

ヘキサノイルリジン (HEL) 測定キット使用説明書

本キットは、ヘキサノイルリジン (Hexanoyl-Lysine: HEL) に特異的なモノクローナル抗体を使用する ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キットで、HEL の簡便な測定を可能にするものです。

本キットは研究用試薬です。研究目的にのみご使用ください。

1. キットの構成

①反応プレート	: HEL 固相化プレート(8×12 ウェル、分割式)	1 枚
②1次抗体試薬	: 抗HELモノクローナル抗体溶液	1 瓶 (約 7ml)
③2次抗体試薬	: HRP 標識-抗マウス IgG (凍結乾燥品)	1 瓶
④2次抗体溶解液	: 0.05% Tween-20/リン酸緩衝生理食塩液	1 瓶 (約 12ml)
⑤発色試薬原液	: 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	1 瓶 (約 250 μl)
⑥発色試薬希釈液	: 過酸化水素/クエン酸リン酸緩衝液	1 瓶 (約 12ml)
⑦洗浄濃縮液	: 0.05% Tween-20/リン酸緩衝生理食塩液 (5倍濃縮)	2 瓶 (約 25ml/瓶)
⑧反応停止液	: 1M リン酸	1 瓶 (約 12ml)
⑨HEL標準液	: Bz-Gly-Hexanoyl-Lys /リン酸緩衝生理食塩水 (A:2.6, B:7.7, C:22.7, D:69.7, E:207, F:624 nmol/L)	各 1 瓶 (各約 500 μl)
⑩プレートシール		2 枚

※貯蔵……………冷蔵 (2~8℃。凍結させないこと)

※有効期間……………製造後 2 年

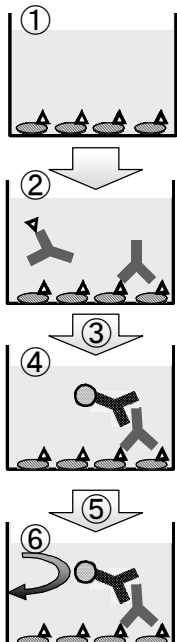
※測定範囲……………2~700 nmol/L

2. 必要な主要機器および器具

①蒸留水	: 希釈洗浄液の調製
②10~50μl 用マイクロピペット及びチップ	: 試薬の分注
③8チャンネルマイクロピペット及びチップ (50~250μl)	: 試薬の分注
④8チャンネルマイクロピペット用トレイ	: 試薬の分注
⑤低温インキュベーター (4~7℃) または冷蔵庫	: 1次抗体反応用
⑥マイクロプレートリーダー (測定波長 450nm)	

3. 測定原理

(図 1)



①HELを固相化したマイクロプレートを用意します。

②測定対象となるサンプルまたはHEL標準液と1次抗体溶解試薬を分注します。この抗体は、HELを特異的に認識するため、固相化HELとサンプル中のHELとが競争的に結合します。その結果、サンプル中のHEL濃度が高いと1次抗体がより多くサンプル中のHELに結合し、その分固相化HELに結合する1次抗体量が減少します。

③洗浄によりサンプル中のHELと結合した1次抗体が除去され、固相化HELに結合した1次抗体のみがマイクロプレート中に残ります。

④続いて2次抗体標識抗体を加えます。この2次抗体は固相化HELと結合した1次抗体を認識します。

⑤洗浄により、余剰な酵素標識抗体を除去します。

⑥発色試薬を加えると、2次抗体のHRP酵素活性により青色の発色が起こります。

⑦反応停止試薬を加えることで発色反応を停止させ、450nmの波長で吸光度を測定します(反応液は黄色になります)。サンプル中のHEL濃度が高いほど、吸光度は低く(黄色が薄く)なります。この黄色の濃さからサンプル中のHEL濃度を算出します。

4. サンプルの前処理

測定するサンプルの種類によって希釈や前処理が必要な場合があります。

A. 尿サンプルの場合：

PBSにて4倍希釈をお勧めします。不溶物がある場合は遠心除去し、また蛋白質を含む尿や異常尿を測定する場合には、B. 血清の場合) に準じた前処理をしてください。

B. 血清サンプルの場合：

HELが高分子蛋白質に含有された状態では、サンプル中のHELを正確に測定できない場合があります。このような場合には下記の手順を参考に蛋白質分解処理をご検討ください。

- ①前処理用酵素試薬（例：14mg/mL α キモトリプシン/PBS）を用意する。
 - ②血清サンプルを必要に応じて生理的リン酸緩衝液（PBS）に希釈する。
 - ③サンプル300 μ Lに対し前処理用酵素試薬60 μ Lを混合し、37 $^{\circ}$ C一晩静置する。
 - ④分画分子量10000Dの限外濾過フィルタを通過させ、濾液をELISAでの測定に用いる。
- ※これは一例です。ご使用になるサンプルの性質と目的に応じて処理条件をご検討ください。

5. 実験操作

以下の実験操作は、キットを常温に戻してから行ってください。分割使用する場合には、今回使用するウェル以外は予めフレームから取り外しておき、開封後は1週間以内にご使用ください。
検体数が多い場合には、各ウェルの反応時間が均一になるように準備の上、測定してください。

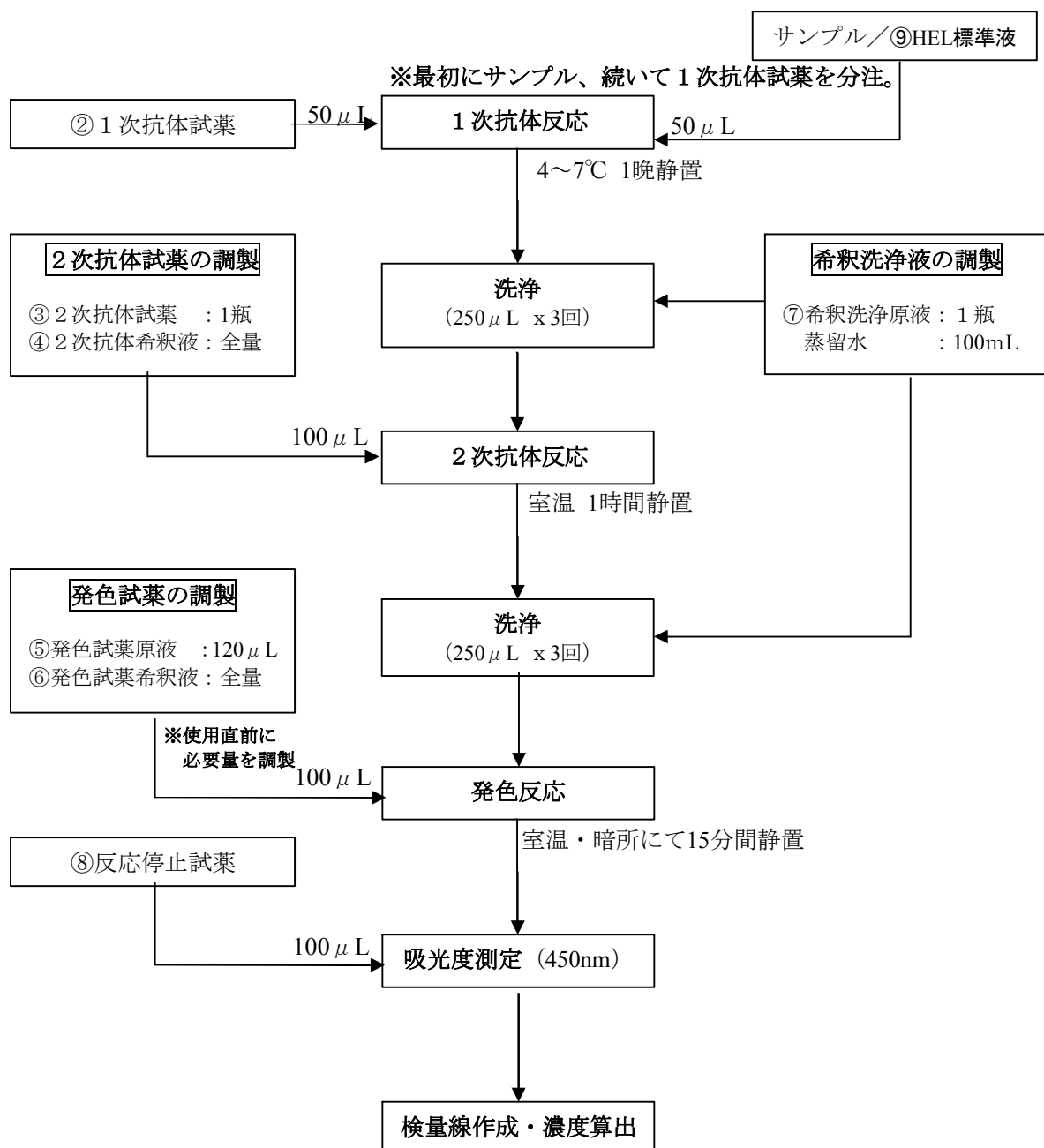
- A) ①マイクロプレートを袋から取出します。
- B) ⑨HEL標準液A~Fをウェルに50 μ L正確に分注します。同様にサンプル50 μ Lを分注します。ブランク用ウェルには蒸留水を100 μ L分注しておきます。ウェルの配置は右図2を参考にしてください。
- C) 続いてブランク用ウェル以外の全ウェルに②1次抗体試薬を50 μ Lずつ分注し、液がウェル内で均一となるようプレート全体を軽く揺らしてください。プレートをシールして密閉したのち4~7 $^{\circ}$ Cで1晩反応させます。
- D) 希釈洗浄液を調製します。⑦希釈洗浄濃縮液1瓶に対して100mLの蒸留水を加え、希釈洗浄液とします。
- E) 2次抗体試薬を調製します。③2次抗体試薬に対し④2次抗体希釈液を全量混合し、2次抗体試薬とします。残った試薬は冷蔵にて保存し1週間以内に使用してください。
- F) シールを剥がしウェル中の反応液を捨て洗浄液250 μ Lを分注します。プレート全体を軽く揺らしたのち、洗浄液を捨てます。プレートのウェル面を下にしてキムタオル等にたたき、ウェルに残った水分を除去してください。この洗浄操作を3回繰り返します。
- G) 2次抗体試薬を全ウェルに100 μ L分注し、プレート全体を軽く揺らしてよく混合します。プレートをシールし、室温（20~24 $^{\circ}$ C）で1時間静置します。
- H) 発色試薬を調製します。⑥発色試薬希釈液全量に対し⑤発色試薬原液を120 μ L混合し、発色試薬とします。尚、分割使用する場合には⑥発色試薬希釈液1mLあたり⑤発色試薬原液を10 μ L混合してください。発色試薬は使用直前に調製し、調整後30分以内に使用してください。
- I) 反応終了後、ウェル中の反応液を捨て、洗浄液250 μ Lを分注し、ステップFと同様に洗浄を3回行います。最後にプレートのウェル面を下にしてキムタオル等にたたき、ウェルに残った水分を除去してください。
- J) 発色試薬を全ウェルに100 μ L分注し、よく混合したのち、暗所室温にて15分間反応させます。
- K) ⑧反応停止液100 μ Lを全ウェルに加え、よく混合し反応を停止させます。
- L) マイクロプレートリーダーを使用して450nmにおける吸光度を測定します。

【図2・ウェル配置例】

下図はプレート使用の一例です。1サンプルにつき3ウェルずつを使用し（n=3）、A行とH行のウェルはエッジ効果を避けるため分析に使用していません（図中×印）。この方法では、96穴のプレート1枚で18サンプルの分析ができます（n=1では54サンプル）。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
B	⑨HEL標準液-A(n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)	サンプル (n=3)
C	⑨HEL標準液-B(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
D	⑨HEL標準液-C(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
E	⑨HEL標準液-D(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
F	⑨HEL標準液-E(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
G	⑨HEL標準液-F(〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)	サンプル (〃)
H	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

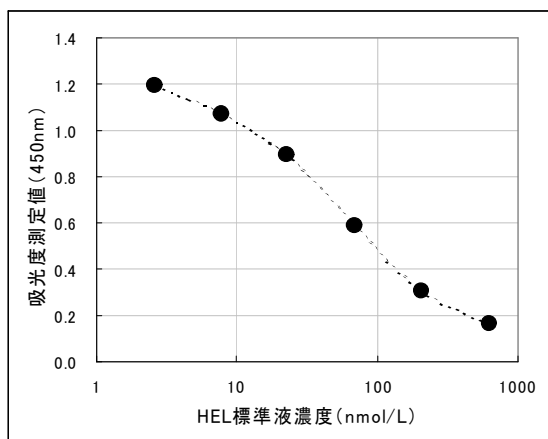
6. 測定法フローチャート



7. 標準曲線の作成とHEL濃度の算出

片対数グラフに標準液の濃度（横軸・対数軸）と、測定した吸光度（縦軸）との関係をプロットし、ヘキサノイルリジンの標準曲線を作成します。検量線の近似関数には6点の曲線または折れ線を推奨。作成した標準曲線を用い、サンプルの吸光度からヘキサノイルリジン濃度を計算します。尚、検量線は毎回必ず作成し、濃度計算にはサンプルと同一のプレートで測定した検量線データを使用してください。

【図3・典型的な検量線】



	標準物質濃度 (nmol/L)	吸光度測定値
⑨HEL 標準液-A	2.6	1.197
-B	7.7	1.070
-C	22.7	0.895
-D	69.7	0.586
-E	207	0.305
-F	624	0.166


8. 関連文献

- ① Yoji Kato, Yoko Mori, Yuko Makino, Yasujiro Morimitsu, Sadayuki Hiroi, Toshitsugu Ishikawa, Toshihiko Osawa. Formation of N^ε-(hexanonyl) lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 29, pp. 20406 – 20414, 1999
- ② Yoji Kato, Yoshiaki Miyake, Kanefumi Yamamoto, Yoshiharu Shimomura, Hirotomoto Ochi, Yoko Mori, Toshihiko Osawa. Preparation of a monoclonal antibody to N^ε-(hexanonyl) lysine: application to the evaluation of protective effects of flavonoid supplementation against exercise-induced oxidative stress in rat skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 274(2), pp389-393, 2000

9. トラブルシューティング

使用時に十分や試薬性能が得られなかった場合には、下記を参考に解決を試みてください。

- ① 測定値のばらつき：
【考えられる原因と対処法】
 - ・反応時の温度ムラ ⇒恒温槽や温度の安定性の高いインキュベーターをお試し下さい。
 - ・洗浄時における洗浄液の不十分な除去 ⇒ペーパータオルに叩きつけるなどして確実に残液を除去してください（ウェル内壁には触れないでください）。
 - ・分注精度が十分でない ⇒特に1次抗体液とサンプルの分注精度は測定結果に大きな影響を与えます。正確に50μLを分注してください。
- ② 吸光度が全体に高い/低い：
【考えられる原因と対処法】
 - ・2次反応および発色反応時のインキュベーション温度と時間は吸光度に影響を与えます。室温が高い（25℃以上）などの場合は、発色反応の時間を短縮/延長してみてください。
- ③ 測定値がマイナスを示す場合：
【考えられる原因と対処法】
 - ・高分子の蛋白質、高濃度の塩、極端なpH等は本測定系に影響を与えます。サンプルの性質に応じて希釈、血清サンプル用の前処理などを実施してください。

【開発・発売元】  日研ザイル(株) 日本老化制御研究所

Japan Institute for the Control of Aging, Nikken SEIL Co. Ltd.

〒437-0122 静岡県袋井市春岡710-1

TEL: 0538-49-0125

FAX: 0538-49-1267

URL: <http://www.jaica.com>

E-mail: biotech@jaica.com