

研究用試薬

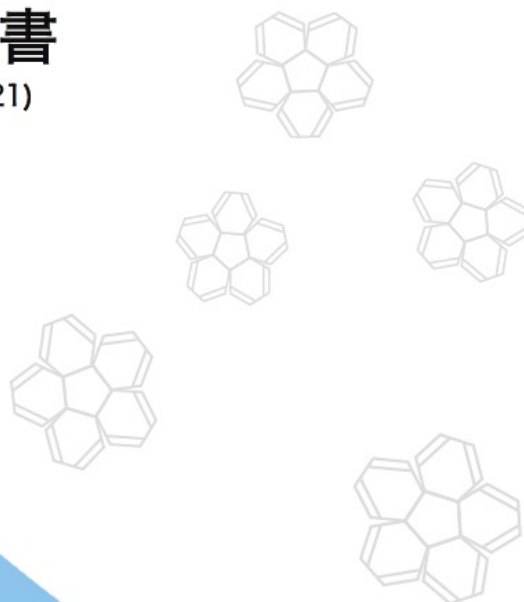


Antioxidant Capacity Assay Kit for Hydroxylradical (chemiluminescence)

Cat. No. SL-2040
(96 tests)

取扱説明書

Ver 1.0 (06/2021)



SAKULABSCIENCE

Made in Japan

1 使用目的・本キットの特徴



使用目的	・被験物質のヒドロキシラジカル消去能の評価・スクリーニング
本キットの特徴	・化学発光による測定のため検体の色や蛍光の影響を受けにくい
測定対象	・化合物、血清、血漿、細胞抽出物、動植物組織抽出物など
所要時間	・約30分間

本製品は試験・研究用試薬です。ヒト、動物への治療・臨床診断には使用しないで下さい。

2 背景と測定原理



活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) は狭義的に「一重項酸素」「スーパーオキシド」「過酸化水素」「ヒドロキシラジカル」の4種類からなる酸化力の強い酸素分子種で生体内において能動的および受動的に産生される(図1)。その特性から免疫系において細菌やウイルス等の外敵を破壊するために能動的に産生される。また、シグナル因子としても機能することが知られている。一方、紫外線暴露や酸素呼吸の場であるミトコンドリアでは副産物として活性酸素が発生する。しかし、能動的・受動的問わず過剰な活性酸素は生命体自身に損傷を与え癌や生活習慣病、老化の原因となることから抗酸化物質により速やかに消去されバランスを保つ必要がある。

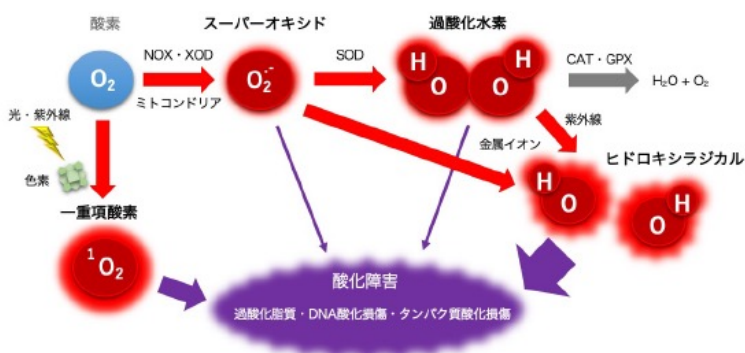








図1 生体における活性酸素発生過程

ヒドロキシラジカルは生体内で発生したスーパーオキシドや過酸化水素に紫外線や金属イオンが作用することで生成される。寿命は短いものの活性酸素のなかでも極めて反応性が高く酸化障害を引き起こし癌や認知症、血管疾患の原因のひとつであると考えられている。生体にはヒドロキシラジカルに対する抗酸化酵素を持っておらず、その消去には摂取した抗酸化物質に頼っている。

本キットは検体のヒドロキシラジカル消去能を検証することができる。過酸化水素からフェントン反応によりヒドロキシラジカルを発生させる。検体によりヒドロキシラジカルを消去し、残存したヒドロキシラジカルを化学発光プローブにより検出することで抗ヒドロキシラジカル能を検証することができる。

3 製品内容 (96 tests)



	Assay buffer	30 mL
	100 X H ₂ O ₂	200 μL
	Initiator	15 mL
	Detection	150 μL
	Detection buffer	7.5 mL
	2mM Gallic acid (Standard)	100 μL
	96 well microplate (White plate)	1 plate

4 キット以外に必要なもの

- ・マイクロプレートリーダー（発光測定）
- ・マルチチャンネルピペット（1-200 μ L）
- ・1.5mLチューブ

5 保管と有効期限

保管温度：	Assay buffer	4 $^{\circ}$ C保管
	100 X H ₂ O ₂	4 $^{\circ}$ C保管
	Initiator	4 $^{\circ}$ C保管
	Detection	4 $^{\circ}$ C保管
	Detection buffer	4 $^{\circ}$ C保管
	2mM Gallic acid	4 $^{\circ}$ C保管
	96 well microplate	室温保管
有効期限：	上記温度にて3ヶ月	

6 サンプルの調製

サンプルは測定前に調製することを推奨する。事前にスタンダードの範囲内の測定値となるように希釈検討を行うことを推奨する。

6-1. 化合物

- ・親水性化合物 サンプルを蒸留水、PBSもしくはキット付属Assay bufferを溶媒として調製する。希釈する場合はキット付属のAssay bufferを用いる。
- ・親油性化合物 サンプルをエタノールもしくはDMSOを溶媒として調製する。これをキット付属のAssay bufferで希釈して測定する。

サンプルとしての許容性状：pH	2-11
エタノール	10%以下
DMSO	50%以下

6-2. 血清・血漿

血清および血漿は一般的な手法で回収し、測定まで-80 $^{\circ}$ Cで保管する。回収した血清および血漿をそのまま測定に使用することもできるが、サンプルの希釈にはキット付属のAssay bufferを使用する。

6-3. 細胞・動植物組織抽出物

- ・細胞 細胞をPBSで1-2 X 10⁷ cells/mLで懸濁する。氷上でホモジェナイズもしくはソニケーションにより細胞を破碎する。破碎物を10,000 X g, 4 $^{\circ}$ C, 10分間遠心分離し、上清をサンプルとして使用する。-80 $^{\circ}$ Cで保管することができる。
- ・動植物組織 組織（100mg）を300 μ LのPBSで懸濁する。氷上でホモジェナイズにより組織を破碎する。破碎物を10,000 X g, 4 $^{\circ}$ C, 10分間遠心分離し、上清をサンプルとして使用する。使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで保管することができる。

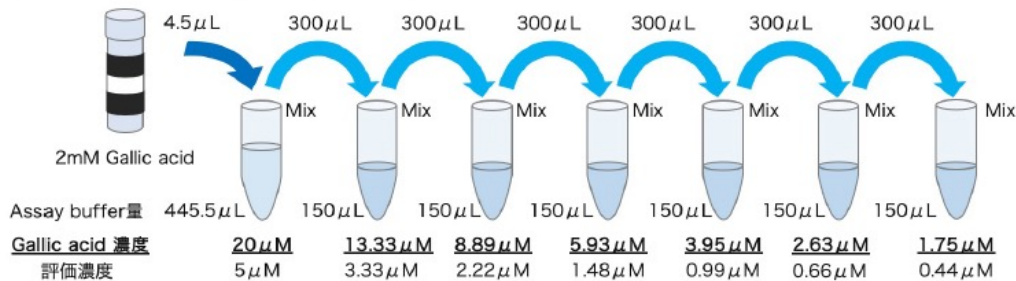
サンプルの希釈にはキット付属のAssay bufferを使用する。破碎程度による検体間誤差を補正するため抽出物のタンパク質濃度を測定し、タンパク質量で補正することを推奨する。

7 試薬の調製



7-1. Standard

キット付属のAssay bufferと2.5mM Gallic acidを用いて7段階濃度のスタンダード1.5倍希釈列 (1.75, 2.63, 3.95, 5.93, 8.89, 13.33, 20 μ M) を調整する (下図は二重測定の場合)。



7-2. Detection solution (Step1前に調製)

使用ウェル数に応じてDetection solutionを調製する。

Detection solution	1 ウェルあたりの使用量
■ Detection	1 μ L
■ Detection buffer	49 μ L

損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

7-3. ROS solution (Step2前に調製、調製後15分以内に使用)

使用ウェル数に応じてROS solutionを調製する。

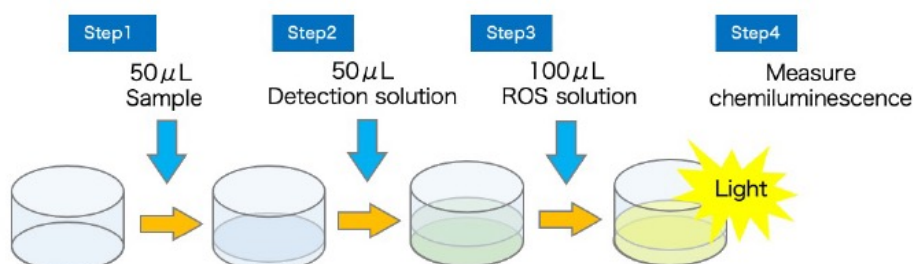
ROS solution	1 ウェルあたりの使用量
■ 100 X H ₂ O ₂	1 μ L
■ Initiator	99 μ L

損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

8 プロトコール



プロトコール概略



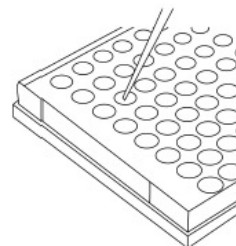
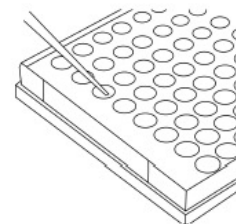
Step1. Sampleの添加

サンプルは事前にスタンダードの範囲内の測定値となるように希釈検討を行うことを推奨する。

付属のマイクロプレートの各ウェルに 50 μ LのControl(Sampleを溶解した溶媒)、Standard (調製は7-1に記載)、Sample (調製は6に記載)を添加する。

サンプルの評価濃度は添加した溶液濃度の 1/4 濃度となる。

この時点で ROS solutionを調製する。調製後15分以内にStep3を終えること。

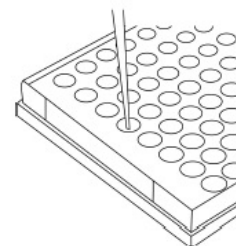


Step2. Detection solutionの添加

各ウェルに 50 μ Lの Detection solution (調製は7-2に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。

Step3. ROS solutionの添加

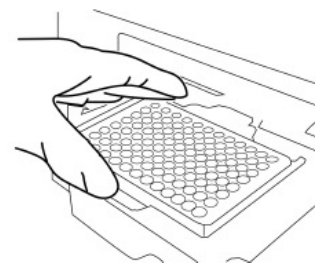
各ウェルに 100 μ Lの ROS solution (調製は7-3に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。



Step4. 相対発光値の測定

Detection solution添加後すぐにプレートリーダーにて相対発光値 (RLUs: Relative Light Units) を測定する※。

※ウェルあたりの測定時間：100ms以内
ウェル間の測定時間誤差をなくすために100ms間での測定を推奨



9 消去能の評価



抗酸化能の評価としてサンプルの過酸化水素消去率やIC50値 (50%阻害 (消去) 濃度) を算出する方法、抗酸化標準物質である没食子酸 (Gallic acid) を用いた没食子酸等価活性値 (Gallic acid equivalent antioxidant capacity: GAEAC) を算出する方法がある。

9-1. 消去率の算出

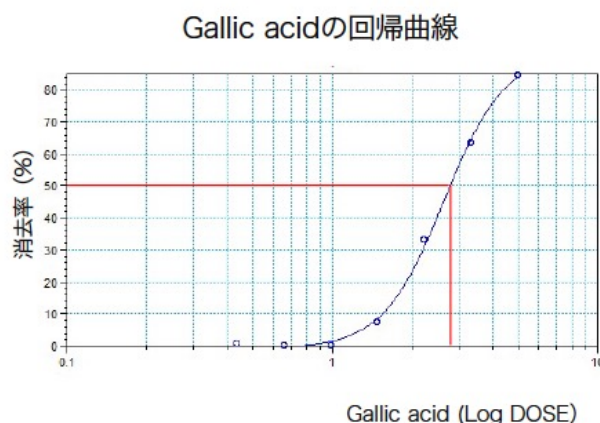
各RLUsから以下の式から消去率を算出する。

$$\text{消去率(\%)} = 100 - \frac{\text{RLUs(Standard or Sample)}}{\text{RLUs(Control)}} \times 100$$

9-2-1. IC50値の算出（方法1）4 parameter logistic curveによる算出

9-1.で算出した消去率からプレートリーダー付属の解析ソフト等を用いて4 parameter logistic curveを作成し、それをもとにIC50値を算出する。

解析ソフト等がない場合は以下の方法でIC50を算出することができる。



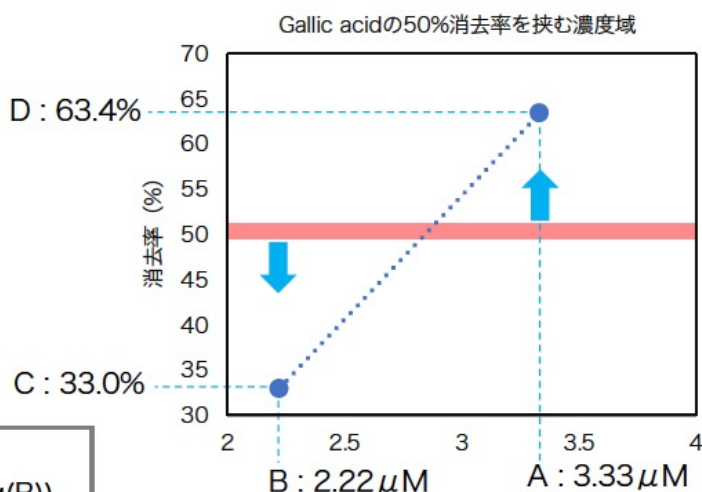
9-2-2. IC50値の算出（方法2）50%消去率を挟む濃度域からの算出

50%消去率を挟む2濃度の消去率からIC50値を算出する。2濃度間にはできるだけ直線性であることが望ましい。

- A: 50%を挟む高い濃度
- B: 50%を挟む低い濃度
- C: Bでの消去率
- D: Aでの消去率

算出式

$$IC50 = 10^{(\text{Log}(A/B) \times (50-C)/(D-C) + \text{Log}(B))}$$



9-2-3. IC50値の算出（方法3）回帰線からの算出

9-2-2.で求めた2点間の回帰線（数式）からIC50値を算出する。ただし2濃度間は直線性であることが必要である。ex) 9-2-2のGallic acidの場合、数式は $y = 27.42x - 27.96$ であった。

9-2-4. 算出法による比較

それぞれの方法で算出したGallic acidのIC50値

- 方法1 2.77 μM
- 方法2 2.78 μM
- 方法3 2.84 μM

可能であれば方法1で算出することが望ましい。50%消去率を挟む2点間が直線性であれば方法3、直線性でない場合は方法2で算出することができる。

9-3. 没食子酸等価活性値の算出

Gallic acidとサンプルのIC50値から没食子酸等価活性値 (GAEAC: Gallic acid equivalent antioxidant capacity)を算出することができる。

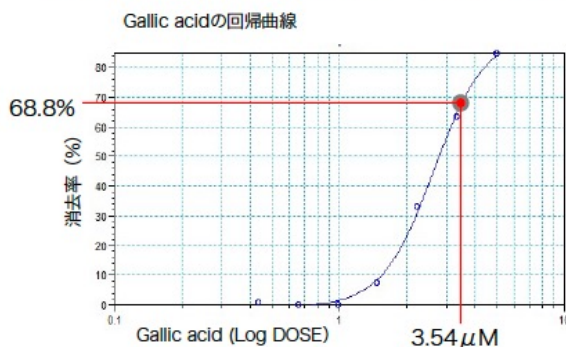
$$\text{GAEAC} = \frac{\text{IC50 (Gallic acid)}}{\text{IC50 (Sample)}}$$

ex) 緑茶抽出物の場合

緑茶抽出物のIC50: 30 mg protein/L
Gallic acidのIC50: 2.8 μM

$$\text{GAEAC} = \frac{2.8 \mu\text{mol/L}}{30\text{mg/L}} = 0.093 \mu\text{mol/mg protein}$$

サンプルのIC50値が算出できないときはGallic acidの標準曲線から算出することもできる。



ex) 緑茶抽出物の場合

緑茶抽出物の消去率 40/L = 68.8% (消去率)
標準曲線から消去率68.8%のときのGallic acid濃度は3.54 μM

$$\text{GAEAC} = \frac{3.54 \mu\text{mol/L}}{40\text{mg/L}} = 0.088 \mu\text{mol/mg protein}$$

10 基本データ

10-1. 本キットを用いた代表的抗酸化物質の IC50値

Antioxidants	IC50
Catalase	N.D.
SOD	N.D.
Trolox	5 μM
Glutathione	10 μM
N-Acetyl-L-Cysteine	150 μM
Ascorbic acid	5 μM
α-Lipoic acid	300 μM
Gallic acid	3 μM
Chlorogenic acid	1 μM

IC50値が低いほど抗酸化力が高いことを意味する。

10-2. 本キットを用いた動物・植物抽出物の没食子酸等価活性値

	GAEAC (μmol GAE / mg protein)
ミカン抽出液	0.75
ニンジン抽出液	0.01
緑茶抽出液	0.10
サケ抽出液	0.004
トマト抽出液	0.01

GAEAC値が高いほど抗酸化力が高いことを意味する。

製造元



株式会社サクラボサイエンス

〒233-0013 神奈川県横浜市港南区丸山台2-38-34 港南ビル202

TEL/FAX: 045-353-7244

E-mail: info@sakulab-sci.co.jp

HP: <https://sakulab-sci.co.jp/>

