

はじめに

グルタチオン (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) は生体内に存在するトリペプチドで、glutathione peroxidase、glutathione S-transferase および thiol transferase 等の酵素基質として抗酸化や薬物代謝などに関与しています。グルタチオンは通常、生体内で還元型 (GSH) として存在していますが、酸化ストレスなどの刺激によって還元型 (GSH) から酸化型 (GSSG) に変換されるため、GSH と GSSG の比率が酸化ストレスの指標として注目されています。本キットには、GSH のマスクング剤が含まれており、このマスクング剤をサンプルに添加することで、サンプル中の GSH を隠蔽することができます。

その後、酵素リサイクリング法を用いた DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) の発色 ($\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$) を測定することで GSSG のみを定量でき、別途測定した総グルタチオン量から GSSG 量を差し引くことで、GSH 量を求めることが可能です。本キットでの総グルタチオンの測定範囲は $0.5 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ 、GSSG の測定範囲は $0.5 \sim 25 \mu\text{mol/l}$ です。

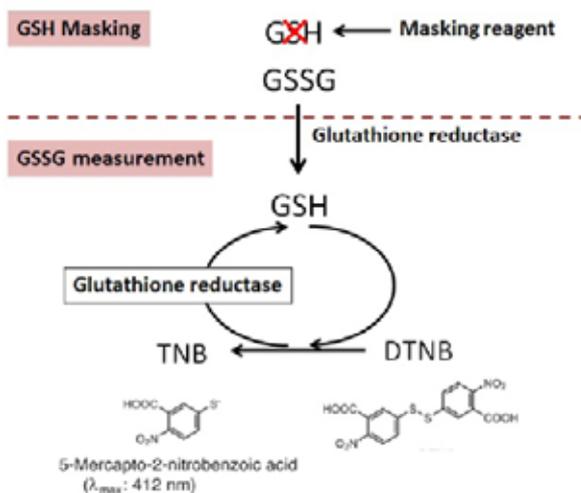


図 1. GSSG/GSH Quantification Kit の測定原理

キット内容

• Enzyme solution	50 μl × 1	• Coenzyme	× 2
• Buffer solution	60 ml × 1	• Substrate (DTNB)	× 4
• Standard GSH	× 1	• Standard GSSG	× 1
• Masking reagent	20 μl × 1		

保存条件

本キットは $0 \sim 5^\circ\text{C}$ で保存し、充分室温に戻してからご使用ください。

必要なもの
(キット以外)

[機器]		
• プレートリーダー (405 nm あるいは 415 nm フィルター)		• 96 ウェルプレート
• 20 μl と 200 μl の可変式マルチチャンネルピペット		• インキュベーター
• 15 ml コニカルチューブ		• ディスポーザブルシリンジ

[試薬]

• 5-スルホサリチル酸 (SSA)	• エタノール
--------------------	---------

※本キットには5-スルホサリチル酸は含まれておりませんのでご注意ください。

使用上の注意

- キットの中の試薬類は、充分室温に戻してから使用してください。
- Masking reagent には催涙性、刺激臭があります。開封ならびに溶液調製はドラフト内で行ってください。
- 正確な測定値を得るために、1つの測定試料につき複数 ($n=3$ 以上) のウェルを使用してください。
- Enzyme/coenzyme working solution を加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグを少なくするため、マルチチャンネルピペットを使用してください。
- 測定試料は、検量線範囲内に入るように数段階で希釈したものを調製してから測定してください。
- 本キットにはガラス製容器及びアルミキャップを使用しております。保護手袋を着用するなど取扱いにはご注意ください。
- 調製した working solution は保存できませんのでご注意ください。

組織 (100 mg)

- 1) 5% SSA 水溶液 0.5 ~ 1 ml 中で組織をホモジナイズする。
- 2) 8,000 x g で 10 分間遠心する。
- 3) 上清を新しいチューブに移す。
- 4) 純水にて SSA 濃度が 0.5% になるように希釈したものを測定試料とする。

血漿

- 1) 抗凝固剤を加えた血液 (ヘパリン処理済) を、1,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 2) 上清を新しいチューブに移し、半量の 5% SSA を加える。
- 3) 8,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 4) 上清を新しいチューブに移し、純水にて SSA 濃度が 0.5% になるように希釈したものを測定試料とする。

赤血球

- 1) 抗凝固剤を加えた血液 (ヘパリン処理済) を、1,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心した後、上清を捨てる。
- 2) 4 倍量の 5% SSA 水溶液で溶血する。
- 3) 8,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 4) 上清を新しいチューブに移す。
- 5) 純水にて SSA 濃度が 0.5% になるように希釈したものを測定試料とする。

細胞 (1x10⁷ cells)

- 1) 200 x g で 10 分間 4°C にて遠心した後、上清を捨てる。
 - 2) 300 µl の PBS で洗浄し、再度、200 x g で 10 分間 4°C にて遠心した後、上清を捨てる。
 - 3) 10 mmol/l の HCl を 80 µl 加え、凍結と溶解を 2 回繰り返す、細胞膜を破壊する。
 - 4) 5% SSA 水溶液を 20 µl 加え、8,000 x g で 10 分間遠心する。
 - 5) 上清を新しいチューブに移し、純水にて SSA 濃度が 0.5% になるように希釈したものを測定試料とする。
- 測定試料中の SSA 濃度が 1% を超えると測定に影響を与えるため、SSA 濃度は 0.5% となるように希釈してください。

溶液調製

- 200 µmol/l GSH standard solution

Standard GSH のバイアルに 0.5% SSA 水溶液 2 ml を加えて溶解する。

- * バイアル瓶は減圧になっているので、シリンジで 0.5% SSA 水溶液を加えてから開封してください。
- * 冷凍保存 (-20°C) してください。2 ヶ月保存できます。

- 100 µmol/l GSSG standard solution

Standard GSSG のバイアルに 0.5% SSA 水溶液 2 ml を加えて溶解する。

- * バイアル瓶は減圧になっているので、シリンジで 0.5% SSA 水溶液を加えてから開封してください。
- * 冷凍保存 (-20°C) してください。2 ヶ月保存できます。

- Masking solution

エタノール 180 µl を、Masking reagent のバイアルに加え、ピペッティングを行い、混合する。

- * Masking reagent は催涙性、刺激臭があるため、開封ならびに溶液調製はドラフト内で行なってください。
- * Masking reagent は黄色～赤褐色に着色している場合があります。
- * 輸送中の振動等により内容物がチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、よく振り落としてご使用ください。
- * Masking solution は冷蔵保存 (0-5°C) してください。2 ヶ月保存できます。

- Substrate working solution

1) Substrate(DTNB) のバイアル 1 本に Buffer solution 1.2 ml を加えて溶解する。

- * 確実に溶解してください。超音波やポルテックスミキサーのご使用をおすすめします。
- * 2) に進むと溶液の保存はできません。保存する場合、1) の溶液を冷凍保存 (-20°C) してください。2 ヶ月保存できます。

2) 15 ml コニカルチューブに 1) の溶液全量に移して、Buffer solution 2.4 ml を加える (総量: 3.6 ml)。

- * 96-well マイクロプレート 1 枚分を調製する場合、Substrate を 2 本使用してください (総量: 7.2 ml)。

- Enzyme/coenzyme working solution

1) チューブ内の Enzyme solution を数回ピペッティングした後、20 µl を 15 ml コニカルチューブに取り、Buffer solution 4 ml で希釈する。

- * チューブ内壁やキャップに酵素溶液が付着していることがありますので、開封前にそれらを振り落としてからご使用ください。希釈後の溶液は手で軽く振り混ぜてからご使用ください (ポルテックスミキサーのご使用はお控えください)。
- * 4) に進むと溶液の保存はできません。保存する場合、冷蔵保存 (0-5°C) してください。2 ヶ月保存できます。

2) 新しい 15 ml コニカルチューブに 1) の溶液 2.4 ml を移す。

3) Coenzyme のバイアル 1 本に、純水 2.4 ml を加えて溶解する。

- * バイアル瓶は減圧になっているので、シリンジで純水を加えてから開封してください。
- * 溶液で保存する場合、4) には進まず 3) の溶液を冷凍保存 (-20°C) してください。2 ヶ月保存できます。

4) 2) の 15 ml コニカルチューブに 3) の溶液全量に移して、Buffer solution 2.4 ml を加える (総量: 7.2 ml)。

1. 測定用サンプルの調製

- 1) GSSG と GSH の測り分けを行なう場合、測定試料はあらかじめ、同一のものを 2 つ (200 μl \times 2 本) 準備する。
 - ・ GSSG 測定用：測定試料 200 μl をマイクロチューブに入れ、Masking solution を 4 μl 加えて、ボルテックスミキサーを用いて混合する [Sample (GSSG)]。
 - ・ 総グルタチオン測定用：測定試料 200 μl を準備する [Sample (GSH)]。
- * 測定試料中のグルタチオン濃度が分からない場合、測定試料を希釈したものを数種類調製してから測定してください。

2. GSSG standard solution の調製

- 1) 100 $\mu\text{mol/l}$ GSSG standard solution 100 μl と 0.5% SSA 水溶液 300 μl を混合して 25.0 $\mu\text{mol/l}$ の GSSG 溶液を調製する。さらに順次 2 倍希釈していき、標準液 (25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78, 0 $\mu\text{mol/l}$) とする。

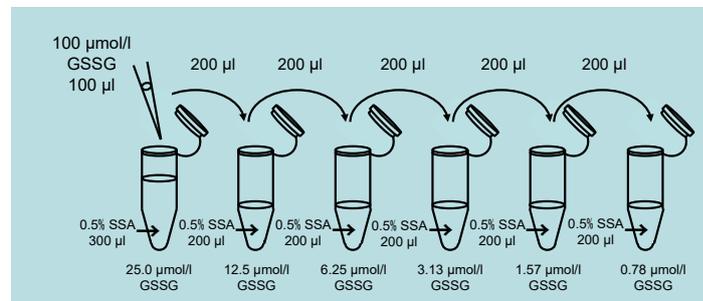


図 2. GSSG standard solution の調製方法

- 2) 調製した各濃度の GSSG standard solution 200 μl に Masking solution 4 μl を加えて、ボルテックスミキサーを用いて混合する。

3. GSH standard solution の調製

- 200 $\mu\text{mol/l}$ GSH standard solution 100 μl と 0.5% SSA 水溶液 300 μl を混合して 50.0 $\mu\text{mol/l}$ の GSH 溶液を調製する。さらに順次 2 倍希釈していき、標準液 (50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0 $\mu\text{mol/l}$) とする。

4. 測定

- 1) GSSG、GSH standard solution、Sample (GSSG) あるいは Sample (GSH) を 40 μl ずつ、各ウェルに入れる。
正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 ($n=3$ 以上) のウェルを使用してください。

- 2) Buffer solution 60 μl を各ウェルに入れる。

- 3) 37°C で 1 時間インキュベートする。

インキュベートする際は、サンプルの揮発を防ぐため、マイクロプレート用ウェルキャップ等を用いてください。

- 4) Substrate working solution 60 μl を各ウェルに加える。

- 5) Enzyme/coenzyme working solution 60 μl を各ウェルに加える。

Enzyme/coenzyme working solution を加えることによって発色反応が開始されます。

ウェル間の反応のタイムラグを抑えるためにマルチチャンネルピペットを使用してください。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 2 (GSSG)	0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 2 (GSH)								
B	0.78 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 3 (GSSG)	1.57 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 3 (GSH)								
C	1.57 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 4 (GSSG)	3.13 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 4 (GSH)								
D	3.13 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 5 (GSSG)	6.25 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 5 (GSH)								
E	6.25 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 6 (GSSG)	12.5 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 6 (GSH)								
F	12.5 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 7 (GSSG)	25.0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 7 (GSH)								
G	25.0 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 8 (GSSG)	50.0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 8 (GSH)								
H	Sample 1 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 1 (GSH)	Sample 9 (GSH)	Sample 9 (GSH)	Sample 9 (GSH)	Sample 9 (GSH)	Sample 9 (GSH)

図 3. Standard solution とサンプルのレイアウト例 ($n=3$)

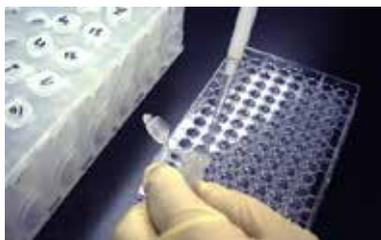
- 6) 37°C で 10 分間インキュベートする。

Kinetic method で測定を行なう場合、マイクロプレートリーダーの測定モードを Kinetic とし、吸光度の変化速度 ($\Delta A/\text{min}$) を求めます。発色開始後 10 分間は、吸光度は直線的に上昇するため、グルタチオン濃度は Kinetic method (反応停止無しで、発色後 5 分間の吸光度を測定) あるいは Pseudo-end point method のどちらでも求めることができます。

- 7) 405 nm もしくは 415 nm のフィルターを使い、マイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定する。

- 8) 測定試料 [Sample (GSSG)] 中の GSSG 濃度を GSSG 検量線より求める。

- 9) 測定試料 [Sample (GSH)] 中の総グルタチオン (GSH+GSSG) 濃度を GSH 検量線より求める。



1) GSSG, GSH standard solution, Sample (GSSG) あるいは Sample (GSH) を各ウェルに入れる。



2) Buffer solution を各ウェルに入れる。



3) 37°Cで1時間インキュベートする。



4)-5) Substrate working solution, Enzyme/coenzyme working solution を各ウェルに加える。



6)-7) 37°Cで10分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定する。

図4. グルタチオン濃度の測定操作

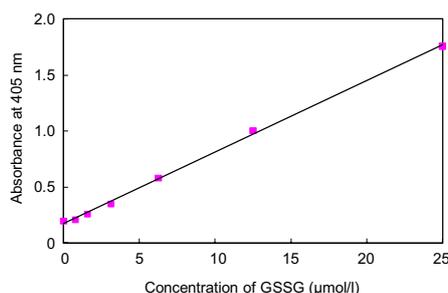


図5. GSSG 検量線の例

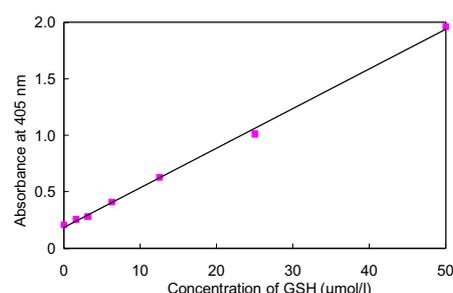


図6. GSH 検量線の例

なお、測定試料中のグルタチオンの濃度は以下の計算式から求めます。

Pseudo-end point method: グルタチオン (GSH, GSSG) = $(O.D._{\text{sample}} - O.D._{\text{blank}}) / \text{検量線の傾き}$

Kinetic method: グルタチオン (GSH, GSSG) = $(\text{傾き}_{\text{sample}} - \text{傾き}_{\text{blank}}) / \text{検量線の傾き}$

* $O.D._{\text{blank}}$ は GSSG および GSH が含まれないウェル (図3の A1 ~ A3 または A7 ~ A9) の値を用いてください。

* この計算式によって求められた値は、調製した測定試料溶液中のグルタチオンの濃度です。

希釈前の試料中に含まれるグルタチオン濃度は、得られた測定値と試料の希釈倍率より算出してください。

10) 求めた総グルタチオン (GSH+GSSG) 濃度と GSSG 濃度より、下式を用いて GSH 濃度を算出する。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - [\text{GSSG 濃度}] \times 2$$

妨害物質

アスコルビン酸、β-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール (DTT) のような還元物質やシステイン、また SH 基と反応する化合物 (マレイミド等) は測定に影響を及ぼします。これらの化合物は前処理等で除くことができますので、測定試料中に混在させないようにご注意ください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650