

还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-G001 分光法 48样)

有效期: 3个月

注意: 正式测定之前选择 **2-3** 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 50mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂二: 液体 36mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂三: 液体 10mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

粗酶液提取:

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。8000g, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 液体: 直接测定。

GSH 测定操作:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37°C 中预热 10min。
3. 空白管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 100 μ L 蒸馏水, 700 μ L 试剂二, 200 μ L 试剂三, 混匀, 静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A1。
4. 测定管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 100 μ L 上清液, 700 μ L 试剂二, 200 μ L 试剂三, 混匀, 静置 2min 后测定 412 nm 吸光度 A2。

注意: 空白管只需要测定一次。

GSH 含量计算公式:

GSH 标准曲线公式: $y=1.5x$ (x 为 GSH 浓度, $\mu\text{mol}/\text{mL}$; y 为吸光值)

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 0.667 \times (A2 - A1) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSH}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W)$$

$$=0.667 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSH} (\mu \text{ mol} / 10^4 \text{ cell}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$
$$= 0.667 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSH} (\mu \text{ mol} / \text{mL}) = (A2 - A1) \div 1.5 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}}$$
$$= 0.667 \times (A2 - A1)$$

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, 20 μ L=0.02 mL; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量

注意事项:

1. 提取液中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。
2. 最低检出限为 0.011mmol/L。