

EZ-Glutathione Assay Kit

(GSH/GSSG, Total) Colorimetric

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-GLU200

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Tri-Peptide (γ -glutamyl cysteinyl glycine)인 Free Thiol-Group을 가지는 환원형 글루타티온(Reduced glutathione, GSH)은 glutathione peroxidase(GPx)에 의해 물과 알코올을 과산화물(Hydrogen peroxide)과 지질 과산화물(Lipid hydroperoxide)로 분해하는 반응에 관여하며, 인체 조직에서 중요하게 작용하는 산화 방지제(antioxidant)로 알려져 있습니다. 이 반응에서 GSH는 산화된 글루타티온(Oxidized glutathione, GSSG)으로 변화하게 되며, 변화된 GSSG는 glutathione reductase (GR)과 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)에 의해 GSH로 환원됩니다.

동물세포가 산화적 스트레스(oxidative stress)에 노출되면, GSSG가 축적되고 상대적으로 GSH/GSSG의 비율은 감소합니다. 이때 측정되는 GSSG 양이나 GSH/GSSG 비율은 산화적 스트레스를 측정할 수 있는 정확한 지표로 사용될 수 있으며, 산화적 스트레스 조절 효과를 모니터링하는 실험에서 효과적으로 사용할 수 있습니다.

조직 내에서 GSSG의 양은 매우 적게 존재하고 GSSG를 측정하기 위한 준비 과정에서 GSSG에서 GSH로 환원되는 것을 막을 수 있는 효과적인 방법이 없기 때문에 GSSG의 측정은 매우 어렵습니다. GSSG를 측정하기 위하여 GSH를 제거하기 위해 N-ethylmaleimide(NEM)가 처음으로 발견되었습니다. 하지만 NEM은 GSH와 반응하여 안정한 복합체 형성을 하는 반면, GR(Glutathione Reductase)과 일어나는 효소적 반응을 저해하는 단점을 가집니다. 이러한 단점을 개선한 물질로 GR을 저해하지 않고, GSH를 형성할 수 있는 2-vinylpyridine(2-VP)를 발견되었습니다. 그러나 2-VP 반응은 비교적 느리게 일어나며, 수용성 용매와는 낮은 용해성을 가지는 단점이 가지고 있습니다.

(주)두젠바이오(DoGENBIO Co. Ltd.)의 EZ-Glutathione(GSH/GSSG, Total) Assay Kit는 thiol-scavenging reagent인 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulfonate¹ (M2VP)를 사용하여 기존 물질들의 단점을 보완하며, 짧은 반응 시간에 GSH를 Masking, GR과의 반응을 방해하지 않아 정확한 측정이 가능한 제품입니다.

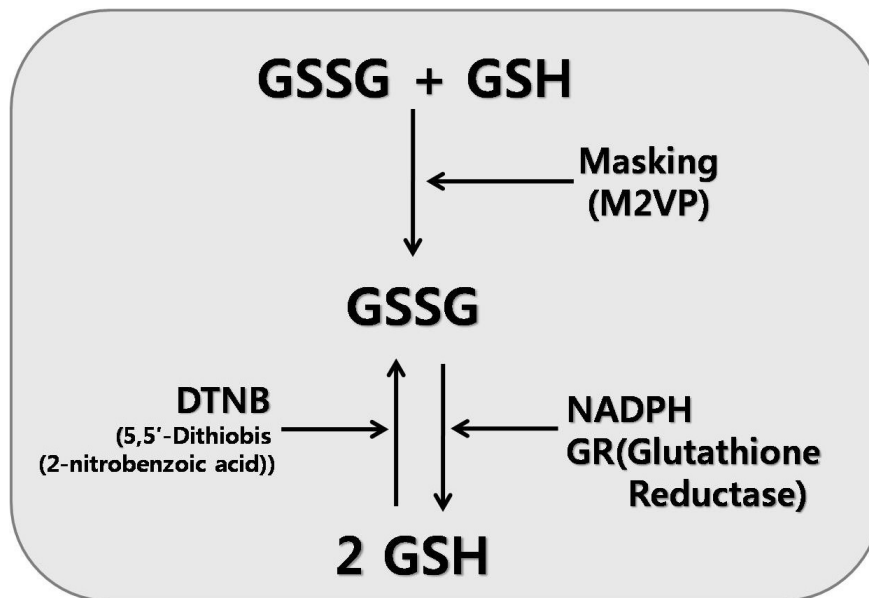


Fig 1. Detection mechanism with EZ-Glutathione assay kit

GSSG 측정은 GSH를 GSSG로 산화된 후, Ellman's reagent(5,5'- dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)와 반응하여 측정합니다.

EZ-Glutathione(GSH/GSSG, Total) Assay Kit는 반응 동안 일어나는 색의 변화를 측정하며, 이러한 색의 변화는 GSH와 GSSG의 농도 변화에 비례하며 일어납니다.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Components	200 assay	
Assay Buffer I	1 Bottle	60 ml
Assay Buffer II	1 Bottle	60 ml
Standard (GSSG Standard)	2 vials	2 ml X 2
Enzyme (GR, Glutathione Reductase)	2 vials	5 ml X 2
NADPH (Lyophilized powder)	2 vials	
Chromogen (DTNB)	2 vials	5 ml X 2
Masking Reagent (M2VP)	2 vials	2 ml X 2

* 개봉 전 Kit 는 4°C에서 보관하십시오.

▪ Preparation of Solution

Solution	Preparation	Storage
NADPH	1 Vial에 Assay Buffer II를 5 ml 넣고 충분히 혼합하여 줍니다. (1 vials은 약 100 test 사용량입니다.)	사용 전 바로 희석하여 사용 하십시오.
5 % MPA (Metaphosphoric Acid)	MPA 1 g을 D.W 20 ml에 완전히 녹여 사용합니다. (별도 구매 <Sigma, 239275>하여 사용합니다.)	녹인 용액은 4°C에서 차갑게 보관 후 사용합니다. 실험 시 새롭게 만들어 사용 하십시오.

▪ Interference

Sample Preparation

** 실험에 사용되는 샘플은 종류와 목적에 따라 처리방법을 달리 하여 준비하여 합니다. 모든 샘플은 즉시 측정하기를 권장 드립니다. 그렇지 못할 경우에는 -80 °C 냉동 조건에서 최대 1 ~ 2 개월 정도 보관 가능합니다. 샘플 내에서 GSH는 빠르게 반응하여 다양한 이황화물을 계속 생성하기 때문에 가능한 빨리 처리하는 것을 권장 드립니다. 모든 샘플의 처리 시 5% MPA를 처리하여 간섭 단백질 및 효소들을 제거하고 안정성을 높여야 합니다. 또한 실험의 다양성으로 인해 샘플 처리 시 제시하는 방법이 정확하지 않을 수 있습니다. 꼭 예비 실험을 진행하여 주세요.

1. Cell Lysate

- 세포 용해 시 GSH는 빠르게 산화됩니다. In Vitro 상에서 GSH에서 GSSG로의 산화를 최소화하기 위해서는 세포를 lysis 또는 homogenization 하기 전에 Masking reagent(M2VP)를 처리해야 합니다.

2. Tissues

- in vitro 상에서 산화된 GSH를 측정하기 위해서는 M2VP를 넣고 최대한 빠르게 실험을 진행 하십시오.
- GSSG 측정값은 매우 적을 수 있습니다. (많이 washing 된 경우 일어날 수 있습니다.)
- γ -Glutamyltranspeptidase는 GSH의 대사 작용으로 나타납니다. 신장, 췌장, 모양체, 맥락막망, 장표피, 담관 상피 세포, 임파상 세포, 암세포 등의 Membrane에서 높게 나타날 수 있습니다.

3. Whole Blood

- Freezing Step : 동결 단계 시 적혈구를 용해 시켜 샘플 내 GSSG의 농도를 최대화 시킵니다.
- Frozen Samples : 전처리 없이 동결된 혈액 샘플에 Masking Reagent(M2VP)를 처리 하여 GSSG를 측정을 할 경우 부정확 할 수 있습니다.
- GSH Linearity(직선화 측정) : whole blood 내의 GSH는 높은 농도로 존재 하고 있기 때문에 최소한 약 244배 정도 희석하여 사용 하십시오.

- Sample Stability (안정화) : Glutathione과 산화된 Glutathione 는 4 °C에서 24시간 보관된 상태의 세포에서는 비교적 안전합니다. 적혈구 내의 높아진 GSSG의 안정성은 확인되지 않았으므로, M2VP 처리된 혈액 샘플은 사용 후 가능한 빨리 냉동하십시오.

Limitations (제한사항)

- 샘플내 Cysteine, dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol, 등과 같은 thiol계 물질이 있는 경우 반응 간섭이 일어나 정확한 측정이 어렵습니다.
- 이 분석은 혈액응고 방지제인 EDTA를 첨가한 whole blood에서 측정 가능합니다.

Assay Performance

측정된 곡선 그래프는 직선화 되어야 합니다. 그렇지 않을 경우, 일반적으로 GSH의 농도가 높다는 것을 의미합니다. 샘플을 희석한 후 다시 진행하십시오. 보정된 곡선도 그래프도 직선화 되어야 합니다.

■ General Protocol

1. Sample Preparation

1) Cell Lysate

- 트립신(Trypsin) 처리하여 분리한 세포를 PBS로 2~3회 세척하여 남아있는 media 및 PBS를 완전히 제거합니다. 대략, $1 \sim 5 \times 10^6$ 세포 당 차가운 5% MPA 200 ~ 500 μ l을 넣어 세포를 현탁합니다. 세포 현탁액은 얼음위에서나 차가운 상태에서 sonicate하거나 homogenize합니다. 충분히 처리한 세포 현탁액은 4 °C, 12,000 rpm, 10 min 간 centrifuge하여 상층액을 사용합니다. 즉시 사용할 경우 얼음위에서 사용하거나 그렇지 않을 경우 -80 °C 넣어 바로 보관하십시오.

2) Tissues

- 대부분의 조직에서의 GSH는 약 1 ~ 10 mM 범위 내에 존재합니다. 조직 적출 후 남아있는 혈액 성분은 높은 GSH의 농도로 인해 정확한 측정을 방해할 수 있습니다. 조직 적출 후에는 PBS/heparin 용액에 보관을 권장 드립니다. 이후, 0.16 mg/mL의 heparin이 들어 있는 PBS로 여러 번 세척해 줍니다. 세척된 조직은 PBS/heparin 용액을 완전히 제거한 후 조직 약 100 mg 당 차가운 5% MPA 용액 1mL을 넣고 homogenize합니다. 균질화 후 4 °C, 12,000 rpm, 10 min 간 centrifuge하여 상층액을 사용합니다. 즉시 사용할 경우 얼음위에서 사용하거나 그렇지 않을 경우 -80 °C 넣어 바로 보관하십시오.

3) Whole Blood

- Sodium citrate 또는 heparin과 같은 항응고제가 들어있는 튜브에 blood샘플을 수집합니다. 모아진 샘플 양의 차가운 5% MPA를 약 4배를 넣어 희석합니다. 이후 얼음 위에서 10분간 반응 후, 4 °C, 12,000 rpm, 10 min 간 centrifuge하여 상층액을 사용합니다. 즉시 사용할 경우 얼음위에서 사용하거나 그렇지 않을 경우 -80 °C 넣어 바로 보관하십시오.

4. Erythrocyte Lysate

- Sodium citrate 또는 heparin과 같은 항응고제가 들어있는 튜브에 blood샘플을 수집합니다.

4 °C, 3,000 rpm, 15 min 간 centrifuge 한 후, 상층액과 white buffy coat(leukocyte) 등을 제거합니다. 완전히 제거한 샘플에 약 4배의 차가운 5% MPA를 넣어 희석합니다. 이후 얼음 위에서 10분간 반응하고, 4 °C, 12,000 rpm, 10 min 간 centrifuge하여 상층액을 사용합니다. 즉시 사용할 경우 얼음위에서 사용하거나 그렇지 않을 경우 -80 °C 넣어 바로 보관하십시오.

5. Saliva, Plasma, Urine

- Saliva, Plasma, Urine 내에 존재하는 GSSG의 경우 본 제품으로 측정이 어려울 수 있습니다. 측정을 권장하지 않습니다.

2. GSSG Standard Preparation

GSSG Standard 용액(10 μ M)을 Assay Buffer I를 이용하여 Serial Dilution으로 희석(1 : 1 희석)하여 standard를 준비합니다.

(희석하지 않은 GSSG Standard의 stock solution의 농도는 10 μ M 입니다.)

1) 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것이 좋습니다.

2) Standard는 실험 시 마다 측정하시기 바랍니다.

3) Blank

① 세포, 조직, 혈액 샘플 사용 시 : 5 % MPA solution 50 μ l와 Assay Buffer I 700 μ l을 혼합하여 사용 합니다.

② 그 외 샘플 사용 시 : Assay Buffer I을 사용 합니다.

4) GSSG standard 희석 시 각 농도 별로 충분히 희석하여 필요량을 사용하시는 것이 좋습니다.

No	GSSG, μ M	GSH, μ M
1	0.000	0.000
2	0.156	0.313
3	0.313	0.625
4	0.625	1.250
5	1.250	2.500
6	2.500	5.000
7	5.000	10.000
8	10.000	20.000

Table 1. protocol for GSSG standard curve.

(* GSH Standard의 경우 GSSG로 Standard curve를 그린 후 농도만 2배하여 사용합니다.)

2. GSSG Sample Preparation

- 1) Micro Centrifuge Tube에 Masking Reagent (M2VP) 10 μl 를 넣습니다.
- 2) tube의 바닥 쪽에 조심스럽게 실험 샘플 100 μl 를 넣습니다.
- 3) 부드럽게 섞어줍니다.
- 4) 사용하지 않는 샘플은 -70 °C에서 냉동하여 보관합니다. (약 30일 정도 안정함.)
- 5) 사용할 샘플은 상온에서 약 10 분간 incubation 합니다.
- 6) 차가운 5% MPA Solution 290 μl 를 넣습니다.
- 7) 15 ~ 20 초간 vortexing 하여 섞어 줍니다.
- 8) Centrifuge를 이용하여 1000 x g 이상에서 10분간 원심분리 합니다.
- 9) 상층액 50 μl 와 Assay buffer II 700 μl 를 혼합합니다.
- 10) 사용 전까지 ice에 둔 후 사용합니다. (샘플은 총 1/60 배 희석됨)

3. GSH Sample Preparation

- 1) Micro Centrifuge Tube의 바닥 쪽에 조심스럽게 샘플 50 μl 를 넣습니다.
- 2) 사용하지 않는 샘플은 -70 °C에서 냉동하여 보관합니다. (약 30일 정도 안정함.)
- 3) 사용할 샘플은 차가운 5% MPA Solution 350 μl 를 tube에 넣어 줍니다.
- 4) 15 ~ 20 초간 vortexing 하여 섞어 줍니다.
- 5) Centrifuge를 이용하여 1000 x g 이상에서 10분간 원심분리 합니다.
- 6) 상층액 50 μl 와 Assay buffer I 3 ml 를 혼합합니다.
- 7) 사용 전까지 ice에 둔 후 사용합니다. (샘플은 총 1/488 배 희석됨)

4. Assay

- 1) Standard, blank, 샘플을 각각 50 μl 씩 96 well plate에 넣습니다.
- 2) Chromogen(DTNB)을 각 well 에 50 μl 씩 넣습니다.
- 3) Enzyme(GR)을 각 well 에 50 μl 씩 넣습니다.
- 4) 상온에서 5분간 반응시킵니다.
- 5) NADPH를 각 well 에 50 μl 씩 넣습니다.
- 6) 412 nm에서 Kinetic 법으로 3분간 값의 변화를 측정합니다.
(3분 동안 30초나 그 이하의 간격으로 측정합니다.)

▪ Calculation

GSH와 GSSG의 농도 및 GSH/GSSG ratio 값을 산출하기 위해서는 다음의 단계를 필요로 합니다.

1. Rate Determination (측정값 결정)

412 nm 흡광도 측정 시 값의 변화는 GSH 농도에 따라 선형으로 나타나며, 선형 함수는 다음의 식에 의해 결정됩니다.

$$A_{412} = \text{Slope (기울기)} \times \text{Minutes (분)} + \text{Intercept (절편)}$$

회귀방정식의 기울기는 측정값의 비율과 동일합니다. DTNB background와 NADPH 첨가(반응의 시작)한 시점과 측정 시점의 시간적 차이 때문에 방정식에서의 절편은 무시할 수 있습니다.

측정값의 변화(기울기 값)가 큰 시간대를 선택합니다.

예)

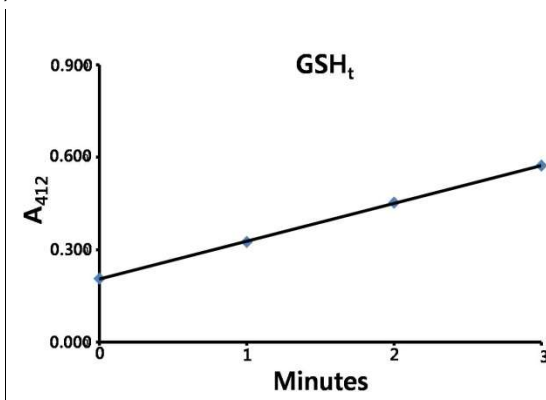


Fig 2. The rate is proportional to the concentration of GSH

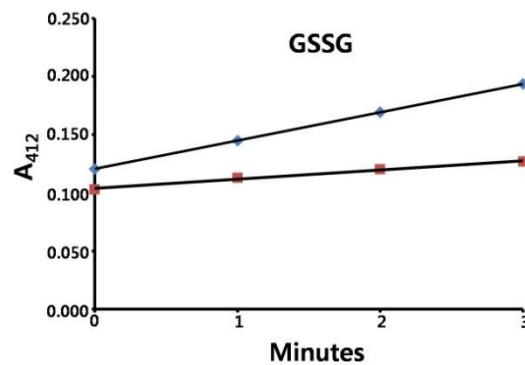


Fig 3. The rate is proportional to the concentration of GSSG (Blue : GSSG, Red : Blank)

- GSH_t : $A_{412} = 0.123 \times \text{Minutes} + 0.205$ (r^2 값 = 0.999) 이기 때문에
GSH_t Sample의 값은 0.123 A_{412}/min 이 됩니다.
 - GSSG : $A_{412} = 0.024 \times \text{Minutes} + 0.120$ (r^2 값 = 1.000) 이기 때문에
GSSG Sample의 값은 0.024 A_{412}/min 이 됩니다.
 - GSH Blank : $A_{412} = 0.008 \times \text{Minutes} + 0.103$ (r^2 값 = 0.999) 이기 때문에
GSH Blank 값은 0.008 A_{412}/min 이 됩니다.
- (* 절편값은 제외하여 계산한 값입니다.)

2. Calibration Curve

GSH_t 를 측정한 반응물에서 GSSG의 농도를 측정할 경우 그 농도가 매우 낮기 때문에 필요한 범위를 선택하여 사용하기를 권장합니다. (이때 GSSG의 농도 범위는 GSH_t 보다 낮게 설정하여 표현합니다.)

Calibration Curve는 Blank 값을 제외하여 작성합니다. (Net Rate = 측정값 - Blank 값)

예)

GSH (μM)	A ₄₁₂ /min	Net Rate
0.00	0.127	0.000
0.25	0.181	0.054
0.50	0.236	0.109
1.00	0.328	0.201
4.00	0.687	0.560
8.00	1.256	1.129

Table 2. A typical 6 point calibration of the EZ-Glutathione Assay Kit.

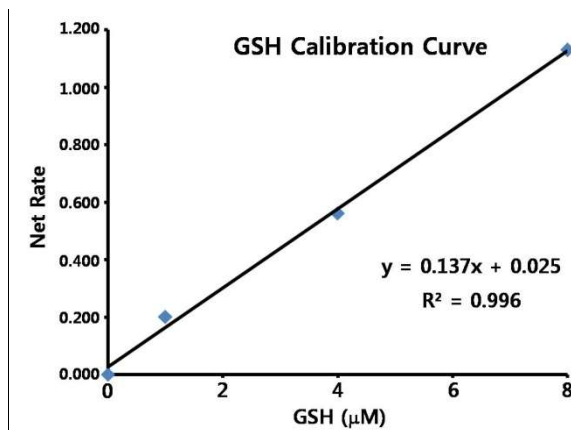


Fig 4. The Calibration Curve of GSH

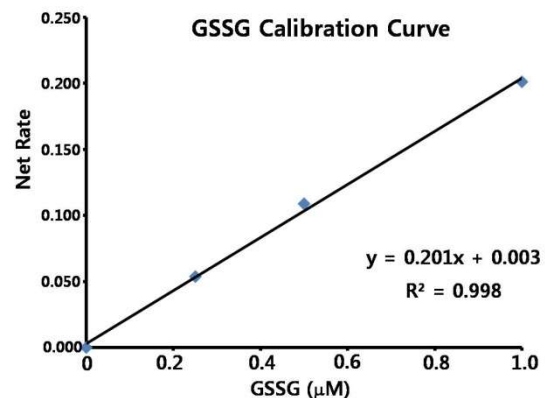


Fig 5. The Calibration Curve of GSSG

3. GSH_t and GSSG Concentrations

Calibration Curve를 구하기 위한 회귀방정식의 일반적 형태는 다음과 같습니다.

(Net Rate = 측정값 - Blank 값)

$$\text{Net Rate} = \text{Slope (기울기)} \times \begin{matrix} \text{GSSG} \\ \text{or 측정값} \\ \text{GSH}_t \end{matrix} + \text{Intercept (절편)}$$

Calibration Curve에서 측정된 농도를 계산하기 위해서 다음과 같이 방정식을 변형합니다.

$$\frac{\text{GSSG}}{\text{or GSH}_t} = \frac{\text{Net Rate} - \text{Intercept}}{\text{Slope}} \times \text{Dilution Factor}$$

예)

Fig 2.에서 GSH_t sample은 0.496 - 0.127 혹은 0.369 A₄₁₂/min로 나타낼 수 있으며, 이 값을 보정하여 나타낸 Fig 4.의 방정식을 이용하여 위의 식에 대입하면 다음과 같은 값을 얻을 수 있습니다.

$$\text{GSH}_t = \frac{0.369 - 0.025}{0.137} \times 488 = 1225.3 \mu\text{M}$$

같은 방식으로 GSSG sample에서 0.194 - 0.127 혹은 0.067 A₄₁₂/min로 나타낼 수 있으며, 이 값을 보정하여 나타낸 Fig 5.의 방정식을 이용하여 위의 식에 대입하면 다음과 같은 값을 얻을 수 있습니다.

$$\text{GSSG} = \frac{0.067 - 0.003}{0.201} \times 60 = 19.1 \mu\text{M}$$

4. GSH/GSSG Ratio

GSH/GSSG Ratio는 다음 공식과 같이 계산하여 값을 구합니다.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{GSH}_t - 2 \text{ GSSG}}{\text{GSSG}}$$

예)

GSH와 GSSG 값으로 GSH/GSSG Ratio를 계산하면 다음과 같습니다.

$$\text{Ratio} = \frac{1225.3 - 38.2}{19.1} = 62.15$$

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay

EZ-Ethanol Assay Kit
(Colorimetric)

DG-ETH100

100 Assay