

はじめに

Superoxide dismutase(SOD) 活性を測定する方法には、シトクロム c 法、NBT 法、エピネフリン法および亜硝酸法などがあります。このうちキサンチン / キサンチンオキシダーゼをスーパーオキシド生成系とし、テトラゾリウム塩の還元反応を利用した NBT 法は操作が簡便な方法ですが、生成するホルマザンが水に溶けにくいことや、NBT がキサンチンオキシダーゼと直接反応するため 100% SOD 阻害率が測定できない等の問題をかかえています。SOD Assay Kit - WST は高水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-1 を使用しているため、ホルマザンの析出がありません。また WST-1 はキサンチンオキシダーゼと直接反応しないため、100% SOD 阻害率を測定できます。96 穴マイクロプレートに対応していますので、一度に多検体の測定が可能です。

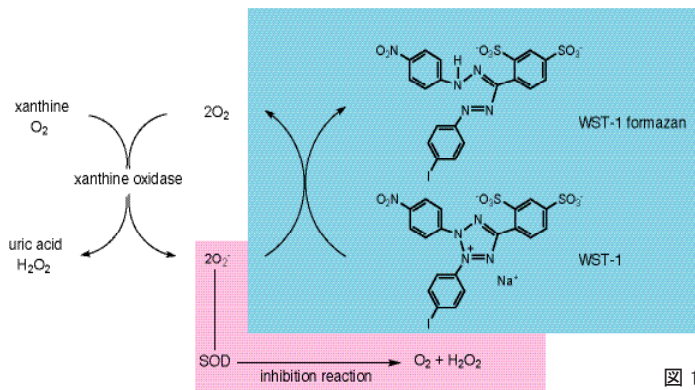


図 1 SOD Assay Kit - WST の測定原理

キット内容

- WST solution 1 mL x 1 本
- Enzyme solution 20  $\mu$ L x 1 本
- Buffer solution 11 mL x 2 本
- Dilution buffer 10 mL x 1 本

保存条件

0 ~ 5  $^{\circ}$ C で保存してください。

必要なもの  
(キット以外)  
使用上のご注意

- プレートリーダー (450 nm フィルター)
- 96 穴 プレート
- 2-20  $\mu$ L と 20-200  $\mu$ L のマルチチャンネルピペット
- インキュベーター (37  $^{\circ}$ C)
- サンプルの希釈には添付の Dilution buffer もしくは生理食塩水をお使いください。
- Enzyme solution は酵素の懸濁液ですので、静置しておくとも酵素が沈殿します。チューブを良く振るかピペティングにより均一な懸濁液にしてご使用ください。
- 正確な測定値を得るために、1つのサンプルにつき複数 (n=3 以上) のウェルをお使いください。(図 3 参照)
- Enzyme working solution を加えると直ちにスーパーオキシドの発生が始まりますので、ウェル間の反応時間差を少なくするためにマルチチャンネルのピペットをお使いください。
- サンプルの前処理につきましては、弊社ホームページ、「プロトコル・SOD 様活性を測定したい」をご覧ください。  
(<http://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>)

測定前処理

溶液調製

96 well プレート一枚分

WST working solution

WST solution 1 mL を Buffer solution 19 mL で希釈する。

\* 希釈後 0 ~ 5  $^{\circ}$ C 保存で 2 ヶ月使用できます。

Enzyme working solution

Enzyme solution をピペティング操作などにより、均一な懸濁液とする。15  $\mu$ L を取り、Dilution buffer 2.5 mL で希釈する。

\* 希釈後 0 ~ 5  $^{\circ}$ C 保存で 3 週間使用できます。

Sample solution

前処理したサンプル溶液を Dilution buffer または生理食塩水で希釈する。

例) 希釈率 : 1 (希釈なし), 1/5, 1/5<sup>2</sup>, 1/5<sup>3</sup>, 1/5<sup>4</sup>, 1/5<sup>5</sup>, 1/5<sup>6</sup>

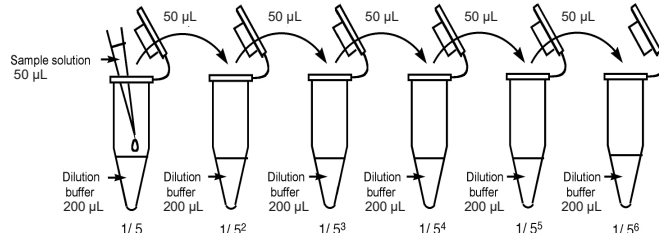


図 2 サンプル溶液調製例

溶液添加

表 1 サンプル及び blank 1, 2, 3 の各ウェルに加える溶液

	sample	blank1	blank2	blank3
サンプル溶液	20 $\mu$ L	-	20 $\mu$ L	-
純水	-	20 $\mu$ L	-	20 $\mu$ L
WST working solution	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Dilution buffer	-	-	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Enzyme working solution	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	-	-

blank 1 : 阻害なしの全発色、blank 2 : sample blank、blank 3 : 試薬 blank

\* 着色の強いサンプルの場合は、サンプルの希釈ごとに blank 2 を測定してください。

SOD assay 操作

- 1) 各ウェルにサンプル溶液 (sample, blank 2) もしくは純水 (blank 1, blank 3) を 20 μL ずつ入れる。
- 2) 各ウェルに WST working solution を 200 μL ずつ加え、ピペッティングまたはプレートミキサーでよく混ぜる。
- 3) blank 2 と blank 3 のウェルに Dilution buffer を 20 μL ずつ加える。
- 4) サンプル溶液を入れたウェルと blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20μL ずつ加える。  
Enzyme working solution を加えるとすぐにスーパーオキシドの発生が始まります。ウェル間の反応時間差を少なくするためにマルチチャンネルのピペットをお使いください。
- 5) 37 °C で 20 分間インキュベートする。
- 6) プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。
- 7) SOD 活性値 (阻害率 %) を下記の計算式により求める。

$$\text{SOD 活性値 (阻害率 \%)} = [(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank 2}})] / (A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}}) \times 100$$

活性値は吸光度変化量からも求めることができます (kinetic assay)。吸光度が直線的に上昇する領域で測定してください。15 ~ 20 分の間では良好な直線性が得られます。

活性値は下記の計算式により求められます。

$$\text{SOD 活性 (阻害率 \%)} = [(S1 - S3) - (SS - S2)] / (S1 - S3) \times 100$$

S1: blank1 の傾き, S2: blank2 の傾き, S3: blank3 の傾き, SS: sample の傾き

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1 1倍											
B	Sample 1 5倍											
C	Sample 1 5 <sup>2</sup> 倍											
D	Sample 1 5 <sup>3</sup> 倍	Sample 2	Sample 3	Sample 4								
E	Sample 1 5 <sup>4</sup> 倍											
F	Sample 1 5 <sup>5</sup> 倍											
G	Sample 1 5 <sup>6</sup> 倍											
H	blank 1	blank 2	blank 3									

図3 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

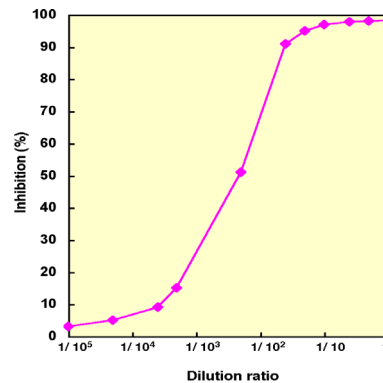


図4 阻害曲線の例

阻害曲線

SOD Assay Kit - WST を使って作成した阻害曲線の例を図4に示す。阻害率 100% が測定できている。

ユニット (U) 定義

『 **WST 還元の 50% 阻害を示すサンプル溶液 20 μL に含まれる SOD を 1 単位 (U) とする** 』

WST 法によるユニット定義は Cytochrome c 法によるユニット定義とは異なりますのでご注意ください。

ユニット (U) の求め方

- 1) 阻害曲線より阻害率 50% (IC<sub>50</sub>) の時の希釈率を求める。
- 2) 阻害率 50% (IC<sub>50</sub>) を示す点が 1 ユニット (U) であるため、ここに希釈倍率を掛けることで元のサンプルの SOD ユニットが算出できる。(容量あるいは質量などに換算して、濃度として算出できる。)

ユニット (U) 規定例: 赤血球 (前処理にて 1/108 希釈)

- 1) 阻害曲線 (図5) より IC<sub>50</sub> 値を求める。サンプルの IC<sub>50</sub> 値の希釈率は「1/1.8」となる。
- 2) 『1/1.8 希釈された液、「20 μL 中」に存在する SOD が 1 ユニットである』ことから、希釈前サンプルは「1.8 U」となる。
- 3) アッセイで添加したサンプル溶液は 20 μL (0.02 mL) であるので、サンプル 1 mL あたりの unit 数を計算する。  
1.8 / 0.02 = 90.0 U/mL
- 4) 元々の試料には SOD 抽出過程 (前処理) での希釈があるため、この希釈 (1/108) を考慮して血液中のユニット数を計算する。  
108 x 90.0 = 9,720 U/mL of blood

\* ここでは容量に換算しています。タンパク質や質量 (mg) に換算したい場合は、さらに別途換算してください。

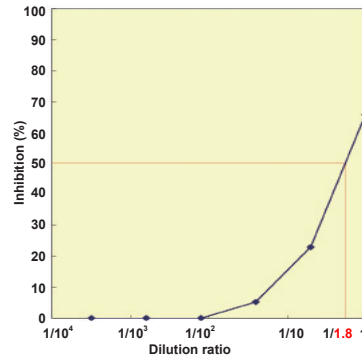


図5 赤血球サンプルを用いた阻害曲線

Mn-SOD 活性の求め方

Cu,Zn-SOD と extracellular-SOD の活性を阻害するシアン化カリウム (KCN; 終濃度 1 mmol/L) あるいは Diethyldithiocarbamate (DDC; 終濃度 1 mmol/L) をサンプルに添加し、Mn-SOD の活性を求める。

妨害物質

表2の試薬は測定に影響を与えます。サンプル中にこれらの試薬を含む場合は、表示の濃度値以下になるようサンプルを希釈してください。

\* 還元物質である 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol については大きな正誤差を与えるため、**使用しないで下さい**。

\* サンプルに界面活性剤および還元物質を含む場合は、表以下の濃度であっても、blank 2 を必ず測定して下さい。

表2 妨害物質の影響濃度

界面活性剤		溶媒		還元物質		その他	
SDS	0.05%	Ethanol	25%	Glutathione reduced form	1.25 mmol/L	EDTA	2 mmol/L
Tween 20	0.5%	DMSO	5%	Ascorbic acid	0.1 mmol/L	BSA	1%(w/v)
NP-40	0.5%						

<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