

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：BC1170

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，有疑问请及时联系相关工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂 10 mg×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、标准品：称 1mg 标准品用 1mL 蒸馏水溶解，浓度为 1mg/mL。

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、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°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）。

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

3、空白管检测：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100μL 蒸馏水，700μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀，放置 2min 后测定 412nm 吸光度 A1。

4、制作标准曲线

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）。

取 1.5mL EP 管依次加入 100μL 标准品，700μL 试剂二，200μL 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、样本管测定：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100μL 样本，700μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀后静置 2min 检测 412nm 处吸光度 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、GSH 含量计算

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

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按血浆（血细胞）体积计算

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

V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，100μL=0.1mL；W：样本质量，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。

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°C 保存。

2、标准品：还原型谷胱甘肽现配现用。

3、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。

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。如需测定蛋白含量，需另取组织。

5、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。

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.