

# グルタチオン（還元型、酸化型）を分別定量したい

## 使用製品

GSSG/GSH Quantification Kit [G257]

## 解析装置



## I はじめに

グルタチオン ( $\gamma$ -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関与している。また、グルタチオンは酵素ラジカル捕捉能があり、酸化や薬物代謝などに関与している。グルタチオンは通常、生体内で還元型 (GSH) として存在しているが、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る。

この章では、GSSG/GSH Quantification Kit (Code: G257) を用いたグルタチオン (GSH : 還元型、GSSG : 酸化型) の分別定量法について紹介する。

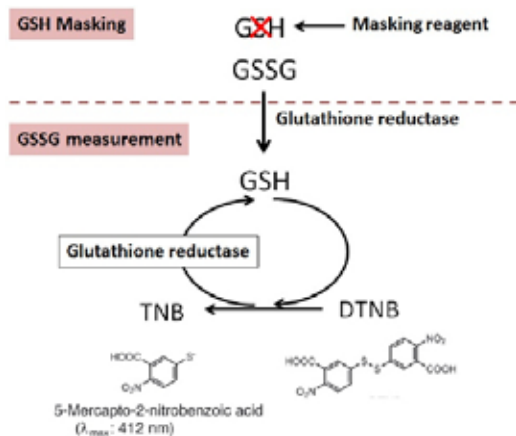


図1 GSSG/GSH 分別定量の測定原理

グルタチオンは、図1に示した酵素リサイクリング法によって高感度に検出される。

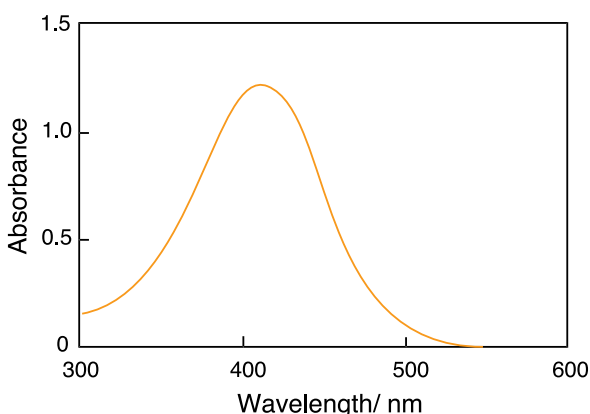


図2 リン酸緩衝液中の5-Mercapto-2-nitrobenzoic acidの吸収スペクトル

5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) [DTNB(Code: D029)] はジスルフィドを分子内に含有し、glutathione を酸化すると同時に、自身は5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid に還元される。この還元体の吸光度 ( $\lambda_{max}=412$  nm) よりグルタチオンを定量することができる (図2)。

GSSG/GSH Quantification Kit 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。その後、酵素リサイクリング法を用いた 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid の発色を測定することで GSSG を定量して、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。

GSSG/GSH Quantification Kit は、この酵素リサイクリング法を利用した 96 穴マイクロプレート用キットである。短時間で、グルタチオン (GSH : 還元型、GSSG : 酸化型) を分別定量することが可能である。

## II キット内容

・ Enzyme solution	50 $\mu$ l $\times$ 1
・ Coenzyme	$\times$ 2
・ Buffer solution	60 ml $\times$ 1
・ Substrate (DTNB)	$\times$ 4
・ Standard GSH	$\times$ 1
・ Standard GSSG	$\times$ 1
・ Masking reagent	20 $\mu$ l $\times$ 1

## III キットの使用方法

### 1. キット以外に必要なもの

- ・ マイクロプレートリーダー (405 nm、もしくは 415 nm フィルター)
- ・ ポリスチレン製 透明 96 well プレート
- ・ 20  $\mu$ l と 200  $\mu$ l のマルチチャンネルピペット
- ・ インキュベーター
- ・ 5-スルホサリチル酸 (SSA)
- ・ エタノール
- ・ 15ml コニカルチューブ

### 2. 試料の前処理例

細胞 (白血病細胞  $1 \times 10^7$  cells)

- 1) 200 x g で 10 分間、4°C にて遠心し、上清を捨てる。
- 2) 300  $\mu$ l の PBS で洗浄し、再度、200 x g で 10 分間、4°C にて遠心し、上清を捨てる。
- 3) 10 mmol/l の HCl を 80  $\mu$ l 加え、凍結と溶解を 2 回繰り返して細胞膜を破壊する。
- 4) 5% SSA を 20  $\mu$ l 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 ~ 1% になるように希釈したものを測定試料とする。

組織 (100 mg)

- 1) 5% SSA 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し、純水にて SSA 濃度が 0.5 ~ 1% 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を、1,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 2) 上清を捨てる。
- 3) 4 倍量の 5% SSA で溶血する。
- 4) 8,000 x g で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 5) 上清を新しいチューブに移し、純水にて SSA 濃度が 0.5 ~ 1% 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 の濃度が 1% を超えると測定に影響があるので、濃度が 0.5 ~ 1% になるよう、測定前に希釈する。

### 3. 溶液調製

#### Substrate working solution

Substrate のバイアル 1 本あたり、Buffer solution 1.2 ml を加えて溶かす。※溶解後、 $-20^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。  
15 ml コニカルチューブに全量を移し、Buffer solution 2.4 ml を加える。(総量: 3.6 ml)

#### Enzyme / Coenzyme working solution

1) Enzyme solution のチューブをよくピペティングして 20  $\mu\text{l}$  を 15 ml コニカルチューブに取り、Buffer solution 4 ml で希釈する。※希釈後  $4^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。

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 本あたり、純水 2.4 ml を加えて溶解する。

※ 溶解後  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。  
※ 瓶内部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する。

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)

#### GSH standard solution

0.5% SSA 水溶液 2 ml を、Standard GSH のバイアルに加えて溶解する。(200  $\mu\text{mol/l}$  GSH standard solution)

※ 溶解後  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。  
※ 瓶内部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する。

#### GSSG standard solution

0.5% SSA 水溶液 2 ml を、Standard GSSG のバイアルに加えて溶解する。(100  $\mu\text{mol/l}$  GSSG standard solution) ※溶解後  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。

※ 瓶内部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する。

#### Masking solution

エタノール 180  $\mu\text{l}$  を、Masking reagent のバイアルに加えて溶解する。

※ 希釈後  $4^{\circ}\text{C}$  保存。約 2 ヶ月使用可能。  
※ 本品には催涙性、刺激臭があるため、開封ならびに調製はドラフト内で行なうこと。

### 4. GSSG/GSH の分別測定方法 (図 4)

#### 4-1. 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  $\mu\text{l} \times 2$ ) 準備する。

・ GSSG 測定用: 測定試料 200  $\mu\text{l}$  に Masking solution を 4  $\mu\text{l}$  加え、攪拌する (Sample A)。

・ 総グルタチオン測定用: 測定試料 200  $\mu\text{l}$  を準備する (Sample B)。  
※ 測定試料中のグルタチオン濃度が未知の場合、測定試料を希釈したものを数種類調製してから測定を行なう。

#### 4-2. GSSG standard solution の調製

1) 100  $\mu\text{mol/l}$  GSSG standard solution (100  $\mu\text{l}$ ) に 0.5% SSA 水溶液 300  $\mu\text{l}$  を加え、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、標準液 (25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78, 0  $\mu\text{mol/l}$ ) とする。

2) 調製した各濃度の GSSG standard solution 200  $\mu\text{l}$  に Masking solution を 4  $\mu\text{l}$  加え、攪拌する。

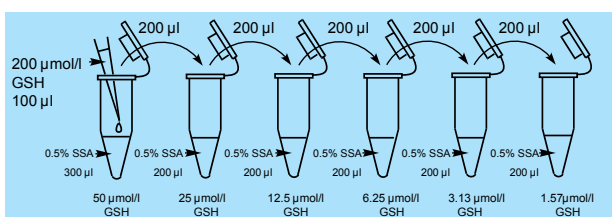
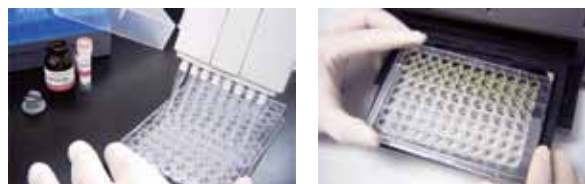


図 3 GSH standard solution の調製例



1) GSSG, GSH standard solution 及び Sample A あるいは Sample B を各ウェルに入れる。  
2) Buffer solution を各ウェルに入れる。  
3)  $37^{\circ}\text{C}$ , 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)  $37^{\circ}\text{C}$ , 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 GSSG/GSH の分別測定操作

	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 1 (GSH)	Sample 9 (GSH)								

図 5 Standard solution とサンプルのレイアウト例 (n=3)

#### 4-3. GSH standard solution の調製

1) 200  $\mu\text{mol/l}$  GSH standard solution (100  $\mu\text{l}$ ) に 0.5% SSA 水溶液 300  $\mu\text{l}$  を加え、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、標準液 (50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0  $\mu\text{mol/l}$ ) とする (図 3)。

#### 4-4. 測定

1) GSSG, GSH standard solution または測定試料 (Sample A, B) を 40  $\mu\text{l}$  ずつ、各ウェルに入れる (サンプルのレイアウトの例を図 5 に示す)。

※ 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) のウェルを使用する。

2) Buffer solution 60  $\mu\text{l}$  を各ウェルに入れる。

3)  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートする。

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

4) Substrate working solution 60  $\mu\text{l}$  を各ウェルに加える。

5) Enzyme / Coenzyme working solution 60  $\mu\text{l}$  を各ウェルに加える。  
※ Enzyme working solution を加えると直ちに発色が始まる。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すること。

6)  $37^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベートする。ただし、Kinetic Method で測定を行なう場合、直ちに次の操作を行なう。

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 A) 中の GSSG 濃度を GSSG 検量線より求める。

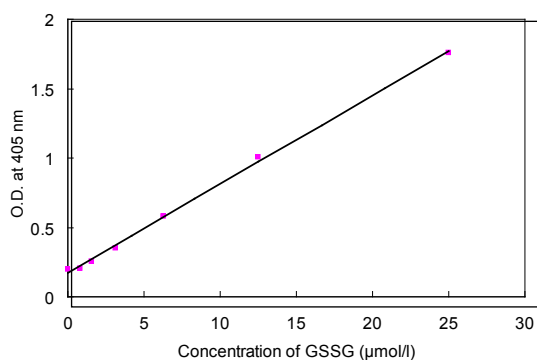


図6 発色後 10 分の pseudo-endpoint method による検量線 (GSSG) の例

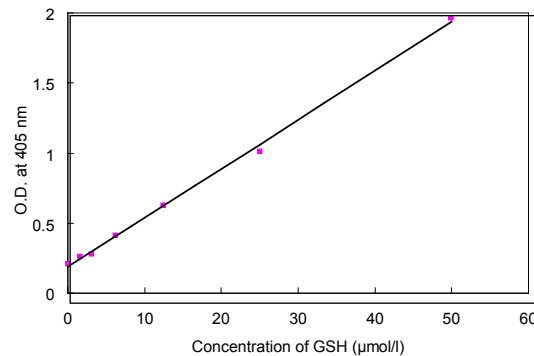


図7 発色後 10 分の pseudo-endpoint method による検量線 (GSH) の例

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

※ 発色開始後 10 分間は吸光度は直線的に上昇していく。グルタチオン濃度は Kinetic method あるいは Pseudo-endpoint method (反応停止無しで、発色後 5 ~ 10 分間で吸光度を測定) のどちらでも求めることができる。

なお、測定試料中のグルタチオン濃度は以下の計算式から求める。図 6, 7 に pseudo-endpoint method で作成した検量線の例を示す。

Pseudo-endpoint method:

グルタチオン (GSH, GSSG)  
= (O.D.<sub>sample</sub> - O.D.<sub>blank</sub>) / 検量線の傾き

Kinetic method:

グルタチオン (GSH, GSSG)  
= (傾き<sub>sample</sub> - 傾き<sub>blank</sub>) / 検量線の傾き

※ blank とは、0 μmol/l GSH, GSSG の測定値を指す。

※ 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総量になる。

※ 細胞や組織中の正確なグルタチオン濃度を求める際、さらに希釈倍率等の計算が必要となる。

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。

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

※ 測定試料に希釈したものをを用いた場合は、求めた値に希釈倍率を積算すること。

※ GSSG/GSH Quantification Kit の総グルタチオン濃度の測定範囲は 0.5 ~ 50 μmol/l、GSSG 濃度の測定範囲は 0.5 ~ 25 μmol/l となっている。

総グルタチオン濃度のみを測定したい場合は、Total Glutathione Quantification Kit (Code: T419) も使用することができる。

#### 5. 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) は測定に影響があるので、これらの化合物は前処理の段階で除くこと。

測定試料中に混在させないように注意すること。

#### IV 使用上または取扱上の注意

- 1) 本キットは 0 ~ 5°C で保存して下さい。
- 2) キットの中の試薬類は、室温に戻してから使用して下さい。
- 3) 正確な測定値を得るため、1 つの測定試料につき複数 (できれば n=3 以上) のウェルを使用して下さい。
- 4) 測定試料中のグルタチオンの濃度が分からない場合は、測定試料を希釈したものを数種類調製してから測定を行なって下さい。

#### 参考文献

- 1) M. E. Anderson, "Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples", *Methods in Enzymol.*, **1985**, 113, 548.
- 2) M. A. Baker, G. J. Cerniglia and A. Zaman, "Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples", *Anal. Biochem.*, **1990**, 190, 360.
- 3) C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier and G. Lorenzon, "A Microtiter Plate Assay for Total Glutathione and Glutathione Disulfide Contents in Cultured/Isolated Cells: Performance Study of a New Miniaturized Protocol", *Cell Biol. Toxicol.*, **1994**, 10, 415.
- 4) S. A. McGrath-Morrow, "Inhibition of Glutamine Synthetase in A549 Cells During Hyperoxia", *J. Stahl, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2002**, 27, 99.
- 5) T. Sato, K. Seyama, Y. Sato, H. Mori, S. Souma, T. Akiyoshi, Y. Kodama, T. Mori, S. Goto, K. Takahashi, Y. Fukuchi, N. Ruyama and A. Ishigami, "Senescence Marker Protein-30 Protects Mice Lungs from Oxidative Stress, Aging, and Smoking", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2006**, 174, 530.
- 6) M. L. Mulhern, C. J. Madson, A. Danford, K. Ikesugi, P.F. Kador and T. Shinohara, "The Unfolded Protein Response in Lens Epithelial Cells from Galactosemic Rat Lenses", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2006**, 47(9), 3951.