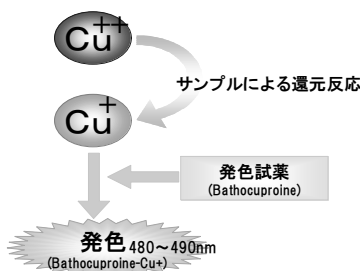


PAO-U 抗酸化能測定キット 使用説明書

(製品コード: KPA-050U)

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、血清抗酸化能を短時間(約8分)で簡便に測定するものです。尿酸はantioxidantよりもprooxidantとして作用する可能性が指摘されており、本試薬では尿酸を除いた血清のトータル抗酸化能の評価にご利用いただけます。

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 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 μ L/テスト)。
④反応停止液(Stop solution)	5mL * 1本	そのまま使用します(50 μ L/テスト)。
⑤マイクロプレート	1枚	
⑥酵素試薬(Enzyme reagent)	1本(凍結保存)	

2. 仕様

- ①測定範囲: 21.9~4378 μ mol/L (Cu還元力: Cu reducing power)
- ②保存条件: 冷蔵(⑤酵素試薬は別途凍結保存)
- 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 μ L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: 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: 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を用います。

4) 測定手順

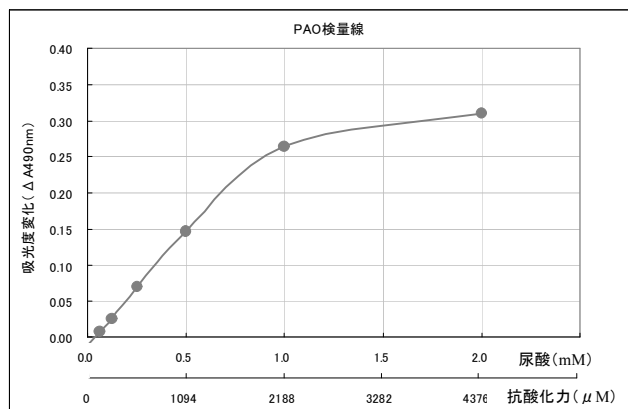
- ・プラスチック製試験管を検体数分用意します。新鮮血清サンプル100 μ Lを分注し、さらに⑥酵素試薬 1 μ Lを加え室温にて3分間インキュベートします。
- ・プラスチック製試験管を準備します(スタンダード分6本+各サンプル用)。試験管に②サンプル希釈液を390 μ L分注します。スタンダード、または酵素試薬で処理した血清サンプル10 μ Lを加え攪拌します。
- ・マイクロプレートに200 μ L/ウェル分注します。ブランクには②サンプル希釈液を用います。
- ・490nmにおける吸光度を測定します。
- ・③Cu⁺試薬を各ウェルに50 μ L分注し、軽くゆすって攪拌し、室温にて3分間インキュベートします。
- ・④反応停止液を各ウェルに50 μ L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。

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。

ヒト血清参考値: 866 \pm 245 μ mol/L

6. 参考文献

When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid.

Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G.: Biochem J. 1999 May 15;340 (Pt 1):143-52.

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 2004; 256: 308-315 (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)

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)

本製品は米国特許 6613577号およびイタリア特許01309421号により保護されています。

【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

ホームページ: <http://www.jaica.com>
TEL: 0538-49-0125