

# EZ-SOD Assay Kit

Superoxide Dismutase Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-SOD400

FOR RESEARCH USE ONLY

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

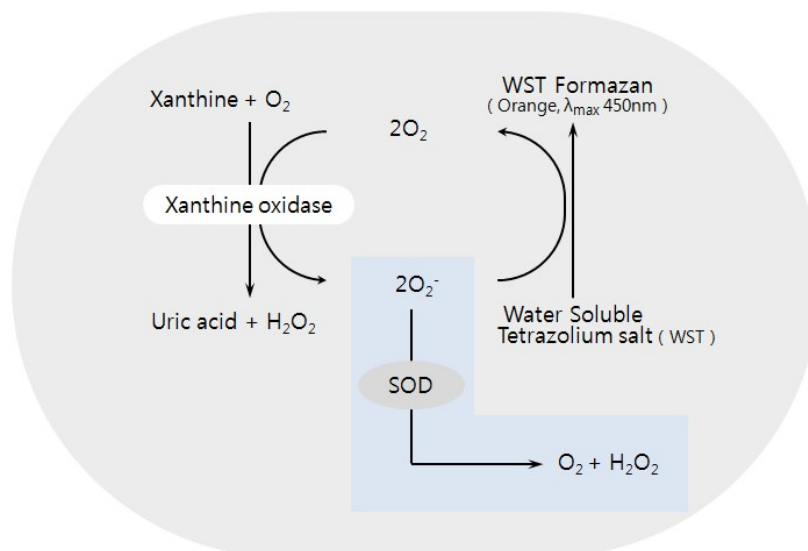
## ▪ Product Description

SOD는 각종 세포의 대사과정에서 끊임 없이 생성되는 활성산소들 중 superoxide anion (또는 라디칼)을 산소와 과산화수소로 전환시키는(dismutation) 반응을 촉매 하는 중요한 항산화 효소입니다.

Animal뿐 아니라 plant에도 광범위하게 존재하는 SOD는 metalloenzymes로써 결합된 metal의 종류에 따라 그 종류가 달라집니다. Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD 등이 대표적인 종류로 진핵세포의 세포질에는 주로 Cu/Zn SOD가 존재하며 사람의 미토콘드리아나 일부 대장균에는 Mn SOD가 존재합니다.

SOD는 대표적인 항산화 효소로써 항산화 능력을 측정하는 지표로 측정되어 왔으며, 대표적인 방식으로 NBT가 많이 사용되어왔으나 물에 잘 녹지 않는 formazan형성과 xanthine oxidase와의 직접적인 반응 등의 문제로 정확한 측정이 어려웠습니다.

DoGen의 EZ-SOD Assay kit는 이러한 문제점을 보완하고자 Water Soluble Tetrazolium salt (WST)를 사용하여 보다 안정적이고 정확한 SOD activity를 측정할 수 있는 제품입니다.



Detection mechanism with EZ-SOD assay kit

Xanthine oxidase는 xanthine을 산화시켜 Uric acid와  $H_2O_2$ 를 생성하는 동시에  $O_2^-$ 를 생성합니다. 이렇게 생성된  $O_2^-$ 는 WST를 환원시켜 450nm에서 흡광을 나타내는 유색의 WST-formazan을 형성하게 됩니다. 하지만 SOD가 활성을 나타내는 경우 Xanthine oxidase에 의해 생성된  $O_2^-$ 을  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 로 전환시켜 WST-formazan의 형성을 억제하게 됩니다. 억제 정도는 SOD 효소 활성과 관련이 있으며, SOD 효소의 활성이 클수록 450nm에서의 흡광도는 낮아지게 됩니다.

## ▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	400 assay
WST Solution	4mℓ
Buffer Solution	50 mℓ x 2
Xanthine Oxidase	70 μℓ
Dilution Buffer	50 mℓ

\* 개봉 전 Kit는 4°C에서 6개월간 안정합니다.

## ▪ Preparation of Working Solution

Solution	Preparation	Storage and Stability
WST Working Solution (Protect from light)	1mℓ WST Solution과 19mℓ Buffer Solution을 혼합한다.	
Enzyme Working Solution (Xanthine Oxidase)	15μℓ Xanthine Oxidase와 2.5mℓ Dilution Buffer을 혼합한다.  * Xanthine Oxidase는 두 층으로 분리가 되어있으며, 사용 전 spin down 후 pipetting 하여 골고루 잘 섞어 사용해야 합니 다.	혼합한 용액은 4°C에서 3주간 안정하나, <u>사용 직전에 혼합하여 사용 하는 것이 좋습니다.</u>

\* Buffer solution, Dilution buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용합니다.  
차가운 상태의 buffer 사용시 enzyme 활성이 억제되어 결과에 영향을 줄 수 있습니다.

## ▪ Interference

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

Detergent		Solvents	
SDS	0.05%	Ethanol	25%
Tween20	0.5%	DMSO	5%
NP-40	0.5%	Methanol	25%
Reducing agents		Others	
Glutathione reduced form	1.25 mmol/l	EDTA	2 mmol/l
Ascorbic acid	0.1 mmol/l	BSA	1%(W/V)

## ▪ Preparation of Sample

**Cells** (0.5~1.5x10<sup>7</sup> cells, 세포의 종류에 따라 적절한 세포수를 결정할 것)

- ① 부유된 세포를 2,000xg로 원심분리(10 min at 4 °C)하고 상층액을 제거합니다.
- ② PBS 1 ml 첨가 후 2,000xg로 원심분리(10 min at 4 °C)하고 상층액을 제거합니다.
- ③ Freeze-Thaw method를 이용하여 세포를 파쇄합니다.  
(-20°C for 20 min, 37°C bath 10 min, 총 3회 반복)  
\* option : PBS 1 ml 첨가하고 homogenizer 또는 sonication으로 세포를 파쇄합니다.
- ④ 1 ml PBS 첨가하고 10,000xg(10 min at 4 °C)로 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 샘플로 사용합니다.

**Plant** (200 mg)

- ① D.W. 1 ml 첨가 후 homogenizer 로 세포를 파쇄합니다.
- ② 종이필터로 여액을 분리하고 동결건조합니다.
- ③ 시료의 무게를 측정한 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 녹입니다.

**Tissue** (100 mg)

- ① 시료를 saline으로 세척하여 blood 를 최대한 제거합니다.
- ② Paper towel을 이용해 수분을 제거하고 무게를 측정합니다.
- ③ Sucrose buffer 0.4~0.9 ml 첨가하고 homogenizer 로 균질화합니다.  
\* option : ice 위의 tube에서 sonication을 하여 세포를 파쇄합니다.
- ④ 10,000xg(10 min at 4 °C)로 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 샘플로 사용합니다.

**Erythrocytes or Plasma**

- ① 항응고제 처리된 혈액 2~3 ml을 600xg(10 min at 4 °C)로 원심분리합니다.
- ② 상층액을 제거하고 saline으로 희석하여 plasma로 사용합니다.
- ③ Pellet에 saline을 추가하여 600xg(10 min at 4 °C)로 원심분리하고 상층액을 제거합니다.
- ④ 위의 ③을 2회 더 반복합니다.
- ⑤ Pellet에 D.W. 4 ml을 첨가한 후, ethanol 1 ml과 chloroform 0.6 ml을 첨가합니다.
- ⑥ 4 °C에서 15 min 동안 shaking합니다.
- ⑦ 600xg(10 min at 4 °C)로 원심분리하고 물-에탄올 층을 새로운 tube로 옮깁니다.
- ⑧ 물-에탄올 층 0.1 ml에 D.W. 0.7 ml을 첨가하여 sample로 사용합니다.  
(필요시 0.25% ethanol로 희석할 수 있습니다.)

## ▪ Preparation of Blank

실험 시 공통적으로 필요한 blank는 다음과 같습니다.

### 1) Blank 1

최대 흡광도를 측정합니다. 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 1 보다 낮아야 합니다. Sample의 흡광도 값이 blank 1 과 비슷하거나 높게 나오는 경우 sample의 희석배율을 높여서 사용하시기 바랍니다.

### 2) Blank 2

Test sample의 background를 측정합니다.

Test sample을 dilution 하여 사용할 경우, dilution된 각각의 test sample의 blank를 측정해야 합니다.

### 3) Blank 3

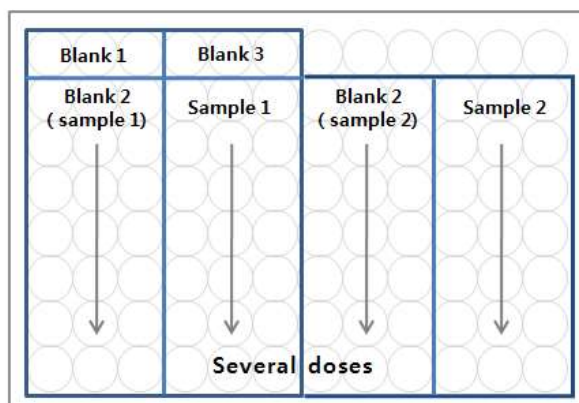
Test sample을 제외한 나머지 solution 들의 background를 측정합니다.

solution들의 background 뿐 아니라 실험진행 시 kit component 오염이나 외부 요인에 의해 실험결과가 영향을 받는지 여부를 체크해 볼 수 있습니다.

## ▪ General Protocol

1. 다양한 농도로 희석한 sample을 각 sample well과 Blank 2의 well에 20  $\mu$ l씩 넣어줍니다. 이때 Blank 1과 Blank 3 well 에는 ddH<sub>2</sub>O를 각각 20 $\mu$ l씩 넣어줍니다.

\* sample의 SOD activity를 unit으로 calculation할 경우 SOD standard (별도구매, sigma S7571)를 사용하거나sample을 serial dilution하여 사용하시기 바랍니다.



Example arrangement on a 96 well plate

2. WST working solution을 각 well에 200  $\mu$ l씩 넣어줍니다.

3. Blank 2와 Blank 3의 well에 Dilution Buffer를 각각 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣어줍니다.

4. Multi-channel pipette을 이용하여 Enzyme working solution을 Blank 1과 sample well에 각각 20 $\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 조심스럽게 섞어줍니다.

\* Enzyme working solution을 넣자마자 superoxide가 발생되어 발색이 진행되기 때문에 multi-channel pipette을 이용하여 well간의 격차를 최소화 시켜주는 것이 좋습니다.

	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Test sample
Sample	—	20 $\mu\text{l}$	—	20 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	20 $\mu\text{l}$	—	20 $\mu\text{l}$	—
WST working solution	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
Dilution Buffer	—	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	—
Enzyme working solution	20 $\mu\text{l}$	—	—	20 $\mu\text{l}$
Total volume	240 $\mu\text{l}$	240 $\mu\text{l}$	240 $\mu\text{l}$	240 $\mu\text{l}$

5. Plate를 37 °C에서 20분간 반응시킵니다.

\* Xanthine Oxidase의 최적 반응온도는 37 °C로 주위 온도가 낮거나 solution이 충분히 warming up 되지 않은 경우 흡광도가 낮게 나올 수 있습니다. Blank 1의 흡광도가 0.7보다 낮게 나오는 경우에는 반응시간을 늘려 측정해주시면 됩니다. (  $0.7 \leq \text{blank1} \leq 1$  )

6. Plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정합니다.

## ▪ Calculation

$$1. \text{SOD activity ( Inhibition rate \% )} = \frac{(\text{OD}_{\text{blank1}} - \text{OD}_{\text{blank3}}) - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank2}})}{(\text{OD}_{\text{blank1}} - \text{OD}_{\text{blank3}})} \times 100$$

2. SOD activity (unit)

1) Sample의 50% inhibition rate (IC50)가 나올 때까지 희석하여 희석배율을 구합니다.

2) WST-1의 환원 반응을 50% 저해하는(IC50) 20 $\mu\text{l}$ 의 sample내에 함유된 SOD의 농도를 1unit으로 나타냅니다.

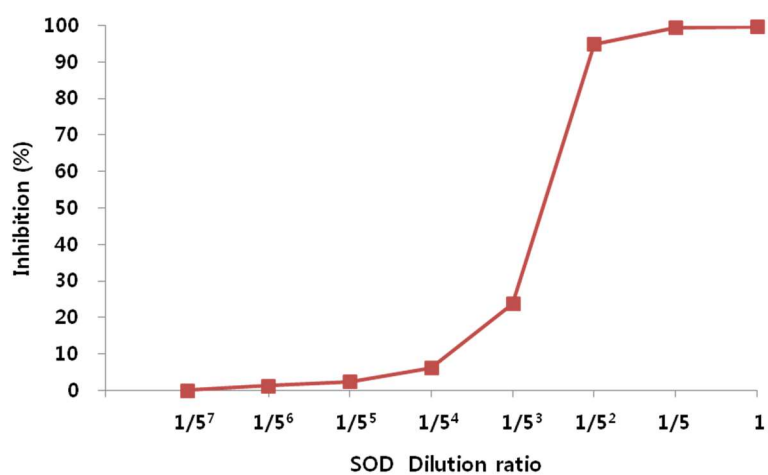
예) Blood sample내의 total SOD unit을 구하는 경우

실험결과 IC50값이 1/25 희석배율에서 결정된 경우 : 1 U x 25 (희석배율) = 25 U

실험에 사용한 sample의 volume이 20 $\mu\text{l}$ 이므로 : 25 U/20  $\mu\text{l}$  = 1.25 U/ $\mu\text{l}$  = 1,250 U/ml

만약 blood sample 준비시 고농도의 stock sample을 10배 희석하여 준비하였다면

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



Inhibition curve of Cu,Zn-SOD

## ▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
<b>Oxidative Stress Assay Kit</b>	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
<b>Metabolism Assay Kit</b>	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay



---

EZ-Total Collagen Assay Kit  
(Colorimetric)

---

DG-COL100

100 Assay