

还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1175

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C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°C可以保存 6 周。

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。



技术指标：

最低检出限：3.763 μg/mL

线性范围：12.5-400 μg/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。

需自备的仪器和用品：

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、可见分光光度计或酶标仪、微量玻璃比色皿或 96 孔板。

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（匀浆器提前放冰上预冷）。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 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），8000g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10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，加入等体积的试剂一，4℃，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，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300μg/mL、200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/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）	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：实验中每个标准管需20μL标准液。

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（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准溶液	-	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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。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，μg/mL）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），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，μg/mL）。

2. GSH含量计算：

（1）按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(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

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

V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μ L=0.02mL；W：样本质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；N：细胞数量，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、样本处理需匀浆完全，若当天不能完成测量，可放-80℃保存。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、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 0.1287g 黄杨叶片加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.19 - 0.119 = 0.071$ ，标准曲线 $y = 0.0021x - 0.0026$ ， $x = 35.05$ ，按样本质量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 272.32 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1229g 小鼠肝脏加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.397 - 0.119 = 0.278$ ，标准曲线 $y = 0.0021x - 0.0026$ ， $x = 133.62$ ，按样本质量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 1087.22 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 3、取 500 万 HaPG1 细胞，加入 1mL 试剂一后超声提取，之后再按照测定步骤操作，96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.163 - 0.119 = 0.044$ ，标准曲线 $y = 0.0021x - 0.0026$ ， $x = 22.19$ ，按细胞数量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$) = $x \div N = 22.19 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ 。
- 4、取羊血清按提取和测定步骤进行实验，96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.209 - 0.119 = 0.09$ ，标准曲线 $y = 0.0021x - 0.0026$ ， $x = 44.10$ ，按血浆（血细胞）体积计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x = 88.19 \mu\text{g/mL}$ 。

相关发表文献：

[1] Fangzhou Chen, Ying Zhao, Huizhao Chen. MicroRNA-98 reduces amyloid β -protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEY2 in Alzheimer's disease mice. *International Journal of Molecular Medicine*. October 2018; 91-102. (IF2.784)

[2] Ming Song, Fangfang Chen, Yihui Li, et al. rimetazidine restores the positive adaptation to exercise training by mitigating statin-induced skeletal muscle injury. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. November 2017; (IF10.754)

[3] Hua Li, Lanying Wang, Yanping Luo. Composition Analysis by UPLC-PDA-ESI (-)-HRMS and Antioxidant Activity Using *Saccharomyces cerevisiae* Model of Herbal Teas and Green Teas from Hainan. *Molecules*. October 2018; (IF3.06)

[4] OuYang Q, Tao N, Zhang M. A damaged oxidative phosphorylation mechanism is involved in the antifungal activity of citral against *Penicillium digitatum*[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 239.

[5] Chen Z Y, Wang Y T, Pan X B, et al. Amelioration of cold-induced oxidative stress by exogenous 24-epibrassinolide treatment in grapevine seedlings: Toward regulating the ascorbate–glutathione cycle[J]. *Scientia horticulturae*, 2019, 244: 379-387.

[6] GongSun X, Zhao Y Q, Jiang B, et al. Inhibition of MUC1-C regulates metabolism by AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(7): 12019-12028.

参考文献:

[1] Alpert A J, Gilbert H F. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction[J]. *Analytical biochemistry*, 1985, 144(2): 553-562.

[2] Owens C W I, Belcher R V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione[J]. *Biochemical Journal*, 1965, 94(3): 705.

相关系列产品:

BC1180/ BC1185 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒

BC1190/ BC1195 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性检测试剂盒

BC1150/ BC1155 硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒

BC1210/ BC1215 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒