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次, 然后称取动物组织或者植物组织 0.1g。加入用试剂一润洗过的匀浆器中 (匀浆器提前放冰上预冷); 然后加入 1mL 试剂一 (组织/试剂一比例保持不变即可), 迅速冰上充分研磨 (使用液氮研磨效果更好); 8000g 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 10 天)。

2、细菌或培养细胞: 收集不少于  $10^6$  个细胞, 首先用 PBS 清洗细胞 2 次 (PBS 重悬细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入 3 倍细胞沉淀体积的试剂一重悬细胞, 反复冻融 2-3 次 (可在液氮中冻结, 37°C 水浴中溶解), 8000g 离心 10 分钟, 收集上清于 4°C 待测, 若暂时不能完成测试可放于 -80°C 保存 (可保存 10 天)。

3、血液样品:

3.1 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, 4°C, 8000g 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 10 天)。

3.2 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, 混匀后 4°C 放置 10 分钟, 8000g 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 10 天)。

#### 四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂二放置 37°C (哺乳动物) 或 25°C (一般物种) 水浴中保温 30min。
- 3、空白管检测: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 100 $\mu$ L 蒸馏水, 700 $\mu$ L 试剂二, 200 $\mu$ L 试剂三, 混匀, 放置 2min 后测定 412nm 吸光度 A1。
- 4、制作标准曲线: 称 1mg 标准品用 1mL 蒸馏水溶解, 浓度为 1mg/mL。取适当溶液配制浓度为 200 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL、12.5 $\mu$ g/mL 的标准品 (试剂一十倍稀释后进行稀释)。取 1.5mL EP 管依次加入 100 $\mu$ L 标准品, 700 $\mu$ L 试剂二, 200 $\mu$ L 试剂三, 每管混匀后静置 2min, 检测 412nm 处吸光度, 吸光度减去空白孔 (A1) 为横坐标, 根据吸光度 (x) 和浓度 (y,  $\mu$ g/mL) 做出标准曲线。
- 5、样品管测定: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 100 $\mu$ L 样品, 700 $\mu$ L 试剂二, 200 $\mu$ L 试剂三, 混匀后静置 2min 检测 412nm 处吸光度 A2,  $\Delta A = A2 - A1$ 。

#### 五、GSH 含量的计算

根据标准曲线, 将样品  $\Delta A$  带入公式中 (x), 计算出样品浓度 y ( $\mu$ g/mL)。

- 1、按照样本蛋白浓度计算:

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

- 2、按照样本鲜重计算:

$$\text{GSH } (\mu\text{g} / \text{g}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = y \div W。$$

- 3、按照细胞数量计算:

$$\text{GSH } (\mu\text{g} / 10^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}。$$

- 4、按照液体体积计算:

$$\text{GSH } (\mu\text{g} / \text{mL}) = 2y。$$

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, 100 $\mu$ L=0.1 mL;

W: 样品质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10<sup>6</sup> 为单位计量;

2: 血浆 (血细胞) 体积被稀释一倍。

#### 六、注意事项

- 1、样品处理需匀浆完全, 若当天不能完成测量, 可放 -80°C 保存。
- 2、标准品: 还原型谷胱甘肽现配现用。
- 3、若不确定样品中 GSH 含量的高低, 可稀释几个梯度后再进行测量。
- 4、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。