

还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10256

规格：50T/48S

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

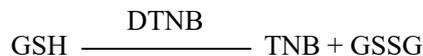
试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

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℃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：2.67 μg/mL

线性范围：3.125-250 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、1mL 玻璃比色皿。

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、组织处理：

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℃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 3 天）。

2、血液处理

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 3 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 3 天)。

3、细胞处理

收集不少于 500 万个细胞, 首先用 PBS 清洗细胞 2 次 (PBS 重悬细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入 1mL 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) 或者进行超声 (200W, 超 3s, 停 10s, 重复 30 次), 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)。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 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 200µg/mL、100µg/mL、50µg/mL、25µg/mL、12.5µg/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)	20	980	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5

备注: 实验中每个标准管需 100µL 标准液。

4、加样表: 在 1.5mL EP 管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	100	-	-
标准溶液	-	100	-
蒸馏水	-	-	100
试剂二	700	700	700
试剂三	200	200	200

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，100 μ L=0.1mL；W：样本质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；N：细胞数量，以 10⁶ 为单位计量；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 $^{\circ}$ C保存 3 天。
- 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，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.255 - 0.119 = 0.136$ ，标准曲线 $y = 0.003x - 0.0015$ ， $x = 45.83$ ，按样本质量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 356.1254 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 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，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.579 - 0.119 = 0.46$ ，标准曲线 $y = 0.003x - 0.0015$ ， $x = 153.83$ ，按样本质量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $x \div W = 1251.70 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 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，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.186 - 0.119 = 0.067$ ，标准曲线 $y = 0.003x - 0.0015$ ， $x = 22.83$ ，按细胞数量计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$) = $x \div N = 4.567 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 4、取羊血清按提取和测定步骤进行实验，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.261 - 0.119 = 0.142$ ，标准曲线 $y = 0.003x - 0.0015$ ， $x = 47.83$ ，按血浆（血细胞）体积计算得：
GSH 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $2x = 95.67 \mu\text{g/mL}$ 。

相关发表文献：

[1] Fangzhou Chen, Xing Zhao, Huizhao Chen. MicroRNA-98 reduces amyloid β -protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEX2 in Alzheimer's disease mice. International Journal of Molecular Medicine. October 2018;91-102. (IF2.784)

[2] Ming Song, Fangfang Chen, Xihui 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, Lanxing Wang, Xanping 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] OuXang 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 X, Wang X 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 X 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:

- AC10258/ AC10259 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒
- AC10260/ AC10261 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性检测试剂盒
- AC10252/ AC10253 硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒
- AC10264/ AC10265 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒