

还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒说明书

Reduced Glutathione Assay Kit

微量法

货号：AK103

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK103-A	100ml×1 瓶	4°C避光保存
AK103-B	20ml×1 瓶	4°C保存
AK103-C	8ml×1 瓶	4°C避光保存
AK103-标准品	粉剂 10mg×1 支	4°C保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

还原型谷胱甘肽 (Reduced Glutathione, 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。

自备用品：

低温离心机、匀浆器/研钵、水浴锅、可调节移液器、酶标仪、微量玻璃比色皿或微孔板和蒸馏水

粗酶液提取：

1. 血液样品制备：

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 AK103-A, 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）。

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 重悬细胞，600g 离心 10 分钟），加入等体积 AK103-A，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）。

2. 细胞或组织样品的制备：

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 AK103-A 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）。

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 AK103-A 润洗过的匀浆器中（匀浆器提前放冰上预冷）；然后加入 1mLAK103-A（组织/Ak103-A 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）。

检测步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
- AK103-B 置于 25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）水浴中保温 30min。
- 制作标准曲线：

称取1mg标准品用1mL蒸馏水溶解，浓度为1mg/mL（现配现用）；用AK103-A稀释标准品到浓度为200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、12.5 μg/mL、0 μg/mL。

在微量玻璃比色皿或微孔板中依次加入20 μL 各浓度标准品，140 μL AK103-B，40 μL AK103-C，混匀后静置2min，检测412nm 处吸光度，根据吸光度（x）和浓度（y, μg/mL）做标准曲线。

4. 在微量玻璃比色皿或微孔板中加入下列试剂：

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
上清液		20
蒸馏水	20	
AK103-B	140	140
AK103-C	40	40
分别混匀静置2min，测定 412nm 吸光度，A对照管记为A1，A测定管记为A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。		

注：对照管只需要测定 1-2 次。

计算公式：

根据标准曲线，将样本 ΔA 带入公式中（x），计算出样本浓度 y (μg/mL)。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

$$GSH (\mu g/10^6 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

(4) 按血浆（血细胞）体积计算

$$GSH (\mu g/mL) = 2y$$

$V_{\text{总}}$: 上清液总体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu L = 0.02mL$; W : 样本质量, g; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10^6 为单位计量; 2: 血浆（血细胞）体积被稀释一倍。

注意事项：

- AK103-A 中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定；若测定蛋白含量，需另取组织。
- 样本处理需匀浆完全，若当天不能完成测量，可放-80°C保存，不超过10d.
- 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。