

## P-22 如何测定总谷胱甘肽

### . 概述

谷胱甘肽 (GSH) 是动物组织、植物组织、细菌和酵母内最为丰富的巯基 (SH) 化合物。GSH具有多种功能，如抵御活性氧和维持蛋白巯基等。在这些反应中GSH转变为二硫代谷胱甘肽 (GSSG: GSH的氧化型)。由于GSSG会被谷胱甘肽还原酶促还原，因此GSH是机体内的主要形式。

DTNB (5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸))，一种Ellman试剂，可以用来检测巯基化合物。1985年Dr.M.E.Anderson建立了利用谷胱甘肽在DTNB和谷胱甘肽还原酶作用下循环反应来检测谷胱甘肽含量的高灵敏度的方法。DTNB和谷胱甘肽 (GSH) 反应，生成2-nitro-5-thiobenzoic acid (2-硝基-5-硫代苯甲酸) 以及GSSG。由于2-硝基-5-硫代苯甲酸为一黄色产物，通过测量其在412 nm处的吸光度就能确定样品中GSH的浓度。GSSG在谷胱甘肽还原酶作用下生成GSH，然后和DTNB反应再次生成2-硝基-5-硫代苯甲酸。因此这种循环反应使得总谷胱甘肽含量的检测灵敏度大大加强了。(图1)

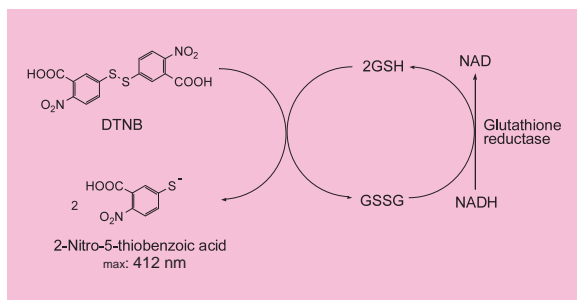


图1. 总谷胱甘肽反应机理

总谷胱甘肽检测试剂盒包含了除用于样品制备以外的其它所有必要的检测试剂。推荐使用5-磺基水杨酸来去除样品溶液中的蛋白以及防止GSH氧化型和 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶反应。样品的最佳制备方法要根据样品而异，所以请先查阅相关资料。运用标准的检测方法，该试剂盒能够检测浓度在1-100  $\mu$ M之间的总谷胱甘肽。如果要检测较低浓度的谷胱甘肽 (如血液样品)，可以延长培养的时间。

### . 试剂盒内含

Substrate (DTNB) .....	2小管
Enzyme Solution .....	50 $\mu$ l $\times$ 1小管
Coenzyme (冷冻干燥) .....	2小管
Standard GSH (冷冻干燥) .....	1小管
Buffer Solution .....	50 ml $\times$ 1瓶

### . 所需的设备和材料

酶标仪 (带有405或415 nm滤光片)  
透明96孔板

20  $\mu$ l 和200  $\mu$ l的可调式移液器  
37 培养箱  
5-Sulfosalicylic Acid (SSA)

### . 储存条件

未开封的试剂盒可在0-5  $^{\circ}$ C 保存1年。Substrate Working Solution、Coenzyme Working Solution和GSH Standard Solution可在-20  $^{\circ}$ C 保存2个月，Enzyme Solution可在4  $^{\circ}$ C下保存2个月(无需冻融)。

### . 注意事项

1. 请在室温下使用试剂盒中的试剂。
2. 建议每组样品设定3个复孔，以便得到更准确的数据。
3. 由于加入Substrate Working Solution之后会立刻产生显色反应，因此尽量使用多通道移液器以减少各孔之间的误差。
4. 如不知道样品中总谷胱甘肽含量的浓度范围，就请准备多个浓度梯度的样品溶液。
5. 本试剂盒不适合测定GSSG。
6. 试剂盒中有带铝盖的玻璃管，请小心拿取。

### . 配制5%的5-磺基水杨酸 (SSA)

将1 g SSA溶解于19 ml的超纯水中。  
该溶液存放在4  $^{\circ}$ C下 (在4  $^{\circ}$ C下可以保存6个月)  
注：本试剂盒中不含该产品。

### . 样品溶液的制备

以下是对通常样品的处理方法，不同样品之间可能有变动，仅供参考。

如果需要更加详细的操作条件，请查看参考文献  
M. E. Anderson, *Methods in Enzymol.*, **1985**, 113, 548.

细胞 (贴壁细胞 :  $5 \times 10^5$  cells ; 白细胞 :  $1 \times 10^6$  cells)

- 1) 在4  $^{\circ}$ C , 200  $\times$  g离心10 min收集细胞，弃上清。
- 2) 用300  $\mu$ l PBS清洗细胞，在4  $^{\circ}$ C , 200  $\times$  g离心10 min，弃上清。
- 3) 加入80  $\mu$ l 10 mM的HCl，反复冻融使细胞溶解。重复该步骤2次。
- 4) 加入20  $\mu$ l 5%的SSA，在8,000  $\times$  g离心10 min。
- 5) 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。<sup>a)</sup>

组织 (重量 : 100 mg)

- 1) 在0.5-1 ml 5%的SSA中对组织匀浆。
- 2) 匀浆后的组织样品在8,000  $\times$  g离心10 min。
- 3) 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。<sup>a)</sup>

## P-22 如何测定总谷胱甘肽

### 血浆

- 1) 在4℃, 1,000 × g离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 将最上层的血浆移入一支新试管, 加入1/2体积的5%的SSA。
- 3) 在4℃, 8,000 × g离心10 min。
- 4) 将上清移入一支新试管中, 进行总谷胱甘肽检测。<sup>a)</sup>

### 红血球<sup>b)</sup>

- 1) 在4℃, 1,000 × g离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 弃上清及浅黄色层面的液体。
- 3) 用4倍体积的5%的SSA溶解红血球。
- 4) 在4℃, 8,000 × g离心10 min。
- 5) 将上清移入一支新试管中, 进行总谷胱甘肽检测。<sup>a)</sup>

a) 在使用样品溶液前, 请先用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%, 高浓度的SSA会引起溶液pH值的变化, 对检测有所干扰。

b) 血球能从血浆分离后所剩样品溶液中分离。

### 反应溶液的制备:

#### Substrate Working Solution

加1.2 ml Buffer Solution于1管Substrate中溶解。

- \* 请确认完全溶解Substrate
- \* 难溶解时, 使用超声或Vortex Mixer (旋涡混合器)
- \* 请将该溶液保存在-20℃条件下(在-20℃下可以保存2个月)

#### Enzyme Working Solution

用移液器混合Enzyme Solution, 吸取20 μl, 将其与4 ml Buffer Solution混合。

- \* 偶尔在管的内壁和盖子附着酶溶液, 请稍微离心后开封。
- \* 请将该溶液保存在4℃条件下(在4℃下可以保存2个月)

#### Coenzyme Working Solution

加1.2 ml 超纯水于Coenzyme管中溶解。

- \* Coenzyme管是经过减压处理的, 请小心打开或者使用注射器来添加超纯水。
- \* 请将剩余的溶液保存在-20℃条件下(在-20℃下可以保存2个月)

#### GSH Standard Solutions

1) 加2 ml 0.5%的SSA于Standard GSH管中, 溶解后制备成200 μM的GSH Standard Solution。

\* Standard GSH管作过减压处理, 请小心打开或者使用注射器来添加SSA。

\* GSH粉末难以肉眼观察到。

\* 请将该溶液存放在-20℃下(在-20℃下可以保存2个月)

- 2) 如下图所示, 在每个塑料管中加100 μl 0.5% SSA。在第一个塑料管中加入100 μl 200 μM的GSH Standard Solution, 混匀后, 取100 μl溶液加到下一个管子, 将其逐级稀释, 制备成GSH Standard Solutions。浓度依次为: 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.13 μM, 1.56 μM和0 μM。

\* 所配溶液需在一天内用完。

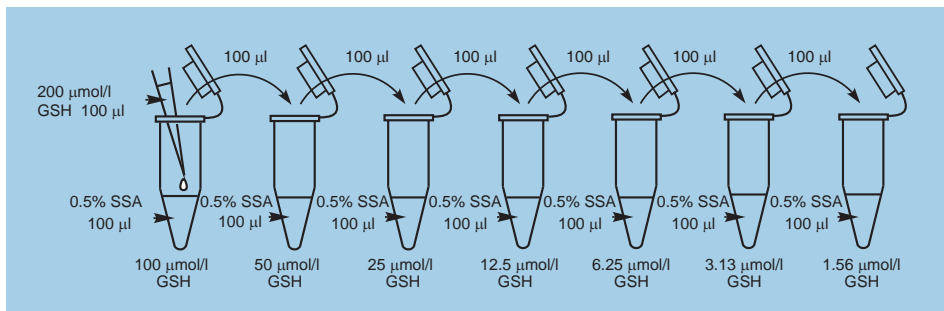


图2. 制备GSH Standard Solution

### 总谷胱甘肽检测 (标准法) (实际操作方法: 如图3)

检测范围: 5-100 μM

- 1) 向每孔中加入20 μl Coenzyme Working Solution, 120 μl Buffer Solution以及20 μl Enzyme Working Solution。
- 2) 在37℃下培养5 min。
- 3) 加入20 μl GSH Standard Solution或样品溶液。<sup>a)</sup>
  - a) 测定前请先用超纯水将样品溶液中SSA的浓度调节0.5%。高浓度的SSA(>1%)会干扰实验。按照图2排列GSH Standard Solution和样品溶液。如果复孔是3个的话, 可以测定24个样品。
- 4) 在37℃下培养10 min。
- 5) 加入20 μl Substrate Working Solution, 在室温下培养10 min。

6) 用酶标仪在405 nm或415 nm下测定吸光度。

7) 用标准曲线测定所得样品溶液的GSH浓度。<sup>b)</sup>

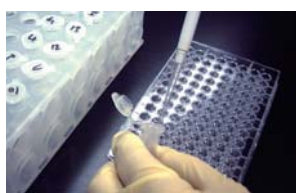
b) 由于比色反应很稳定且O.D.值呈线性增长超过30 min, 因此可以采用Kinetic法或Pseudo-endpoint法测定GSH浓度(不停止反应, 在5-10 min的固定时间点快速测定O.D.值)。比色反应随时间的变化见图5。采用Kinetic法或Pseudo-endpoint法测定的曲线见图6,7。

\* 如果预计样品中总谷胱甘肽的浓度 > 25 μM, 则制备GSH Standard Solutions时可以按照图2比例, 从25 μM起开始逐级稀释, 浓度依次为: 25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.13 μM, 1.56 μM, 0.78 μM, 0.39 μM和0 μM。加入Substrate Solution后, 在室温下培养20-30 min。

## P-22 如何测定总谷胱甘肽

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	1.56 $\mu\text{mol/l}$ GSH											
C	3.13 $\mu\text{mol/l}$ GSH											
D	6.25 $\mu\text{mol/l}$ GSH					Sample						
E	12.5 $\mu\text{mol/l}$ GSH											
F	25 $\mu\text{mol/l}$ GSH											
G	50 $\mu\text{mol/l}$ GSH											
H	100 $\mu\text{mol/l}$ GSH											

图3. 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列



1)-2)  
向各孔中加入Coenzyme Working Solution, Buffer Solution和Enzyme Working Solution, 并在37 °C下培养5 min。



3)-4)  
向各孔中加入GSH Standard Solution或者Buffer样品溶液, 并在37 °C下培养10 min。



5) 向各孔中加入Substrate Standard Solution, 并在37 °C下培养10 min。



6) 测定405或415 nm处的O.D.值。

图4. 总谷胱甘肽检测步骤

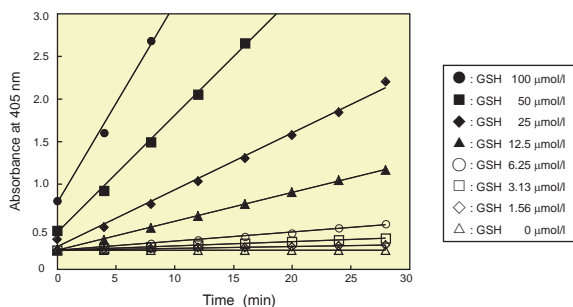


图5. 不同GSH浓度下的DTNB比色反应  
(自添加Substrate Working Solution起记录反应时间)

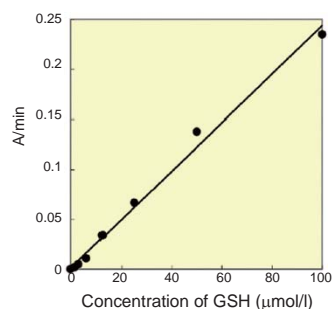


图6. Kinetic法标准曲线

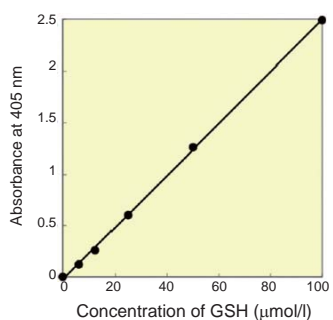


图7. Pseudo-endpoint法标准曲线

### 总谷胱甘肽检测 (高灵敏度)

检测范围: 0.5-25  $\mu\text{M}$

- 1) 向每孔中加入20  $\mu\text{l}$  Coenzyme Working Solution, 120  $\mu\text{l}$  Buffer Solution以及20  $\mu\text{l}$  Enzyme Working Solution。
- 2) 在37 °C下培养5 min。
- 3) 加入20  $\mu\text{l}$  GSH Standard Solution <sup>a)</sup> 或样品溶液 <sup>b)</sup>。
  - a) 准备50  $\mu\text{M}$  GSH Standard Solutions, 然后用0.5% SSA将其逐级稀释为如下浓度: 25  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 6.25  $\mu\text{M}$ , 3.13  $\mu\text{M}$ , 1.56  $\mu\text{M}$ , 0.78  $\mu\text{M}$ , 0.39  $\mu\text{M}$ 和 0  $\mu\text{M}$ 。
  - b) 检测前先用超纯水调整样品溶液中SSA的浓度为0.5%。高浓度的SSA (>1%) 会引起溶液pH值的变化, 对检测有所干扰。
- 4) 在37 °C下培养10 min。
- 5) 加入20  $\mu\text{l}$  Substrate Working Solution, 在室温下培养20-40 min。
- 6) 用酶标仪在405或415 nm下测定吸光度。
- 7) 用标准曲线测定所得样品溶液的GSH浓度。

### . 总谷胱甘肽浓度的计算使用以下公式<sup>a)</sup>

#### Pseudo-endpoint法：

总谷胱甘肽= (O.D.sample - O.D.blank) / slope

#### Kinetic法：

总谷胱甘肽= (slope<sup>c)</sup> sample - slope<sup>c)</sup> blank) / slope<sup>b)</sup>

- a) 由于这个公式所得数值是处理后的样品中总谷胱甘肽的量，如果要知道细胞或者组织中实际的谷胱甘肽的浓度，还需要作进一步的计算由Pseudo-endpoint法或Kinetic法所制备的标准曲线的斜率。
- b) 标准曲线的斜率
- c) Kinetic反应的斜率

### . 干扰物

还原剂 (如抗坏血酸,  $\beta$ -mercaptoethanol, DTT, 半胱氨酸) 以及巯基活性化合物 (如马来酰亚胺基) 会对检测造成干扰，因此在制备样品溶液的时候应该设法先将其除去。

### . 参考文献

1. Yosuke Okuno, *et al.*, Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway, *Diabetes*, **2018**, 67(6), 1113-1127
2. Sawako Suzuki, *et al.*, Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, 107(16), 7461-7466
3. John R. Ridpath, *et al.*, Cells Deficient in the FANC/BRCA Pathway Are Hypersensitive to Plasma Levels of Formaldehyde, *Cancer Research*, **2007**, 67(23), 11117-11122
4. Tadashi Sato, *et al.*, Senescence Marker Protein-30 Protects Mice Lungs from Oxidative Stress, Aging, and Smoing, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2006**, 174, 530-537
5. Makito Hirano, *et al.*, ALADINI<sup>482S</sup> causes selective failure of nuclear protein import and hypersensitivity to oxidative stress in triple A syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103(7), 2298-2303
6. Tsudoi Sugiura, *et al.*, Docetaxel enhances antitumor activity of cisplatin via modification of multidrug resistance-associated protein-1 in gastric cancer cell lines, *Cancer Research*, **2004**, 64, 463-464