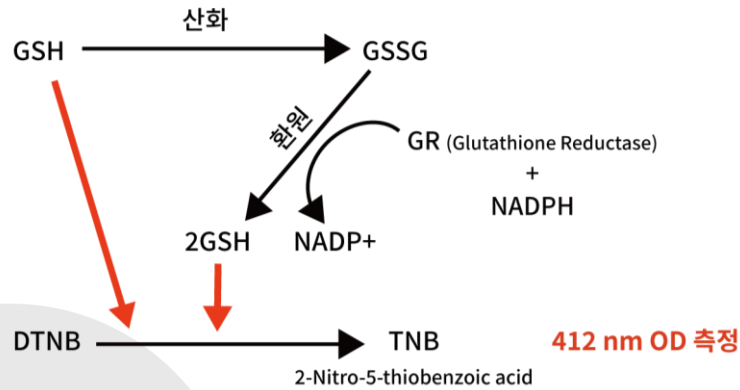


OxiTec™ Total Glutathione Assay Kit

(Colorimetric)

BO-GLU-T100, 100 assays

제품 원리



BIOMAX 사의 OxiTec™ Total Glutathione Assay Kit는 Sample에 존재하는 Total GSH의 양을 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.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Assay Buffer	60 ml	4°C
GSH Standard (4 mM)	2 ml	
Glutathione Reductase (GR)	5 ml	
NADPH (Lyophilized)	1 Bottle	
Chromogen (DTNB)	5 ml	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 4°C 보관 시 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.
- ▶ 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 l일 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 Erythrocytes의 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 l일 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

- ① Microtube의 바닥 쪽에 조심스럽게 Sample 50 μ l 를 넣습니다.
- ② -70 °C에서 냉동시켜 보관합니다. (1개월간 안정적임)
- ③ 사용 전 Sample을 상온에서 완전히 녹인 후 섞어 줍니다.
- ④ Ice-cold 5% MPA Solution 350 μ l를 Microtube에 넣어 줍니다. (Sample을 1/8로 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 l 와 Assay Buffer 1.5 ml를 혼합합니다. (상층액을 1/61로 희석함)
- ⑧ 사용 전까지 Ice에 둔 후 사용합니다. (Sample은 총 1/488 배 희석 됨)



실험 과정

GSH 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 4 mM GSH Standard 50 μ l와 Assay Buffer 9.95 ml 를 혼합하여 20 μ M GSH Standard를 만들어줍니다.
희석한 용액은 Assay Buffer를 이용하여 Microtube 내에서 Serial dilution으로 희석하여 아래 표와 같이 Standard solution을 준비합니다.

No.	Volume of 20 μ M GSH stock (μ l)	Assay Buffer (μ l)*	GSH Concentration (μ M)
1	500	500	10
2	500 of NO. 1	500	5
3	500 of NO. 2	500	2.5
4	500 of NO. 3	500	1.25
5	500 of NO. 4	500	0.625
6	500 of NO. 5	500	0.3125
7	Blank	1000	0

- 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.

회귀 방정식: $y = ax + b$

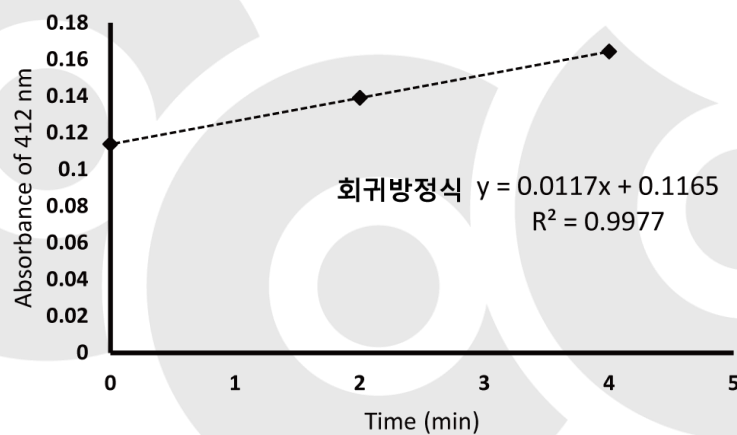
$y = \text{OD}_{412\text{nm}}$

$a = \text{기울기 (slope)}$

$x = x \text{ 축 값 (minutes)}$

$b = \text{절편}$

- 절편의 의미는 DTNB Background와 NADPH 첨가하여 반응 시작한 시간적 차이에 따라 달라지는 요소이므로, 따라서 절편은 제외할 수 있습니다.



② ①에서 구한 기울기에 0 μM 에서의 기울기 값을 빼줍니다. [Net Blank Slope]

Table 1.	Time (min)			Slope (°)	Net Blank Slope (°)
GSH (μM)	0	2	4		
Blank	0.1158	0.1411	0.1625	0.011675	0
0.312	0.1195	0.168	0.2169	0.02435	0.012675
0.62	0.1232	0.2094	0.2756	0.0381	0.026425
1.25	0.1332	0.2477	0.3538	0.05515	0.043475
2.5	0.1505	0.3832	0.6029	0.1131	0.101425
5	0.1905	0.6205	0.9863	0.19895	0.187275
10	0.2792	1.0597	1.7098	0.35765	0.345975

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

[GSH 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

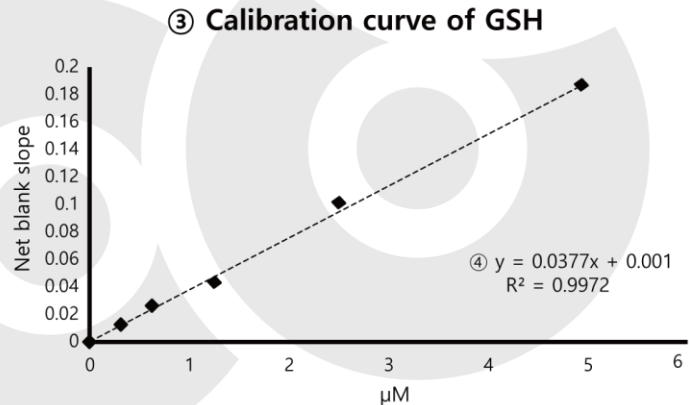


Table 1.에서의 Net blank slope 값만 표시한 표이며, Max con.은 5 μM 까지만 표시한 표입니다.

⑤ sample 의 시간별 기울기 값을 구합니다.

예) sample 의 시간별 기울기 = 0.0381

⑥ sample 의 기울기를 GSH Calibration curve 를 이용하여 GSH 농도값(μM)을 각각 구합니다.

예) sample

Total GSH

$$\underline{0.0381} = 0.0377x + 0.001$$

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

$$= 0.984$$

GSH 농도값 (μM) = 0.984 (μM)

⑦ 각각의 농도값에 희석배수를 곱해줍니다.

- Datasheet 앞 Sample preparation 과정에서 희석된 배수입니다.

GSH 농도값 X 488 : Sample 에서의 Total GSH 양

예) Sample 에서의 Total GSH 양

$$\underline{0.984} \times 488 = \underline{480.2}$$

Related products

- BO-TAC-200	OxiTec™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)
- BO-DPH-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-200	OxiTec™ 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