



(21) 申请号 202111223419.X

(22) 申请日 2021.10.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113945552 A

(43) 申请公布日 2022.01.18

(73) 专利权人 延边大学

地址 133002 吉林省延吉市公园路977号

(72) 发明人 金京一 王翎力 延光海 麦愉卓

郑明花

(74) 专利代理机构 北京共腾律师事务所 16031

专利代理师 姚星

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110257055 A, 2019.09.20

Jing Liu等. Simultaneous fluorescent imaging of Cys/Hcy and GSH from different emission channels. Chemical Science. 2014, (第08期), 正文第3184-3186页.

审查员 冯凤珍

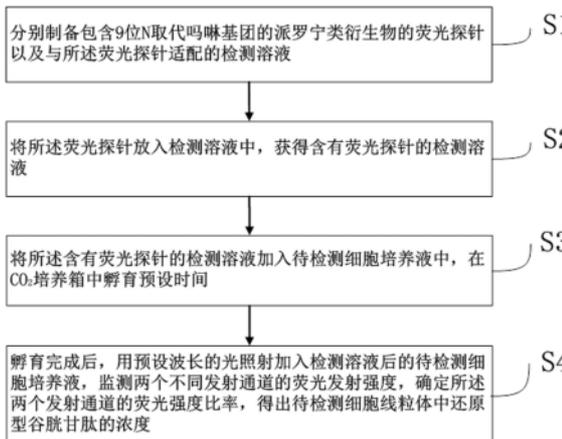
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

#### (54) 发明名称

一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法

#### (57) 摘要

本发明提供了一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,属于生物分析化学技术领域,解决了现有技术无法精准测定正常细胞线粒体中GSH浓度的问题。该方法包括如下步骤:分别制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针以及与所述荧光探针适配的检测溶液;将所述荧光探针放入检测溶液中,获得含有荧光探针的检测溶液;将含有荧光探针的检测溶液加入待检测细胞培养液中,在CO<sub>2</sub>培养箱中孵育预设时间;孵育完成后,用预设波长的光照射加入检测溶液后的待检测细胞培养液,监测两个不同发射通道的荧光发射强度,确定所述两个发射通道的荧光强度比率,得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。实现了检测精度可达 $10 \times 10^{-9}$  mol/L数量级。



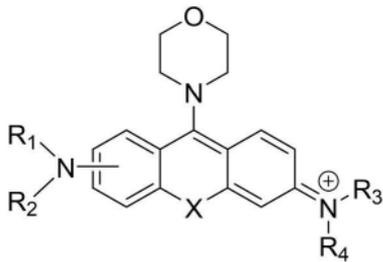
1. 一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,包括如下步骤:  
分别制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针以及与所述荧光探针适配的检测溶液;

将所述荧光探针放入检测溶液中,直到获得荧光探针浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L的检测溶液,在对检测溶液进行除氧;

将所述含有荧光探针的检测溶液加入待检测细胞培养液中,在CO<sub>2</sub>培养箱中孵育预设时间;

孵育完成后,用预设波长的光照射加入检测溶液后的待检测细胞培养液,监测两个不同发射通道的荧光发射强度,确定所述两个发射通道的荧光强度比率,得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度;并且,

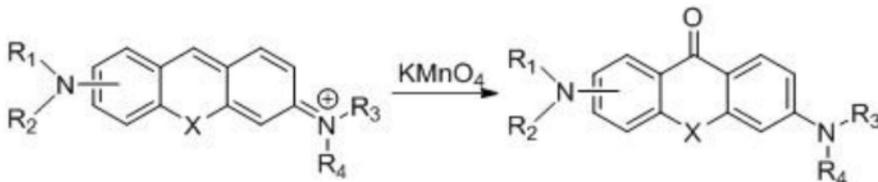
所述9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的分子式为



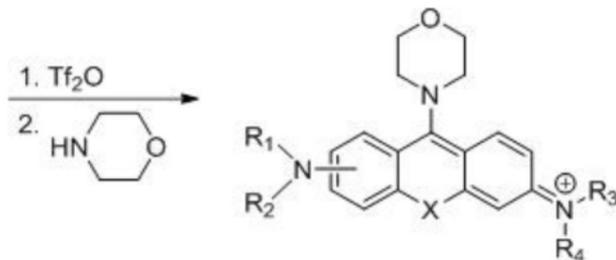
其中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种,X为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种。

2. 根据权利要求1所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,通过如下方法制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针:

根据下面反应式一,从派罗宁衍生物经高锰酸钾KMnO<sub>4</sub>氧化制备派罗宁氧酮;



根据下面反应式二,将制备的派罗宁氧酮在三氟磺酸酐Tf<sub>2</sub>O(1)的作用下,与吗啉(2)反应,得到包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针



其中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种,X为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种。

3. 根据权利要求2所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,所述检测溶液为去氧的二次蒸馏水和二甲亚砜的混合溶液,或者去氧的二次蒸馏水、磷

酸缓冲盐溶液、HEPES缓冲溶液与二甲亚砜的混合溶液。

4. 根据权利要求3所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,通过如下步骤获得与所述荧光探针适配的检测溶液:

制备去氧的二次蒸馏水;

将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砜按预设比例进行混合,获得与所述荧光探针适配的检测溶液。

5. 根据权利要求4所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,所述预设比例为二次蒸馏水和液态二甲亚砜的容积比为99:1 ~ 999:1。

6. 根据权利要求3或4所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砜按预设比例进行混合后,还加入预设剂量的曲拉通X-100作为助剂,获得最终的与所述荧光探针适配的检测溶液。

7. 根据权利要求3-5任一项所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砜按预设比例进行混合后,还加入预设剂量的维生素C作为稳定剂,获得最终的与所述荧光探针适配的检测溶液。

8. 根据权利要求7所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,孵育的预设时间为20 ~ 30min。

9. 根据权利要求1-5任一项所述的活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,其特征在于,确定所述两个发射通道的荧光强度比率后,通过如下步骤得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度:

根据事先标定的荧光强度比率-还原型谷胱甘肽含量的标准曲线,确定该曲线上所述两个发射通道的荧光强度比率对应的还原型谷胱甘肽含量,作为待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度;或者,

将所述两个发射通道的荧光强度比率输入事先训练好的深度学习网络中,获得待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。

## 一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物分析化学技术领域,尤其涉及一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法。

### 背景技术

[0002] 还原型谷胱甘肽(GSH)是一种重要的内源性生物还原剂,在维持细胞正常生理功能、氧化应激、铁死亡等过程中起着重要的调节作用。GSH在HeLa细胞、A549等多种癌细胞中具有较高的含量(0.5~10mM),其浓度变化直接关系癌细胞的存活率。目前,已有多种荧光探针分子用于癌细胞中GSH含量的测定(X.Jiang,J.Chen,A. **Bajić**,et al.Nat.Comm., 2017,8,16087.)。

[0003] 现有技术并无正常细胞线粒体中GSH的测定方法。目前市售的GSH检测试剂盒只能测定生物组织检材中的GSH整体含量,由于精度较低,并不能对单细胞线粒体中GSH的含量进行检测。而且,正常细胞受外界刺激,如人肺上皮细胞受到PM2.5等超细颗粒物的作用,进而引起线粒体GSH的动态变化,是细胞正常或病理状态的重要表征。

[0004] 因此,在医学、细胞生物学、化学生物学、毒理学等相关科学领域中,非常有必要建立一种简便、快速、实时检测活细胞存活状态下线粒体GSH浓度的测定方法。

### 发明内容

[0005] 鉴于上述的分析,本发明实施例旨在提供一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,用以解决现有技术无法精准测定正常细胞线粒体中GSH浓度的问题。

[0006] 一方面,本发明实施例提供了一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,包括如下步骤:

[0007] 分别制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针以及与所述荧光探针适配的检测溶液;

[0008] 将所述荧光探针放入检测溶液中,获得含有荧光探针的检测溶液;

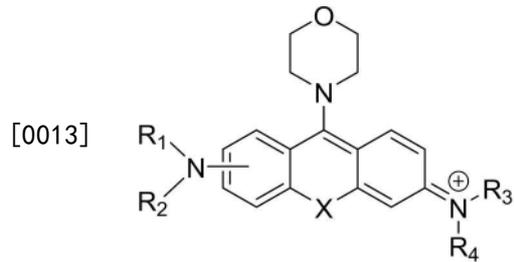
[0009] 将所述含有荧光探针的检测溶液加入待检测细胞培养液中,在CO<sub>2</sub>培养箱中孵育预设时间;

[0010] 孵育完成后,用预设波长的光照射加入检测溶液后的待检测细胞培养液,监测两个不同发射通道的荧光发射强度,确定所述两个发射通道的荧光强度比率,得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。

[0011] 上述技术方案的有益效果如下:公开了一种基于比率荧光法测定活细胞线粒体中GSH浓度的测定方法,具有较好的活细胞线粒体定位功能,可以在(0.01~50.0)×10<sup>-6</sup>mol/L的浓度范围内检测活细胞线粒体GSH含量,简便、快速、实时测定活细胞线粒体内GSH浓度,并监测其变化动态。与目前市场上出售的比色型GSH试剂盒比较,上述技术方案的检测精度更高,并且,通过采用比率荧光法进行定量,避免了探针的浓度误差、光漂白和背景干扰等问题。另外,现有技术的线粒体GSH探针基本主要是对癌细胞的测量,本方法由于检测精度

更高,可对正常活细胞线粒体中GSH浓度进行定量,广泛适用于如炎症、神经退行性疾病等非肿瘤类疾病的细胞研究,以及传统的基质、血清、血液、尿液、细胞和组织样本的GSH检测。

[0012] 基于上述方法的进一步改进,所述9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的分子式为

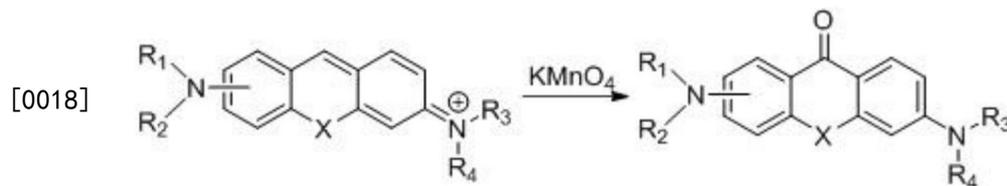


[0014] 其中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种, $X$ 为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种。

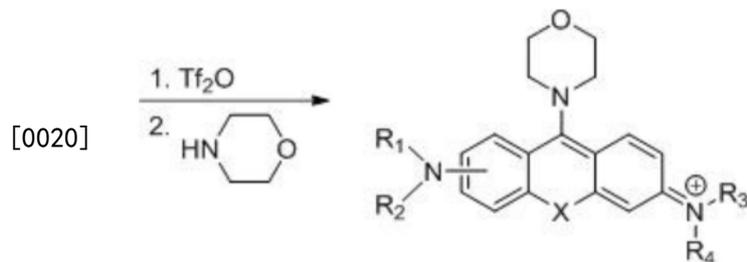
[0015] 上述进一步改进方案的有益效果是:上述荧光探针在细胞线粒体定位后,与GSH结合前后具有两个不同的荧光发射波长(可通过试验确定,在特定波长的光激发下,具有不同波长的两个荧光发射具有各自的荧光发射强度)。并且,该分子结构的探针的毒性较小,GSH检测精度可以达到 $10 \times 10^{-9}$  mol/L数量级,与GSH的响应时间相对迅速,能用于活细胞线粒体中GSH的简便、快速测定;而且,具备对GSH的可逆响应能力,可以用于监测活细胞线粒体内GSH的变化动态。

[0016] 进一步,通过如下方法制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针:

[0017] 根据下面反应式一,从派罗宁衍生物经高锰酸钾 $KMnO_4$ 氧化制备派罗宁氧酮;



[0019] 根据下面反应式二,将制备的派罗宁氧酮在三氟磺酸酐 $Tf_2O$ 的作用下,与吗啉反应,得到包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针



[0021] 其中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种, $X$ 为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种。

[0022] 上述进一步改进方案的有益效果是:制备了一种高效检测的荧光探针。

[0023] 进一步,所述检测溶液为去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷的混合溶液,或者去氧的

二次蒸馏水、磷酸缓冲盐溶液、HEPES缓冲溶液与二甲亚砷的混合溶液。

[0024] 上述进一步改进方案的有益效果是：对检测溶液的成分进行了限定。只有在上述成分的检测溶液中，检测精度才能持续保持较高的水平。

[0025] 进一步，通过如下步骤获得与所述荧光探针适配的检测溶液：

[0026] 制备去氧的二次蒸馏水；

[0027] 将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合，获得与所述荧光探针适配的检测溶液。

[0028] 上述进一步改进方案的有益效果是：对检测溶液的配置方法进行了限定。使用上述检测溶液，不需要对细胞等生物样品进行前期的蛋白纯化工作，能够直接作用于活细胞样本，减少了测量步骤，降低了工作强度和配套仪器要求，大大降低了测量成本。

[0029] 进一步，所述预设比例为二次蒸馏水和液态二甲亚砷的容积比为99:1 ~ 999:1。

[0030] 上述进一步改进方案的有益效果是：对检测溶液的成分混合比例进行了限定，有利于节约制备成本。

[0031] 进一步，将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合后，还加入预设剂量的曲拉通X-100作为助剂，获得与所述荧光探针适配的检测溶液。

[0032] 上述进一步改进方案的有益效果是：通过加入曲拉通X-100作为助剂，可以进一步提高探针的细胞膜通过性。

[0033] 进一步，将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合后，还加入预设剂量的维生素C作为稳定剂，获得与所述荧光探针适配的检测溶液。

[0034] 上述进一步改进方案的有益效果是：通过加入维生素C作为稳定剂，可以提高探针与GSH的结合效率。

[0035] 进一步，孵育的预设时间为20 ~ 30min；并且，

[0036] 获得与所述荧光探针适配的检测溶液后，将所述荧光探针放入检测溶液中，直到获得荧光探针浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L的检测溶液，再对所述检测溶液进行除氧。

[0037] 上述进一步改进方案的有益效果是：荧光探针可在20 ~ 30min内与GSH充分反应。通过除氧操作，可以降低测量误差，提高测量精度。

[0038] 进一步，确定所述两个发射通道的荧光强度比率后，通过如下步骤得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度：

[0039] 根据事先标定的荧光强度比率-还原型谷胱甘肽含量的标准曲线，确定该曲线上所述两个发射通道的荧光强度比率对应的还原型谷胱甘肽含量，作为待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度；或者，

[0040] 将所述两个发射通道的荧光强度比率输入事先训练好的深度学习网络中，获得待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。

[0041] 上述进一步改进方案的有益效果是：使用双通道的荧光发射强度比率值，进一步降低了探针光漂白、仪器背景干扰等系统误差。采用了比率荧光法对GSH的含量进行测定，克服了传统比色法和单一荧光强度法中探针光漂白、基线漂移、背景干扰等缺点，降低了测量误差。

[0042] 提供发明内容部分是为了以简化的形式来介绍对概念的选择，它们在下文的具体实施方式中将被进一步描述。发明内容部分无意标识本公开的重要特征或必要特征，也无

意限制本公开的范围。

### 附图说明

[0043] 通过结合附图对本公开示例性实施例进行更详细的描述,本公开的上述以及其它目的、特征和优势将变得更加明显,其中,在本公开示例性实施例中,相同的参考标号通常代表相同部件。

[0044] 图1示出了实施例1活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法的步骤示意图;

[0045] 图2示出了实施例3中9-吗啉-派洛宁的核磁共振氢谱图;

[0046] 图3示出了实施例3中采用9-吗啉-派洛宁对GSH的荧光滴定图;

[0047] 图4示出了实施例3中采用9-吗啉-派洛宁与GSH作用后被活性氧物种(NaOCl)可逆作用返回探针初始状态的荧光进程图;

[0048] 图5示出了实施例3中采用9-吗啉-派洛宁与GSH作用后的荧光比率值与GSH浓度的标准曲线;

[0049] 图6示出了实施例3中采用9-吗啉-派洛宁与市售Mito-Red线粒体定位染料在活的细胞BEAS-2B的线粒体共染图;

[0050] 图7示出了实施例3中采用9-吗啉-派洛宁在活的细胞BEAS-2B的线粒体中的成像图。

[0051] 附图标记:

[0052] Dimethyl Sulfoxide-d<sub>6</sub>-二甲亚砜-d<sub>6</sub>;Probe-探针;

[0053] Excited at 492nm-492nm波长的光激发;

[0054] Fluorescence intensity(a.u.)-荧光强度,单位a.u.;

[0055] Wavelength(nm)-波长,单位nm;

[0056] [GSH]-谷胱甘肽浓度; $I_{554nm}$ -554nm处荧光发射强度;

[0057]  $I_{602nm}$ -602nm处荧光发射强度;

[0058]  $I_{554nm}/I_{602nm}$ -554nm和602nm两个荧光发射强度的比率(比值);

[0059] Ex@488nm-488nm波长的光激发;

[0060] Mito-Red-线粒体定位红色荧光染料;

[0061] Ex@561nm-561nm波长的光激发;

[0062] <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,500MHz,ppm)  $\delta$  = 7.93(d,2H,J=9.4Hz),6.96(d,2H,J=8.4Hz,2.0Hz),6.67(d,2H,J=2.0Hz),4.03-4.08(m,4H),3.90-3.95(m,4H),3.15(s,12H)。

### 具体实施方式

[0063] 下面将参照附图更详细地描述本公开的实施例。虽然附图中显示了本公开的实施例,然而应该理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施例所限制。相反,提供这些实施例是为了使本公开更加透彻和完整,并且能够将本公开的范围完整地传达给本领域的技术人员。

[0064] 在本文中使用的术语“包括”及其变形表示开放性包括,即“包括但不限于”。除非特别申明,术语“或”表示“和/或”。术语“基于”表示“至少部分地基于”。术语“一个示例实施

例”和“一个实施例”表示“至少一个示例实施例”。术语“另一实施例”表示“至少一个另外的实施例”。术语“第一”、“第二”等等可以指代不同的或相同的对象。下文还可能包括其他明确的和隐含的定义。

[0065] 实施例1

[0066] 本发明的一个实施例,公开了一种活细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度测定方法,如图1所示,包括如下步骤:

[0067] S1.分别制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针以及与所述荧光探针适配的检测溶液;

[0068] S2.将所述荧光探针放入检测溶液中,获得含有荧光探针的检测溶液;

[0069] S3.将所述含有荧光探针的检测溶液加入待检测细胞培养液中,在CO<sub>2</sub>培养箱中孵育预设时间;

[0070] S4.孵育完成后,用预设波长的光照射加入检测溶液后的待检测细胞培养液,监测两个不同发射通道的荧光发射强度,确定所述两个发射通道的荧光强度比率,得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。

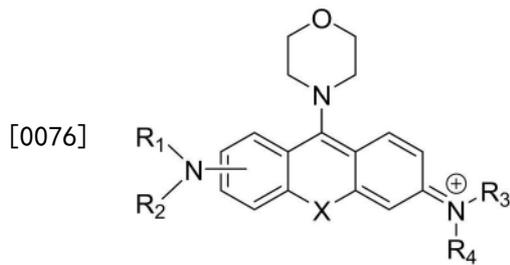
[0071] 上述方法涉及比率荧光分析法的基本原理。具体地,荧光分子是指一个化合物(A),在受到一定波长的光照射时,可在某一特定波长( $\lambda_1$ )发射荧光;A与待检测物种进行特定的化学反应或发生特定的物理效应,获得具有另一特定发射波长( $\lambda_2$ )的产物(B)。两个发射波长( $\lambda_1$ 和 $\lambda_2$ )的强度比值,即比率值,反映了B在检测体系中的浓度值。

[0072] 实施时,9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物具有良好的线粒体靶向定位功能,荧光探针在细胞线粒体定位后,与GSH结合前后的探针具有两个不同的荧光发射波长,这两个不同发射波长的荧光强度比值不受探针浓度、光漂白、基线漂移等误差的影响,能准确地反映活细胞线粒体中GSH的浓度。使用双通道的荧光发射强度比率值,进一步降低了探针光漂白、仪器背景干扰等系统误差。使得上述浓度测定方法的检测精度可达 $10 \times 10^{-9}$ mol/L数量级。

[0073] 与现有技术相比,本实施例公开了一种基于比率荧光法测定活细胞线粒体中GSH浓度的测定方法,具有较好的活细胞线粒体定位功能,可以在 $(0.01 \sim 5.0) \times 10^{-6}$ mol/L的浓度范围内,简便、快速、实时测定活细胞线粒体内GSH浓度,并监测其变化动态。与目前市场上出售的比色型GSH试剂盒比较,上述方法的检测精度更高,并且,通过采用比率荧光法进行定量,避免了探针的浓度误差、光漂白和背景干扰等问题。另外,现有技术的线粒体GSH探针基本主要是对癌细胞的测量,本方法由于检测精度更高,可对正常活细胞线粒体中GSH浓度进行定量,广泛适用于如炎症、神经退行性疾病等非肿瘤类疾病的细胞研究,以及传统的基质、血清、血液、尿液、细胞和组织样本的GSH检测。

[0074] 实施例2

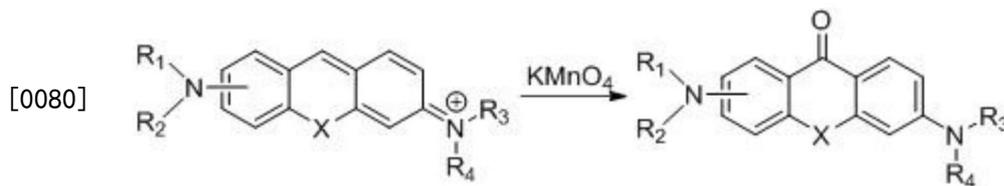
[0075] 在实施例1的基础上进行优化,步骤S1中,所述9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的分子式为



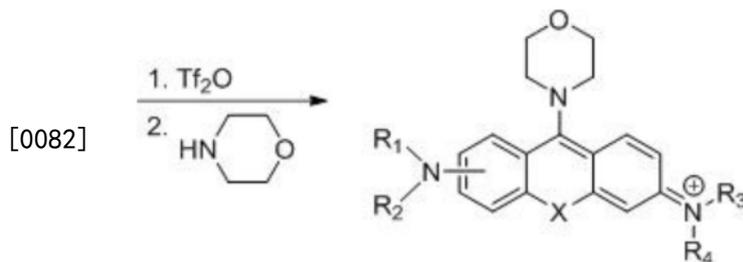
[0077] 其中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种,  $X$  为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种,  $O$  为氧原子,  $N$  为氮原子。

[0078] 优选地, 通过如下方法制备包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针:

[0079] S11. 根据下面反应式一, 从派罗宁衍生物经高锰酸钾  $KMnO_4$  氧化制备派罗宁氧酮;



[0081] S12. 根据下面反应式二, 将制备的派罗宁氧酮在三氟磺酸酐  $Tf_2O$  的作用下, 与吗啉反应, 得到包含9位N-取代吗啉基团的派罗宁类衍生物的荧光探针



[0083] 其中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  独立地选自氢、取代或未取代脂肪烃基、取代或未取代脂环烃基、取代或未取代芳基、取代或未取代杂芳基中的一种,  $X$  为氧原子、偕二甲基或二甲硅基中的一种,  $\text{HN} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O}$  为吗啉。

[0084] 优选地, 步骤S1中, 所述检测溶液为去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷的混合溶液, 或者去氧的二次蒸馏水、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、HEPES缓冲溶液 (HEPES) 与二甲亚砷的混合溶液。

[0085] 优选地, 通过如下步骤获得与所述荧光探针适配的检测溶液:

[0086] S13. 制备去氧的二次蒸馏水;

[0087] S14. 将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合, 获得与所述荧光探针适配的检测溶液;

[0088] S15. 对所述检测溶液进行除氧。优选地, 可采用通氮气20min以上。

[0089] 优选地, 所述预设比例为二次蒸馏水和液态二甲亚砷的容积比为99:1 ~ 999:1。

[0090] 可选地, 步骤S14还可为, 将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合后, 还加入预设剂量的曲拉通X-100作为助剂, 获得与所述荧光探针适配的检测溶液。优

选地,曲拉通X-100的预设剂量不超过5% (质量比)。

[0091] 可选地,步骤S14还可为,将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合后,还加入预设剂量的维生素C作为稳定剂,获得与所述荧光探针适配的检测溶液。优选地,维生素C的预设剂量不超过0.01% (质量比)。

[0092] 可选地,步骤S14还可为,将所述去氧的二次蒸馏水和二甲亚砷按预设比例进行混合后,还加入预设剂量的曲拉通X-100作为助剂,并加入预设剂量的维生素C作为稳定剂,获得与所述荧光探针适配的检测溶液。

[0093] 优选地,步骤S2进一步细化为:获得与所述荧光探针适配的检测溶液后,将所述荧光探针放入检测溶液中,直到获得荧光探针浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L的检测溶液;再对所述检测溶液进行除氧。

[0094] 优选地,步骤S3中,孵育的预设时间为20 ~ 30min。

[0095] 优选地,在特定波长的光激发下,记录两个不同发射通道的荧光发射强度数值,得到两个发射通道的荧光强度比率值。

[0096] 优选地,确定所述两个发射通道的荧光强度比率后,通过步骤S41或步骤S42得出待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度:

[0097] S41.根据事先标定的荧光强度比率-还原型谷胱甘肽含量的标准曲线,确定该曲线上所述两个发射通道的荧光强度比率对应的还原型谷胱甘肽含量,作为待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度;或者,

[0098] S42.将所述两个发射通道的荧光强度比率输入事先训练好的深度学习网络中,获得待检测细胞线粒体中还原型谷胱甘肽的浓度。训练方法本领域技术人员能够理解,不再赘述。

[0099] 与实施例1相比,本实施例提供的探针的细胞毒性较小,GSH检测限可以达到 $10 \times 10^{-9}$  mol/L数量级,与GSH的响应时间相对迅速,能用于活细胞线粒体中GSH的简便、快速测定;而且,所使用的探针分子具备对GSH的可逆响应能力,可以用于监测活细胞线粒体内GSH的变化动态。采用了比率荧光法对GSH的含量进行测定,克服了传统比色法和单一荧光强度法中探针光漂白、基线漂移、背景干扰等缺点,降低了测量误差;而且,不需要对细胞等生物样品进行前期的蛋白纯化工作,能够直接作用于活细胞样本,减少了测量步骤,降低了工作强度和配套仪器要求,大大降低了测量成本。

[0100] 实施例3

[0101] 以荧光探针为9-吗啉-派洛宁材料制成,采用的细胞株为人肺上皮细胞(BEAS-2B),对活的BEAS-2B细胞的线粒体GSH含量进行测定的方法为例,如图2~图7所示,该方法可分为3步骤:

[0102] SS1.取10 $\mu$ L浓度为1mM的探针溶液,加入990 $\mu$ L的二次蒸馏水,振荡1~2分钟,使其混合均匀,得到检测溶液;

[0103] SS2.将荧光探针放入BEAS-2B细胞的培养液中,再取5 $\mu$ L的检测溶液,加入至含BEAS-2B细胞的培养液中,进而在二氧化碳培养箱内标准条件下孵育20min,得到已被探针充分染色的BEAS-2B细胞;

[0104] SS3.在激光共焦荧光显微镜下,以488nm激发光源照射上述已染色的BEAS-2B细胞样本,同时记录500~560nm和600~1000nm两个发射通道的荧光强度( $I_{\text{green}}$ 和 $I_{\text{red}}$ ),得到

$I_{\text{green}}/I_{\text{red}}$ 的数值;

[0105] SS4. 参照标准曲线,如图7所示,可以直接确定活的BEAS-2B细胞线粒体中GSH的含量为 $(1.53 \pm 0.16) \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

[0106] 本领域技术人员可以理解,实现上述实施例方法的全部或部分流程,可以通过计算机程序来指令相关的硬件来完成,所述的程序可存储于计算机可读存储介质中。其中,所述计算机可读存储介质为磁盘、光盘、只读存储记忆体或随机存储记忆体等。

[0107] 以上已经描述了本公开的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。本文中所用术语的选择,旨在最好地解释各实施例的原理、实际应用或对现有技术的改进,或者使本技术领域的其它普通技术人员能理解本文披露的各实施例。

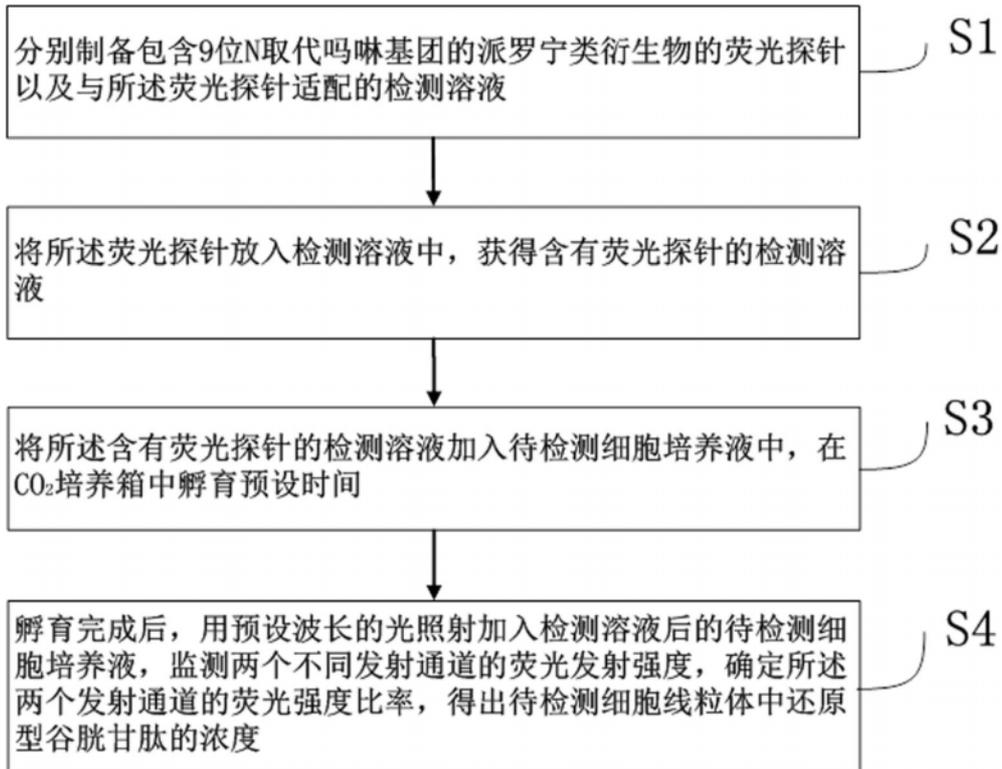


图1

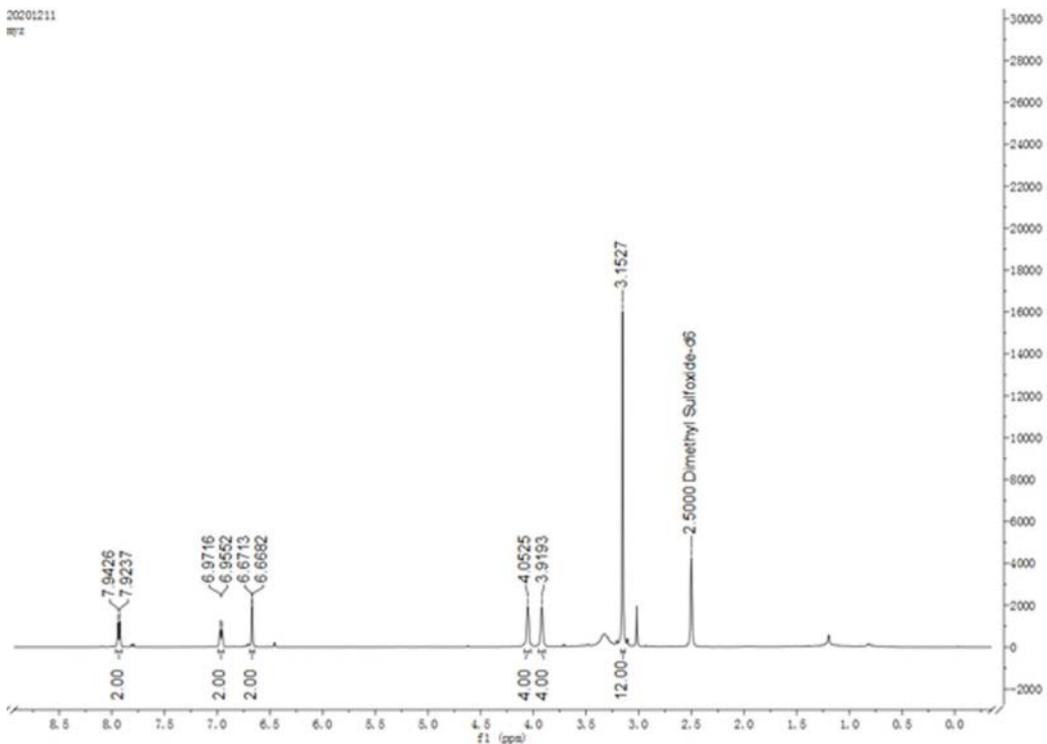


图2

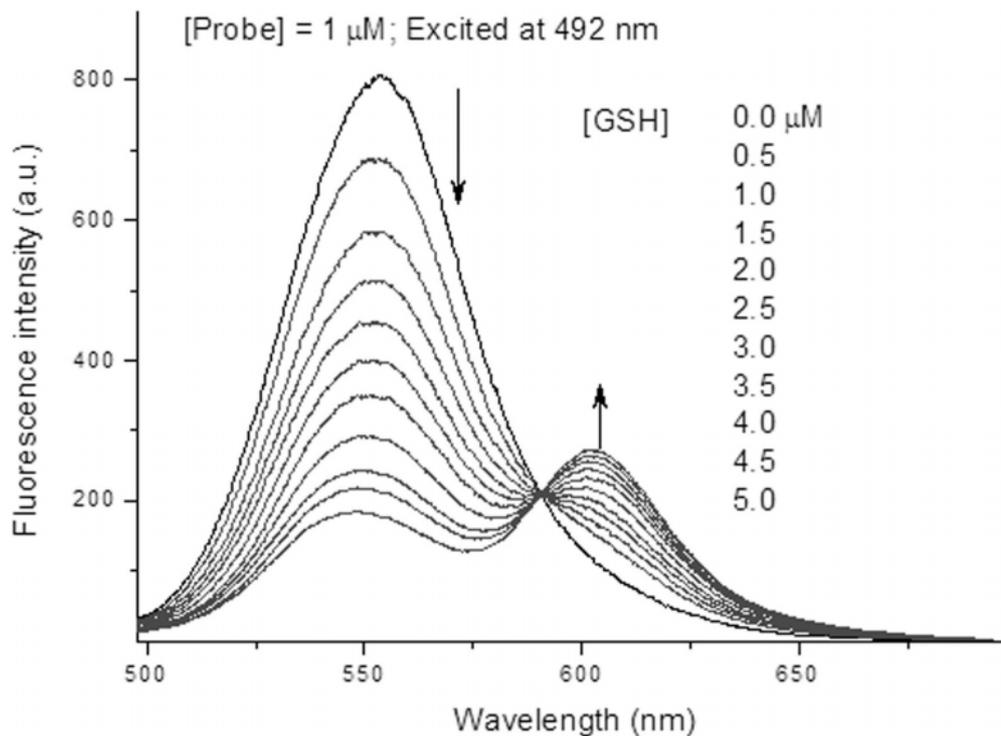


图3

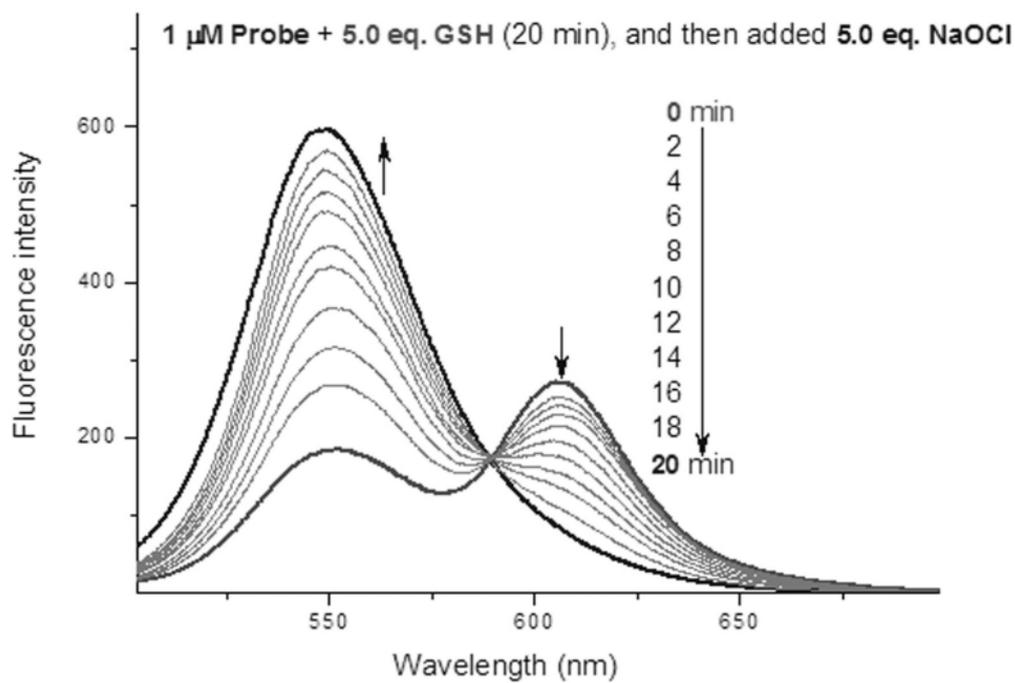


图4

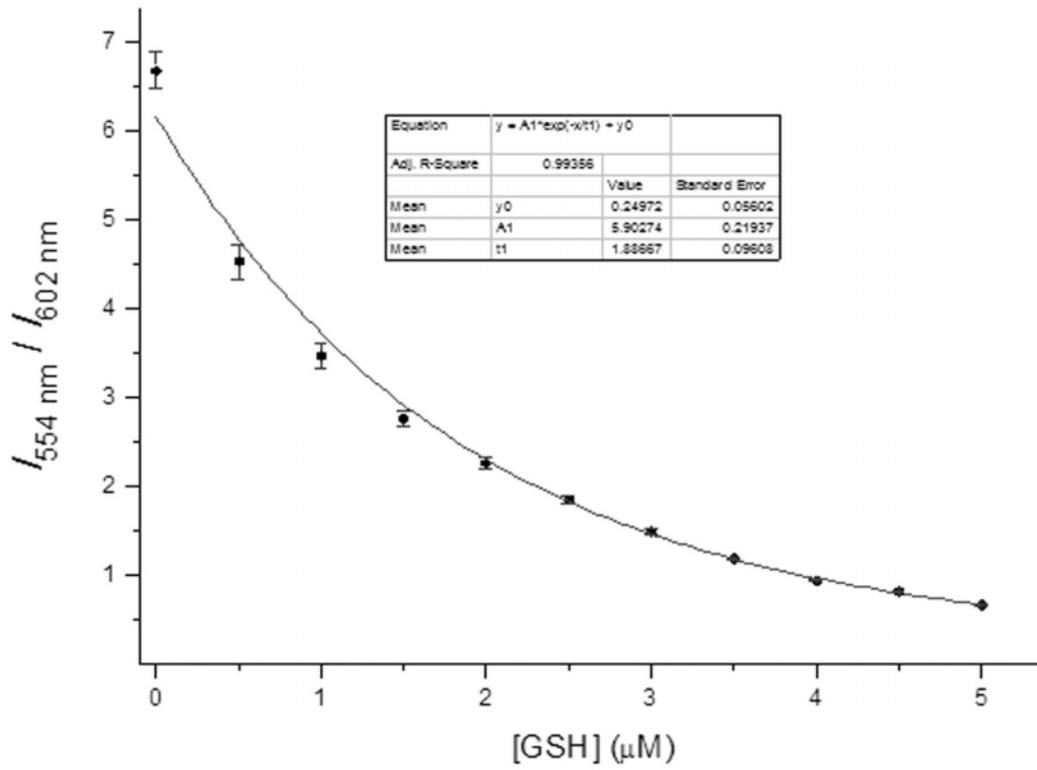


图5

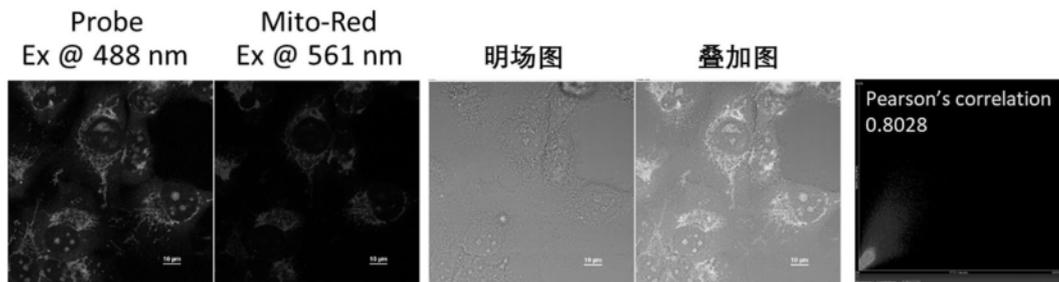


图6

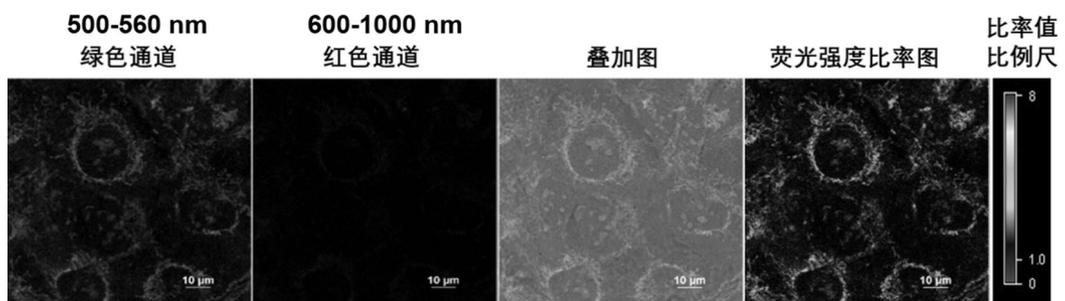


图7