

2.7 GSH-Bestimmung

Die GSH-Konzentrationen wurden in Mikrotiterplatten bestimmt (Baker, Cerniglia et al. 1990). Die Reaktion beruht auf einem Komplex den DTNB mit GSH oder GSSG (Glutathiondisulfid) bildet, der dann bei 405 nm spektrometrisch bestimmt werden kann (Tietze 1969).

Probenvorbereitung

Jeweils 10 Zellkulturen wurden in 300 μ l PB (50 mM) aufgenommen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Gelelektrophores) die Proteine durch Zugabe von 30 μ l 5%iger TCA (Trichloresigsäure) präzipitiert. Nach Zentrifugation (2.600 g für 10 min) und Abnahme des Überstands wurde dieser neutralisiert (30 μ l einer 0,3 M KOH-Lösung in 20 mM HEPES).

Lösungen

- PB-EDTA (PB mit 1 mM EDTA)
- 1 mM NADPH in PB-EDTA (4,2 g / 5 ml)
- 1 mM 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzen) in PB-EDTA (DTNB; 2 mg / 5 ml)
- 3,2 mM GSSG in PB-EDTA (10 mg / 5 ml, entspricht 3,2 nmol/ μ l)
- GSH-Reduktase
- 97%ige Vinylpyridin-Lösung
- Triethanolamin

Reaktionsgemisch

- 2,8 ml DTNB
- 3,75 ml NADPH
- 5,8 ml PB-EDTA
- 6 μ l GSH-Reduktase (entspricht 20 U)

Reaktion

Es wurden 50 μ l Probe in die Mikrotiterplatten pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Reaktions-Lösung gestartet. Zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 10$ min wurden dann bei 405 nm die Werte bestimmt.

A) Für die GSSG-Bestimmung (ohne GSH) wurden 3 μl der Vinylpyridin-Lösung zu 100 μl Probe pipettiert, die dann mit 5 μl Triethanolamin neutralisiert wird.

B) Für die Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehalts wurde die unbehandelte Probe verwendet. Zu jedem Versuch wurde eine Eichkurve mit GSH erstellt, indem die GSSG-Lösung 1 : 1000 verdünnt und, wie im folgenden dargestellt, mit PB-EDTA verdünnt wurde:

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----|------|------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GSSG (μl) | 1 | 2 | 4 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Puffer (μl) | 49 | 48 | 46 | 40 | 35 | 30 | 25 | 20 | 15 | 10 | 5 | 0 |
| GSSG [pmol] | 6,4 | 12,8 | 25,6 | 64 | 96 | 128 | 160 | 192 | 224 | 256 | 288 | 320 |

Die Daten der Eichkurve wurden als Δ mOD/min aufgetragen und durch Ablesen die Konzentration der Proben bestimmt. Hierbei ist zu beachten, daß die Glutathionreduktase 1 GSSG zu 2 GSH umbaut.