

Glutamine Assay Kit-WST® (货号: G268)

. 概述

谷氨酰胺是TCA循环的中间体 α -酮戊二酸的主要来源，并且是用于核酸和其他氨基酸合成及能量产生的重要物质。根据文献报道¹⁾特别是在癌细胞中，谷氨酰胺作为底物可促进 Glutaminolysis 的生成，而 Glutaminolysis 是产生 α -酮戊二酸的途径之一。同时 Glutaminolysis 还可以消除活性氧并减少氧化型谷胱甘肽。

Glutamine Assay Kit-WST® 是用于定量检测谷氨酰胺的试剂盒。无论是培养基内还是细胞内的谷氨酰胺均可以通过 WST® 的还原反应进行定量，可检测的最低浓度为 5 $\mu\text{mol/l}$ 。此外，本试剂盒还可使用 96 孔板进行多样品批量检测。

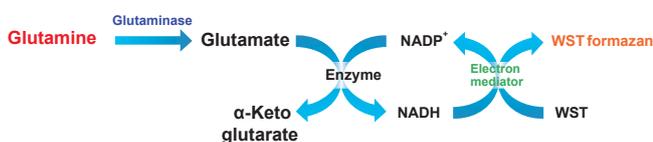


图1. Glutamine Assay Kit-WST®的检测原理

. 试剂盒内含

Dye Mixture	x 1 管
Glutamine Standard (红盖子)	x 1 管
Enzyme (绿盖子)	x 1 管
Glutaminase (黄盖子) 20 μl	x 1 管
Reconstitution Buffer (白盖子) 750 μl	x 1 管
Reaction Buffer 5 ml	x 1 管
Assay Buffer 7.5 ml	x 1 管
Lysis Buffer 25 ml	x 1 管
Filtration Tube	x 12 管

* 本试剂盒附带的Filtration Tube用于细胞内谷氨酰胺的定量检测。本试剂盒可检测8个标准样品和12个检测样品(n = 3时)。因此附带了12个Filtration Tube。当需要12个以上检测样品时，需另外准备 Filtration Tube (Nanosep 超滤离心管 (10K) ([OD010C33], PALL公司))。

. 储存条件

0-5 保存

. 所需的设备和材料

1. 酶标仪 (450 nm 滤光片)
2. 96 孔板
3. 培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$)
4. 多通道移液器 (20-200 μl)
5. 锥形样品管
6. 单通道移液器 (100-1000 μl , 20-200 μl , 2-20 μl)
7. Phosphate Buffered Saline (PBS)

. 溶液制备

1. 本试剂盒中的试剂，请恢复至室温再使用。
2. 由于在运输过程中可能会因振动而使试剂粘附在管壁或管盖内侧，因此在打开前，请将试剂敲落至管底部。
3. 由于 Glutaminase 悬浊液的状态。静置后会发生沉淀，因此在使用前请先用移液器吹打混匀。
4. 为了获得准确的实验结果，建议对每个检测样本使用复 (n=3 或更多) 孔。
5. 向样品中添加 Working Solution 后立即开始显色。请使用多通道移液器以减少由于每个孔之间的时间差而导致的检测误差。
6. 样品需要稀释到标准曲线范围内再进行检测。
7. 由于本试剂盒含有玻璃容器和铝制密封盖，使用时请戴防护手套。
8. 本产品用于检测细胞培养上清液和细胞内的谷氨酰胺。测量细胞内谷氨酰胺浓度时，请使用试剂盒附带的 Lysis Buffer 制备细胞裂解液和 Glutamine Standard Solution。细胞裂解液请在使用 Filtration Tube 进行除蛋白质处理之后再加入。

. 溶液制备

1. 配制 Dye Mixture Stock Solution

将所有 Reconstitution Buffer 加入到 Dye Mixture 的 Vial 瓶中溶解。

* 将溶解好的 Dye Mixture Stock Solution 转移到 Reconstitution Buffer 瓶中，遮光，冷藏 (0-5 $^{\circ}\text{C}$) 保存。(保质期 2 个月)

2. 配制 Enzyme Stock Solution

向 Enzyme 中加入 120 μl PBS，用移液器吹打混匀。

* Enzyme 可能会从管底部脱落并粘在管壁或盖子内侧。请确认将 Enzyme 敲落至管底后再打开。

* Enzyme Stock Solution 应在冰浴上使用，溶解后需要冷藏 (0-5 $^{\circ}\text{C}$) 保存 (保质期 2 个月)。

3. 配制 Glutamine Standard Stock Solution (10 mmol/l)

向 Glutamine Standard 中加入 300 μl 超纯水，用移液器吹打混匀。

* 每次开盖前请离心管子以使粘附在管壁或盖子内侧的 Glutamine Standard 粉末落到管底。

* Glutamine Standard Stock Solution 应在冰浴上使用，溶解后应冷藏 (0-5 $^{\circ}\text{C}$) 保存 (保质期 2 个月)。

4. 配制 Glutaminase Solution

用 Reaction Buffer 稀释 Glutaminase。

* 请参考表1配制 Glutaminase Solution。

	24 孔板	48 孔板	96 孔板
Reaction Buffer	550 μl	1100 μl	2200 μl
Glutaminase	2.5 μl	5 μl	10 μl

表1. Glutaminase Solution 配制例

5 配制Working Solution

- 1) 将 Dye Mixture Stock Solution 添加到锥形管中，并用 Assay Buffer 稀释。
- 2) 将 Enzyme Stock Solution 添加到步骤 (1) 中制备的溶液中。*请参考表2配制 Working Solution。

	24 孔板	48 孔板	96 孔板
Dye Mixture Stock Solution	175 μ l	350 μ l	700 μ l
Assay Buffer	1575 μ l	3150 μ l	6300 μ l
Enzyme Stock Solutin	24.5 μ l	49 μ l	98 μ l

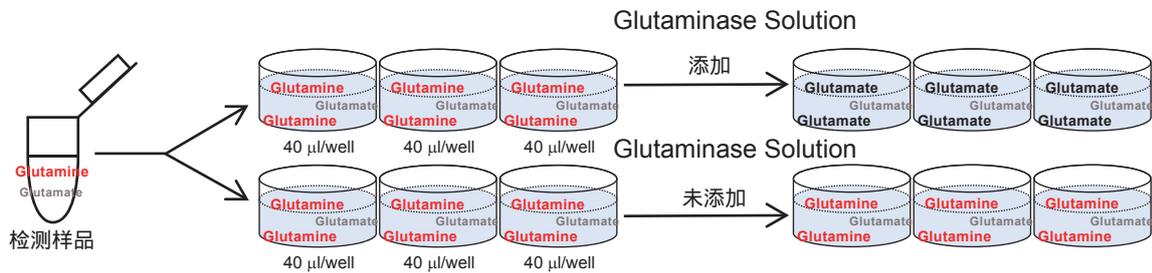
表2. Working Solution的配制例

* 由于 Working Solution 对光不稳定，请现配现用。配制后请用铝箔包裹避光，配置好的 Working Solution 无法长期保存，请在当天内使用。

操作步骤

1. 检测用样品的配制

如图 2 所示，使用 Glutamine Assay Kit - WST[®] 测定样品中的谷氨酰胺浓度。在 n=3 时，(添加了 Glutaminase Solution (40 μ l \times 3孔) 和未添加 Glutaminase Solution (40 μ l \times 3孔))，共计需要 6 个孔。



$$\text{样品中谷氨酰胺浓度(mmol/l)} = (\text{添加 Glutaminase Solution}) - (\text{未添加 Glutaminase Solution})$$

图2. 使用 Glutamine Assay Kit - WST[®] 检测谷氨酰胺浓度的方法

- 细胞培养上清中谷氨酰胺定量用样品的配制 -

准备细胞培养上清液检测样品 (Sample)。

* 用超纯水稀释检测样品，使其在校准曲线范围内 (0-0.5 mmol/l)。

* 当以 n=3 进行测量时，至少需要 240 μ l (每孔 40 μ l \times 6孔)。

- 细胞内谷氨酰胺定量用样品的配制 -

- 1) 在 1.5 ml 微型管中准备细胞 (5 - 10 \times 10⁵ 细胞)。
- 2) 以 300 \times g 离心 5 min，然后除去上清液。
- 3) 加入 500 μ l PBS，用移液器吹打形成细胞悬液后，300 \times g 离心 5 min，除去上清液。
- 4) 加入 400 μ l Lysis Buffer，通过移液器吹打形成细胞悬液后，12,000 \times g 离心 5 min。
- 5) 将 350 μ l 上清液转移至 Filtration Tube 并以 12,000 \times g 离心 10 min。

* 当 n=3 时，至少需要 240 μ l (每孔 40 μ l \times 6孔)。

* 如果离心后的滤液不足 240 μ l，请延长离心时间。

6) 将操作 5) 中获得的滤液用于检测 (Sample)。

* 请用 Lysis Buffer 稀释检测样品，使其在标准曲线范围内 (0 - 0.5 mmol/l)。

2. Glutamine Standard Solution 的配制

用 950 μ l 超纯水稀释 50 μ l 的 10 mmol/l 谷氨酰胺标准储备液，以制备 0.5 mmol/l 谷氨酰胺标准溶液。然后依次进行 2 倍稀释制成标准溶液 (0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0157、0.00785、0 mmol/l) (见图 3)。

* 当测量细胞裂解液中的谷氨酰胺浓度时，请用裂解缓冲液代替纯水制备谷氨酰胺标准溶液。

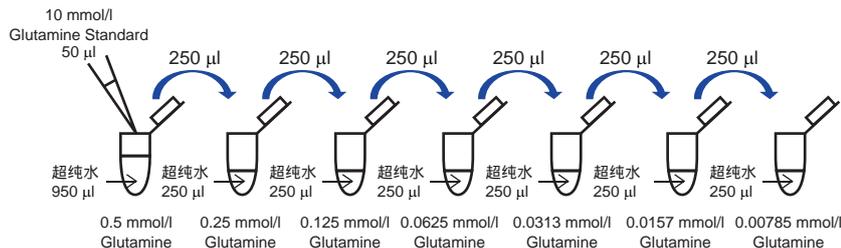


图3. Glutamine Standard Solution 的调制方法

3. 检测

- 向每个孔中添加 40 μl 谷氨酰胺标准溶液或样品(见图4)。
 - * 为了获得准确的检测值, 建议每个样品使用复孔 ($n=3$ 或更多) 检测。
- 向谷氨酰胺标准溶液和样品的每个孔中添加20 μl 谷氨酰胺酶溶液 (添加了谷氨酰胺酶溶液)。
- 在样品 (不添加谷氨酰胺酶溶液) 的每个孔中添加 20 μl Reaction Buffer。
- 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 15 min。
 - * 培养时, 请使用微孔板密封垫, 以防止溶液挥发。
- 向每个孔中加入 60 μl 工作溶液。
 - * 由于加入Working Solution后立即开始显色。请使用多通道移液器以减少孔间差。
- 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 min。
 - * 培养时, 请使用微孔板密封垫, 以防止溶液挥发。
- 使用酶标仪, 测量450 nm处的吸光度。
- 从标准曲线中获取检测样品中的谷氨酰胺浓度。
 - * 使用右侧公式计算检测样品中的谷氨酰胺浓度。谷氨酰胺浓度(mmol/l)=(添加谷氨酰胺酶溶液)-(未添加谷氨酰胺酶溶液)
 - * 计算出的值是配制的检测样品溶液中的浓度。稀释前样品中的浓度请根据检测值和样品的稀释倍数计算。
 - * 由于 Working Solution对光不稳定, 请现配现用。配制后用铝箔包覆避光, 配置好的Working Solution无法长期保存, 请在当天内使用。

	1	2	3	4	5	6
A	0 mmol/l Glutamine			Sample 1 添加Glutaminase Solution		
B	0.00785 mmol/l Glutamine			Sample 1 未添加Glutaminase Solution		
C	0.0157 mmol/l Glutamine			Sample 2 添加Glutaminase Solution		
D	0.0313 mmol/l Glutamine			Sample 2 未添加Glutaminase Solution		
E	0.0625 mmol/l Glutamine			Sample 2 添加Glutaminase Solution		
F	0.125 mmol/l Glutamine			Sample 2 未添加Glutaminase Solution		
G	0.25 mmol/l Glutamine			Sample 2 添加Glutaminase Solution		
H	0.5 mmol/l Glutamine			Sample 2 未添加Glutaminase Solution		

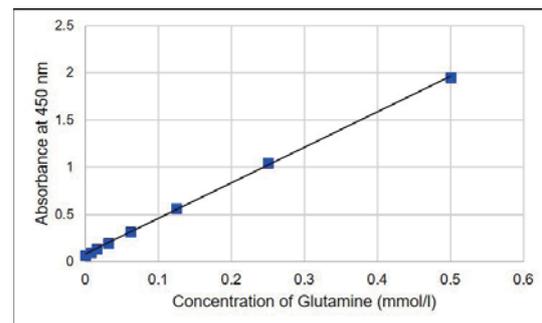
图4. Glutamine Standard Solution和样品孔分布例($n=3$)

图5. Glutamine 标准曲线的实验例

. 实验例

阿霉素(Doxorubicin)诱导衰老的 A549 细胞中谷氨酰胺消耗量的检测

- 将A549细胞 (含有 2×10^7 细胞/培养皿, 10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基) 接种在10 cm 培养皿中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中过夜培养。
- 吸除培养基, 加入10 ml 用DMEM 培养基稀释的200 nmol/l阿霉素溶液, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中培养 2天。
- 吸除培养基, 并用2 ml PBS洗涤一次。
- 通过胰蛋白酶处理将细胞分离, 然后用 DMEM 培养基将细胞回收至锥形管中。
- 在6孔板中分别播种添加和不添加阿霉素的 A549细胞 (1×10^6 细胞/孔, 10%胎牛血清, 含 1%青霉素-链霉素的 DMEM培养基), 在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱过夜培养。
- 吸除培养基, 加入2 ml含 2 mmol/l 谷氨酰胺的 DMEM 培养基, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中过夜培养。
- 将 100 μl 细胞培养上清液置于1.5 ml微型管中, 并用超纯水稀释 15 倍。
 - * 为了确定谷氨酰胺的消耗量, 将含有2 mmol/l谷氨酰胺的 DMEM培养基用超纯水稀释 15倍。
- 配制Glutamine Standard Solution并制备标准液 (请参见Glutamine Standard Solution的制备)。
- 将制备好的检测样品 (仅含 DMEM 培养基, 经阿霉素处理和未处理的细胞培养上清液) 和谷氨酰胺标准溶液按照每孔40 μl 分别加至96孔板中。
- 将 20 μl 制备好的谷氨酰胺酶溶液添加到谷氨酰胺标准溶液孔和样品孔中 (添加谷氨酰胺酶溶液)。

- 11) 在不添加谷氨酰胺酶溶液的样品孔中，加入 20 μl Assay Buffer。
- 12) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 15 min。
- 13) 将 60 μl 配制好的Working solution添加到每个孔中。
- 14) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 min。
- 15) 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度，并从标准曲线中得出检测样品中的谷氨酰胺浓度。

由下式算出检测样品中的谷氨酰胺浓度。

$$\text{谷氨酰胺浓度}(\text{mmol/l}) = (\text{添加了谷氨酰胺酶溶液}) - (\text{未添加谷氨酰胺酶溶液})$$

由下式算出每个细胞的谷氨酰胺消耗量。

谷氨酰胺消耗量 (nmol/ 10^4 个细胞) =

$$\frac{(\text{DMEM 培养基中的谷氨酰胺含量}(\text{nmol})) - (\text{有或没有阿霉素处理的培养上清液中的谷氨酰胺含量}(\text{nmol}))}{\text{细胞数}}$$

$$* \text{谷氨酰胺消耗量}(\text{nmol}) = (\text{计算出的谷氨酰胺浓度}(\text{mmol/l})) \times (\text{6孔板中添加的培养基的量}(2\text{ ml}))$$

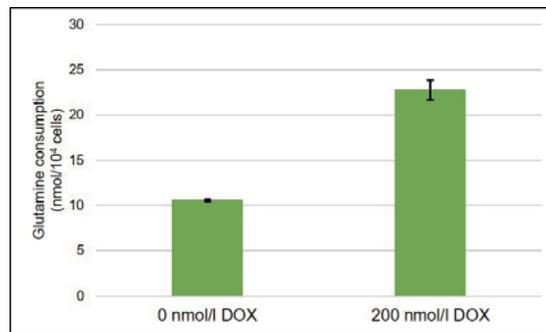


图6. 阿霉素(Doxorubicin)诱导衰老的A549细胞中谷氨酰胺小含量的检测
实验证实通过阿霉素处理的A549细胞的细胞培养上清液中的谷氨酰胺消耗量增加

参考文献

1. Lingtao, J. *et al.*, *Cancer Cell*, **2015**, 27, 257-270

Glutamate Assay Kit-WST® (货号: G269)

. 概述

谷氨酸不仅用于蛋白质和谷胱甘肽的生物合成，而且还作为神经递质发挥重要作用，谷氨酸过多被认为是引起神经退行性疾病如阿尔茨海默氏病的原因。根据文献报道，胱氨酸/谷氨酸的转运蛋白 (xCT) 具有吸收胱氨酸放出谷氨酸的功能，而抑制xCT会诱导细胞发生铁依赖性的死亡—铁死亡，近年来针对 xCT的癌症研究越来越多^{1), 2)}。

Glutamate Assay Kit-WST®是谷氨酸的定量检测试剂盒。细胞培养基中或细胞内的谷氨酸都可以通过WST®的还原反应进行定量，谷氨酸定量的最低浓度为5 μmol/l。此外，本试剂盒还可以使用96孔板进行多样品批量检测。

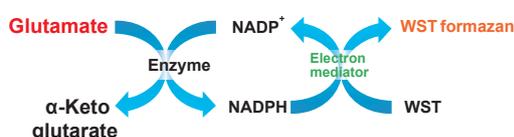


图1. Glutamate Assay Kit-WST®的检测原理

. 试剂盒内含

Dye Mixture	× 1 管
Glutamine Standard (10 mmol/l) (红盖子) 300 μl	× 1 管
Enzyme (绿盖子)	× 1 管
Reconstitution Buffer (白盖子) 750 μl	× 1 管
Assay Buffer 7.5 ml	× 1 管
Lysis Buffer 25 ml	× 1 管
Filtration Tube	× 24 管

* 本试剂盒附带的Filtration Tube用于细胞内谷氨酰胺的定量检测。本试剂盒可检测8个标准样品和24个检测样品(n = 3时)。因此，附带了24个Filtration Tube。当需要24个以上检测样品时，需另外准备Filtration Tube (Nanosep超滤离心管 (10K) ([OD010C33], PALL公司))。

. 储存条件

0-5 °C 保存

. 所需的设备和材料

1. 酶标仪 (450 nm 滤光片)
2. 96 孔板
3. 培养箱 (37 °C)
4. 多通道移液器 (20-200 μl)
5. 锥形样品管
6. 单通道移液器 (100-1000 μl, 20-200 μl)
7. Phosphate Buffered Saline (PBS)

. 溶液制备

1. 本试剂盒中的试剂，请恢复至室温再使用。
2. 由于在运输过程中可能会因振动而使试剂粘附在管壁或管盖内侧，因此在打开前，请将试剂敲落至管底部。
3. 为了获得准确的实验结果，建议对每个检测样本使用复 (n=3 或更多) 孔。
4. 使用多通道移液器以减少由于每个孔之间的时间差而导致的检测误差。
5. 样品需要稀释到标准曲线范围内再进行检测。
6. 由于本试剂盒含有玻璃容器和铝制密封盖，使用时请戴防护手套。
7. 本产品用于检测细胞培养上清液和细胞内的谷氨酸。测量细胞内谷氨酸浓度时，请使用试剂盒附带的 Lysis Buffer 制备细胞裂解液和 Glutamate Standard Solution。细胞裂解液请在使用Filtration Tube 进行除蛋白质处理之后再加入。

. 溶液制备

1. 配制Dye Mixture Stock Solution

将所有 Reconstitution Buffer 加入到 Dye Mixture的 Vial瓶中溶解。

* 将溶解好的Dye Mixture Stock Solution转移到Reconstitution Buffer瓶中，遮光，冷藏 (0-5 °C) 保存。(保质期 2个月)

2. 配制Enzyme Stock Solution

向Enzyme中加入120 μl PBS，用移液器吹打混匀。

* Enzyme 可能会从管底部脱落并粘在管壁或盖子内侧。请确认将Enzyme敲落至管底后再打开。

* Enzyme Stock Solution应在冰浴上使用，溶解后需要冷藏 (0-5 °C) 保存 (保质期2个月)。

3. 配制Working Solution

1) 将 Dye Mixture Stock Solution添加到锥形管中，并用Assay Buffer 稀释。

2) 将Enzyme Stock Solution添加到步骤 (1) 中制备的溶液中。* 请参考表1配制Working Solution。

* 由于Working Solution对光不稳定，请现配现用。配制后请用铝箔包裹避光，配置好的Working Solution无法长期保存，请在当天内使用。

	24 孔板	48 孔板	96 孔板
Dye Mixture Stock Solution	175 μl	350 μl	700 μl
Assay Buffer	1575 μl	3150 μl	6300 μl
Enzyme Stock Solutin	24.5 μl	49 μl	98 μl

表1. Working Solution配制例

. 操作步骤

1. 检测用样品的配制

– 细胞培养上清中谷氨酸定量用样品的配制 –

准备细胞培养上清液测量样品 (Sample)。

* 用超纯水稀释检测样品，使其在校准曲线范围内 (0-0.5 mmol/l)。

* 测量样品每孔需要40 μ l。

– 细胞内谷氨酸定量用样品的配制 –

1) 在 1.5 ml 微型管中准备细胞 ($5-10 \times 10^5$ 细胞)。

2) 以 $300 \times g$ 离心 5 min，然后除去上清液。

3) 加入 500 μ l PBS，用移液器吹打形成细胞悬液后， $300 \times g$ 离心 5 min，除去上清液。

4) 加入 300 μ l Lysis Buffer，用移液器吹打形成细胞悬液后， $12,000 \times g$ 离心 5 min。

5) 将 250 μ l 上清液转移至 Filtration Tube 并以 $12,000 \times g$ 离心 10 min。

* 当 $n=3$ 时，至少需要 120 μ l (每孔 40 μ l)。

* 如果离心后的滤液不足 120 μ l，请延长离心时间。

2. Glutamine Standard Solution 的配制

用 950 μ l 超纯水稀释 50 μ l 的 10 mmol/l 谷氨酸标准溶液，以制备 0.5 mmol/l 谷氨酸标准溶液。然后依次进行 2 倍稀释制成标准溶液 (0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0157、0.00785、0 mmol/l) (见图 2)。

* 当测量细胞裂解液中的谷氨酸浓度时，用 Lysis Buffer 代替超纯水来制备谷氨酸标准溶液。

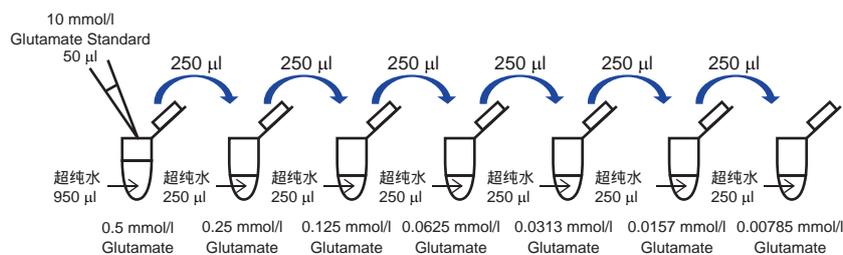


图2. Glutamate Standard Solution 的配制方法

3. 检测

1) 向每个孔中添加 40 μ l 谷氨酸标准溶液或样品 (见图 3)。

* 为了获得准确的检测值，建议每个样品使用复孔 ($n=3$ 或更多) 检测。

2) 向每个孔中加入 60 μ l Working Solution。

* 由于加入 Working Solution 后立即开始显色。请使用多通道移液器以减少孔间差。

3) 在 37°C 下培养 15 min。

* 培养时，请使用微孔板密封垫，以防止溶液挥发。

4) 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

* 由于加入 Working Solution 后立即开始显色。请使用多通道移液器以减少孔间差。

5) 从标准曲线中获得检测样品中的谷氨酸浓度。

* 计算出的值是配制的检测样品溶液中的浓度。稀释前样品中的浓度请根据检测值和样品的稀释倍数计算。

	1	2	3	4	5	6
A	0 mmol/l Glutamate			Sample 1		
B	0.00785 mmol/l Glutamate			Sample 2		
C	0.0157 mmol/l Glutamate			Sample 3		
D	0.0313 mmol/l Glutamate			Sample 4		
E	0.0625 mmol/l Glutamate			Sample 5		
F	0.125 mmol/l Glutamate			Sample 6		
G	0.25 mmol/l Glutamate			Sample 7		
H	0.5 mmol/l Glutamate			Sample 8		

图3. Glutamate Standard Solution 和样品孔分布例 ($n=3$)

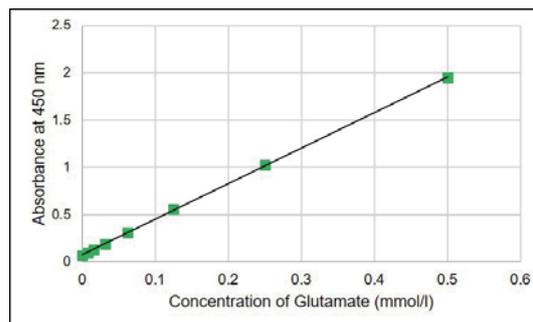


图4. Glutamate 标准曲线的实验例

. 实验例

Elastin对胱氨酸/谷氨酸交换转运蛋白的抑制作用检测

- 1) 将 A549细胞 (1×10^6 细胞/孔, 含有10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素的DMEM培养基) 接种在 6孔板中, 并在 37°C 5% CO_2 的培养箱中过夜培养。
- 2) 去除培养基, 加入2 ml在 DMEM 培养基中制备的目标浓度的Elastin溶液, 并在 37°C 5% CO_2 的培养箱中培养过夜。
- 3) 将 100 μl 细胞培养上清液置于1.5 ml微型管中, 并用超纯水稀释15 倍。
- 4) 制备Glutamate Standard Solution 并制备标准液 (请参见Glutamate Standard Solution 的配制)。
- 5) 将制备好的检测样品和Glutamate Standard Solution按照每孔 40 μl 分别加至96孔板中。
- 6) 将 60 μl 配制好的Working Solution 添加到每个孔中。
- 7) 在 37°C 下培养 30 min。
- 8) 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度, 并从标准曲线中得出测量样品中的谷氨酸浓度。

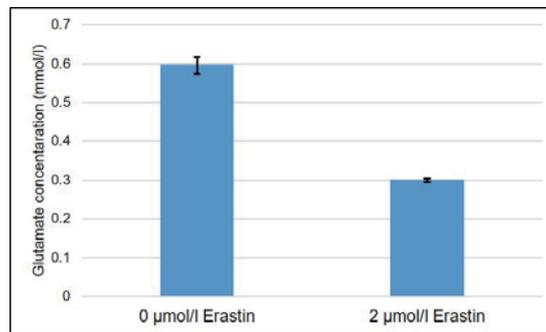


图5. Elastin对胱氨酸/谷氨酸交换转运蛋白的抑制作用检测

实验证实了通过用胱氨酸/谷氨酸交换转运蛋白抑制剂Elastin处理减少了释放到培养基中的氨基酸

. 参考文献

1. Cobler, L. *et al.*, *Oncotarget*, **2018**, 9, 32280-32297
2. Tobias, M. *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, **2019**, 133, 144-152.

GSSG/GSH Quantification Kit (货号: G263)

. 概述

谷胱甘肽 (γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸) 是体内的一种三肽化合物, 它参与抗氧化和药物代谢的过程, 还是谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽S-转移酶、巯基转移酶等的底物。谷胱甘肽通常以还原型状态 (GSH) 存在, 但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态 (GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

GSSG/GSH Quantification Kit含有GSH掩蔽剂, 加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的GSH。因此可以通过检测加入DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) 后在412nm处的显色反应加上在谷胱甘肽还原酶作用下的循环体系选择性地对GSSG进行定量。GSH含量则可以通过总谷胱甘肽含量减去GSSG含量来得到。

本试剂盒总谷胱甘肽和GSSG的检测限分别为0.5 $\mu\text{mol/l}$ -50 $\mu\text{mol/l}$ 和0.5 $\mu\text{mol/l}$ -25 $\mu\text{mol/l}$ 。

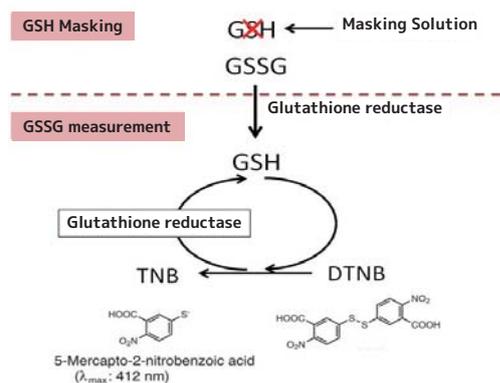


图1. GSSG/GSH检测原理

. 试剂盒内含

Enzyme Solution	50 μl \times 1管
Coenzyme	\times 2管
Buffer Solution	60 ml \times 1瓶
Substrate (DTNB)	\times 4管
Standard GSH	\times 1管
Standard GSSG	\times 1管
Masking Solution	1 ml \times 1管

. 储存条件

0-5 $^{\circ}\text{C}$, 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。

. 所需的设备和材料

- 酶标仪 (405或415 nm)	- 96孔板
- 培养箱	- 20 μl 和200 μl 移液器
- 多通道移液器	- 5-磺基水杨酸 (SSA) 溶液
- 乙醇	- 15ml锥形管

. 注意事项

- * 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用;
- * 建议每组样品设定3个复孔, 以便得到更准确的数据;
- * 由于加入Enzyme/Coenzyme Working Solution之后会立刻产生显色反应, 因此尽量使用多通道移液器以减少各孔之间的误差;
- * 如不知道样品中总谷胱甘肽含量的浓度范围, 就请准备多个浓度梯度的样品溶液;
- * 试剂盒中有带铝盖的玻璃管, 请小心拿取。

. 样品制备

组织 (100 mg)

- 1) 在0.5-1.0 ml 5%的SSA溶液中对组织匀浆。
- 2) 匀浆后的组织样品在8,000 $\times g$, 离心10 min。
- 3) 转移上清液至一支新管中, 用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

细胞 (1×10^7 个细胞)

- 1) 在4 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\times g$ 离心10 min后收集细胞, 弃上清。
- 2) 用300 μl PBS清洗细胞, 在4 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\times g$ 离心10 min, 弃上清。
- 3) 加入80 μl 10 mM HCl, 反复冻融2次使细胞裂解。
- 4) 加入20 μl 5%的SSA, 在8,000 $\times g$ 离心10 min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

血浆

- 1) 在4 $^{\circ}\text{C}$, 1,000 $\times g$ 离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 将最上层血浆转移至一支新管中, 加入血浆量的1/2体积的5%的SSA。
- 3) 在4 $^{\circ}\text{C}$, 8,000 $\times g$ 离心10 min。
- 4) 转移上清液至一支新管中, 用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

红血球^{b)}

- 1) 在4 $^{\circ}\text{C}$, 1,000 $\times g$ 离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 弃上清液及白膜层。
- 3) 用4倍体积的5% SSA溶解红血球。
- 4) 在4 $^{\circ}\text{C}$, 8,000 $\times g$ 离心10 min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

a) 在使用样品溶液前, 请先用超纯水稀释, 将SSA浓度调节为0.5%, 高浓度的SSA会引起溶液pH值的变化, 对检测有所干扰。

b) 血球能从血浆分离后所剩样品溶液中分离

. 反应溶液的制备

— Substrate Working Solution

- 1) 加1.2 ml Buffer Solution至Substrate (DTNB)管中，溶解DTNB。
* 请确认是否完全溶解DTNB？如溶解不完全时，请用超声或涡旋振荡。
* 如需保存，则不要继续步骤2)。直接放在-20 保存，可以保存2个月。
- 2) 转移上述全部溶液至15 ml锥形管中，并用2.4 ml Buffer Solution稀释 (总体积为3.6 ml)。
* 一个96孔板需要使用2管Substrate (总体积：7.2 ml)。
* 由于Substrate Working Solution不稳定，所以需要现配现用。

— Enzyme/Coenzyme Working Solution

- 1) 用移液器吹打混匀Enzyme Solution，吸取20 μ l至15 ml锥形管中，用4 ml Buffer Solution稀释。
* Enzyme Solution可能会附着在管的内壁和盖子上，开瓶前可轻摇几下，但是不可使用旋涡震荡器。
* 如需保存，则不要继续步骤2)。直接放在0-5 保存，可以保存2个月。
- 2) 取2.4 ml上述溶液至一支新的15 ml锥形管中。
- 3) 加2.4 ml 超纯水至Coenzyme管中并溶解。
* 由于Coenzyme管做过减压处理，请用注射器加入超纯水后再打开。
* 如需保存，则不要继续步骤4)，将上述溶液放在-20 保存，可以保存2个月。
- 4) 转移上述全部溶液至步骤2) 的15 ml锥形管中，并用2.4 ml Buffer Solution稀释 (总体积：7.2 ml)。
* 由于Enzyme/Coenzyme Working Solution不稳定，需要现配现用。

— 200 μ mol/l GSH Standard Solution

- 加2.0 ml 0.5%的SSA至Standard GSH管中并溶解。
- * 由于Standard GSH管做过减压处理，请用注射器加入SSA后再打开。
 - * 将GSH Standard Solution溶液放在-20 保存，可以保存2个月。

— 100 μ mol/l GSSG Standard Solution

- 加2.0 ml 0.5%的SSA至Standard GSSG管中并溶解。
- * 由于Standard GSSG管做过减压处理，请用注射器加入SSA后再打开。
 - * 将GSSG Standard Solution溶液放在-20 保存，可以保存2个月。

. 操作步骤

1. 样品制备

- 1) 如需要测定GSH和GSSG，请准备2组样品溶液 (200 μ l \times 2)。
- 测定 GSSG：
加200 μ l的样品，20 μ l的Masking Solution至一个微量管中，用涡旋振荡器混匀，作为 (GSSG) 样品管。
- 测量总谷胱甘肽：
取200 μ l样品加入管中，加入20 μ l 超纯水，用涡旋振荡器混匀。
* 如果样品溶液中总谷胱甘肽的浓度范围未知，可梯度稀释样品溶液。

2. GSSG Standard Solution的制备

- 1) 分别取100 μ l 的100 μ mol/l GSSG Standard Solution和300 μ l 0.5% SSA溶液至微量管中，混合制备终浓度为25 μ mol/l的GSSG Standard Solution。用0.5% SSA溶液按图2中步骤进行梯度稀释以制备成下列GSSG Standard Solution，浓度依次为：25.0 μ mol/l, 12.5 μ mol/l, 6.25 μ mol/l, 3.13 μ mol/l, 1.57 μ mol/l, 0.78 μ mol/l和0 μ mol/l。
- 2) 在上述GSSG Standard Solution中加入20 μ l Masking Solution，用涡旋振荡器混匀。

3. GSH Standard Solution的制备

- 1) 分别取100 μ l浓度为200 μ mol/l 的GSH Standard Solution和300 μ l 0.5%的SSA溶液至微量管中，混合制备终浓度为50 μ mol/l GSH Standard Solution。用0.5% SSA溶液进行梯度稀释以制备成下列GSH Standard Solution,浓度依次为：50.0 μ mol/l, 25.0 μ mol/l, 12.5 μ mol/l, 6.25 μ mol/l, 3.13 μ mol/l, 1.57 μ mol/l和0 μ mol/l。
- 2) 在配制好的200 μ l GSH Standard Solution中加入20 μ l 超纯水，用涡旋振荡器混匀。

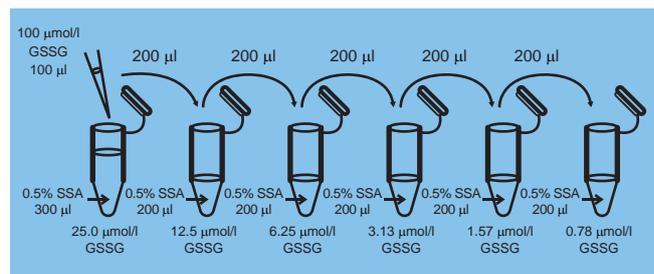


图2. GSSG Standard Solution的制备

4. 检测

1) 在每孔中分别加入40 μl GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG样品或GSH样品。

* 建议每个样品重复3次, 以获得准确的数据。

2) 每孔加入60 μl Buffer Solution。

3) 在37 °C 培养1 h。

* 培养时盖上盖子以防止溶液在培养过程中蒸发。

4) 每孔加入60 μl Substrate Working Solution。

5) 每孔加入60 μl Enzyme/Coenzyme Working Solution。

* 加入Enzyme/ Coenzyme Working Solution后, 反应立即开始。建议用多通道移液器操作以减少各孔间误差。

6) 在37 °C 培养10 min。

* 如果选择Kinetics 法, 请选择 “ Kinetic ” 模式。

* 在反应开始后的10 min, OD值呈线性增长, 因此可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint 法测定谷胱甘肽浓度(测定5-10 min内的某个时间点的OD值, 不需要终止反应)

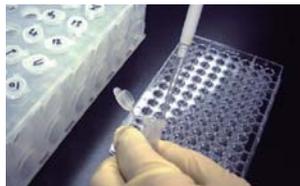
7) 用酶标仪在405 nm或415 nm下测定吸光度。

8) 用GSSG标准曲线测定所得GSSG样品溶液中的GSSG浓度。

9) 用GSH标准曲线测定所得GSH样品溶液中总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 的浓度。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 μmol/l GSSG	Sample 2 (GSSG)	0 μmol/l GSH	Sample 2 (GSH)								
B	0.78 μmol/l GSSG	Sample 3 (GSSG)	1.57 μmol/l GSH	Sample 3 (GSH)								
C	1.57 μmol/l GSSG	Sample 4 (GSSG)	3.13 μmol/l GSH	Sample 4 (GSH)								
D	3.13 μmol/l GSSG	Sample 5 (GSSG)	6.25 μmol/l GSH	Sample 5 (GSH)								
E	6.25 μmol/l GSSG	Sample 6 (GSSG)	12.5 μmol/l GSH	Sample 6 (GSH)								
F	12.5 μmol/l GSSG	Sample 7 (GSSG)	25.0 μmol/l GSH	Sample 7 (GSH)								
G	25.0 μmol/l GSSG	Sample 8 (GSSG)	50.0 μmol/l GSH	Sample 8 (GSH)								
H	Sample 1 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 1 (GSH)	Sample 9 (GSH)								

图3. 96孔板排列示意图 (复孔n = 3)



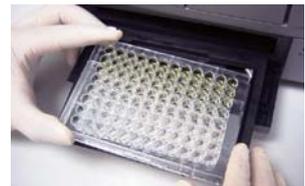
1) 每孔加入40 μl GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG样品或GSH样品。



3) 在37 °C 培养1 h。



4)-5) 每孔加入60 μl Substrate Working Solution和60 μl Enzyme/Coenzyme Working Solution。



7) 用酶标仪在405 nm或415 nm 测定吸光度。

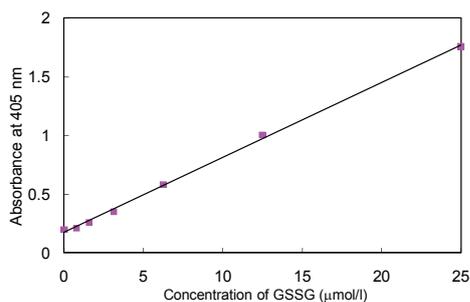


图4. GSSG的标准曲线

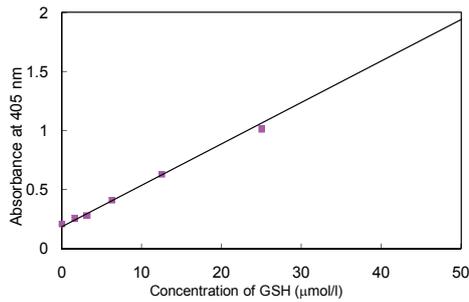


图5. GSH 的标准曲线

谷胱甘肽浓度可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint 法测定

Pseudo-Endpoint 法 : $\text{Glutathione (GSH, GSSG)} = (\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}) / \text{slope}^{\text{b}}$

Kinetic法 : $\text{Glutathione (GSH, GSSG)} = (\text{Slope}_{\text{sample}}^{\text{c}} - \text{Slope}_{\text{blank}}^{\text{a), c}}) / \text{slope}^{\text{b}}$

a) 采用图3中的A1 - A3孔或A7 - A9孔的O.D.值。

b) Slope为标准品采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint 法测定得到的曲线斜率。

c) Slope_{sample} (或Slope_{blank})为每个样品 (或Blank) 采用Kinetic法测定得到的曲线斜率。

* 如果测定样品是由原始样品稀释得来, 则将上述测定值乘以稀释倍数, 以计算原始样品的谷胱甘肽浓度。

10) GSH浓度使用以下公式计算【总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 和GSSG】

$$\text{GSH} = \text{Total Glutathione (GSH + GSSG)} - \text{GSSG} \times 2$$

. 干扰物

一些还原剂如抗坏血酸, β -巯基乙醇, 二硫苏糖醇 (DTT) 和半胱氨酸, 或巯基反应性化合物如马来酰亚胺化合物会干扰谷胱甘肽测定。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。

. 参考文献

1. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development, *Cancer Cell*, **2014**, 26, 331-343
2. Rhythmic oscillations of the microRNA miR-96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels, *Nature Communications*, **2014**, 5, 3823
3. Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling, *The EMBO Journal*, **2015**, 34(21), 2703-2719
4. Administering xCT inhibitors based on circadian clock improves antitumor effects, *Cancer Research*, **2017**, 77(23), 6603-6613
5. Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway, *EMBO reports*, 2017, 18(11), 2067-2078
6. Chloroplast DNA Replication Is Regulated by the Redox State Independently of Chloroplast Division in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, **2013**, 161, 2102-2112
7. Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway, *Diabetes*, **2018**, 67(6), 1113-1127
8. Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain, *Aging Cell*, **2017**, 16, 39-51
9. Ubiquinol-10 Supplementation Activates Mitochondria Functions to Decelerate Senescence in Senescence-Accelerated Mice, *Antioxidants & Redox Signaling*, **2014**, 20(16), 2606-2620
10. Skeletal muscle-specific eukaryotic translation initiation factor 2 α phosphorylation controls amino acid metabolism and fibroblast growth factor 21-mediated non-cell-autonomous energy metabolism, *The FASEB Journal*, **2016**, 30(2), 798-812
11. Riluzole exerts distinct antitumor effects from a metabotropic glutamate receptor 1-specific inhibitor on breast cancer cells, *Oncotarget*, **2017**, 8(27), 44639-44653

SOD Assay Kit-WST® (货号: S311)

. 概述

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶,它可以催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的歧化反应,生成过氧化氢和单质氧。目前有很多种直接或间接地测量SOD活性的方法,在这些方法中,使用硝基蓝四唑(氮蓝四唑Nitroblue Tetrazolium,简称NBT)的一种间接测量方法因其便捷、简单的使用方法而被广泛应用。但是NBT法存在一些缺点,例如生成的染料(Formazan dye)的水溶性较低,会和黄嘌呤氧化酶的还原型发生反应等问题。SOD检测试剂盒-WST®提供了更为简便的检测SOD的方法,它是利用同仁化学研究所研发的高度水溶性四唑盐WST®-1(2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二磺酸苯基)-2-氢-四唑盐,二钠盐),能与超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应生成一种水溶性的染料。WST®-1被超氧阴离子还原的比率与黄嘌呤氧化酶的活性线性相关,并且会被SOD所抑制(见下图,即红色区域SOD反应优先发生,SOD反应完后蓝色区域WST®-1反应才能发生)。因此SOD或者SOD类似物的 IC_{50} (50%的抑制浓度)就能用比色法来测定。

WST®: WST是日本同仁化学研究所的注册商标。

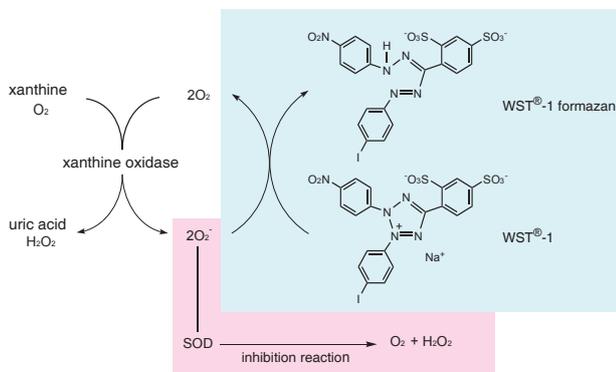


图1. SOD活性检测机理

. 试剂盒内容

WST® Solution	1 ml × 1瓶
Enzyme Solution	20 μl × 1瓶
Buffer Solution	11 ml × 2瓶
Dilution Buffer	10 ml × 1瓶

. 储存条件

请在0-5℃下保存。试剂盒在0-5℃下可保存一年。在4℃下,WST®工作液可保存2个月,酶工作液可保存3周。请避光保存WST® Solution和WST®工作液。

. 所需的设备和材料

酶标仪(450 nm)、培养箱、96孔板
2-20 μl和20-200 μl的可调式移液器、多通道移液器

V. 注意事项

1. 请使用试剂盒中附带的Dilution Buffer或生理盐水稀释样品。
2. Enzyme Solution被分成两层,因此忽略了移液器混合的步骤会导致实验结果的不准确。
3. 为提高实验准确性,建议每个样品进行复孔实验。
4. 最后一步加入酶工作液后,会立即产生超氧化物,开始显色反应。请尽量使用多通道移液器加入酶工作液,减少各孔误差,保证显色时间平行。

. 样品制备

(其他样品的处理方法详见目录、网站,或者请您以邮件、电话的形式直接联系我们。)

红细胞或血浆

1. 取2-3 ml抗凝处理后的血液(如最终浓度约为10 U/ml肝素钠),在0-5℃下,600 × g离心10 min。
2. 移去上清液作为血浆样品。
3. 加等量的生理盐水(相当于移去的血浆量)至沉淀中,制成悬液。取0.4 ml加入到10 ml的玻璃离心管中,加生理盐水至10 ml,在0-5℃下,600 × g离心10 min。
4. 弃上清液,加入等量的生理盐水至沉淀中,制成悬液。在0-5℃下,600 × g离心10 min。重复此步骤1次。
5. 在沉淀中加入4.0 ml蒸馏水,制成悬液。加入1 ml乙醇和0.6 ml氯仿。
6. 将混合后的液体,盖紧盖子,在0-5℃下用振荡器强烈震荡15 min。
7. 在0-5℃下,将混合液在600 × g,离心10 min,随后将上层水乙醇层小心移入一支新的试管中。
8. 取出0.1 ml的水乙醇层,加入0.7 ml蒸馏水,制成红细胞样品溶液。

* 如果进行SOD活性检测,在各稀释梯度的Dilution Buffer中需加入乙醇稀释液,维持0.25%的乙醇体系。

组织(100 mg)

1. 用生理盐水清洗组织,尽可能将血液去除。用纸巾将组织上的水分吸干,然后称重。
2. 加入400-900 μl蔗糖缓冲液(0.25 mol/l蔗糖,10 mmol/l HEPES,1 mmol/l EDTA,pH 7.4),用Teflon匀浆机将样品匀浆。如果必要的话,用冰浴器将样品超声粉碎(60 W,0.5 s间隔,15 min)。
3. 匀浆后的样品,在10,000 × g离心60 min,将上清液移入新的试管中,制成样品溶液。

细胞 (HeLa: 1×10^7 个细胞, HL60: 1.2×10^7 个细胞)

1. 用刮刀刮下细胞。在0-5℃下, $2,000 \times g$ 离心10 min, 弃上清。
2. 用1 ml PBS洗净细胞, 在0-5℃, $2,000 \times g$ 离心10 min, 弃上清。重复此步骤一次。
3. 用匀浆器将细胞破损。
4. 加入1 ml 新的PBS。如果必要的话, 在冰浴器上用超声降解细胞裂解物 (60 W, 0.5 s间隔, 15 min)。
5. 在0-5℃下, $10,000 \times g$ 离心15 min, 将上清液移入新的试管中, 制成样品溶液。

*由于细胞或组织的量过少等原因, 无法使用匀浆器或超声方法破碎的时候, 可以考虑使用细胞裂解液或反复冻融的方法破碎细胞或组织, 虽然裂解液中的表面活性剂会对WST®-1的显色产生影响, 但在操作过程中保证平行性的前提下, 依然可以得到组与组间的SOD活性差异。请实验者自行参考或致电我公司技术人员。

工作液的制备(供1块96孔板用)

WST®工作液

用19 ml的Buffer Solution稀释1 ml WST® Solution。

酶工作液

将装有Enzyme Solution的试管离心5 s。用移液器混匀*, 用2.5 ml的Dilution Buffer稀释15 μl Enzyme Solution。

* Enzyme Solution被分成两层, 因此忽略了移液器混合的步骤会导致实验结果的不准确。

操作步骤

1. 计算SOD对WST®-1的抑制率(请见表1, 图2及图3)。

- 1) 样品孔和空白孔2中分别加入20 μl 样品溶液, 在空白孔1和空白孔3中分别加入20 μl 超纯水。
- 2) 每孔分别加入200 μl WST®工作液, 混匀。
- 3) 空白孔2和空白孔3中分别加入20 μl Dilution Buffer。
- 4) 样品孔和空白孔1中分别加入20 μl 酶工作液, 充分混合*。
- 5) 在37℃培养箱中培养20 min。
- 6) 用酶标仪在450 nm处读数。
- 7) 按照下面的公式计算SOD的抑制率%。

$$\text{SOD抑制率\% (对WST®-1的抑制率)} = \frac{[(A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白3}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白2}})]}{(A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白3}})} \times 100\%$$

* 酶工作液加入后会立即有超氧化物生成, 请用多通道移液器来加酶工作液以缩短时间, 减少各孔间的误差。

表1. 96孔板中各孔溶液用量

	样品	空白 1	空白 2	空白 3
样品溶液	20 μl	-	20 μl	-
超纯水	-	20 μl	-	20 μl
WST® 工作液	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Dilution Buffer	-	-	20 μl	20 μl
酶工作液	20 μl	20 μl	-	-

空白1: 不含抑制剂的空白对照;

空白2: 样品空白对照; 空白3: 试剂空白对照;

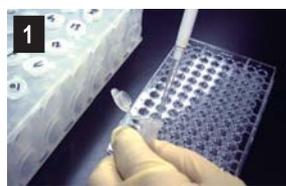
* 如果样品是组织或样品溶液的颜色较深, 必须测定每个稀释样品空白2的值并扣除。

实验例1. 用SOD标准品制作抑制率曲线

用Dilution Buffer稀释SOD标准品 (Sigma, S5395, CAS: 9054-89-1, 来源于牛红细胞) 制备成以下系列浓度的SOD溶液: 200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml, 1 U/ml, 0.1 U/ml, 0.05 U/ml, 0.01 U/ml, 0.001 U/ml。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				SOD 200 U/ml			SOD 0.1 U/ml					
B				SOD 100 U/ml			SOD 0.05 U/ml					
C				SOD 50 U/ml			SOD 0.01 U/ml					
D				SOD 20 U/ml			SOD 0.001 U/ml					
E				SOD 10 U/ml			Blank 1					
F				SOD 5 U/ml			Blank 2					
G				SOD 1 U/ml			Blank 3					
H												

图2. 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列



1) 各孔中加入样品溶液或超纯水。



2-4) 各孔中加入WST®工作液, 然后加Dilution Buffer或酶工作液。



5) 在37℃培养20 min。



6) 用酶标仪在450 nm处读数。

图3. 操作示意图

根据得到的O.D.值和SOD抑制率计算公式，测得各个浓度SOD对应的抑制率，制成如下曲线图：

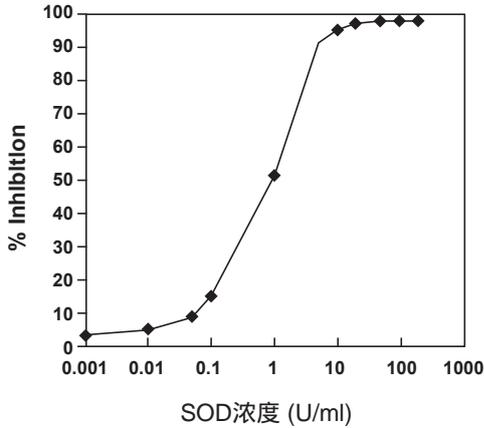


图4. SOD抑制曲线

一般情况下，不同待测样品之间SOD抑制率的大小，可以反映SOD活性的强弱，如果要计算具体的SOD活性值，可以按照步骤2操作。

2. 通过检测样品不同浓度的SOD抑制率，定量SOD的活性数值

- 1) 请按照图5的步骤，使用试剂盒中的Dilution Buffer或生理盐水稀释待测的样品溶液为若干个梯度。
稀释比率：1, 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶ (见下图)

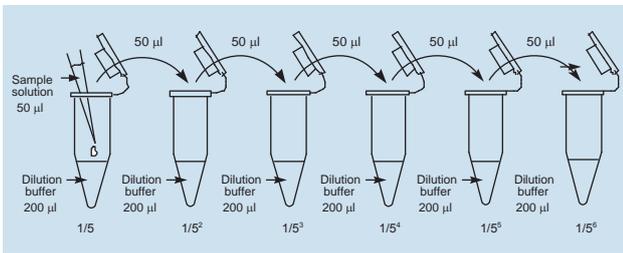


图5. 样品溶液的制备

- 2) 操作步骤与SOD抑制率操作相似，将待测的样品稀释7个梯度左右后，参考抑制率操作步骤，分别求出每个梯度的SOD抑制率。孔板设计请参考图6进行。

	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	Sample 2		Sample 3				Sample 4				
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								

图6. 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列
注意：5倍稀释为常规稀释倍数，如遇特殊情况，可使用2倍或其他倍数稀释。

“1 Unit SOD”的定义

20 µl样品溶液中能够抑制50%的WST[®]-1和超氧阴离子的还原反应所需的SOD的量。

实验例2. 测定大鼠肝脏的SOD活性

1. 大鼠肝脏处理方法：取湿重140.38 mg的大鼠肝脏，用1 ml 0.9%的生理盐水清洗2次并弃上清。加入10 mM HEPES 250 mM Sucrose (pH 7.4), 1 mM EDTA 0.5 ml. 超声破碎 (10,000 × g, 15 min) 后得到待测样品。
2. 按照图5的步骤，使用试剂盒中的Dilution Buffer稀释待测样品，稀释比率：1, 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶。
3. 按照图6的孔板设计，分别计算各浓度梯度下对应的SOD抑制率。
4. 以待测样品的稀释比率为X坐标轴(稀释倍数做对数处理)，对应的抑制率为Y坐标轴，生成平面直角坐标图(图7)。

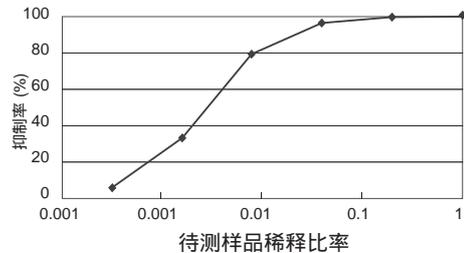


图7. SOD抑制率与稀释比率关系图

- * 样品浓度由高到低，对应图中从右到左的各个点，
- * 如果各个梯度的抑制率均>50%，则需要稀释待测样品。
- * 如果各个梯度的抑制率均<50%，则需要提高待测样品浓度或增加细胞数量。

5. 图7中为一条光滑的曲线，越接近50%抑制率时，曲线越趋近于直线关系。这与图4中的抑制率曲线相似。取抑制率(Y)为50%的左右最近一点作直线图(图8)，将这2点的稀释比率(X)与抑制率(Y)代入两点式，得到直线方程： $y = 28.889 \ln(x) + 218.56$

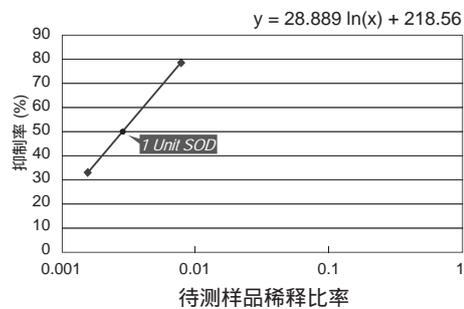


图8. 抑制率为50%的左右最近的一点作直线模拟图

- * 当抑制率为50%时(即y=50%时，SOD活性为1 Unit)，得出X值即为稀释比率。假设稀释比率为1/8，则待测样品的SOD活性为8 Unit。

注意事项

1. 我公司提供“SOD计算器”以方便计算SOD活性，可联系我公司技术人员索取。
2. 当样品差异不大时，在首次摸好条件后，可每次只做50%左右两个稀释浓度以节省试剂。

. Mn-SOD活性的测定

Mn-SOD活性可以通过向样品溶液中加入氰化钾(终浓度: 1 mmol/l) 或Diethyldithiocarbamate(终浓度: 1 mmol/l) 测得。这些试剂可以抑制Cu, Zn-SOD和胞外SOD的活性。

. 干扰物质

表2. 列出了一些干扰物质的干扰浓度。如果样品中含有这些物质，请稀释样品至干扰浓度以下。由于2-巯基乙醇和二巯苏糖醇的存在会使O.D.值显著增加，所以如果样品中含有这些物质请将其去除。

表2. SOD检测中常见干扰物质的干扰浓度

表面活性剂	SDS	0.05%
	Tween20	0.5%
	NP-40	0.5%
	Triton X-100	0.2%
溶剂	Ethanol	25%
	DMSO	5%
还原剂	Glutathione,(还原型)	1.25 mmol/l
	Ascorbic acid	0.1 mmol/l
其他	EDTA	2 mol/l
	BSA	1%(W/V)

表3. 生物样本的SOD活性

	Total-SOD
红细胞	10845 U/ml of blood
血浆	335 U/ml of blood
大鼠心脏	15712 U/g (湿重)
大鼠肝脏	142907 U/g (湿重)
HeLa 细胞	73 U/1x10 ⁷ cells
HL 60细胞	226 U/1x10 ⁶ cells

. Q&A

样品处理过程中，不使用匀浆器或低温超声，使用裂解液或其他方法可以吗？

裂解液中的表面活性剂，可能会影响实际的显色O.D.值。此外反复冻融等方法，可能会引起样品中的SOD活性改变，从而影响检测结果。但在保证样品处理平行性的前提下，不同样品间SOD活性的变化依然可靠，绝大多数情况是可以得到满意的、可重复的结果。

一定要检测SOD活性值吗？

不一定，检测结果的表示方法一般有2种：SOD活性的绝对值(结果以Unit表示)和SOD活性的相对值(结果以抑制率%表示)。如需精确计算SOD的活性，建议按照操作步骤2测定活性，您可以根据自己的需要选择合适的方法。

以前使用过其他公司的SOD试剂盒，现在改用同仁化学的试剂盒，以前的数据是否还能用？

可以作为参考数据。SOD活性的数值，是由显示底物的种类和浓度决定的，更换厂家，数值的大小会有变化，但是不会影响活性变化的趋势。同仁化学研发的专利产品WST[®]-1(试剂盒显色底物)，优于NBT等同类物质，不与黄嘌呤氧化酶反应，可以得到100%的抑制率曲线，数据更为精确，使用在文章中更有说服力。

SOD检测试剂盒，是否一定要与MDA(丙二醛)试剂盒一起使用？

不一定，生物体内氧自由基作用于脂质发生过氧化反应，氧化终产物为MDA(丙二醛)，SOD是清除生物体内氧自由基的重要的抗氧化酶。在生物体内二者此消彼长，一起检测SOD与MDA可起到相互印证的作用。但是也可以单独检测SOD。另外还可以和其它指标一起检测，例如谷胱甘肽(GSH)、DNA氧化损伤等，能更全面地说明问题。

“1 Unit”的定义是什么？

1 Unit是指样品中的还原性染料(如细胞色素C，WST[®]-1，NBT或XTT)与超氧阴离子之间的比色反应，50%被抑制时的点。例如，如果不含任何SOD的样品溶液的O.D.值为1.0的话，那么另一个O.D.值为0.5的样品则被定义为具有1个单位的酶活性。可以使用这个单位来确定样品中的SOD活性。因此用不同染料或方法检测SOD活性，它们之间不具有可比性。

是否可以用动力学法来测定SOD活性？

可以。因为在20分钟内的生色比率是保持一致的，可以测量直线上升阶段5分钟内的斜率来测定SOD活性。

如果样品自身带有较深的颜色，这样的样品可以使用吗？

可以。稀释样品可以减小干扰，将样品孔的O.D.值 - Blank₂的O.D.值就可以扣除本底的颜色。但是如果样品溶液的SOD活性过低，是不能检测出的。

如何能够制备更多的Dilution Buffer？

Dilution Buffer为PBS。请按以下浓度配制：
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄,
8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4。

使用该试剂盒能否分别检测Mn-SOD和Cu/Zn-SOD？

可以。要单独检测Mn-SOD活性，可以添加KCN阻断Cu/Zn-SOD活性。向样品中加入1 mM的KCN可以完全阻断Cu/Zn-SOD活性。要测定Cu/Zn-SOD的活，可以用总的SOD活性 - Mn-SOD活性，就可以得到。

怎样保存样品？

-80 可以保存1个月。

能否使用该试剂盒检测超氧化物阴离子的水平？

不必用这个试剂盒，可以使用WST[®]-1来检测超氧化物。但是必须有一个检测样品溶液中超氧化物量的标准，因为超氧化物不稳定，而且会和其它物质反应，要确定系统中生成的超氧化物的总量是比较困难的。试剂盒中的黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系可以被用作检测每个样品中超氧化物相对生成量的标准。

. 参考文献

1. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease, *European Heart Journal*, **2008**, *29*, 1267-1274
2. Extracellular Superoxide Dismutase Accelerates Endothelial Recovery and Inhibits In-Stent Restenosis in Stented Atherosclerotic Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit Aorta, *Journal of the American College of Cardiology*, **2007**, *50*, 2249-2253
3. An Abnormal Mitochondrial-Hypoxia Inducible Factor-1-Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats: Similarities to Human Pulmonary Arterial Hypertension, *Circulation*, **2006**, *113*, 2630-2641
4. Deficient plastidic fatty acid synthesis triggers cell death by modulating mitochondrial reactive oxygen species, *Cell Research*, **2015**, *25*, 621-633
5. A Tau-Targeted Multifunctional Nanocomposite for Combinational Therapy of Alzheimer's Disease, *ACS Nano*, **2018**, *12*(2), 1321-1338
6. Endothelial Cell Palmitoylproteomic Identifies Novel Lipid-Modified Targets and Potential Substrates for Protein Acyl Transferases, *Circulation Research*, **2012**, *110*(10), 1336-44
7. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2008**, *295*, L422-L430
8. Inhaled Ethyl Nitrite Prevents Hyperoxia-impaired Postnatal Alveolar Development in Newborn Rats, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2007**, *176*, 291-299
9. In vivo guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy, *Nature Communications*, **2018**, *9*(1), 1440
10. A lytic polysaccharide monooxygenase-like protein functions in fungal copper import and meningitis, *Nature Chemical Biology*, **2020**, doi.org/10.1038/s41589-019-0437-9
11. Nestin regulates cellular redox homeostasis in lung cancer through the Keap1-Nrf2 feedback loop, *Nature Communications*, **2019**, *10*, 5043
12. Allelopathic interactions of linoleic acid and nitric oxide increase the competitive ability of *Microcystis aeruginosa*, *The ISME Journal*, **2017**, *11*, 1865-1876
13. Phase I Study of Copper-Binding Agent ATN-224 in Patients with Advanced Solid Tumors, *Clinical Cancer Research*, **2008**, *14*, 7526-7534
14. Chemoprevention of Carcinogenic Progression to Esophageal Adenocarcinoma by the Manganese Superoxide Dismutase Supplementation, *Clin. Cancer Res.*, **2007**, *13*, 5176-5182
15. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **2004**, *101*, 8852-8857

Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging (货号: MT05)

. 概述

单线态氧(Singlet Oxygen, 1O_2)是一种具有强氧化性的活性氧(ROS),是造成皮肤斑点及皱纹的重要因素。在化妆品等研究中,去除单线态氧是重要的研究目的。在癌症研究领域,单线态氧在光动力疗法(PDT:一种采用光敏药物和激光活化治疗肿瘤的新兴抗癌疗法)中起到关键作用。因此检测活细胞内的单线态氧对于了解PDT的抗癌机理至关重要。但是现有的荧光探针由于不能穿透细胞膜,所以无法用于活细胞检测。Majima等人合成了一种由含硅罗丹明和蒽环构成的新型远红外荧光探针Si-DMA,分别作为发色团和单线态氧反应位点。当存在单线态氧时会在Si-DMA的蒽环部位生成内过氧化物, Si-DMA的荧光强度会增强¹⁾。在七种不同活性氧中, Si-DMA能够特异性地检测单线态氧(图3)。另外在用5-氨基乙酰丙酸(5-ALA,一种血红素前体)处理细胞后, Si-DMA可以实时观察到线粒体中原卟啉IX产生单线态氧的变化情况(图4)。

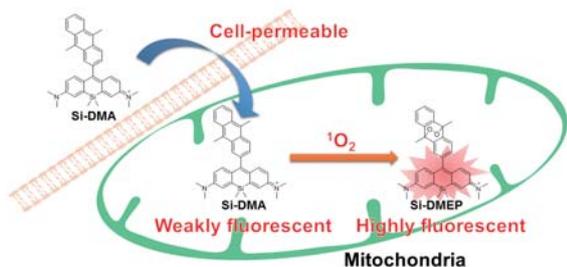


图1. Si-DMA的细胞染色原理

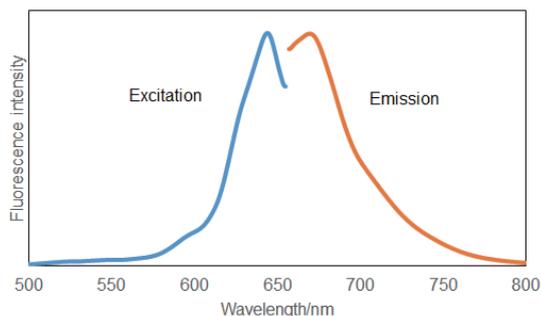


图2. Si-DMA与单线态氧反应后的激发和发射光谱

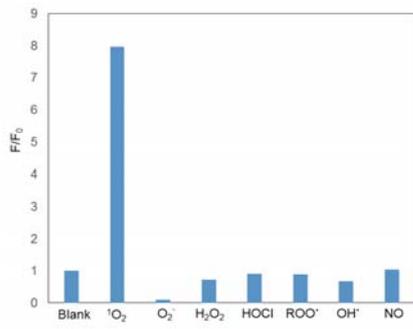


图3. Si-DMA对各种ROS的选择性

. 试剂内含

Si-DMA 2 μ g \times 1

. 储存条件

0-5 $^{\circ}C$, 避光保存

注意: Si-DMA对光敏感, 请将未使用完的Si-DMA放在铝箔袋中, 在0-5 $^{\circ}C$ 保存。

. 溶液的配制

配制100 μ mol/l Si-DMA的DMSO储存液取36 μ l的DMSO至含有2 μ g Si-DMA的管内, 吹打至溶解。* Si-DMA DMSO储存液在-20 $^{\circ}C$ 条件下可以保存1个月。

配制Si-DMA工作液

用Hanks 'HEPES 缓冲液稀释Si-DMA DMSO储存液, 配制成浓度为25~100 nmol/l 的Si-DMA工作液。

* 由于Si-DMA工作液不稳定, 请避光并于当天使用。

. 注意事项

Si-DMA工作液的推荐浓度为25~100 nmol/l。一旦Si-DMA的终浓度超过1 μ mol/l, Si-DMA可能会在细胞器中蓄积。当超过5 μ mol/l时, 可能会对细胞产生毒性。

. 操作步骤

Si-DMA染色

1. 准备细胞。
2. 去除培养基, 并用Hanks 'HEPES 缓冲液洗涤细胞2次。
3. 加入适量的Si-DMA工作液。
4. 在37 $^{\circ}C$ 培养45 min。
5. 弃上清, 用Hanks 'HEPES 缓冲液洗涤细胞2次。
6. 加入Hanks 'HEPES 缓冲液, 在荧光显微镜下观察细胞。

. 实验例

一. 荧光显微镜观察用5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 处理后的HeLa细胞中的单线态氧

1. 接种200 μl HeLa细胞 (2.4×10^5 cells/ml) 在 μ -slide 8 well (ibidi) , 培养基为DMEM (10%FBS , 1%青霉素-链霉素) , 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中过夜培养。
2. 用200 μl Hanks 'HEPES 缓冲液洗涤细胞2次。
3. 在 μ -slide中加入200 μl 含5-ALA的Hanks 'HEPES 缓冲液 (150 $\mu\text{g/ml}$) , 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养4 h。
4. 用Hanks 'HEPES 缓冲液洗涤细胞2次。
5. 加入200 μl Si-DMA工作液(40 nmol/l) , 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养45 min。
6. 用200 μl Hanks 'HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
7. 加入200 μl Hanks 'HEPES缓冲液 , 并用荧光显微镜进行观察。

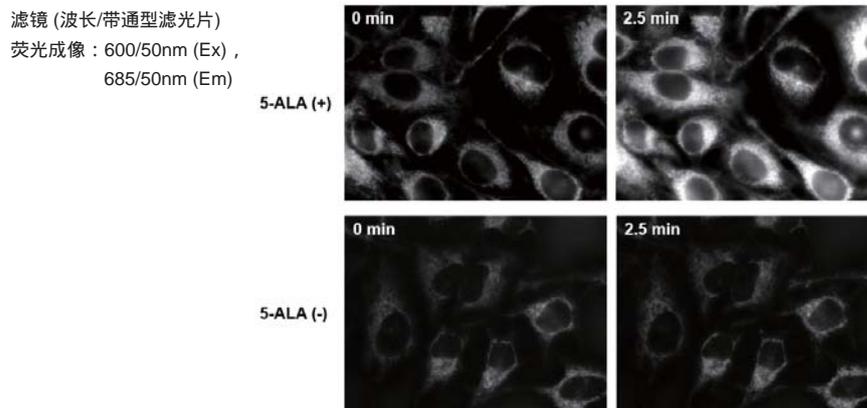


图4. Si-DMA检测5-ALA处理的HeLa细胞线粒体中的单线态氧的荧光成像
 5-ALA处理过的HeLa细胞经过2.5 min照射后, Si-DMA的荧光增强, 因此Si-DMA可以用于实时监测线粒体中原卟啉IX产生的单线态氧。

二. 观察用 H_2O_2 处理Primary Hepatocytes细胞后产生的单线态氧

实验条件 :

用10 mM H_2O_2 刺激Primary Hepatocytes 20 min.

细胞数量 : 10^4 /dish

容器 : Nest 15mm共聚焦培养皿801002

Si-DMA工作液浓度 : 100 nmol/l

染色条件 : 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中染色45 min

检测仪器 : 激光共聚焦显微镜

仪器品牌 : Leica, Cambridge, UK

仪器型号 : BMI-6000

Ex : 600 nm , Em : 685 nm

(以上数据由第二军医大学附属东方肝胆外科医院信号转导实验室友情提供)

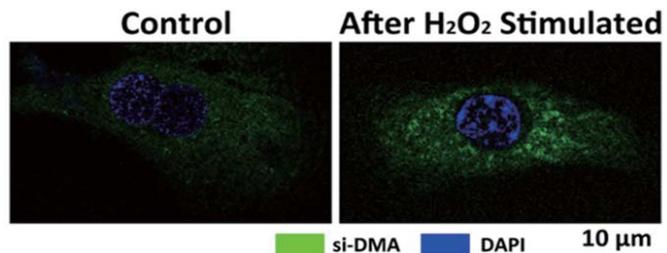


图5. Si-DMA检测用 H_2O_2 刺激Primary Hepatocytes 细胞后产生的单线态氧的荧光成像

. 参考文献

1. Contradictory Effects of Mitochondria and Non-Mitochondria-Targeted Antioxidants on Hepatocarcinogenesis by Altering DNA Repair in Mice, *Hepatology*, 2018, 67(2), 623-635
2. Green monomeric photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation, *BMC Biology*, 2018, 16, 50
3. Sonodynamic therapy inhibits palmitate-induced beta cell dysfunction via PINK1/Parkin-dependent mitophagy, *Cell Death & Disease*, 2019, 10, 457
4. Blue-Emitting Electron-Donor/Acceptor Dyads for Naked-Eye Fluorescence Detection of Singlet Oxygen, *ChemPhotoChem*, 2017, 1(7), 299-303
5. Physical Plasma Elicits Immunogenic Cancer Cell Death and Mitochondrial Singlet Oxygen, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2018, 2(2), 138-146

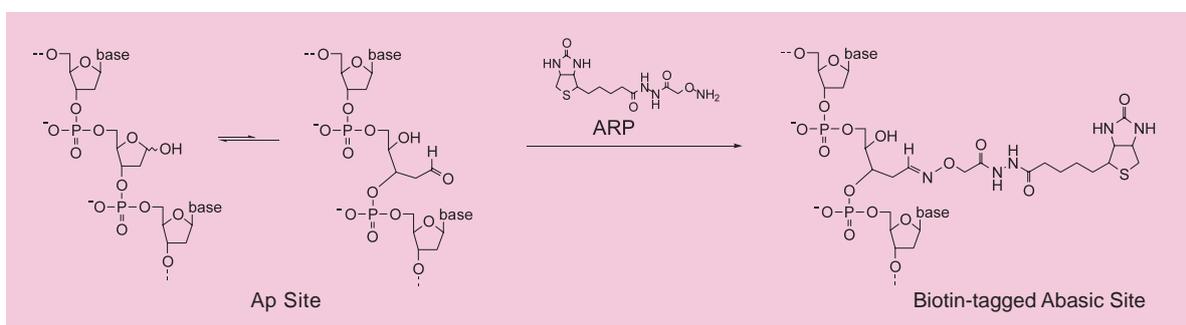
DNA Damage Quantification Kit-AP Site Counting- (货号: DK02)

. 概述

DNA的氧化损伤是由于DNA与活性氧 (ROS) 尤其是羟自由基之间的相互作用造成的。由超氧阴离子和过氧化氢通过Fenton反应产生的羟自由基在DNA中产生多重修饰。羟自由基对脱氧核糖基团的氧化攻击将导致DNA释放自由碱基, 产生链断裂、各种糖修饰以及单个无碱基位点 (AP位点)。事实上AP位点是由ROS产生的损伤的主要类型。醛反应性探针 (ARP; *N*'-氨基甲基羰基胍-D-生物素) 特异性地与AP位点的开环上的醛基反应。通过这个反应可以检测到导致醛基形成的DNA修饰。用过量ARP试剂反应后, DNA上的所有AP位点均用生物素做了标签。可以用亲和素-生物素法, 用连接到亲和素上的过氧化物酶或碱性磷酸酶做比色法检测来对这些带有生物素标签的AP位点进行计数。DNA损伤定量试剂盒包含用于检测每 1×10^5 个碱基对中1-40个AP位点的所有必需溶液。

* 本试剂盒仅适用于基因组DNA中无碱基位点 (Abasic Sites)的检测。

. 在无碱基位点处制备ARP标签的机制



. 试剂盒内含

20 samples

ARP Solution	250 μ l \times 1管
ARP-DNA Standard Solution	不同浓度各250 μ l
Filtration Tube	20管
Washing Buffer	1包
96孔板	1块
DNA Binding Solution	10 ml \times 1瓶
Substrate Solution	10 ml \times 1瓶
TE Buffer	40 ml \times 1瓶
HRP-Streptavidin	25 μ l \times 1管

. 储存条件

1. 请在0-5 $^{\circ}$ C下保存, 切勿冻存。试剂盒在0-5 $^{\circ}$ C下可保存6个月。
2. Washing Buffer Solution在室温保存。
3. 纯化的ARP-DNA在0-5 $^{\circ}$ C下可以保存1年。

. 所需的设备和材料

1. 带有630-670 nm滤光片的酶标仪
2. 培养箱
3. 10 μ l和200 μ l的可调式移液器, 多通道移液器
4. 微量离心机

. 注意事项

1. AP-DNA不稳定, 从样品中分离出基因组DNA后请用ARP处理并用过滤管纯化。
2. 纯化ARP-DNA后应立即加入200 μ l TE Buffer, 如果旋转震荡后的DNA放在过滤管中超过30 min, DNA的回收率会下降。
3. 在混合DNA Solution和DNA Binding Solution时, 使用 γ 射线消毒的过滤管会造成DNA粘附在过滤管上, 如果一定要使用过滤管, 请不要使用 γ 射线消毒的过滤管。
4. 如果想精确测定样品DNA的AP位点数量, 建议重复多次测定。
5. 如果样品DNA Solution少于10 μ l, 请用等量的ARP Solution, 在用过滤管纯化后要测定DNA的浓度。
6. 在测定时如果没有630-670 nm的滤光片, 可以从每孔中吸取50 μ l溶液到一个新的96孔板中, 每孔加入50 μ l 1 M浓度的硫酸 (Sulfuric Acid), 在450 nm波长处检测。
7. 剩余的溶液会带来误差, 在每一步可以采用在纸巾上充分拍打96孔板的方式去除剩余的溶液。

. 操作步骤



1 向样品DNA溶液中加入ARP溶液。在37 °C下培养1 h。



2 将ARP反应混合液转移到过滤管中，离心以纯化ARP标记的DNA。



3 将ARP-DNA标准溶液或ARP标记的样品DNA溶液加到各孔中。加入DNA结合溶液，并将培养板置于室温下过夜。



4 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能干净地去除缓冲液。



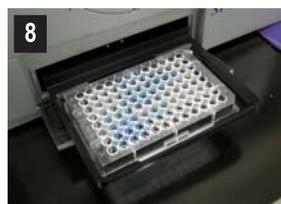
5 将HRP-链霉亲和素溶液加到每孔中并置于37 °C下培养1 h。



6 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能干净地去除缓冲液。



7 将Substrate Solution加入各孔中并置于37 °C下培养1 h。



8 测定630-670 nm处O.D.值。

. ARP反应 (制备ARP标记的DNA)

1. 用TE Buffer溶解纯化后的DNA，测定吸光度 (260 nm)。按吸光度换算浓度 (DNA浓度:以50 $\mu\text{g}/\text{l}$ 为吸光度1)，用TE Buffer调节浓度至100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
 2. 在0.5 ml管中混合10 μl 纯化的基因组DNA溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和10 μl ARP溶液，在37 °C下培养1 h。
 3. 用100 μl TE洗涤过滤管内侧。
 4. 向ARP标记的DNA溶液中加入380 μl TE Buffer，并将此溶液加入过滤管中。^{a)}
 5. 以2,500-5,000 $\times g$ 离心过滤管15 min，倒掉滤出液。
 6. 向过滤管内加入400 μl TE Buffer，用移液器将过滤膜上的DNA重悬。
 7. 以2,500-5,000 $\times g$ 离心过滤管15 min。^{b)}
 8. 向过滤管中加入200 μl TE Buffer并用移液器将过滤器上的DNA重悬。
 9. 将ARP标记的DNA溶液转移到1.5 ml管中，并向过滤管中再加入200 μl TE Buffer以完全将ARP标记的DNA从过滤器转移到1.5 ml管中。^{c)}
 10. 将ARP标记的DNA溶液储存于0-5 °C。
- a) 可用乙醇沉淀代替过滤管来纯化ARP标记的DNA。乙醇沉淀后，将DNA沉淀物溶解到100 μl TE中，并测定DNA浓度。
b) 如果离心后DNA溶液残留在过滤器上，再离心5 min，接着按步骤7操作。
c) 使用过滤管的DNA回收率为90%，因此ARP标记的DNA的浓度大约为2.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。为更准确地测定样品DNA中无碱基位点的数目，我们建议测定准确的DNA浓度值。

. DNA中无碱基位点数目的测定

第一天

1. 用310 μl TE稀释90 μl ARP标记的DNA溶液。
2. 每孔中加入60 μl ARP-DNA标准溶液。每个浓度的ARP-DNA标准溶液三个孔。
3. 每孔中加入60 μl 稀释的ARP标记的DNA溶液。每个样品三个孔。
4. 向每孔中加入100 μl DNA结合溶液并混合。将培养板置于室温下过夜。

第二天

5. 溶液的制备

洗涤缓冲液：

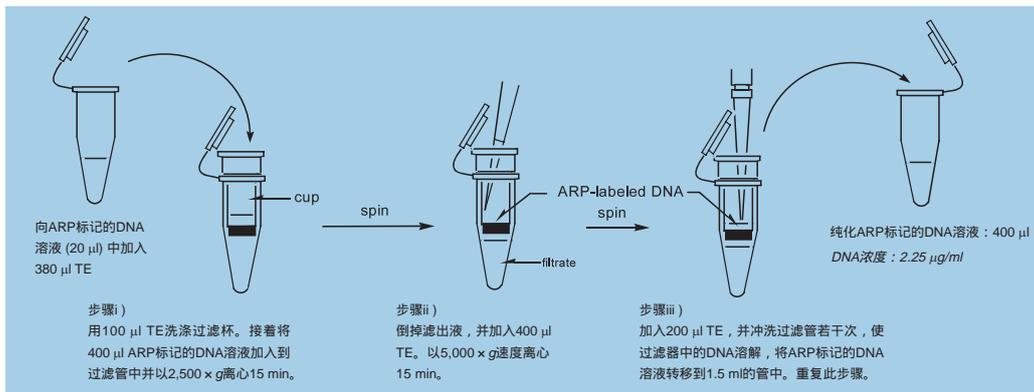
将洗涤缓冲液包的内容物溶解到1 L去离子水或蒸馏水中。室温储存此洗涤缓冲液。

HRP-链霉亲和素溶液：

用洗涤缓冲液稀释HRP-链霉亲和素以制备HRP-链霉亲和素工作液。稀释到4,000倍 (现配现用)。

6. 倒掉各孔中的DNA结合溶液并用250 μl 洗涤缓冲液洗涤各孔5次。倒掉洗涤缓冲液后，将培养板倒置并轻拍几次以完全去除该溶液。
7. 向每孔中加入150 μl 稀释的HRP-链霉亲和素工作液并置于37 °C下培养1 h。
8. 倒掉各孔中的溶液，用250 μl 洗涤缓冲液洗涤各孔5次。
9. 向每孔中加入100 μl 底物溶液并置于37 °C下培养1 h。
10. 测定630-670 nm处的O.D.值，并使用从ARP-DNA标准溶液孔得到的数据制作校准曲线。
11. 使用标准曲线确定基因组DNA中的无碱基位点的数目。

ARP标记的基因组DNA的分离过程



96板孔上DNA溶液的排列

Standard ARP-DNA (60 µl/well) or sample DNA (60 µl/well) + DNA Binding Solution (100 µl/well)

[20 samples]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		0 ARP DNA std.			sample 1		sample 5			sample 13			
B		2.5 ARP DNA std.						sample 6			sample 14		
C		5 ARP DNA std.			sample 2		sample 7			sample 15			
D		10 ARP DNA std.						sample 8			sample 16		
E		20 ARP DNA std.						sample 9			sample 17		
F		40 ARP DNA std.					sample 10			sample 18			
G		blank		sample 3			sample 11			sample 19			
H				sample 4			sample 12			sample 20			

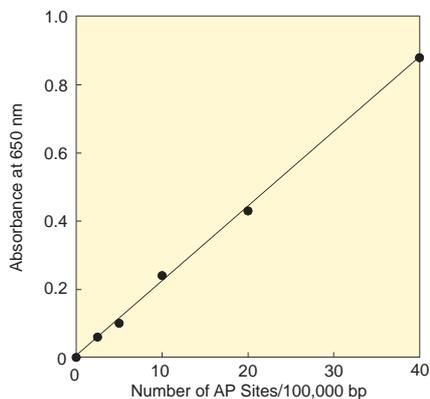
blank: 60 µl TE Buffer + 100 µl DNA Binding Solution/well
Do not use column 1 and 12

↓
Washing (250 µl/well)
HRP-Streptavidin (150 µl/well)
Washing (250 µl/well)
Substrate (100 µl/well)

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

Washing HRP-Streptavidin and Substrate

典型标准曲线



如何制备典型标准曲线

1. 计算每个ARP-DNA标准溶液的平均O.D.值。
 2. 用平均O.D.值 - 空白O.D.值。^{a)}
 3. 绘出标准溶液的AP位点数目对应的O.D.值。X轴为AP位点数目，Y轴为O.D.值。
 4. 使用此标准曲线确定样品中的AP位点数目。
- a) 空白O.D.值约为0.04-0.06，且40个ARP-DNA标准溶液的O.D.值约为0.8-1.0。O.D.值取决于HRP-链霉亲和素的活性。

. 参考文献

1. Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction, *Cell*, **2010**, *143*, 802-812
2. S-adenosylmethionine regulates apurinic/aprimidinic endonuclease 1 stability: implication in hepatocarcinogenesis, *Gastroenterology*, **2009**, *136*(3), 1025-36
3. Impaired Integrity of DNA After Recovery From Inflammation Causes Persistent Dysfunction of Colonic Smooth Muscle, *Gastroenterology*, **2011**, *141*, 1293-1301
4. DNA damage is a novel response to sublytic complement C5b-9-induced injury in podocytes, *The Journal of Clinical Investigation*, **2003**, *111*, 877-885
5. Symbiophagy as a cellular mechanism for coral bleaching, *Autophagy*, **2009**, *5*(2), 211-6
6. The prion protein is critical for DNA repair and cell survival after genotoxic stress, *Nucleic Acids Research*, **2015**, *43*(2), 904-916
7. APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features, *Nucleic Acids Research*, **2018**, *46*(11), 5664-5677
8. Telomeric epigenetic response mediated by Gadd45a regulates stem cell aging and lifespan, *EMBO Reports*, **2018**, *19*, e45494
9. Inhibiting translesion DNA synthesis as an approach to combat drug resistance to DNA damaging agents, *Oncotarget*, **2017**, *8*(25), 40804-40816

DMPO (货号: D048)

. 概述

活性氧具有调节许多重要细胞功能的作用，它和人体衰老、多种人类疾病，如癌症、糖尿病有关。自旋捕捉ESR技术是一种检测活性氧的最可靠的办法，它能提供具有特征的ESR信号。DMPO采用一种特殊的敏感方法，可以捕捉超氧阴离子和羟自由基等，分别产生独特的ESR光谱。因此它是探测生物系统内ROS的强有力工具。同仁化学研究所的DMPO具有很高的纯度，和其他产品相比，它的最大优点是使用前不需要再纯化，使您的ESR检测变得更容易。

. 常规参数

名称：5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide

性状：无色液体

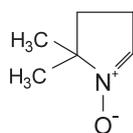
纯度：99% (GC)

分子量：113.16, C₆H₁₁NO

保存条件：-20℃，防潮，避光

运输条件：蓝冰

CAS：3317-61-1



. 操作步骤

常规检测步骤 (*本数据仅供参考，具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

SOD清除超氧阴离子的活性检测

1. 将15 μl的DMPO溶液和 50 μl的5 mM的次黄嘌呤加入到35 μl的0.1 M的磷酸盐缓冲液 (pH 7.8) 中。
2. 加入50 μl的待测SOD标准品或待测样品，涡旋振荡 1-2 s。
3. 加入50 μl的0.4 U/ml的黄嘌呤氧化酶之后立即涡旋振荡。
4. 放置一段时间 (例如 1 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
5. 通过峰值计算相对强度(DMPO-O²⁻/Mn²⁺)。

V. 实验例

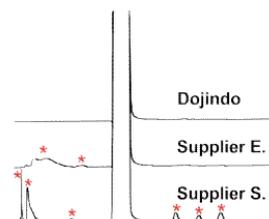
C-,N-,S-基自由基的检测

1. 制备100 mM含有25 μM Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA)的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)，作为过渡金属螯合剂。
2. 制备以下过氧化物酶底物：A) 100 mM 甲酸钠(HCOONa)；B) 100 mM氰化钾(KCN)；C) 100 mM叠氮钠(NaN₃)；D) 含有100 mM亚硫酸钠(Na₂SO₃)的100 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)。
3. 制备4.0 mg/ml (~100 μM)的辣根过氧化物酶 (HRP)溶液和1 mM H₂O₂溶液。
4. 制备浓度为1 M的DMPO溶液。
5. 在离心管中加入130 μl的缓冲液，加入20 μl已配好的1 M的DMPO溶液，再加入20 μl底物储存液，10 μl的1 mM H₂O₂溶液，最后加入20 μl HRP触发反应。
6. 涡旋振荡离心管，加入到进样系统中，检测图谱。
7. 加样后调节光谱并得到图谱。

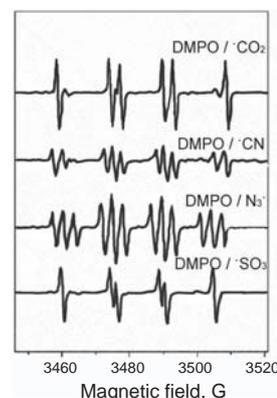
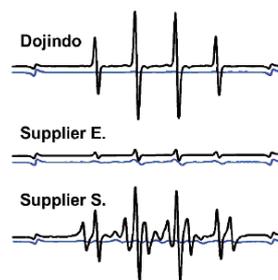
各物质的终浓度为：100 mM DMPO，10 mM的底物，50 μM H₂O₂，10 μM HRP。

. 纯度对比

同仁化学研究所 (Dojindo) 的DMPO没有杂质 (*) 检出



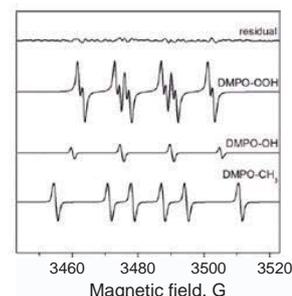
以羟自由基的Fenton反应(黑色)和空白(蓝色)为例同仁化学研究所(Dojindo)的峰更清晰，S/N比例更高



超氧阴离子操作流程

1. 制备100 mM含有25 μ M Diethylenetriaminepentaacetic Acid(DTPA)的磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 作为过渡金属螯合剂。
2. 制备100 mM含有1 mM次黄嘌呤的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。
3. 制备浓度为1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 制备浓度为1 M的DMPO溶液。
5. 在离心管中加入70 μ l缓冲液。再加入20 μ l已配好的1 M DMPO溶液以及100 μ l的1 mM次黄嘌呤保存液。
6. 加入10 μ l的黄嘌呤氧化酶触发反应, 涡旋振荡离心管后将溶液转移至进样系统中。
7. 加样后调节光谱并得到图谱。

各物质的终浓度为: 100 mM DMPO, 0.5 mM次黄嘌呤, 0.05 U/ml黄嘌呤氧化酶。



. 参考文献

1. Cardiac Myocyte-Specific Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury by Preventing Mitochondrial Permeability Transition, *Circulation*, **2008**, 118(19),1970-8
2. Genetic Deficiency of Glutathione S-Transferase P Increases Myocardial Sensitivity to Ischemia-Reperfusion Injury, *Circulation Research*, **2015**, 117(5), 437-49
3. Prussian Blue Nanoparticles as Multienzyme Mimetics and Reactive Oxygen Species Scavengers, *Journal of the American Chemical Society*, **2016**, 138(18), 5860-5
4. Highly bioactive zeolitic imidazolate framework-8-capped nanotherapeutics for efficient reversal of reperfusion-induced injury in ischemic stroke, *Science Advances*, **2020**, 6(12), eaay9751
5. Potentiating antibiotics in drug-resistant clinical isolates via stimuli-activated superoxide generation, *Science Advances*, **2017**, 3(10), e1701776
6. Detection and imaging of the free radical DNA in cells-Site-specific radical formation induced by Fenton chemistry and its repair in cellular DNA as seen by electron spin resonance, immuno-spin trapping and confocal microscopy, *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40(12), 5477-5486
7. Ultrasmall Cu₂-xS nanodots as photothermal-enhanced Fenton nanocatalysts for synergistic tumor therapy at NIR-II biowindow, *Biomaterials*, **2019**, 206, 101-114
8. Intelligent Nanocomposites with Intrinsic Blood-Brain-Barrier Crossing Ability Designed for Highly Specific MR Imaging and Sonodynamic Therapy of Glioblastoma, *Small*, **2020**, e1906985
9. Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, 114(11), 2988-2993
10. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**, 111(8), 3182-3187
11. Nonenzymatic displacement of chlorine and formation of free radicals upon the reaction of glutathione with PCB quinones, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2009**, 106(24), 9725-9730
12. Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Heparanase Expression and Inhibits Breast Carcinoma Cell Growth and Invasion, *Cancer Research*, **2009**, 69(15), 6355-63
13. Manganese Superoxide Dismutase Modulates Hypoxia-Inducible Factor-1A Induction via Superoxide, *Cancer Research*, **2008**, 68(8), 2781-8
14. Iron and sulfur co-doped graphite carbon nitride (FeOy/S-g-C₃N₄) for activating peroxymonosulfate to enhance sulfamethoxazole degradation, *Chemical Engineering Journal*, **2020**, 382, 122836
15. Spontaneous DNA damage to the nuclear genome promotes senescence, redox imbalance and aging, *Redox Biology*, **2018**, 17, 259-273
16. Switch of Mitochondrial Superoxide Dismutase into a Prooxidant Peroxidase in Manganese-Deficient Cells and Mice, *Cell Chemical Biology*, **2018**, 25, 413-425
17. Photochemical reaction of tricresyl phosphate (TCP) in aqueous solution: Influencing factors and photolysis products, *Chemosphere*, **2020**, 241, 124971
18. Crossover between anti- and pro-oxidant activities of different manganese oxide nanoparticles and their biological implications, *Journal of Materials Chemistry B*, **2020**, DOI:10.1039/c9tb02524c

BMPO (货号: B568)

. 概述

自旋捕捉技术是当今检测和鉴别不稳定自由基的最可靠的手段之一。顺磁共振波谱 (ESR) 捕捉剂能够成功的检测体内或体外生成的超氧自由基和羟自由基等。

BMPO是同仁化学研究所 (DOJINDO) 自主开发生产的新型高效、高稳定型自由基捕捉剂。它在捕捉自由基能力上优于PBN、DMPO等一般捕捉剂，与自由基的结合能力更强，半衰期 ($t_{1/2}=23 \text{ min}$) 更长，ESR谱图能够明显的区别不同的自由基结构如：GS和·OH。BMPO检测结果可靠性高、重复性强。由于具有高水溶性的特点，更利于水相体系自由基的研究，尤其是生物体系的自由基研究。

. 常规参数

名称: 5-tert-Butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide

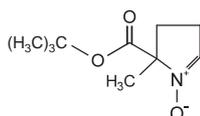
性状: 白色粉末

纯度: 99.0%

分子量: 199.25, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3$

保存条件: -20°C , 注意防潮

运输要求: 室温



. 操作步骤

常规检测步骤 (*本数据仅供参考, 具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

检测芬顿 (Fenton) 反应所产生的羟自由基:

1. 将1.5 mg的BMPO溶解于5 ml的超纯水。
2. 取15 μl 的BMPO溶液, 75 μl 的1 mM的 H_2O_2 和75 μl 的100 μM 的 FeSO_4 加入到50 μl 的超纯水中。
3. 放置一段时间 (例如1 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
4. 通过峰值计算相对强度。

检测黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶体系 (XO) 所产生的超氧自由基:

1. 溶液A: 将1 mg的BMPO溶解于1 ml的浓度为50 mM的PBS溶液 (pH 7.4)。
2. 溶液B: 用50 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 配制含有1 mM DTPA和0.4 mM黄嘌呤的混合溶液。
3. 溶液C: 用50 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 配制含有0.1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 取15 μl 溶液A, 135 μl 溶液B和10 μl 溶液C混合。
5. 放置一段时间 (例如 8 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
6. 通过峰值计算相对强度。

. 实验例

(*本数据仅供参考, 具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

*本数据均由Bruker公司ESR仪器检测得出, 由于BMPO的分子结构在平面上下差异较大, 使得图中BMPO·OH的两种异构体的超精细结构常数较大能够被ESR分辨出来。本实验中BMPO·OH的两种立体异构体与BMPO·OOH的构成相似, 两种BMPO结合物的适宜条件为:

构象异构体 (conformer) :

$a_N=13.47 \text{ G}$, $a_H^\beta=15.31 \text{ G}$, $a_H^{\gamma1}=0.62 \text{ G}$

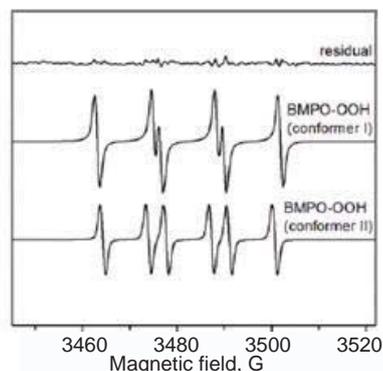
构象异构体 (conformer) :

$a_N=13.56 \text{ G}$, $a_H^\beta=12.3 \text{ G}$, $a_H^{\gamma1}=0.66 \text{ G}$

超氧化物检测操作流程

1. 用100 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 制备浓度为25 μM 的DTPA, 作为过渡金属螯合剂。
2. 用100 mM PBS (pH 7.4)配制1 mM次黄嘌呤溶液。
3. 配制1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 将10 mg的BMPO溶于200 μl 的PBS溶液中。(终浓度约为 250 mM)。
5. 向EP管中加入70 μl 缓冲液。
6. 继续添加20 μl 浓度为250 mM的BMPO和100 μl 步骤2中准备的1 mM的次黄嘌呤溶液。
7. 加入10 μl 黄嘌呤氧化酶触发反应, 将EP管漩涡震荡后转移到扁平池。
8. 上样并调整参数, 获得图谱。

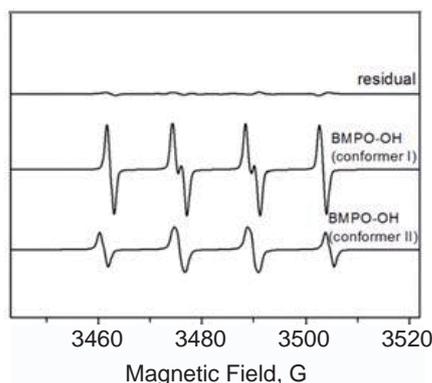
溶液终浓度为: 25 mM BMPO, 0.5 mM次黄嘌呤和0.05 U/ml的黄嘌呤氧化酶。



羟自由基操作流程

1. 分别准备1 mM的 FeSO_4 , 10 mM的 H_2O_2 和250 mM的BMPO水溶液。
2. 向EP管中加入140 μl 的超纯水。
3. 继续加入20 μl 浓度为250 mM的BMPO和20 μl 浓度为1 mM的 FeSO_4 。
4. 加入20 μl 浓度为10 mM的 H_2O_2 , 触发反应。
5. 混合并迅速转移至扁平池中。
6. 上样并调整参数, 获得图谱。

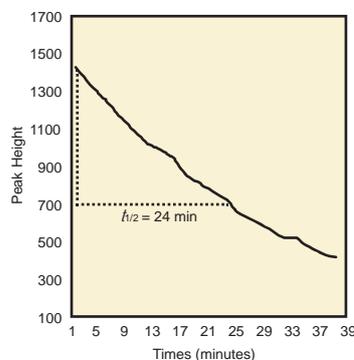
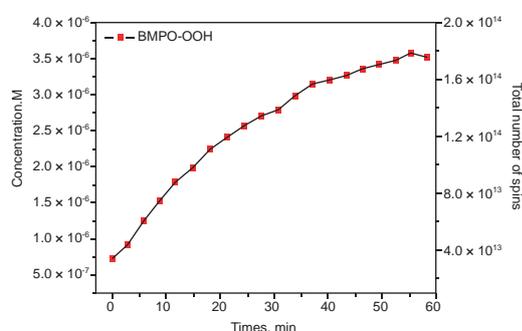
溶液终浓度为: 25 mM BMPO, 0.1 mM FeSO_4 和1 mM H_2O_2



*建议实验人员做背景图片，以在ESR图谱中排除自选杂质的干扰。

V. 相关参考数据

超氧化物信号强弱随时间的变化曲线和半衰期时间



*BMPO检测超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 的半衰期 (pH=7.4) 更长。因此更适合长时间观察样品的实验。(如检测生物酶反应)

. 参考文献

- Highly Catalytic Niobium Carbide (MXene) Promotes Hematopoietic Recovery after Radiation by Free Radical Scavenging, *ACS Nano*, **2019**, 13(6), 6438-6454
- Peroxymonosulfate enhanced visible light photocatalytic degradation bisphenol A by single-atom dispersed Ag mesoporous g-C₃N₄ hybrid, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2017**, 211, 79-88
- Synergetic Activation of Peroxymonosulfate by Co₃O₄ Modified g-C₃N₄ for Enhanced Degradation of Diclofenac Sodium under Visible Light Irradiation, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2017**, 218, 810-818
- Tailored synthesis of active reduced graphene oxides from waste graphite: Structural defects and pollutant-dependent reactive radicals in aqueous organics decontamination, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2018**, 229, 71-80
- Mitochondria-targeted TPP-MoS₂ with dual enzyme activity provides efficient neuroprotection through M1/M2 microglial polarization in an Alzheimer's disease model, *Biomaterials*, **2020**, 232, 119752
- Impact of humic acid on the degradation of levofloxacin by aqueous permanganate: Kinetics and mechanism, *Water Research*, **2017**, 123, 67-74
- Quinone group enhances the degradation of levofloxacin by aqueous permanganate: Kinetics and mechanism, *Water Research*, **2018**, 143, 109-116
- Enhanced Fenton-like degradation of pharmaceuticals over framework copper species in copper-doped mesoporous silica microspheres, *Chemical Engineering Journal*, **2015**, 274, 298-306
- MOF-templated synthesis of CoFe₂O₄ nanocrystals and its coupling with peroxymonosulfate for degradation of bisphenol A, *Chemical Engineering Journal*, **2018**, 353, 329-339
- Mechanism of Catalytic Ozonation in Fe₂O₃/Al₂O₃@SBA-15 Aqueous Suspension for Destruction of Ibuprofen, *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49(3), 1690-1697
- Mechanism for enhanced degradation of clofibrac acid in aqueous bycatalytic ozonation over MnOx/SBA-15Qiangqiang, *Journal of Hazardous Materials*, **2015**, 286, 276-284