

製品コード MK150

研究用

Takara

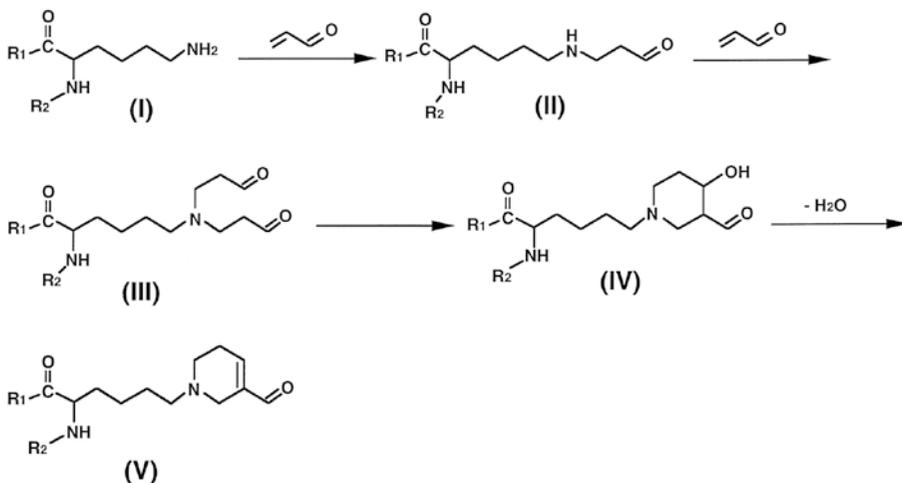
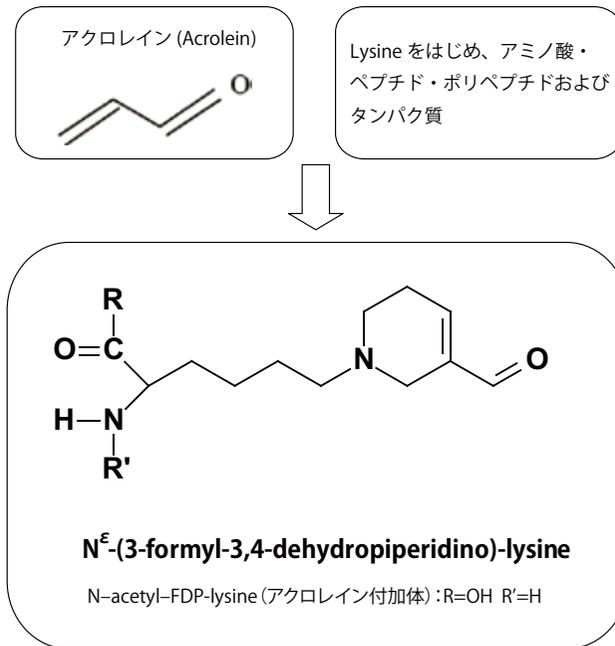
**Acrolein-Lysine Adduct
Competitive EIA Kit**

説明書

v201606

アクロレイン (CH₂=CHCHO ; Acrolein) は石油、石炭、木材およびプラスチックの燃焼により生成するばかりでなく、タバコの煙や排気ガス、油脂の加熱等で生成する化学物質で、細胞毒性が強い物質として知られています。近年、脂質の過酸化によってもアクロレインが生成することが明らかにされ、生体内での脂質過酸化二次生成物としての存在が確認されるとともに生体に対するアクロレインの影響が注目されるようになってきました。¹⁾⁻⁵⁾

本キットはアクロレインがタンパク質のリジン残基に付加して生じたホルミルデヒドロピペリジノ (FDP)- リジン (Lys) 構造に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、血中・尿中・組織中に含まれるアクロレインとタンパク質との付加体を簡便かつ迅速に測定するための競合法を利用した免疫学的測定キットです。サンプル中のアクロレイン付加体の存在量を FDP-Lys 量として定量測定します。



付加体形成のメカニズム (参考文献 2 より引用)

I. キットの内容

1. Antigen Coated Microtiterplate Acrolein-Lysine Adduct 固定化プレート (96 ウェル：8 ウェル× 12 strips)	1 plate
2. Sample Diluent サンプル希釈用緩衝液	50 ml
3. Standard (7 濃度) N-acetyl-FDP-lysine	350 μ l × 7
4. Anti Acrolein Monoclonal Antibody (凍結乾燥品) Acrolein 付加体を認識する一次抗体	10 ml 用
5. Antibody Diluent 一次抗体溶解液	11 ml
6. Wash Buffer (×20) Tween 20 含有緩衝液	50 ml
7. POD-Labeled Anti Mouse IgG Conjugate (×100) POD 標識抗マウス IgG 二次抗体 (100 倍濃縮溶液)	120 μ l
8. Conjugate Diluent 標識二次抗体希釈液	12 ml
9. Substrate Solution (TMBZ) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液	12 ml
10. Stop Solution without Sulfuric Acid 反応停止液 (硫酸不含)	12 ml
11. Plate Seal	2 枚

II. キット以外に必要な器具 (主なもの)

- ・ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- ・緩衝液調製用容器
- ・プレート洗浄装置 (手動の場合は、分注器およびアスピレーター等)
※簡易洗浄機として Personal Microplate Washer (製品コード MK950) がお勧めです。
- ・プレートミキサー
- ・室温 (20 ~ 30°C) 設定用恒温槽
- ・マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)

III. 保存

4°C

IV. 使用目的

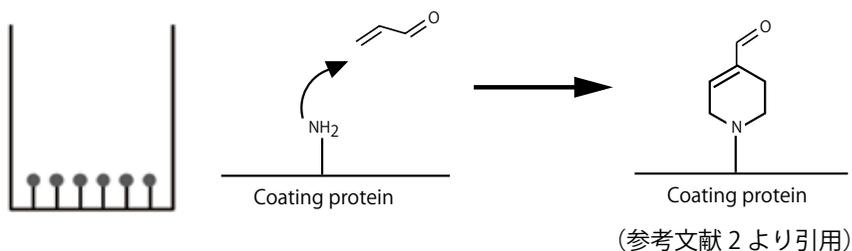
- ・自然界および環境下に存在するアクロレイン付加体の検出
- ・工業製品生産工程に副産するアクロレイン付加体の検出
- ・生体内に由来するアクロレイン付加体の検出

注：本キットは研究用です。診断目的には使用できません。

V. 測定原理

本キットは、固相化した抗原 (Acrolein-Lysine Adduct) とサンプル (未知の測定物質) を共存させた中に、検出用一次抗体を投入し、固相化プレート上に結合して残留する一次抗体を酵素標識二次抗体で検出することで、共存させたサンプル中の抗原量を測定する 1 抗体競合 ELISA システムです。サンプル中に抗原 (Acrolein 付加体) が大量に存在すると、サンプルの抗原に結合するために一次抗体が多く消費され、結果的に固相化プレートに結合できる一次抗体が少なくなり、得られる吸光度が減少します。

1. 抗原固定化プレートを室温に戻す。



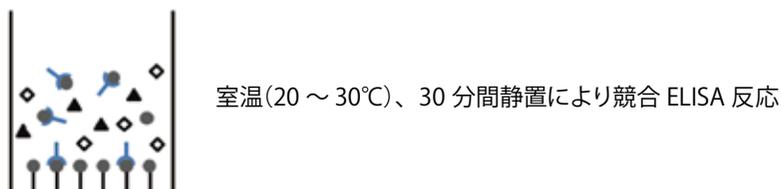
2. Standard (標準品) またはサンプルを適宜希釈して抗原固定化プレートに投入する。



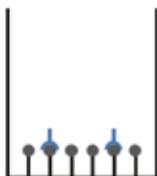
3. 還元した一次抗体液 (Acrolein 付加体を認識するモノクローナル抗体) を加える。



4. 一次抗体は、サンプル中の Acrolein 付加体およびプレートに固定化している Acrolein 付加体 (Acrolein-Lysine Adduct) と競合的に反応する。(サンプル中に含まれる Acrolein 付加体が多い場合は、固相に結合する一次抗体が減少する。)

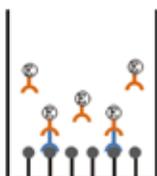


5. 洗浄により余分な反応物を除去する。



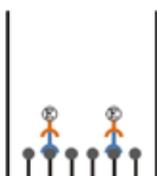
4回洗浄(200 ~ 300 μ l/well \times 4)

6. 固相に結合した一次抗体に対する POD 標識二次抗体を投入する。



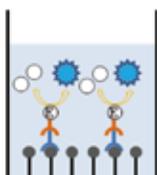
POD 標識二次抗体液を 100 μ l/well で投入
室温(20 ~ 30°C)、1 時間静置反応

7. 洗浄により余分な POD 標識二次抗体を除去する。



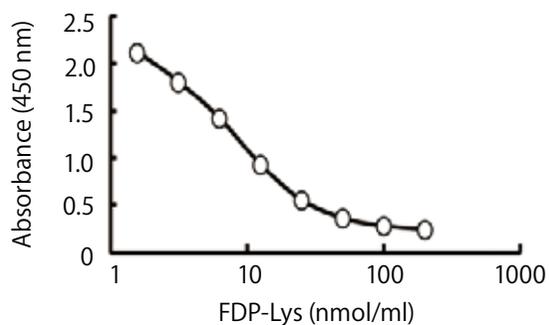
4回洗浄(200 ~ 300 μ l/well \times 4)

8. 基質液を投入し、酵素反応により呈色させる。(青色)



発色基質液(TMBZ) を 100 μ l/well で投入
室温(20 ~ 30°C)、5 ~ 15 分静置により基質発色反応

9. 反応停止液を 100 μ l/well 添加し (青色 \Rightarrow 黄色)、最終的に 450 nm 吸光度測定をする。



VI. 使用方法

1. 検体

- ・動物種を問わず、尿・血清・血漿・腹水・細胞上清・抽出液が測定対象となる。また、中間工程品等も測定対象とすることができる。
- ・検体は 2～10℃に保存し、12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- ・希釈が必要な場合は 2. Sample Diluent を用いて希釈する。
- ・生体試料（尿）を測定する場合は、2. Sample Diluent で 10 倍以上希釈して測定する。
- ・血液検体の場合、濃厚な状態で測定すると希釈直線性が不良となる場合がある。（検体の測定にはあらかじめ希釈倍率検討が必要）
- ・マウス血液サンプルの場合には、二次抗体に POD-labeled Anti Mouse IgG Conjugate を用いていることから、非特異的なバックグラウンドが生じる場合があるので注意を要する。尿サンプル同様に 2. Sample Diluent で 10 倍以上希釈し、対象群のサンプルを用意して相対的な評価を実施する必要がある。
- ・本測定系は、抗原抗体反応を利用しているため、反応系の pH には留意し、中性域で測定する。また、タンパク質変性剤は反応阻害を起こす可能性がある。
- ・サンプルに不溶物および濁りがある場合は、測定前に遠心分離（3,000 rpm、10 分）、あるいはフィルター濾過等により除去してから用いる。
- ・溶血血清は、測定値に影響をおよぼす場合がある。

2. 試薬調製

- ・抗原固定化プレート（1. Antigen Coated Microtiterplate）
使用前に室温に戻してから開封する。
11. Plate Seal は適宜反応時の乾燥防止として利用するとよい。
- ・一次抗体液
4. Anti Acrolein Monoclonal Antibody（凍結乾燥品）に、5. Antibody Diluent を 10 ml 加え、よく攪拌して使用する。
試薬調製後は、4℃で 2 週間安定。
1 プレートに必要な溶液は、5.5 ml 程度。
- ・POD 標識二次抗体液
7. POD-Labeled Anti Mouse IgG Conjugate（100 倍濃縮溶液）を 8. Conjugate Diluent で 100 倍希釈して使用する。
1 プレートに必要な溶液は 11 ml で、希釈した POD 標識二次抗体液は 24 時間以内に使用する。
- ・洗浄液
6. Wash Buffer（× 20）を蒸留水で 20 倍希釈して使用する。
0.05% Tween20 含有 PBS となる。
- ・N-acetyl-FDP-lysine 標準液（3. Standard）
7 段階の各濃度に調製済の標準液（200、100、50、25、12.5、6.25、3.13 nmol/ml）であり、そのまま使用する。
吸着等不測の事態を避けるため、容器の移し替えは行わないこと。
Blank を設定する場合は、2. Sample Diluent を利用する。
遮光下、4℃で専用のガラス容器のまま保存する。
- ・基質液（9. Substrate Solution（TMBZ））
反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。
数回に分けて使用する場合は、あらかじめ必要量を取り分けるようにする。

・反応停止液 (10. Stop Solution without Sulfuric Acid)

本品は硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液である。そのまま使用する。
濃度の高い溶液であるため、投入後はプレートミキサー等で十分に攪拌すること。

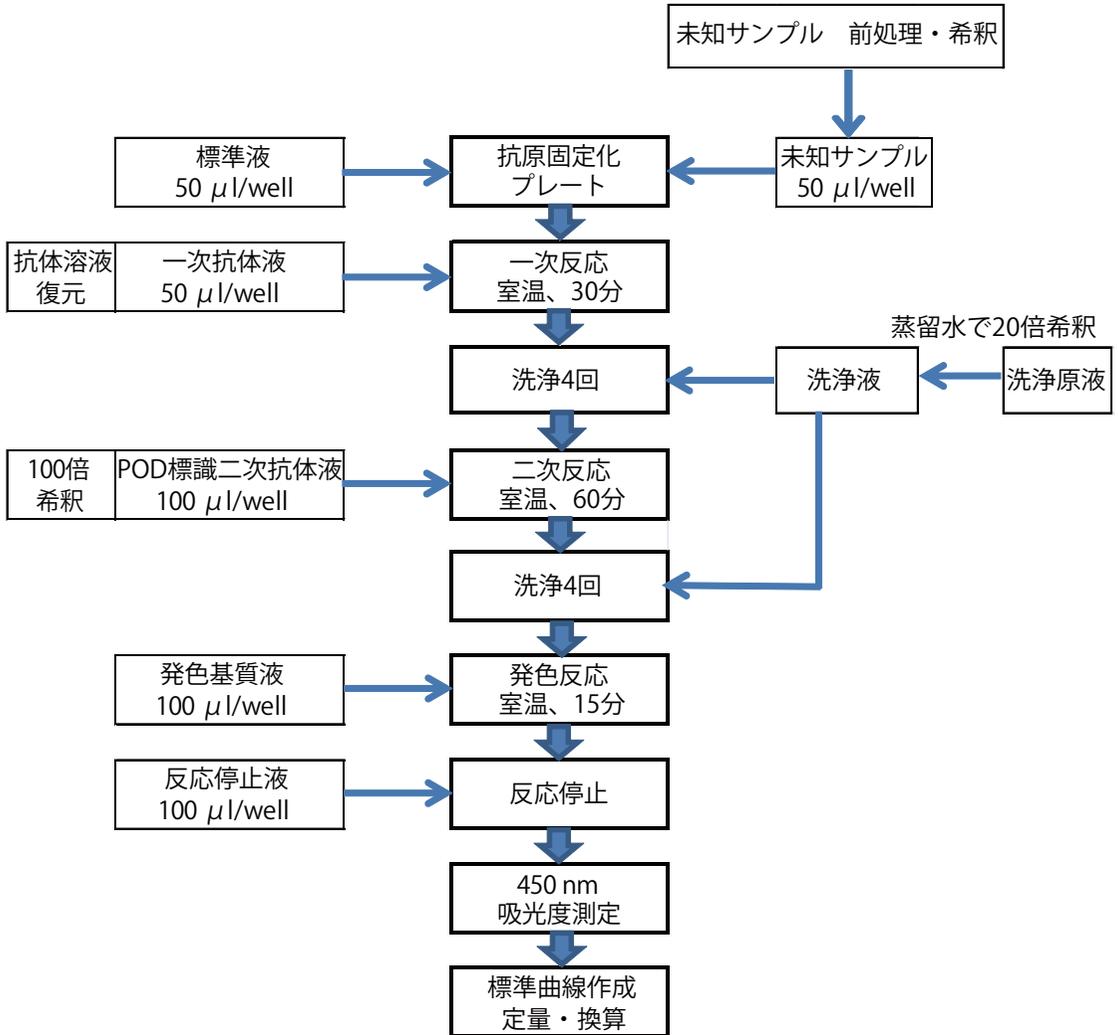
3. 操作法

測定は二重測定を推奨する。

キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

- (1) 各濃度の Standard および検体を 50 μ l ずつマイクロピペットで抗原プレートの各 well に 2 連ずつ加え、引き続きあらかじめ調製しておいた抗 Acrolein 一次抗体液を 50 μ l/well で各 well に投入する。プレート全体を軽く振とうし、well 内の液を均一にする。プレートシールを利用して、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置反応する。検体はあらかじめ別の 96 well プレート等を利用して希釈液等を用意し、8 連ピペット等で投入する。Standard は各濃度の専用ガラス容器から 50 μ l ずつ直接、マイクロピペットで抗原プレートに投入する。(Standard の別容器への入替えは吸着等の懸念があるので避けてください。) その後の一次抗体液の投入は、連続分注器や 8 連ピペット等を利用し 5 分以内に終了することが望ましい。37 $^{\circ}$ C での加温は抗原性をそこなう恐れがあるので、反応は室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で行う。(第一反応)
- (2) 反応液を捨て、洗浄液 (0.05% Tween20 含有 PBS) で 4 回洗浄後、あらかじめ調製しておいた POD 標識二次抗体液を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各 well に加え、プレートシールを利用して室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 60 分静置反応する。(第二反応)
- (3) 反応液を捨て、洗浄液 (0.05% Tween20 含有 PBS) で 4 回洗浄後、十分に液を切り、発色基質液 (Substrate Solution (TMBZ)) を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各 well に加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 15 分をめぐりに反応させる。(第三反応)
- (4) Stop Solution を 100 μ l ずつ、発色基質液 (Substrate Solution (TMBZ)) を入れた順番に各 well に加え、反応を停止させた後、プレートミキサー等でよく混和する。
- (5) 波長 450 nm で吸光度を測定する。
発色は反応停止後 6 時間以上安定である。
- (6) グラフ用紙の横軸に各 Standard の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度から対応する Acrolein 付加体濃度を算出する。

<測定フローチャート>



<添加回収>

種々の濃度の Acrolein 陽性サンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値から回収率を調べた。

サンプル A	サンプル B	理論値 (A+B)/2	実測値	添加回収率 (%)
11.471	11.471	11.471	7.874	68.6
11.471	7.868	9.670	7.860	81.3
11.471	5.028	8.250	7.515	91.1
11.471	1.637	6.554	7.254	110.7
7.868	5.028	6.448	5.911	91.7
7.868	1.637	4.753	4.570	96.2
12.500	6.250	9.375	8.444	90.1
6.250	3.130	4.690	5.141	109.6

単位 : nmol/ml

VIII. 測定例

1. 生体サンプルの希釈直線性

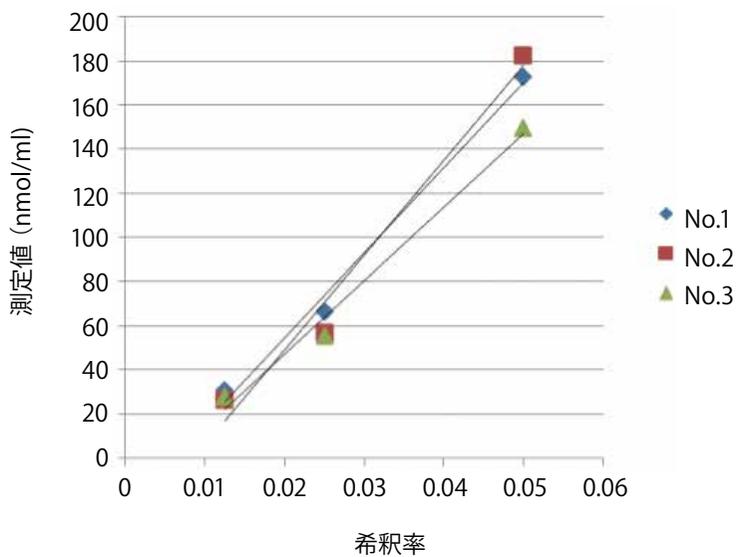
8～9週齢のマウス (BALB/c 系統・C57BL6 系統) 随時尿および糞の水抽出物の測定例である。糞のサンプルは、マイクロチューブ内で標準 1 粒に Sample Diluent 500 μ l を加え、小型簡易型ホモジナイザー TaKaRa BioMasher Standard (Srerile) (製品コード 9791A/B) でよく懸濁したあとの遠心上清を用いた。尿サンプルは、随時尿を用いた。試験的に個体間で相対評価する場合には、代謝ケージ等を利用した 1 日のプール尿が望ましい。なお、尿サンプルで希釈直線性が得られるのは、10～20 倍希釈以上からと予想される。

Acrolein Lysine Adduct 実測濃度

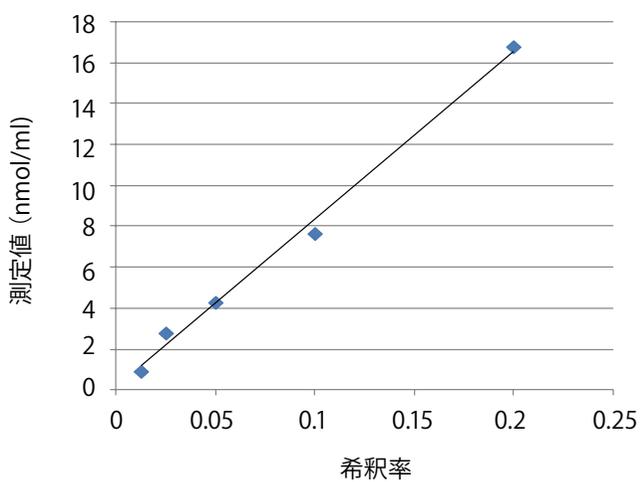
マウス系統	サンプル	希釈率				
		× 5	× 10	× 20	× 40	× 80
BALB/c No.1	尿	over	over	172.7	66.5	30.5
BALB/c No.2	尿	over	over	182.5	56.6	26.3
BALB/c No.3	尿	over	over	149.6	55.1	27.6
C57BL6 No.1	尿	over	over	over	84.3	35.8
C57BL6 No.2	尿	over	over	150.1	47.8	20.5
C57BL6 No.3	糞 水抽出	16.8	7.7	4.3	2.8	1.0

単位 : nmol/ml

< BALB/c No. 1 ~ 3 >



< C57BL6 No. 3 >



2. 尿中タンパク質との相対比較測定

正常マウス（雌）随時尿において Acrolein 測定と IgG フラグメント測定を実施した。

使用キット：本キットおよび Mouse IgG EIA Kit（製品コード MK137；終売）

サンプル：8～9 週齢のマウス（BALB/c 系統・C57BL6 系統）随時尿

Acrolein 測定は、40 倍希釈での測定換算値を採用。

Mouse IgG 測定は、20 倍希釈での測定換算値を採用。

マウス系統	サンプル	尿中 Acrolein (nmol/ml)		尿中 IgG (ng/ml)		Acrolein/IgG (nmol/ng)
		× 40	原液換算値	× 20	原液換算値	1 ml あたりのタンパク質比率
BALB/c No.1	尿	66.5	2,661.9	62.0	1,239.6	2.1
BALB/c No.2	尿	56.6	2,262.2	50.4	1,007.3	2.2
BALB/c No.3	尿	55.1	2,203.4	44.2	884.0	2.5
C57BL6 No.1	尿	84.3	3,372.8	122.5	2,450.3	1.4
C57BL6 No.2	尿	47.8	1,913.0	100.9	2,017.2	0.9

結果：随時尿測定の場合は、尿中の他のタンパク質との相対評価がひとつの測定手法として使える可能性がある。

今回は、IgG での補正を試みた。その他アルブミン等が補正候補として考えられる。

3. 組織抽出物をサンプルとした測定例

正常マウス各抽出組織を秤量後、小型簡易型ホモジナイザー TaKaRa BioMasher Standard (Sterile) を用いて、免疫沈降用 Lysis Buffer で可溶化を行い、サンプルを調製した。各サンプルは、10 倍希釈から 20、40、80 倍の希釈段階をとって測定を行ったが信頼性のある測定範囲に入ったのが 10 倍希釈の測定値であった。10 倍希釈での測定値を採用し、可溶化 Lysis Buffer 値を差し引いて算出した。

なお、サンプル B、C、D は同一個体からの同時抽出物である。

サンプル	組織	湿潤重量	抽出液量	実測値 (× 10) (nmol/ml)	原液換算値 (nmol/ml)	組織 1 mg あたりの Acrolein-Lysine Adduct 値 (nmol/mg)
A	ICR マウス 肝臓	420 mg	1 ml	10.6	71	0.169
B	BALB/c マウス脾臓	40 mg	1 ml	4.37	9	0.225
C	BALB/c マウス脳	250 mg	1 ml	7.75	43	0.172
D	BALB/c マウス腎臓	50 mg	1 ml	5.5	20	0.400
E	Lysis Buffer	—	1 ml	3.5	0	—

結果：腎組織に Acrolein 付加体の集積傾向が見られた。

尿とともに排出される過程を捉えている可能性が示唆された。

IX. 参考文献

- 1) 内田浩二, 脂質過酸化反応によるアクロレインの生成と蛋白質修飾, 日本油化学会誌, **47**, 1207-1215, 1998
- 2) Koji Uchida *et al.*, Acrolein is a product of lipid peroxidation : formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidative low density lipoproteins. *J Biol Chem.*, **273**, 16058-16066, 1998
- 3) Koji Uchida *et al.*, Protein-bound acrolein : Potential markers for oxidative stress., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **95**, 4882-4887, 1998
- 4) Noel Y. Calingasar *et al.*, Protein-bound acrolein : A novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease., *J Neurochem.*, **72**, 751-756, 1999
- 5) Kimihiko Sato *et al.*, A one-hour ELISA for quantitation of Acrolein and hydroxynonenal-Modified proteins by epitope-bound casein matrix method., *Anal Biochem.*, **270**, 323-328, 1999

X. 関連製品

TaKaRa BioMasher Standard (Sterile) (製品コード 9791)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
Personal Microplate Washer (製品コード MK950)

[尿中タンパク質を測定可能な ELISA Kit]
Fibronectin EIA Kit (製品コード MK115)
Laminin (LN) EIA Kit (製品コード MK107)
E-cadherin EIA Kit (製品コード MK117)
Human Albumin EIA Kit (製品コード MK132)
Human IgG EIA Kit (製品コード MK136)

XI. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットの試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に試薬を強い光に当てないでください。
3. Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution に用いるピペット等は金属が使われていないものを用いてください。
4. Substrate Solution (TMBZ) や Stop Solution は手や粘膜につかないようご注意ください。
5. 着色した Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
6. 各反応は時間、温度の影響を受けるので測定ごとに標準曲線を作成してください。
7. 血液検体の取扱いには充分注意してください。

XII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社

v201606