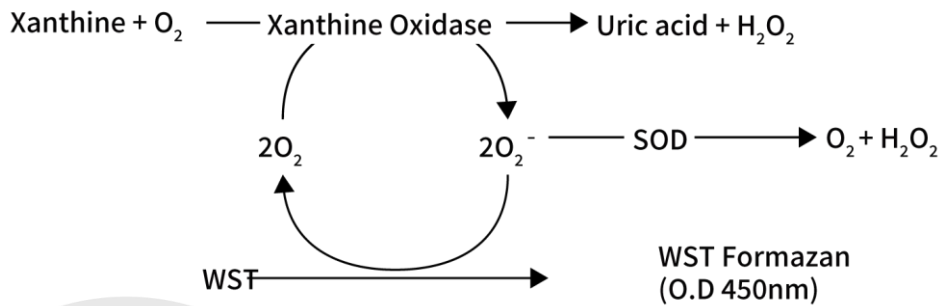


OxiTec™ SOD Assay Kit

(Colorimetric)

BO-SOD-250/500, 250/500 assays

제품 원리



BIOMAX 사의 OxiTec™ SOD Assay Kit는 Xanthone Oxidase와 WST를 이용하여 Sample내에 존재하는 SOD의 활성을 분석하는 제품입니다. 산화 환원 반응을 통해 WST-Formazon을 형성하여 흡광도 450 nm에서 측정 가능합니다. 이때 SOD가 활성을 나타내는 경우 Xanthine oxidase에 의해 생성된 $2O_2^-$ 는 WST와의 반응 보다 SOD에 의해 O_2 와 H_2O_2 로 전환되려는 경향이 강하므로 WST-Formazan이 적게 생성되어 SOD 활성도와 흡광도 값은 반비례를 나타냅니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	250 Assays	500 Assays	Storage
WST Solution	2.5 ml	5 ml	4°C
Buffer Solution	50 ml	100 ml	
Xanthine Oxidase	50 µl	100 µl	
Dilution Solution	25 ml	50 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
- ▶ Colorimetric microplate reader (450 nm Filter, 37°C)
- ▶ Vortexer
- ▶ Micro centrifuge (4°C)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

WST Working solution

1 ml WST Solution과 19 ml Buffer Solution을 혼합하여 WST Working solution을 준비합니다. 혼합한 용액은 빛을 차단한 상태에서 4°C 보관 시 3주간 안정하나, 사용 직전에 혼합하여 사용하는 것이 좋습니다.

Xanthine Oxidase

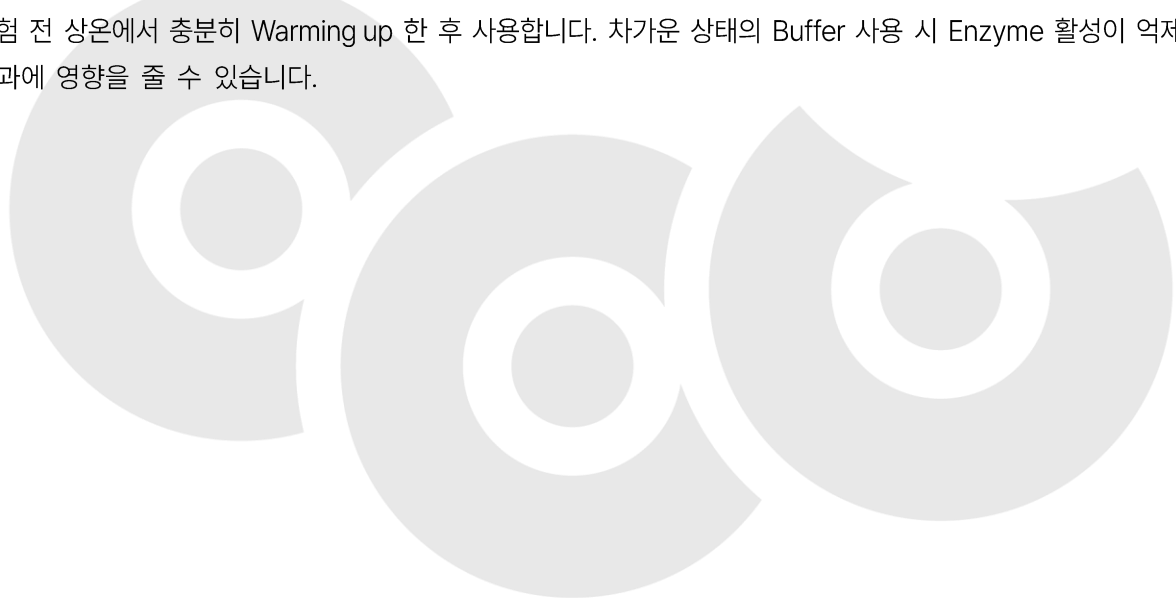
두 층으로 분리가 되어있으며, 사용 전 Spin down 후 Pipetting 하여 골고루 잘 섞어 사용해야 합니다.

Enzyme working solution

16.5 µl Xanthine Oxidase와 2.5 ml Dilution Solution를 혼합하여 Enzyme working solution을 준비합니다. 혼합한 용액은 4°C에서 3주간 안정하나, 사용 직전에 혼합하여 사용하는 것이 좋습니다.

Buffer solution, Dilution solution

실험 전 상온에서 충분히 Warming up 한 후 사용합니다. 차가운 상태의 Buffer 사용 시 Enzyme 활성이 억제되어 결과에 영향을 줄 수 있습니다.



Sample pre-treatment

* 모든 샘플은 Fresh한 상태이어야 하며, -80°C에서 보관 하더라도 1개월 이상 된 샘플을 측정할 시 결과값이 떨어질 수 있습니다.

Erythrocytes or Plasma

- ① Heparin (10 U/ml) 또는 다른 Anticoagulant을 처리한 혈액 2~3 ml를 4°C, 600 x g에서 10 min 간 Centrifuge 합니다.
- ② Supernatant만 분리하여 Plasma sample로 사용하며, 필요할 경우 PBS로 희석합니다. Pellet을 사용할 경우 Pellet과 동량으로 PBS를 넣고 Pellet을 잘 풀어줍니다.
- ③ 4°C, 600 x g에서 10 min 간 Centrifuge합니다.
- ④ ②~③ (Washing step)을 총 세 번 반복합니다. 그 후 남아있는 Pellet에 D.W. 4 ml에 Suspend 시킨 후, 1 ml Ethanol과 0.6 ml의 Chloroform을 넣습니다.
- ⑤ 4 °C에서 Shaker로 15 min 간 잘 섞어 줍니다.
- ⑥ 600 x g에서 10 min 간 Centrifuge한 후, 상층액 (Water-ethanol phase)을 새로운 Microtube에 옮긴 후, 0.1 ml Upper phase 당 0.7 ml 의 D.W. 와 0.25 %의 Ethanol을 넣고 잘 혼합하여 Sample solution으로 사용합니다.

Tissue (100 mg)

- ① Tissue을 PBS로 Washing하여 남아있는 잔여 혈액을 제거하여 주십시오. 그 후 물기를 제거한 후 무게를 측정합니다.
- ② 400~900 µl Sucrose buffer (0.25 M Sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4)를 넣고, Homogenize 합니다. 만약 Sonicate를 하길 원하면 Ice bath에 넣고 약 15 min 간 60 W, 0.5 sec Intervals로 Homogenize 합니다.
- ③ 4°C, 10,000 xg로 60 min 동안 Centrifuge 합니다. 그 후 Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Assay에 사용합니다.

Cell

- ① 실험에 진행할 Cell (Adherent cell : 9×10^6 / Leukocyte : 1.2×10^7 cells)을 Scraper로 긁어서 떨어 트린 후, 2,000 x g에서 10 min 간 4 °C Centrifuge 진행 합니다.
- ② 상층액 제거 후, 1 ml PBS로 Resuspension 진행합니다. 2,000 x g에서 10 min 간 4 °C Centrifuge 합니다. 이를 두 번 더 진행합니다.
- ③ 상층액을 제거합니다.
- ④ Freeze – thaw method (-20 °C / 20 min -> 37 °C / 10 min 두 번 반복)을 이용하여 Cell을 깍니다.
- ⑤ 1 ml PBS를 추가합니다. (필요하다면 Ice bath에서 Sonication 을 진행해도 무방합니다. (60 W, 0.5sec, Interval 15 min))
- ⑥ 10,000 x g 15 min 간 4 °C Centrifuge 진행 후 상층액만 취합니다.

주의 사항

- ▶ Sample에 2-Mercaptoethanol 또는 Dithiothreitol(DTT)이 함유된 경우 흡광도에 영향을 줍니다. 전처리 과정을 거쳐 모두 제거한 후 실험하시기 바랍니다.
- ▶ Sample에 아래와 같은 물질이 포함된 경우 주어진 농도보다 낮은 농도가 되도록 Sample을 희석하여 사용하시기 바랍니다.

Detergents		Solvents	
SDS	0.05 %	Ethanol	25 %
Tween 20	0.5 %	DMSO	5 %
NP-40	0.5 %	Methanol	25 %
Reducing agents		Others	
Glutathione reduced form	1.25 mmol/l	EDTA	2 mM
Ascorbic acid	0.1 mmol/l	BSA	1 % (W/V)

- ▶ Sample의 SOD Activity 를 Unit으로 Calculation할 경우 SOD Standard (별도구매)를 사용하거나 Sample을 Serial dilution하여 사용하시기 바랍니다.

Blank

실험 시 공통적으로 필요한 Blank는 다음과 같습니다.

Blank 1

최대 흡광도를 나타냅니다. SOD가 없는 상태로 반응상 발생되는 Superoxide anion이 분해되지 않고 모두 WST-formazan 형성에 관여하기 때문에 실험결과 가장 높은 흡광도가 측정 되어 합니다.

* 실험하는 Sample의 흡광도 값은 Blank 1보다 낮아야 합니다. Sample의 흡광도 값이 Blank 1과 비슷하거나 높게 나오는 경우 Sample의 희석 배율을 높여서 사용하시기 바랍니다.

Blank 2

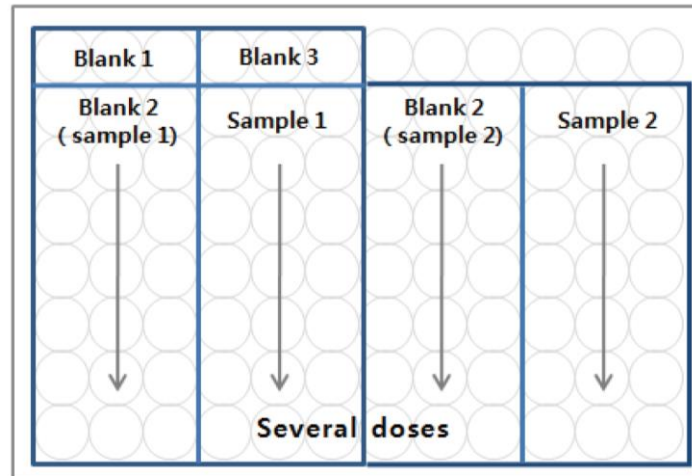
Test sample의 Background를 나타냅니다. Test sample을 Dilution하여 사용할 경우, Dilution된 각각의 Test sample의 Blank를 측정해야 합니다.

Blank 3

Test sample을 제외한 나머지 Solution들의 Background를 나타냅니다. Solution들의 Background 뿐 아니라 실험 진행 시 Kit component 오염이나 외부 요인에 의해 실험결과가 영향을 받는지 여부를 체크해 볼 수 있습니다.

실험 과정

- ① 다양한 농도로 희석한 Sample을 각 Sample well과 Blank 2 well에 20 μ l씩 넣어줍니다.
- ② Blank 1과 Blank 3 well에는 D.W.를 각각 20 μ l씩 넣어줍니다.



Example arrangement on a 96-well Microplate

- ③ WST Working solution을 각 Well에 200 μ l씩 넣어줍니다.
- ④ Blank 2와 Blank 3의 Well에 Dilution Solution을 각각 20 μ l씩 넣어줍니다.
- ⑤ Multi-channel micropipette을 이용하여 Enzyme working solution을 Blank 1과 Sample well에 각각 20 μ l씩 넣은 후 조심스럽게 섞어줍니다.

* Enzyme working solution을 넣자마자 Superoxide가 발생되어 발색이 진행되기 때문에 Multi-channel micropipette을 이용하여 Well간의 격차를 최소화 시켜주는 것이 좋습니다.

	Blank 1 (μ l)	Blank 2 (μ l)	Blank 3 (μ l)	Test sample (μ l)
Sample	-	20	-	20
D.W.	20	-	20	-
WST Working solution	200	200	200	200
Dilution Solution	-	20	20	-
Enzyme working solution	20	-	-	20
Total volume	240	240	240	240

- ⑥ Plate를 37°C 에서 20~30 min 동안 반응시킵니다.

* Xanthine Oxidase의 최적 반응온도는 37 °C로 주위온도가 낮거나 Solution 이 충분히 Warming up 되지 않은 경우 흡광도가 낮게 나올 수 있습니다. Blank 1 의 흡광도가 0.7보다 낮게 나오는 경우에는 반응시간을 늘려 측정해주시면 됩니다. ($0.7 \leq \text{Blank 1} \leq 1$)

- ⑦ Microplate reader로 흡광도 450 nm에서 측정합니다.

결과 분석

$$\text{SOD Activity (Inhibition rate \%)} = \frac{(OD_{\text{blank 1}} - OD_{\text{blank 3}}) - (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank 2}})}{(OD_{\text{blank 1}} - OD_{\text{blank 3}})} \times 100$$

SOD Activity (Unit)

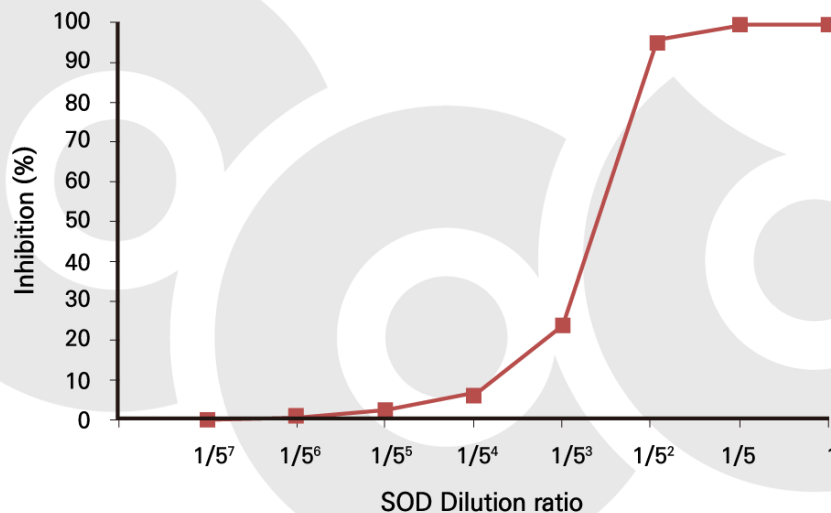
- Sample의 50 % Inhibition rate (IC₅₀)가 나올 때까지 희석하여 희석배율을 구합니다.
- 1 Unit = WST-1의 환원 반응을 50% 저해하는(IC₅₀) 20 μl의 Sample 내에 함유된 SOD의 농도
예) Blood sample 내의 Total SOD unit을 구하는 경우

실험결과 IC 값이 1/25 희석배율에서 결정된 경우 : 1 U x 25 (희석배율) = 25 U

실험에 사용한 Sample의 Volume이 20 μl이므로 : 25 U / 20 μl = 1.25 U/μl = 1,250 U/ml

만약 Blood sample 준비 시 고농도의 Stock sample을 10 배 희석하여 준비하였다면

: 1,250 U/ml x 10 = 12,500 U/ml of blood



Inhibition curve of Cu,Zn-SOD

Related products

- | | |
|------------------|--|
| - BO-TAC-200 | OxiTec™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric) |
| - BO-TBR-200 | OxiTec™ TBARS Assay Kit (Colorimetric) |
| - BO-GLU-200 | OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit (Colorimetric) |
| - BO-CAT-400 | OxiTec™ Catalase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) |
| - BO-PER-500 | OxiTec™ Hydrogen Peroxide/peroxidase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) |
| - BO-DPH-200/500 | OxiTec™ DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric) |

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 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