

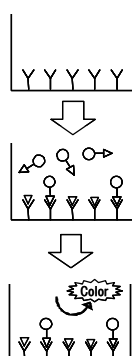
尿中イソプラスタンELISA Kit

Urinary Isoprostane assay kit

使用説明書

イソプラスタンは細胞膜やリポ蛋白に含まれるリン脂質がフリーラジカルで酸化されることによって生じるプロスタグランジン様の化合物であり、尿中イソプラスタンを測定することにより、生体内における酸化ストレスを非侵襲的に評価することが可能になります。本試薬は尿サンプルを対象に15-イソプラスタン F_{2t} (15-isoprostane F_{2t} : 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ 又は8-isoPGF $_{2\alpha}$ とも呼ばれます)を測定するELISAキットです。

1. 測定原理



1. 抗15-isoprostane F_{2t} 抗体がコートされたマイクロプレートを用意します。
2. ウェルにサンプルおよびHRP標識-15-isoprostane F_{2t} を分注します。
マイクロプレート上の抗15-isoprostane抗体の一部はHRP標識-15-isoprostane F_{2t} に結合しますが、一部はサンプル中の遊離15-isoprostaneに結合します。
3. 余剰なHRP標識-15-isoprostane F_{2t} を洗浄除去します。
4. TMB発色基質を加え、マイクロプレート上に結合したHRP標識-15-isoprostane F_{2t} を検出します。
サンプル中の15-isoprostane F_{2t} 濃度が低い場合には吸光度が高く、15-isoprostane F_{2t} 濃度が高い場合には吸光度が低くなります。

2. 仕様

1. 測定範囲: 0.05~100 ng/mL
2. 保存条件: 冷蔵(凍結不可)
3. 有効期限: 外箱側面に記載

3. キットの構成

①マイクロプレート(Micro Plate)	1枚	そのまま使用します。
②標準物質原液(Standard)	2本	希釈液を用いて希釈調製します。
③希釈液(Enhancer/Dilution Buffer)	1本	そのまま使用します。
④洗浄液(x5)(Washing Buffer)	1本	蒸留水にて5倍希釈して使用します。
⑤HRP標識-15-isoprostane F_{2t} (HRP-Conjugate)	1本	希釈液5.8 mLと混合して使用します。
⑥発色試薬(TMB Substrate)	1本	そのまま使用します(150 μ L/テスト)。
⑦プレートシール	2枚	

4. 必要な器具・試薬

1. マイクロプレートリーダー(測定波長450nm)
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
5. 3M 硫酸(反応停止液) ※本キットには反応停止液は付属していません。

5. サンプルと試薬の調製

1. 洗浄液の調製:

④洗浄液(x5)に蒸留水160mLを混合して、洗浄液を調製します。分割使用する場合には必要量を取り、蒸留水にて5倍希釈します。

2. HRP標識-15-isoprostane F_{2t} 試薬の調製:

⑤HRP標識-15-isoprostane F_{2t} 200 μ Lに対し、③希釈液5.8mLを加えて調製します。分割使用する場合には必要量を取り、③希釈液にて30倍希釈します。

3. サンプルの調製:

尿サンプルを③希釈液にて4倍または8倍に希釈しておきます。

血清サンプルや組織サンプルの場合には、予め15-isoprostane F_{2t} を固相抽出してから測定してください。

4. Standardの調製: StandardはB0、S1～S7の計8レベルです。

②標準物質原液 60 μL に対し、③希釈液を 540 μL 添加してボルテックスにてよく混合します (S7: 15-isoprostane F_{2t}: 100 ng/mL)。

S6 (50 ng/mL) の調製: 250 μL の S7 に対し、250 μL の ③希釈液を混合します (50 ng/mL)。

S5 (10 ng/mL) の調製: 150 μL の S6 に対し、600 μL の ③希釈液を混合します (10 ng/mL)。

S4 (5 ng/mL) の調製: 250 μL の S5 に対し、250 μL の ③希釈液を混合します (5 ng/mL)。

S3 (1 ng/mL) の調製: 100 μL の S4 に対し、400 μL の ③希釈液を混合します (1 ng/mL)。

S2 (0.1 ng/mL) の調製: 75 μL の S3 に対し、675 μL の ③希釈液を混合します (0.1 ng/mL)。

S1 (0.05 ng/mL) の調製: 200 μL の S2 に対し、200 μL の ③希釈液を混合します (0.05 ng/mL)。

B0: ③希釈液をそのまま使用します (0 ng/mL)。

	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	B0
STD 濃度	100 ng/mL	50 ng/mL	10 ng/mL	5 ng/mL	1 ng/mL	0.1 ng/mL	0.05 ng/mL	0 ng/mL
	原液 60 μL	250 μL	150 μL	250 μL	100 μL	75 μL	200 μL	—
③希釈液	540 μL	250 μL	600 μL	250 μL	400 μL	675 μL	200 μL	400 μL

6. 測定手順

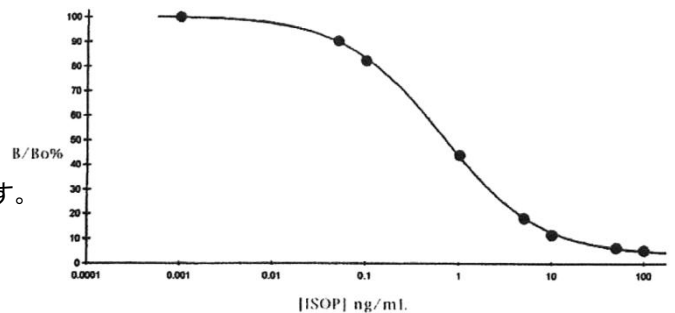
測定開始前に本キットを室温に戻しておいてください。反応停止液 (3M 硫酸) をご用意ください。

- ①マイクロプレートを袋から取り出します (今回使用しないウェルは、予めプレートから取り外しておいてください)。
- ウェルに Standard (B0、S1～S7 および希釈した尿サンプル) を 50 μL 分注します。
- ブランクを除く全てのウェルに HRP 標識-15-isoprostane F_{2t} 試薬を 50 μL 添加し、軽く振とうして混合します。
ブランクには ③希釈液を 50 μL 添加します。
- ⑦プレートシールを貼り、室温にて 2 時間静置します。
- ⑦プレートシールを剥がし、プレートを上下逆さにして液を勢いよく捨て、清潔なペーパータオル等に叩きつけて液を完全に除去します。
(アスピレーター、自動洗浄装置等はウェル内面のコーティングを傷つける可能性がありますのでご注意ください。)
- 洗浄液を全てのウェルに 300 μL 分注し、軽く振とう混合したのち、2 分間静置します。
- ステップ 5～6 の洗浄操作を合計 3 回実施します。
- 全てのウェルに ⑥発色試薬を 150 μL 分注し、室温にて 20～40 分間インキュベートします (発色状況によりの間で調整します)。
- 全てのウェルに 3M 硫酸を 50 μL 分注します。
- 450 nm における吸光度を測定します。

7. 検量線の作成

※検量線は毎回必ず作成してください。

- 各ウェルの吸光度を B0 の吸光度で割り、B/B0 を計算します。
- 縦軸に B/B0、横軸に標準物質濃度 (対数) をプロットして検量線を作成します。
- 各ウェルの B/B0 から、サンプル中のイソプラスタン濃度を算出します。



8. 文献

- Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ 2nd: Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. Anal Biochem.184(1), p1-10 (1990)
- Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, Kanai K, Taber D, Moore K, Oates JA, Roberts LJ.: Quantification of the major urinary metabolite of 15-F_{2t}-isoprostane (8-iso-PGF₂α) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. Anal Biochem. 269(2), p326-331 (1999).
- Roberts LJ, Morrow JD.: Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med.28(4), p505-513 (2000).

【輸入・発売元】:



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
テクニカルサポート biotech@jaica.com