

# 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、200T/192S

**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。**

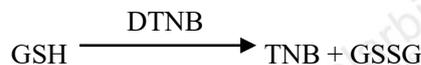
试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	液体 110 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃保存

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：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：

可见分光光度计或酶标仪、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、微量玻璃比色皿或 96 孔板、冰和蒸馏水。

## 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/研钵提前放冰上预冷）。12000g，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. 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、 $37^{\circ}\text{C}$ 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），12000g， $4^{\circ}\text{C}$ 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  $-80^{\circ}\text{C}$  保存（可保存 3 天）。

### 3. 血液处理

血浆：将收集的抗凝血于  $4^{\circ}\text{C}$ ，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**，沸水浴 5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 12000g， $4^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟，将上清移入新的试管中放置于  $4^{\circ}\text{C}$ 待测，若暂时不能完成测试可放于  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存（可保存 3 天）。

血细胞：将收集的抗凝血于  $4^{\circ}\text{C}$ ，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**，沸水浴 5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 12000g， $4^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟，吸取上清放于  $4^{\circ}\text{C}$ 待测，若暂时不能完成测试可放于  $-80^{\circ}\text{C}$ 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 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	标准液体积 ( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
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：下述实验中每个标准管需 20 $\mu\text{L}$  标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

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 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	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， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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  $\Delta A$ （y， $\Delta A$ ）带入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

### 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/细菌数量计算

$$\text{GSH 含量 } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = x \div N$$

## (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 $\mu$ L=0.02mL; W: 样本质量, g;  
Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; N: 细胞/细菌数量, 以 10<sup>6</sup> 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、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。
- 2、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。
- 3、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 0.1002g 大鼠肝脏加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.573 - 0.097 = 0.476$ , 标准曲线  $y = 0.0031x - 0.0117$ ,  $R^2 = 0.9989$ ,  $x = 157.323$ , 按样本质量计算得:  
GSH 含量 ( $\mu\text{g/g 质量}$ )  $= x \div W = 1570.09 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1014g 韭菜叶片加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.117 - 0.097 = 0.020$ , 标准曲线  $y = 0.0031x - 0.0117$ ,  $R^2 = 0.9989$ ,  $x = 10.226$ , 按样本质量计算得:  
GSH 含量 ( $\mu\text{g/g 质量}$ )  $= x \div W = 100.85 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 3、取 0.5mL 鸡血清按前处理步骤操作, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.127 - 0.097 = 0.03$ , 标准曲线  $y = 0.0031x - 0.0117$ ,  $R^2 = 0.9989$ ,  $x = 13.452$ , 按样本体积计算得:  
GSH 含量 ( $\mu\text{g/mL}$ )  $= 2x = 26.90 \mu\text{g/mL}$ 。

**相关发表文献:**

[1] Wei M, Bai J, Shen X, Lou K, Gao Y, Lv R, Wang P, Liu X, Zhang G. Glutathione-Exhausting Nanoprobes for NIR-II Fluorescence Imaging-Guided Surgery and Boosting Radiation Therapy Efficacy via Ferroptosis in Breast Cancer. ACS Nano. 2023 Jun 27;17(12):11345-11361. doi: 10.1021/acsnano.3c00350. Epub 2023 Jun 5. PMID: 37272787; PMCID: PMC10311599.

[2] Li K, Xu K, He Y, Yang Y, Tan M, Mao Y, Zou Y, Feng Q, Luo Z, Cai K. Oxygen Self-Generating Nanoreactor Mediated Ferroptosis Activation and Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. ACS Nano. 2023 Mar 14;17(5):4667-4687. doi: 10.1021/acsnano.2c10893. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36861638.

[3] Yang L, Zhang D, Li W, Lin H, Ding C, Liu Q, Wang L, Li Z, Mei L, Chen H, Zhao Y, Zeng X. Biofilm microenvironment triggered self-enhancing photodynamic immunomodulatory microneedle for diabetic wound therapy. Nat Commun. 2023 Nov 23;14(1):7658. doi: 10.1038/s41467-023-43067-8. PMID: 37996471; PMCID: PMC10667311.





[4] Li K, Lin C, Li M, Xu K, He Y, Mao Y, Lu L, Geng W, Li X, Luo Z, Cai K. Multienzyme-like Reactivity Cooperatively Impairs Glutathione Peroxidase 4 and Ferroptosis Suppressor Protein 1 Pathways in Triple-Negative Breast Cancer for Sensitized Ferroptosis Therapy. ACS Nano. 2022 Feb 22;16(2):2381-2398. doi: 10.1021/acsnano.1c08664. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35041395.

#### 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 (GSH-Px/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  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒

