Trans Genic Inc.

Code No.KK123

研究用試薬

尿中ジアセチルスペルミジン測定用 ELISA キット

ヒトの体内には 4 種類のポリアミンと、そのモノおよびジアセチル体があります（図 1）。

多価カチオンであるポリアミンは、核酸その他のアニオンとの相互作用を通じて蛋白質合成や核酸合成の過程に影響を与えることが知られておりますが、その生理的機能は多年にわたる研究にも関わらずまだ十分には解明されておりません。しかし活発に増殖する組織にはポリアミンが多量に含まれているだけではなく、そのような組織ではポリアミン代謝が活発であり、また、細胞内レベルも精密に制御されていることから、ポリアミンは細胞増殖およびその制御の過程で重要な役割を果たす物質の一つであると考えられております。

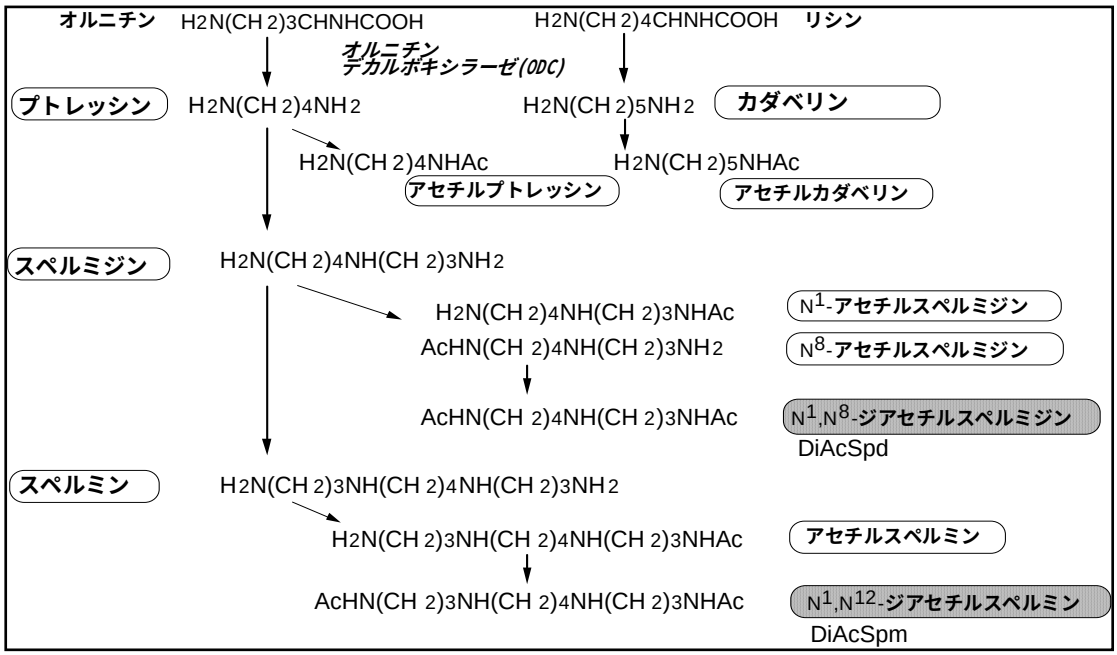
癌患者において尿中ポリアミン排泄量が増加することは 1971 年に Russel によって最初に報告され、それ以後多くの研究が行われてきました。すでに、尿中総ポリアミン量測定キットが開発され一般生化学検査として利用されております。

近年、わずかな量ではありますが N1,N12-ジアセチルスペルミン、N1,N8-ジアセチルスペルミジンという 2 種類のジアセチルポリアミンが尿中に排泄されていることが見出されました。健常者の尿中では、これらの成分はそれぞれ総ポリアミンの 0.4%、1.2%を占めるにすぎませんが、総ポリアミンと比較して病態の変化をより顕著に示す可能性が報告されています。

本キットは、尿中ジアセチルスペルミジン量を ELISA 法により簡便に測定できるキットです。

研究用試薬としてご利用ください。

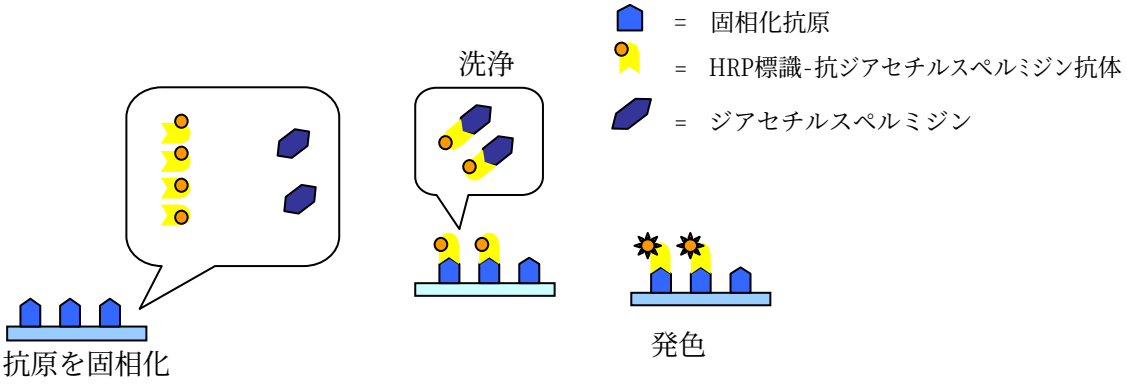
図 1 ポリアミンとそのモノおよびジアセチル体



〔測定原理〕

本キットは、ジアセチルスペルミジンに特異的な抗体を用いた競合 ELISA 法に基づいています。

マイクロプレートには抗原（ジアセチルスペルミジン）がコートされております。あらかじめ尿サンプル及び標準液中のジアセチルスペルミジンと HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン特異抗体を反応させておきますと、残った抗体がプレート上のジアセチルスペルミジンと結合します。さらに、HRP により触媒される発色反応により定量されます。



〔キット内容〕

①	抗原固相化マイクロプレート(96 well)	1 枚
②	ジアセチルスペルミジン標準品（STD）600nM	250μL× 2 本
③	標準品及び検体共通希釈液	15mL×1 本
④	抗体希釈液	20 mL × 1 本
⑤	HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体（×100）（マウスモノクローナル抗体）	60μL × 1 本
⑥	OPD（オルトフェニレンジアミン）錠	2 錠
⑦	基質液	30 mL × 1 本
⑧	反応停止液	15 mL × 1 本
⑨	濃縮洗浄液(×20)	30 mL × 1 本
⑩	希釈用プレート	1 枚

〔キット以外に必要な器具･器材〕

(1) マイクロプレートリーダー
(2) マイクロピペット
(3) プレートウォッシャー ただし無い場合は、説明書内の操作法に従ってマニュアルで洗浄して下さい。

〔使用方法〕

(1) 試薬の調製

① 洗浄液

濃縮洗浄液（×20）を室温に戻し、塩類が沈殿してないか確かめて下さい。

濃縮洗浄液（×20）30mL を精製水 570mL で希釈して用います。（希釈した洗浄液は冷蔵で 14 日間安定です。）

② 標準液（用事調製）

標準品は 600nM より標準品希釈液にて 2 倍段階希釈し、300、150、75、37.5、18.75、9.375nM の各濃度を調製します。

※標準品の調製にガラス容器は使用しないでください。ジアセチルスペルミジンがガラスに非特異吸着します。
調製にはポリプロピレン素材のものをご推奨いたします。

標準液濃度 (nM)	300	150	75	37.5	18.75	9.375
標準品 600nM (μL)	100	100	100	100	100	100
標準品希釈液 (μL)	100	100	100	100	100	100

③HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体（×100）※使用時調製して下さい。
HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体(×100)40μL を抗体希釈液 4mL で希釈すると 96 ウェル分の抗体溶液を調製することができます。
④発色液　※使用時調製して下さい。
室温に戻した基質液 13mL に OPD 1 錠を溶解します。

(2)尿サンプルの調製
採取した尿は1500rpm･5分遠心し、その上清を検体希釈液にて4倍（以上）に希釈して使用して下さい。尿サンプル採取後すぐに測定しない時は、アジ化ナトリウムを添加し冷蔵保管してください。
（上清の一部は尿中クレアチニン濃度測定用に別途保管してください。）

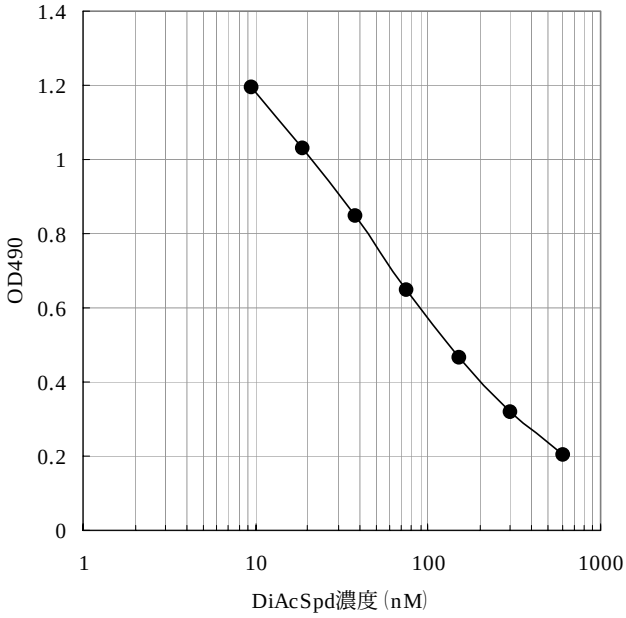
(3)測定操作法
① プレ反応
希釈用プレートに HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体溶液 70μl+各濃度の標準液（600、300、150、75.0、37.5、18.75、9.375nM）70μL および HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体溶液 70μL+希釈した各尿サンプル 70μL（抗体：サンプル＝1：1）を作製し、プレートを軽く叩いて混和後室温で 30 分間インキュベートします。
※標準液、尿サンプルともダブル測定分の液量調製となっております。シングル測定の場合は、抗体：サンプル＝40μL：40μL でご使用ください。
② 反応プレートの準備
②-1 抗原固相化マイクロプレートをアルミシートから使用するウェルだけ取りだし、洗浄液を 300μL/ウェル加え、室温で 20 分間静置します。
②-2 上記ウェル内の液を捨て、洗浄液を少なくとも 300μL 分注し、デカントで除去します（2 回）。
ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。
(プレートの乾燥はデータエラーの原因になります。)
③ 1 次反応
③-1 ウェルに①で作製したプレ反応液を 50μL/ウェル×2 ウェル（ダブル測定の場合）ずつ加え、プレートを軽く叩いて混和し、室温で 1 時間インキュベートします。
③-2 反応終了後、ウェル内の反応液を捨て、洗浄液を少なくとも 300μL 分注し、デカントで除去します。この操作をさらに 2 回繰り返した後、ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。(プレートの乾燥はデータエラーの原因になります。)
④ 発色
各ウェルに発色液を 100μL ずつシステマティックに加え、室温で 10 分間反応させます。
⑤ 反応停止
各ウェルに反応停止液を 100μL ずつ加え、酵素反応を停止させます。各ウェルの酵素反応時間が一定になるように、発色液と同様にシステマティックに添加して下さい。反応時間が変わると発色強度に誤差が生じます。
⑥ 吸光度測定
プレートリーダーで 490nm（あるいは 492nm）の吸光度を測定します。
⑧ 濃度換算
標準曲線より、ジアセチルスペルミジンの濃度を算出します（nM）。

*実測値が 600nM を超える検体については、18.75～600nM の範囲で測定できるように希釈倍数を上げて尿を再調製し、測定してください。
*実測値に希釈倍数を乗じてください。
*臨床データとしての比較には、尿中クレアチニン濃度による補正が必要です（nmol/g･Cre）。

臨床データ算出方法
尿中排泄物の濃度は尿量に依存しますが、腎疾患等や健常人においても水分摂取量や環境などにより尿量は大きく変動します。そのため一般に尿中排泄物の測定値には尿中クレアチニン排泄量による補正が行われます。
尿中クレアチニン排泄は、クレアチニンの産生が筋肉の量に依存することからほぼ一定であるため、1g のクレアチニンあたりの量に換算して利用するものです。本キットにて得られた尿中ジアセチルスペルミジン濃度（nM）を、酵素法などにより測定した尿中クレアチニン濃度（mg/dl）で補正してください。

$$\text{補正式：}\quad \text{nmol/g・cre} = \frac{\text{尿中ジアセチルスペルミジン濃度}}{\text{尿中クレアチニン濃度（mg/dl）}} \times 100$$

〔標準曲線〕



〔キット性能〕

標準曲線領域：9.375～600nM
最低検出実測域：18.75nM
最低尿希釈倍数：×2
検体最低検出感度：37.5nM
日内再現性（n=10、2 濃度）：CV(%)= 5.76、2.58
日間再現性（n=10、2 濃度）：CV(%)= 6.76、4.25
添加回収試験：×2、×4、×8 正常尿に既知濃度(200nM)のジアセチルスペルミジンを添加した場合：96%～108%以内
共存物質：ヘモグロビン 4500mg/dL・ビリルビン 180mg/dL・グルコース 1000mg/dL・アスコルビン酸 40mg/dL まで影響なし

〔使用上の注意〕

①試薬は－30℃で保管し、再凍結・融解は避けて下さい。（融解後は冷蔵にて保管し、4 週間以内に使用してください。）
②使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
③尿サンプルは 4 倍に希釈して測定して下さい。
④溶解した標準品及び抗体は、室温で長時間放置しないで下さい。
⑤発色液（基質液）を調製する器具は、よく洗浄したものを使用して下さい。
⑥OPD（オルトフェニレンジアミン）は有害物質ですので取り扱いに注意して下さい。
⑦反応停止液は1N 硫酸を使用していますので、取り扱いに注意して下さい。
⑧本キット内でも他のロットのものとの併用、混合による使用はしないで下さい。
⑨本品は研究用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれません。
⑩取り扱い中は皮膚、粘膜、着衣に触れたり、目に入らないように適当な措置を行なって下さい。
⑪試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行ない、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。
⑫取り扱い後には手洗いを十分に行なって下さい。
⑬容器の破損、異物混入など異常が認められたものは使用しないで下さい。
⑭使用後の容器および廃液は廃棄物に関する規定に従って処理して下さい。
⑮容器、付属品などの他目的への転用は保証できません。

〔使用期限〕キット外箱に表示

【参考文献】

1. 五十嵐一衛:
神秘の生命物質-ポリアミン.
未来の生物科学シリーズ 28,共立出版,1993

2. Russell DH:
Increased polyamine concentration in the urine of human cancer patients.
Nature New Biol 233:144-145,1971

3. 久保田俊一郎：ポリアミンとオルニチン脱炭酸酵素
日本臨床,53,増刊号,pp.501-505(1995)

4. Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, and Kawakita M:
Determination of amounts of polyamines excreted in urine;demomstration of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12- diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine.
J. Biochem., 117:107-112,1995

5. Sugimoto M, Hiramatsu K, Kamei S, Kinoshita K, Hoshino M, Iwasaki K, and Kawakita M:
Significance of urinary N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12- diacetylspermine as indicators of neoplastic diseases.
J. Cancer Res. Clin. Oncol.,121:317-319,1995

6. Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, and Kawakita M:
Diagnostic and prognostic usefulness of N1,N8- diacetylspermidine and N1,N12- diacetylspermine in urine as novel markers of malignancy.
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123:539-545,1997

7. トピックス「尿中ジアセチルポリアミンと悪性腫瘍」
平松恭子（東京都臨床医学総合研究所医化学研究部門）、高橋慶一（東京都立駒込病院外科）、杉本雅幸（東京都立大久保病院泌尿器科）、川喜田正夫（工学院大学応用化学科・教授）
臨床検査　第 46 巻　第 1 号　別冊（2002 年 1 月 15 日発行）

This product is generated from GANP® mice.

製造元
株式会社トランスジェニック
〒650-0047　兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14
TEL: 078-306-0295　FAX:078-306-0296
URL:http://www.transgenic.co.jp　techstaff@transgenic.co.jp