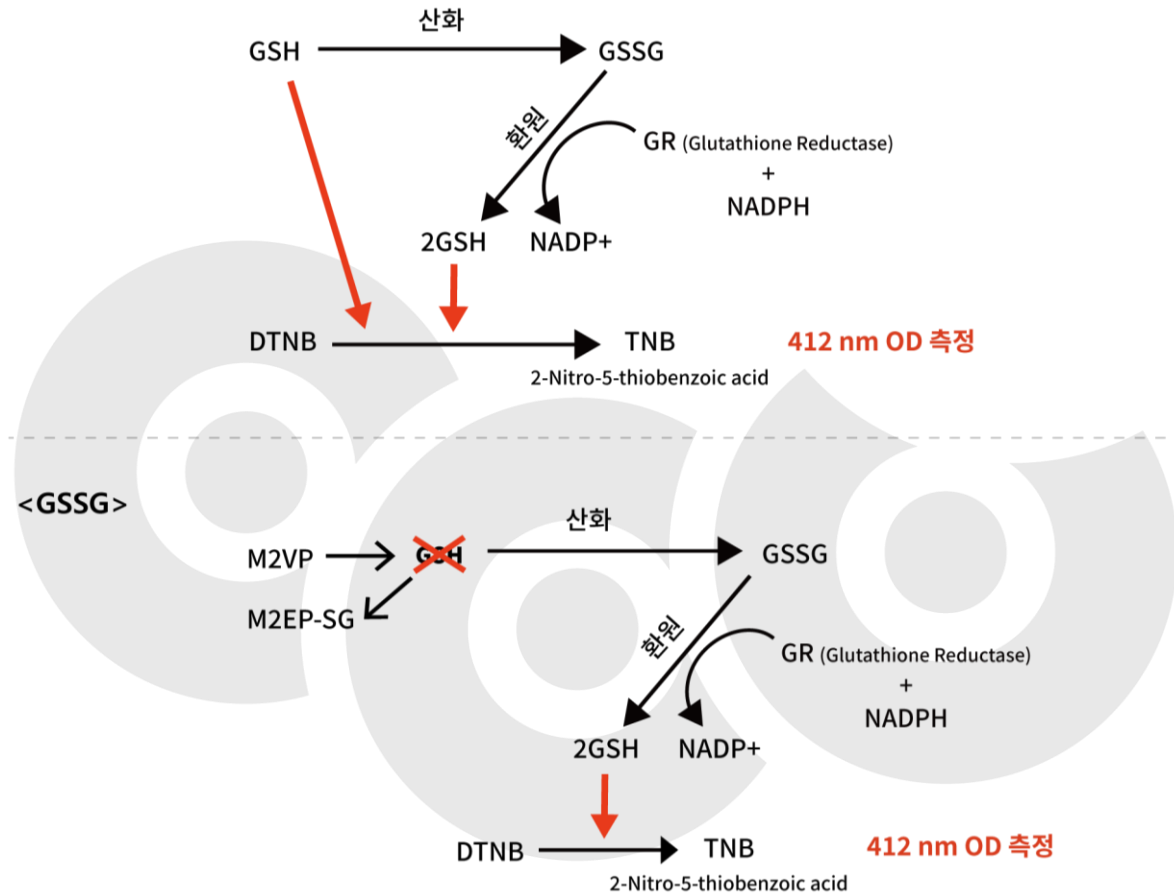


OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit (Colorimetric)

BO-GLU-200, 200 assays

제품 원리

<Total Glutathione>



BIOMAX 사의 OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit는 Sample에 존재하는 Total GSH의 양과 GSSG, GSH의 비율을 측정하기 위한 제품입니다. Total GSH는 산화형인 GSSG가 NADPH, Glutathione Reductase에 의해 2개의 GSH로 환원되고, 환원된 GSH와 기존 Sample 내에 존재하는 GSH가 DTNB와 반응하면서 노란색인 TNB를 형성하여 흡광도 412 nm에서 측정됩니다. 또한, 환원되어 있는 GSH를 Masking Reagent (M2VP)로 먼저 제거하고 산화된 GSSG만을 GSH로 환원시켜 GSSG의 양을 측정할 수 있으며 GSSG/GSH의 비율도 측정 가능합니다.

제품의 구성 및 보관 조건

- 본 제품은 Total (GSH+GSSG), GSSG 각각 분석이 가능합니다.
- 본 제품은 200 assays로, Standard, Blank 등을 제외한 실제 시료 분석은 40 samples (duplication 기준) 가능합니다.

Components	Size	Storage
Assay Buffer	60 ml X 2 Bottles	4°C
GSSG Standard (2 mM)	2 ml X 1 vial	
Glutathione Reductase (GR)	5 ml X 2 Bottle	
NADPH (Lyophilized)	2 vials	
Chromogen (DTNB)	5 ml X 2 vials	
Masking Reagent (M2VP)	2 ml X 1 vial	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 4°C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Microtube
- ▶ Sonicator
- ▶ Colorimetric microplate reader (412 nm Filter)
- ▶ Micro centrifuge (4°C)
- ▶ MPA (Metaphosphoric Acid) : 별도 구매 (Sigma, 239275)하여 사용합니다.

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.
- NADPH : 1 Bottle에 Assay Buffer를 5 ml 넣어 충분히 혼합하여 줍니다. (1 Bottle은 100 assay 사용량입니다.)
사용 전 바로 희석하여 사용합니다.

5% MPA (Metaphosphoric Acid)

MPA 1 g을 D.W. 20 ml에 완전히 녹여 사용합니다. (별도 구매 <Sigma, 239275>하여 사용합니다.)

녹인 용액은 4°C에서 보관 후 사용 합니다. 실험 시 새롭게 만들어 사용합니다.

주의 사항

- ▶ Dithiothreitol (DTT), 2-Mercaptoethanol과 같은 Thiol계 물질이나 Thiol-reactive compounds는 Assay에 관여하는 Chromogen과 Enzyme에 영향을 주므로 Sample 준비 시 주의하시기 바랍니다.
- ▶ *in vitro*에서 GSH는 빠르게 GSSG로 산화되므로 Lysis, Homogenization, Sample freezing step 전에 반드시 Masking Reagent (M2VP)를 처리합니다.
- ▶ Saliva, Plasma or Urine : Saliva, Plasma 및 Urine에서 존재하는 GSSG의 경우 Detection limit 보다 낮을 수도 있습니다. OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit로 이들 샘플에 대한 GSSG의 검출은 권장하지 않습니다.
- ▶ Whole blood의 경우 GSH의 농도가 높으므로 1 : 200 이상 희석하여 사용할 것을 권장합니다.

Sample pre-treatment

Tissues lysate

대부분의 Tissue에서 GSH의 농도는 1~10 mM 범위에 있습니다. Tissue의 경우 Blood를 함유하기 때문에 높은 GSH 농도를 가지고 있어 Tissue를 적출 후 보관 할 때는 1X PBS with 0.16 mg/ml PBS/Heparin 용액에 보관 하길 추천합니다. 사용시 PBS/Heparin 용액으로 깨끗하게 세척 후 물기가 없는 상태에서 Tissue의 무게를 잽니다. 무게를 잦 Tissue는 Ice-cold 5% MPA (~1 ml /100 mg Tissue)에 넣고 Homogenize하여 4°C, 12,000 rpm 에서 15 min 간 Centrifuge한 후, Supernatant를 사용합니다.

Whole blood lysate

Sodium citrate나 Heparin을 함유한 Microtube에 수집합니다. Ice-cold 5% MPA로 혈액 Volume에 대비하여 4배 Volume을 넣어 잘 섞어 줍니다. (예를 들어, Blood sample volume : 100 μ l 일 경우 Ice-cold 5% MPA 400 μ l 넣어 잘 섞어줍니다.) Ice에서 10 min 간 보관 후 4°C, 12,000 rpm에서 10 min 간 Centrifuge하여 Supernatant를 사용합니다.

Erythrocyte lysate

Sodium citrate나 Heparin을 함유한 Microtube에 Blood를 수집한 후, 4°C, 3,000 rpm에서 15 min 간 Centrifuge 한 후, Plasma와 Erythorocytes의 표면에 있는 White buffy coat (Leukocytes)를 제거합니다. 그 후 Ice-cold 5% MPA로 혈액 Volume에 대비하여 4배 Volume을 넣어 잘 섞어 줍니다. (예를 들어, Blood sample volume : 100 μ l 일 경우 Ice-cold 5% MPA 400 μ l 넣어 잘 섞어줍니다.) Ice 에서 10 min 간 보관 후 4°C, 12,000 rpm에서 10 min 간 Centrifuge하여 Supernatant를 사용합니다

Cell lysate

약 $1\sim5 \times 10^6$ cells을 수집한 후, 1X PBS로 세척합니다. Serum이 남아 있는 경우 실험 결과값에 영향을 줄 수 있습니다. 4°C, 12,000 rpm에서 3 min 간 Centrifuge하여 Supernatant를 제거한 후 200~500 μ l의 Ice-cold 5% MPA에 Resuspend 합니다. 세포는 Ice 위에서 Sonicate하거나 Homogenize합니다. 충분히 깎 세 포는 4°C, 12,000 rpm에서 10 min 간 Centrifuge하여 Supernatant를 사용합니다.

Sample preparation

GSSG Sample preparation

- ① Microtube에 Masking Reagent (M2VP) 10 μ l를 넣습니다.
- ② Microtube의 바닥 쪽에 조심스럽게 전 처리된 Sample 100 μ l를 넣은 후 부드럽게 섞어줍니다.
- ③ 혼합한 Sample은 상온에서 2~10 min 간 Incubation 합니다.
(사용 전 혼합한 Sample은 -70 °C에서 보관 가능, 1개월간 안정적임)
- ④ Ice-cold 5% MPA Solution 290 μ l를 넣습니다. (Sample을 1/4로 희석함)
- ⑤ 15 ~ 20 sec 간 Vortexing 하여 섞어 줍니다.
- ⑥ Centrifuge를 이용하여 1000 x g 이상에서 10 min 간 원심분리 합니다.
- ⑦ 상층액 25 μ l와 Assay Buffer 350 μ l를 혼합합니다. (상층액을 1/15로 희석함)
- ⑧ 사용 전까지 Ice에 둔 후 사용합니다. (Sample은 총 1/60 배 희석됨)

GSH Sample preparation

- ① Microtube의 바닥 쪽에 조심스럽게 Sample 50 μ l를 넣습니다.
(사용 전 Sample은 -70 °C에서 보관 가능, 1개월간 안정적임)
- ② Ice-cold 5% MPA Solution 350 μ l를 Microtube에 넣어줍니다. (Sample을 1/8로 희석함)
- ③ 15 ~ 20 sec 간 Vortexing 하여 섞어 줍니다.
- ④ Centrifuge를 이용하여 1000 x g 이상에서 10 min 간 원심분리 합니다.
- ⑤ 상층액 25 μ l 와 Assay Buffer 1.5 ml를 혼합합니다. (상층액을 1/61로 희석함)
- ⑥ 사용 전까지 Ice에 둔 후 사용합니다. (Sample은 총 1/488 배 희석됨)

실험 과정

GSSG Standard preparation

* Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.

* Blank는 Tissue, Whole blood sample의 경우 5 % MPA solution 50 μ l와 Assay Buffer 700 μ l을 혼합하여 사용하고, 그 외 Sample은 Assay Buffer를 사용합니다.

- ① 2 mM GSSG Standard 50 μ l와 Assay Buffer 9.95 ml를 혼합하여 10 μ M GSSG Standard를 만들어 줍니다. 희석한 용액은 Assay Buffer를 이용하여 Microtube 내에서 Serial dilution으로 희석하여 아래 표와 같이 Standard solution을 준비합니다.

No.	Volume of 10 μ M GSSG stock (μ l)	Assay Buffer (μ l)*	GSSG Concentration (μ M)	GSH Concentration (μ M)
1	500	500	5	10
2	500 of NO. 1	500	2.5	5
3	500 of NO. 2	500	1.25	2.5
4	500 of NO. 3	500	0.625	1.25
5	500 of NO. 4	500	0.3125	0.625
6	500 of NO. 5	500	0.15625	0.3125
7	Blank	1000	0	0

GSH standard는 GSSG 1분자가 Glutathione reductase에 의해 2분자의 GSH로 바뀌므로 따로 준비하지 않고, GSSG standard를 농도만 2배하여 사용합니다.

- ② 준비된 Standard, Blank, Sample을 각각 50 μ l/well 씩 96-well Microplate에 넣습니다.
③ Chromogen(DTNB)을 Standard, Blank, Sample well에 50 μ l/well 씩 넣습니다.
④ Enzyme(GR)을 Standard, Blank, Sample well에 50 μ l/well 씩 넣습니다.
⑤ 상온에서 5 min 간 반응시킵니다.
⑥ NADPH를 Standard, Blank, Sample well에 50 μ l/well 씩 넣습니다.
⑦ 412 nm에서 Kinetic mode로 5 min간 흡광을 측정합니다.

결과 분석

① GSSG STD와 GSH STD에서의 각 농도의 시간별 기울기 값을 구합니다.

- OD_{412nm}에서 흡광도 측정시 값의 변화는 선형으로 나타나며, 선형 그래프의 함수는 다음의 식에 결정됩니다.

$$\text{회귀 방정식: } y = ax + b$$

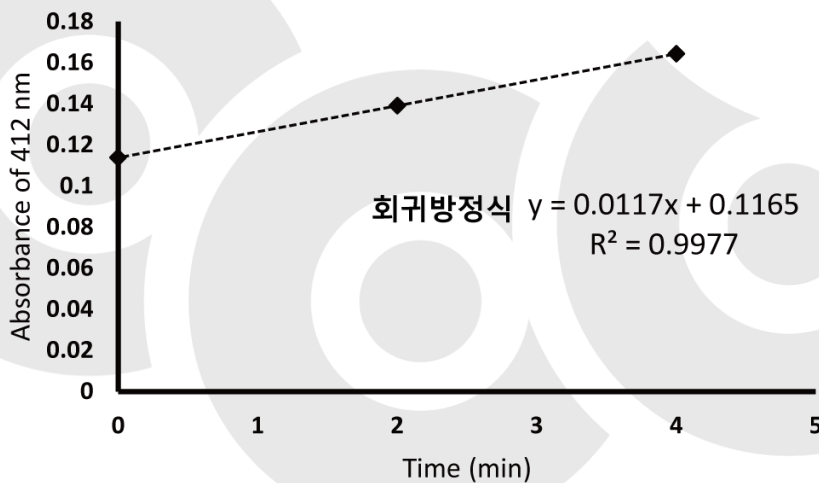
$$y = \text{OD}_{412\text{nm}}$$

$$a = \text{기울기 (slope)}$$

$$x = x \text{ 축 값 (minutes)}$$

$$b = \text{절편}$$

- 절편(b) 값은 DTNB Background와 NADPH 첨가 시점 및 측정 시점의 시간적 차이를 의미하는 것으로 제외할 수 있습니다.



GSH, GSSG의 0 μM 시간별 그래프이며 이 그래프의 기울기 (Slope)는 0.0117입니다.

㉔ 각 농도의 기울기 값(㉓)에서 0 μ M에서의 기울기 값을 빼줍니다.

Table 1. Net Blank Slope

Standard		Time (min)			Slope (㉓)	Net Blank Slope (㉔)
GSH (μ M)	GSSG (μ M)	0	2	4		
Blank		0.1158	0.1411	0.1625	0.011675	0
0.312	0.156	0.1195	0.168	0.2169	0.02435	0.012675
0.62	0.313	0.1232	0.2094	0.2756	0.0381	0.026425
1.25	0.625	0.1332	0.2477	0.3538	0.05515	0.043475
2.5	1.25	0.1505	0.3832	0.6029	0.1131	0.101425
5	2.5	0.1905	0.6205	0.9863	0.19895	0.187275
10	5	0.2792	1.0597	1.7098	0.35765	0.345975



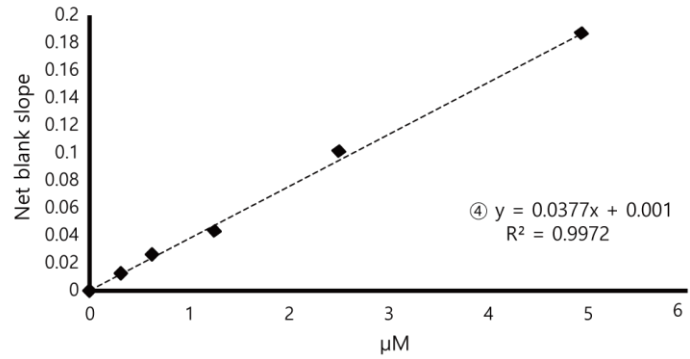
③ GSH, GSSG STD 에서 구한 Net blank slope 값(②)을 이용하여 선형 그래프를 그립니다.

[GSH Calibration curve. GSSG Calibration curve.]

④ ③ 선형 그래프의 함수를 그려줍니다.

Calibration curve of GSH	
GSH (μM)	Net Blank Slope
0	0
0.312	0.012675
0.626	0.026425
1.25	0.043475
2.5	0.101425
5	0.187275
10	0.345975

③ Calibration curve of GSH



Calibration curve of GSSG	
GSSG (μM)	Net Blank Slope
0	0
0.156	0.012675
0.313	0.026425
0.625	0.043475
1.25	0.101425
2.5	0.187275
5	0.345975

③ Calibration curve of GSSG

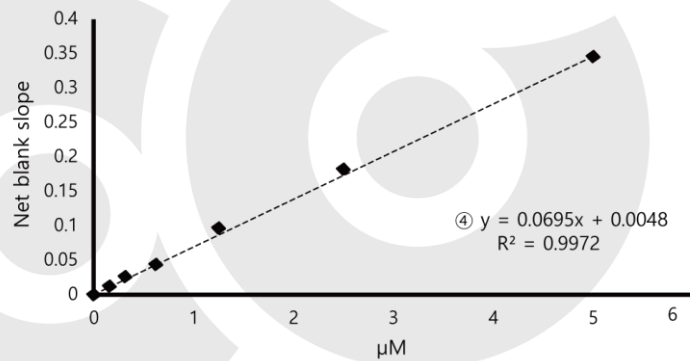


Table 1.에서의 Net blank slope 값만 표시한 표이며, Max con.은 5 μM 까지만 표시한 표입니다.

⑤ GSSG sample 과 Total GSH sample 의 시간별 기울기 값을 구합니다.

예) GSSG sample 의 시간별 기울기 = 0.0244

Total GSH sample 의 시간별 기울기 = 0.0381

⑥ GSSG sample 또는 GSH sample 기울기를 GSH Calibration curve, GSSG Calibration curve 를 이용하여 GSH 농도값(μM)과 GSSG 농도값(μM)을 각각 구합니다.

예) GSSG

$$0.0244 = 0.0695x + 0.0048$$

$$x = (0.0244 - 0.0048) / 0.0695$$

$$= 0.282$$

GSSH 농도값 (μM) = 0.282 (μM)

Total GSH

$$0.0381 = 0.0377x + 0.001$$

$$x = (0.0381 - 0.001) / 0.0377$$

$$= 0.984$$

Total GSH 농도값 (μM) = 0.984 (μM)

⑦ 각각의 농도값에 희석배수를 곱해줍니다.

- Datasheet 앞 Sample preparation 과정에서 희석된 배수입니다.

GSSG 농도값 X 60 : Sample에서의 GSSG 양

Total GSH 농도값 X 488 : Sample 에서의 Total GSH 양

예) Sample에서의 GSSG 양

$$0.282 \times 60 = 16.92$$

Sample에서의 Total GSH 양

$$0.984 \times 488 = 480.2$$

⑦ GSH/GSSG Ratio 는 다음 공식과 같이 계산하여 값을 구합니다.

$$\text{Ratio} = (\text{Total GSH} - 2 \times \text{GSSG}) / \text{GSSG}$$

$$\text{예) } (480.2 - 2 \times 16.92) / 16.92 = 26.4$$

Related products

- BO-TAC-200	OxiTec™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)
- BO-DPPH-200/500	OxiTec™ DPPH Assay Kit (Colorimetric)
- BO-TBR-200	OxiTec™ TBARS Assay Kit (Colorimetric)
- BO-SOD-250/500	OxiTec™ SOD Assay Kit (Colorimetric)
- BO-CAT-400	OxiTec™ Catalase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BO-PER-500	OxiTec™ Hydrogen Peroxide/peroxidase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BO-GLU-T100	OxiTec™ Total Glutathione Assay Kit (Colorimetric)

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 **MSDS**를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note