

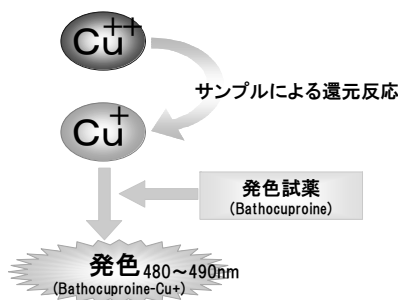
PAO 抗酸化能測定キット

使用説明書

(製品コード: KPA-050)

酸化ストレスは数多くの疾病や老化現象に深く関わっており、酸化ストレスの低減は疾病予防や老化制御に役立つことが期待されています。酸化ストレスとは、体内で発生する活性酸素と、活性酸素を消去する抗酸化能のバランスが崩れることによって生じます。このため、酸化ストレスの的確な評価には、生体内における活性酸素(損傷レベル)と抗酸化能の両面を測定することが重要と考えられます。本試薬は銅イオンの還元反応($\text{Cu}^{++} \Rightarrow \text{Cu}^{+}$)を利用し、サンプルの抗酸化能を短時間(約5分)で簡便に測定するものです。血清のトータル抗酸化能の評価にご利用いただけます。血清の酸化ラグタイムと高い相関性を示すほか、赤ワインや紅茶といった食品サンプルの抗酸化能評価にも適用可能です。

1. 測定原理とキット構成



Cu^{++} 試薬とサンプルを混合すると、サンプル中の抗酸化物質の還元作用により Cu^{+} が生成されます。 Cu^{+} は発色試薬(Bathocuproine)と複合体を形成し、480~490nmにおいて吸光を示します。発生した Cu^{+} よりサンプルの抗酸化能(還元能)を評価します。

①標準物質 (Standard 2mM)	1本	蒸留水をラベル記載量加えて溶解します。
②サンプル希釈液 (Sample diluent)	60mL * 1本	そのまま使用します。
③ Cu^{++} 試薬 (Cu^{++} solution)	5mL * 1本	そのまま使用します(50 μL /テスト)。
④反応停止液 (Stop solution)	5mL * 1本	そのまま使用します(50 μL /テスト)。
⑤マイクロプレート	1枚	

2. 仕様

①測定範囲:	21.9~4378 $\mu\text{mol/L}$ (Cu還元力: Cu reducing power)
②保存条件:	室温
③有効期限:	製造後3年間(本キット外箱に記載)

3. 必要な器具・試薬

- ①マイクロプレートリーダー(測定波長490nm)
- ②ピペット(50~200 μL 可変)
- ③プラスチック試験管
- ④蒸留水
- ⑤NaOH・HCl・pHメーター(標準物質を蒸留水で溶解する場合には不要)

4. 測定手順

- 1) **標準物質の溶解**(2通りの溶解法があります。) ※溶解した標準物質(2mM 尿酸)は凍結保存できます(-70°Cにて1年以上)。蒸留水にて調製する場合は: ①標準物質 1瓶に対し蒸留水をラベルに表示されている量分注し、室温にて3~4時間静置して溶解します。アルカリ溶解する場合は: 10% NaOH水溶液1mLを分注して粉末を完全に溶解します。続いて蒸留水を2mLを加え、塩酸にてpH7.4に調整します。最後に総液量がボトルに記載されている液量となるよう蒸留水を加えます。

2) スタンダードの調製

1)で溶解した標準物質(2mM 尿酸)を蒸留水にて2倍(1mM)、4倍(0.5mM)、8倍(0.25mM)、16倍(0.125mM)、32倍希釈(0.063mM)して、スタンダードを調製します。検量線の作成には0.063mM、0.125mM、0.25mM、0.5mM、1mM、2mM尿酸の6レベルを使用します。

3) サンプル調製

血清サンプルは新鮮なもの又は-20°C以下で保存したものを用います。その他のサンプルにつきましては「6. サンプル調整法」を参考に希釈してください。

4) 測定手順

- ・プラスチック製試験管を準備します(スタンダード分6本+各サンプル用)。試験管に②サンプル希釈液を390 μL 分注します。スタンダードまたはサンプル10 μL を加え攪拌します。
- ・マイクロプレートに200 μL /ウェル分注します。ブランクには②サンプル希釈液を用います。
- ・490nmにおける吸光度を測定します。
- ・③ Cu^{++} 試薬を各ウェルに50 μL 分注し、軽くゆすって攪拌し、室温にて3分間インキュベートします。
- ・④反応停止液を各ウェルに50 μL 分注し、軽くゆすって攪拌します。
- ・490nmにおける吸光度を測定します。

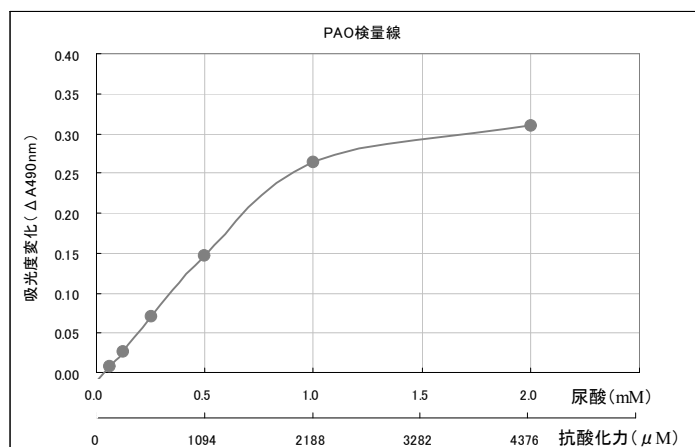
(次ページに続く)

5) 抗酸化能の算出

反応開始前の吸光度と反応終了後の吸光度の差を使用します。方眼紙に標準物質の濃度と吸光度をプロットして検量線を作成します。サンプルの吸光度から、尿酸相当濃度 (mmol/L) を算出し、さらに2189を掛けてCu還元力を計算します。

尿酸 1mM = 2189 μ mol/L (Cu還元力: copper reducing power)

5. 検量線および参考値



横軸に標準物質の濃度(尿酸濃度:mM)、縦軸に490nmにおける吸光度変化をプロットして検量線を作成します。吸光度0.2以下の部分であれば直線による検量線近似が可能です。

6. サンプル別調製法

サンプル	前処理	測定例 (μ mol/L antioxidant power)	
ヒト血清	なし	1069 \pm 145	ヒト新鮮血清をご使用ください
ヒト尿	蒸留水にて4倍希釈	5508	
赤ワイン	蒸留水にて8倍希釈	45479	
日本酒	なし	18~211	
紅茶	蒸留水にて8倍希釈		
コーヒー	蒸留水にて28倍希釈		
緑茶	蒸留水にて8倍希釈	8728~46687	市販の緑茶飲料測定例

測定結果が2000 μ mol/L antioxidant powerを超えるサンプルは、さらに蒸留水にて希釈して測定することをお奨めします。例えば高濃度カテキンを含む緑茶は非常に高い抗酸化性を示しますので、蒸留水にて40倍程度の希釈が必要となる場合があります。

また、銅イオンを含むサンプルや、逆に銅イオンを吸収する(キレート作用)を持つサンプルでは正しく測定できない場合があります。

7. 参考文献

Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors

C. VASSALLE, L. PETROZZI, N. BOTTO, M. G. ANDREASSI & G. C. ZUCHELLI

Journal of Internal Medicine 256, p308-315 (2004) (PAO測定値は高血圧患者、冠動脈疾患患者で低値を示します)

Oxidative imbalance and cathepsin D changes as peripheral blood biomarkers of Alzheimer disease: A pilot study

E. Strafacea, P. Matarrese, L. Gambardella, R. Vona, A. Sgadari, MC Silveri, W. Malorni

FEBS Letters 579, p2759-766 (2005) (アルツハイマー患者では血清PAOは低値を示します)

Restored Antioxidant Capacity Parallels the Immunologic and Virologic Improvement in Children with Perinatal Human Immunodeficiency Virus Infection Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy.

M. Martino, F. Chiarelli, M. Moriondo, M. Torello, C. Azzari, and L. Galli

Clinical Immunology, Vol.100(1),p82-6 (2001)

Antioxidant capacity as a reliable marker of stress in dairy calves transported by road.

P. Preget, E. Bollo, FT Cannizzo, B. Biolatti, E. Contato, PG Biolatti: Veterinary Record Vol. 156, p53-54 (2005)

最新の技術情報・学術情報は日本老化制御研究所ホームページにてどうぞ。 <http://www.jaica.com>



日研ザイル(株)日本老化制御研究所

〒437-0122 静岡県袋井市春岡710-1

TEL:0538-49-0125 FAX:0538-49-1267