还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒（微量法）
（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
YFX0246	还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒（微量法）	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 8mL × 1 瓶	4℃，避光
标准品	粉剂 10mg ×1 管	4℃，避光

一、产品说明

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。

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。

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、可见分光光度计或酶标仪、超微量比色皿或 96 孔板。

三、样品准备

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）；8000rpm 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 10 天）。

2、细胞/细菌：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℃水浴中溶解），8000g 离心 10 分钟，收集上清于 4℃ 待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

3、血浆样本：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, 4℃，8000g 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 10 天）。

4、血细胞样本：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，混匀后 4℃放置 10 分钟，8000g 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 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/酶标仪预热 30min 以上，分光光度计调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2、试剂二放置 37℃（哺乳动物）或 25℃（一般物种）水浴中保温 30min。

3、空白管检测：取超微量比色皿，依次加入 20μL 蒸馏水，140μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀， 放置 2min 后测定 412nm 吸光度 A1。

4、制作标准曲线：

4.1 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 200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL 的标准品（试剂一十倍稀释后进行稀释）。

4.2 取 1.5mL EP 管依次加入 20μL 标准品，140μL 试剂二，40μL 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，μg/mL） 做出标准曲线。

5、样品管测定：取超微量比色皿，依次加入 20μL 样品，140μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后静置 2min 检测 412nm 处吸光度 A2，△A= A2- A1。

6、酶标仪操作同分光光度计，操作尽量迅速。

五、含量的计算

根据标准曲线，将样品△A 带入公式中（x），计算出样品浓度 y（μg/mL）。

1、按照组织蛋白浓度计算

GSH（μg / mg prot）=y×V 样÷（V 样×Cpr）。

2、按照样本鲜重计算

GSH（μg /g 鲜重）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×W)。

3、按照细菌/细胞密度计算

GSH（μg /10^6cell）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×细胞数量)。

4、按照液体体积计算

GSH（μg / mL）=2 y。

V 样总：上清液总体积，mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02 mL；

W：样品质量，g ；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量：以 106 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℃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。