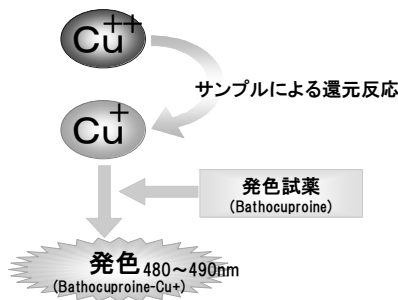


抗酸化能測定キット PAO-SO

使用説明書

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。本キットは食用油等の抗酸化能を、銅イオンの還元反応($\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^+$)を利用して検出します。

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 4 mM)	1本	そのまま使用します。
②エタノール試薬(Ethanol)	1本	そのまま使用します。
③サンプル希釈液(Sample diluent)	2本	そのまま使用します。
④-A Cu^{++} 試薬A(Cu^{++} solution-A)※	2本	} 試薬Aと試薬Bを等量混合して使用します。 (試薬Aの全量を試薬Bのボトルに加えます)
④-B Cu^{++} 試薬B(Cu^{++} solution-B)※	2本	
⑤反応停止液(Stop solution)	1本	そのまま使用します(50 μL /テスト)。
⑥マイクロプレート	1枚	

※④ Cu^{++} 試薬は使用前に調製してください。調製後は蓋をしっかりと閉めて冷蔵保存してください。有効期限は2週間です。まれに保存中に沈殿が生ずる場合があります。この場合には、よく混合して懸濁状態のままご利用ください。

2. 仕様

- ①測定範囲: ~7752 $\mu\text{mol/L}$ (Cu還元力: Cu reducing power)
- ②保存条件: 冷蔵
- ③有効期限: 外箱側面に記載(開封後の有効期限は2週間)

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. 測定手順

1) スタンドアートの調製

①標準物質(4 mM)を②エタノール試薬にて2倍(2 mM)、4倍(1 mM)、8倍(0.5 mM)、16倍(0.25 mM)、32倍希釈(0.125 mM)して、スタンダードを調製します。検量線の作成には0.125 mM、0.25 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM、4 mMの、計6レベルを使用します。

2) ④ Cu^{++} 試薬の調製

「④-A Cu^{++} 試薬A」の全量を「④-B Cu^{++} 試薬B」のボトルに入れ、よく混合してください。調製後は冷蔵保存で2週間使用できます。何回かに分けて使用する場合には「④-A Cu^{++} 試薬A」と「④-B Cu^{++} 試薬B」を必要な分だけ等量混合してください。

3) サンプル調製(前希釈) サンプルを必要に応じて③サンプル希釈液にて希釈し、よく攪拌します。

4) 測定手順

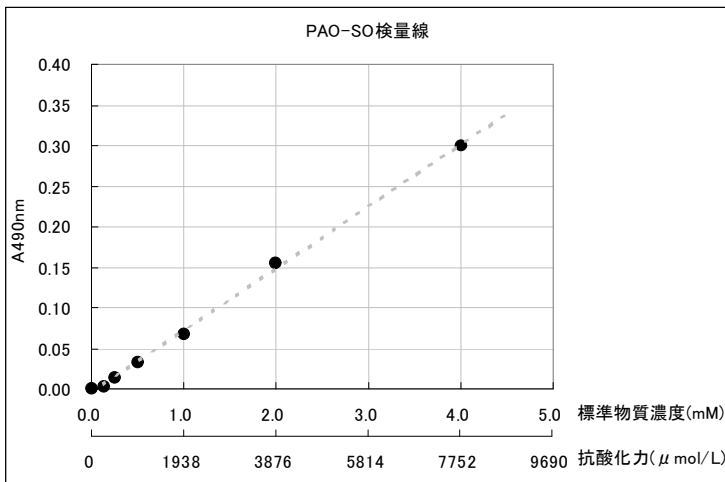
- A) プラスチック製試験管を準備します(スタンダード分6本+各サンプル用)。試験管に③サンプル希釈液を390 μL 分注します。スタンダード、またはサンプル10 μL を加え攪拌します(40倍希釈)。
- B) マイクロプレートに200 μL /ウェル分注します。ブランクには③サンプル希釈液を用います。
- C) 490nmにおける吸光度を測定します。
- D) ④ Cu^{++} 試薬を全ウェルに50 μL 分注し、軽くゆすって攪拌し、室温にて10分間インキュベートします。
- E) ⑤反応停止液を各ウェルに50 μL 分注し、軽くゆすって攪拌します。
- F) 490nmにおける吸光度を測定します。

4) 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、標準物質相当濃度 (mmol/L) を算出し、さらに1938を掛けてCu還元力を計算します。

標準物質 1mM = 1938 μ mol/L (Cu還元力: copper reducing power)

5. 検量線と食用油への応用



横軸に標準物質の濃度 (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。

食用油の測定例:

市販の食用油2品目について抗酸化力の測定を試みた。原液での測定ではウェル内に濁りが発生したため、測定手順3-Aの希釈倍率を40倍から80倍および160倍に上げて測定を行った。

(サンプルの性状によってはプロトコル通り40倍希釈で測定できる場合があります)

サンプル名	希釈率	A490nm	抗酸化力 (μ mol/L)
オリーブオイル	*2 (計80倍希釈)	0.370	9437
	*4 (計160倍希釈)	0.210	5402
ゴマ油	*2 (計80倍希釈)	0.334	8529
	*4 (計160倍希釈)	0.177	4570

6.トラブルシューティング

1) サンプル希釈時に油分が分離する場合:

③サンプル希釈液または②エタノール試薬にて希釈倍率を上げて、ボルテックス等で数分攪拌してみてください。
食用油の場合には、測定ステップ3-Aの希釈倍率(40倍)をさらに4倍(計160倍希釈)程度上げて測定してください。

2) 測定時に④Cu⁺⁺試薬を添加すると濁りが発生する場合:

サンプルの性質により、測定ステップ3-B)の時点で透明でも、ステップ3-D)で④Cu⁺⁺試薬を添加することで濁りが発生する場合があります。濁りは測定誤差の要因となりますので、この場合はさらにサンプル希釈率を上げてみてください。

3) うまく発色しない場合:

④Cu⁺⁺試薬は白色沈殿を生ずる場合があります。この場合には軽く暖めながら10分程度軽く攪拌し、懸濁液の状態のままウェルに分注してください。上清を使用した場合には十分な発色が得られない場合があります。

7. 参考文献

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)

Effects of the daily administration of a rehydrating supplement to trotter horses.

A Falaschini, G Marangoni, S Rizzi, MF Trombetta: J Equine Sci Vol. 16(1), p1-9 (2005)

8. 包装単位

1キット中 96ウェル。MSDS、最新のテクニカルサポートの情報は <http://www.jaica.com> にてご利用いただけます。

【製造元】:



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