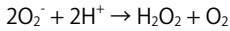


P-14 SOD 様活性を測定したい

Iはじめに

近年、活性酸素と老化および発癌との関わりが活発に研究され、その真相が解明されつつある。中でも活性酸素の一つであるスーパーオキシドを消去する、superoxide dismutase (SOD) および SOD 様物質が注目されている。SOD は以下のスーパーオキシドの不均化反応を触媒する酵素である。



SOD 活性を測定する方法として、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知られている。xanthine/xanthine oxidase 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

であることから汎用されているが、生成するホルマザンが不溶性の沈殿物であることや、NBT が xanthine oxidase (XO) と直接反応し 100% SOD 阻害率を測定することができない等の問題をかかえている。

この章では、小社 SOD Assay Kit - WST (Code: S311) を用いた方法について紹介する。

SOD Assay Kit - WST は水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-1 (Code: W201) を使用しているため、ホルマザンの溶解操作は不要である。また WST-1 は XO と直接反応しないため、100% SOD 阻害率を測定できる。また 96 穴マイクロプレート対応なので、一度に多検体の測定が可能である。

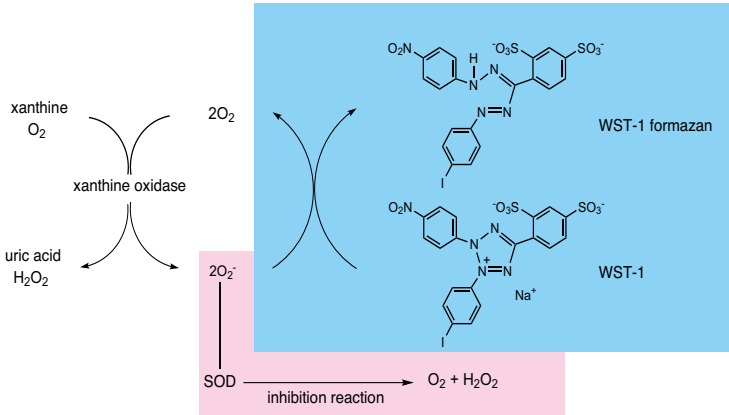


図 P-14-1 SOD Assay Kit-WST の測定原理

II キット内容

- WST solution 5 ml × 1
- Enzyme solution 100 μl × 1
- Buffer solution 100 ml × 1
- Dilution buffer 50 ml × 1

III キットの使用方法

1. キット以外に必要なもの

- プレートリーダー (450 nm フィルター)
- 96 well マイクロプレート
- 2 ～ 20 μl および 20 ～ 200 μl マルチチャンネルピペット
- インキュベーター

2. プロトコル

(1) 試料の前処理例

血漿、赤血球

- 1) 凝固剤で処理した血液試料 (最終濃度: 約 10 U/ml ヘパリン液) 2-3 ml を遠心管に採取し、4℃、600 x g で 10 分間遠心する。
- 2) 上清を回収し、生理食塩水で希釈したものを血漿試料とする。
- 3) 残った沈殿に元の試料と同じ量の生理食塩水を加え懸濁後、10 ml 用ガラス遠心管に懸濁液 0.4 ml を移し、生理食塩水で 10 ml にする。
- 4) 4℃、600 x g で 10 分間遠心する。
- 5) 上清を除去後、生理食塩水 10 ml を加え懸濁後、4℃、600 x g で 10 分間遠心する。
- 6) 操作 5) を 2 回行う。
- 7) 上清を除去後、沈殿に蒸留水 4 ml を加え (赤血球が溶血して SOD が流出する。)、次にエタノール 1 ml とクロロホルム 0.6 ml を加える。
- 8) 共栓をしてシェーカーで 4℃にて 15 分間強く振る。

- 9) 4℃、600 x g で 10 分間遠心し、上層の水 / エタノール層を取り出す。
 - 10) 水 / エタノール層 0.1 ml と蒸留水 0.7 ml を混合したものを赤血球試料とする。
- * 希釈の際は 0.25% エタノールをご使用ください。

組織

- 1) 生理食塩水でよく洗い、できるだけ脱血する。
- 2) 水分を濾紙などで注意深くふき取り、湿重量を測る。
- 3) 湿重量に対し 4 ～ 9 倍のショ糖緩衝液 (0.25 mol/l ショ糖 10 mmol/l トリス塩酸緩衝液 pH7.4、1 mmol/l EDTA) を加え、組織をヒストコロン等を用いて破碎する。
- 4) テフロン製ホモジナイザー等でよくホモジナイズする。
- 5) 10,000 x g、60 分間遠心し、上清を測定試料とする。

細胞 (HeLa : 9 × 10⁶ cells、または HL60 : 1.2 × 10⁷ cells)

- 1) PBS 1 ml で 2 回洗浄する。
- 2) PBS を除去後、ホモジナイザーあるいは超音波破碎機等を

用いて細胞膜を破壊する。

3) 新たに PBS 1 ml を加え、良く混合する。

4) 0 ～ 4℃、10,000 x g で 15 分間遠心する。

5) 上清を測定試料とする。

* 希釈前で阻害率が 50% を超えていない場合には更に細胞数を増やして測定を行う。

(2) 溶液調製 (96 well プレート 1 枚分)

• WST working solution

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

• Enzyme working solution

Enzyme solution 15 μl を Dilution buffer 2.5 ml で希釈する。

• 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 倍 (希釈なし), 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶

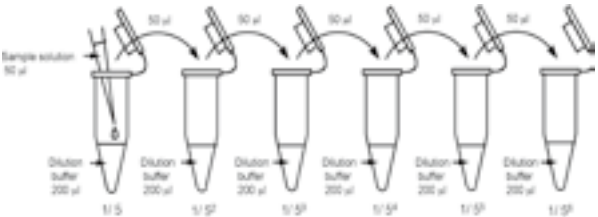


図 P-14-3 Sample solution 調製例

(3) 操作 (図 P-14-4 参照)

- 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、ピペティングもしく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 20 μl ずつ加える。
- 5) 37℃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。SOD 阻害活性 (阻害率 %) は下記の計算式により求められる。

SOD 阻害活性 (阻害率 %) =
[(A_{blank 1} - A_{blank 3}) - (A_{sample} - A_{blank 2})] / (A_{blank 1} - A_{blank 3}) × 100



- a) サンプル溶液または純水を各ウェルに入れる。
- b) 各ウェルに WST working solution を加え、Dilution buffer または Enzyme working solution を加える。



- c) 37℃で 20 分間インキュベーターでインキュベートする。
- d) 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 P-14-4 SOD assay 操作法

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

図 P-14-5 プレート配置例

表 P-14-1
サンプルおよび blank 1、2、3 の各ウェルに加える溶液の量

	sample	blank 1	blank 2	blank 3
サンプル溶液	20 μl	—	20 μl	—
純水	—	20 μl	—	20 μl
WST working solution	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Dilution buffer	—	—	20 μl	20 μl
Enzyme working solution	20 μl	20 μl	—	—

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、サンプルの希釈毎に blank 2 を測定する必要がある。

3. 阻害曲線

SOD Assay Kit - WST を使って作成した阻害曲線の例を図 P-11-6 に示す。阻害率 100% が測定できていることが確認できる。

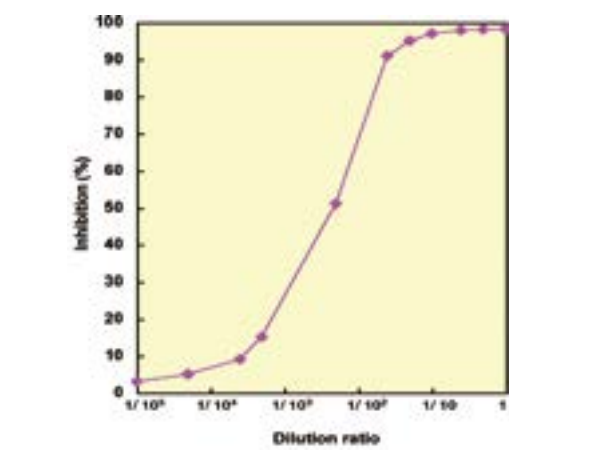


図 P-14-6 Cu, Zn-SOD の阻害曲線

4. ユニット定義

WST 法におけるユニット定義は以下の通りである。
『WST 還元 の 50% 阻害を示すサンプル溶液 20 μl に含まれる SOD 量が 1 単位 (U) である』
* Cytochrome c 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。

5. ユニット (U) 規定

- 1) 阻害曲線より阻害率 50%(IC₅₀) の時の希釈率を求める。
- 2) 阻害率 50%(IC₅₀) 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。)

6. ユニット (U) 規定例：赤血球 (前処理にて 108 倍希釈)

- 1) 阻害曲線 (図 P-14-7) より IC₅₀ 値を求める。サンプルの IC₅₀ 値の希釈率は「1.8 倍」となる。
- 2) 『1.8 倍に希釈された液、「20 μl 中」に存在する SOD 量が 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。
 $1.8 / 0.02 = 90.0 \text{ U/ml}$
- 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、この希釈率 (108 倍) を考慮して血液中のユニット数を計算する。
 $108 \times 90.0 = 9720 \text{ U/ml of blood}$
* ここでは容量に換算しています。タンパク量や質量 (mg) に換算したい場合は、さらに別途換算してください。

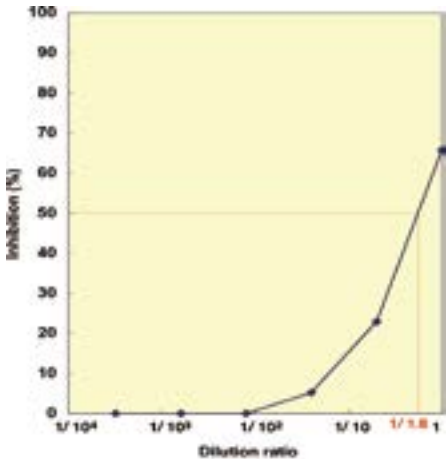


図 P-14-7 赤血球サンプルの阻害曲線

7. Mn-SOD 活性の規定

サンプル溶液中にシアン化カリウム (KCN; 終濃度 1 mmol/l, 参考文献 12 参照) あるいは Diethyldithiocarbamate(DDC; 終濃度 1 mmol/l, 参考文献 7 参照) を添加すると、これらの試薬が Cu, Zn-SOD と extracellular-SOD(EC-SOD) の活性を阻害し、Mn-SOD のみの活性を測定できる。

8. 妨害物質

表 P-14-2 の化合物は測定に影響を与えます。サンプル中にこれらの化合物を含む場合は、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 P-14-2 妨害物質の影響濃度 (サンプル中)

界面活性剤	
SDS	0.05%
Tween 20	0.5%
NP-40	0.5%
Triton X-100	0.2%
溶媒	
Ethanol	25%
DMSO	5%
還元物質	
Glutathione reduced form	1.25 mmol/l
Ascorbic acid	0.1 mmol/l
その他	
EDTA	2 mmol/l
BSA	1 %w/v

9. サンプル実測例

本プロトコルで前処理したサンプルを SOD Assay Kit - WST で測定し、WST 法でユニットを規定した場合の結果を表 P-14-3 に示します。
* 一測定例ですので、実際の測定値は異なることがあります。

表 P-14-3 サンプル実測例

Total-SOD	
赤血球	9720 U/ml of blood
血漿	335 U/ml of blood
ラット心臓	15712 U/g(湿重量)
ラット肝臓	142907 U/g(湿重量)
HeLa 細胞	73 U/1 × 10 ⁷ cells
HL60 細胞	226 U/1 × 10 ⁸ cells

IV 使用上または取扱上の注意

- 1) 本キットは 0 ～ 5℃ で保存してください。
- 2) サンプルの希釈には、添付の Dilution buffer もしくは生理食塩水をご使用ください。
- 3) 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) のアッセイを推奨します (図 P-14-5 参照)。
- 4) Enzyme working solution を加えると、直ちにスーパーオキシドの発生が開始しますので、ウェル間のタイムラグをできるだけ少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用ください。
- 5) 活性値はキネティックアッセイでも求めることができます。Enzyme working solution 添加後、直線的に吸光度が上昇する時間 (20 分以内) で測定してください。

阻害率は下記の計算式により求められます。
 $\text{阻害率 (\%)} = [(S1 - S3) - (SS - S2)] / (S1 - S3) \times 100$
S1: blank 1 の傾き, S2: blank 2 の傾き,
S3: blank 3 の傾き, SS: sample の傾き

参考文献

- 1) J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 1969, 244, 6049 .
- 2) S. Goldstein and G. Czapski, Free Rad. Res. Comms., 1991, 12, 5.
- 3) R. H. Burdon, V. Gill and C. Rice-Evans, Free Rad. Res. Comms., 1993, 18, 369.
- 4) M. W. Sutherland and B. Learmonth, Free Rad. Res., 1997, 27, 283.
- 5) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, Anal. Sci., 1999, 15, 353.
- 6) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 485.
- 7) R. E. Heikkila, F. S. Cabbat and G. Cohen, J. Biol. Chem., 1976, 251, 2182 .
- 8) H. R. Rezvani, F. Mazurier, M. Cario-Andre, C. Pain, C. Ged, A. Taieb and H. de Verneuil, J. Biol. Chem., 2006, 281, 17999 .
- 9) A. R. Sifakas, L. C. Wright, T. C. Sorrell and J. T. Djordjevic, Eukaryotic Cell, 2006, 5, 488 .
- 10) 大柳善彦, 炎症, 1984, 4, 63.
- 11) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子編, 活性酸素測定マニュアル, 講談社, 1992.
- 12) M. L. Salin, E. D. Day, Jr. J. D. Crapo, Arch. Biochem. Biophys., 1978, 187, 223.