

## 尿中クレアチニン測定用 ELISA キット

クレアチニンは筋肉内で、クレアチン及びクレアチンリン酸から非酵素的に産生される最終代謝物で、血液を介して腎臓に運ばれた後、尿中に排泄されます。健常人では体内のクレアチン及びクレアチンリン酸全体の一定量（1-2%）が毎日排泄されます。従って、尿中クレアチニン排泄量から筋肉量を推定できます。尿中クレアチニン量は他の尿中物質の濃度や検査結果の補正に用いられるほか、尿中クレアチニン検査は、筋疾患や腎臓疾患、腎機能障害の検出にも利用されています。

本キットは尿中クレアチニン量を 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下さい。

### Metabolism of Creatinine

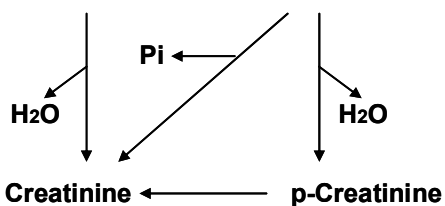
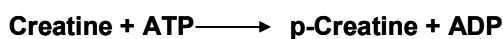
#### In the kidneys



#### In the liver



#### In muscle

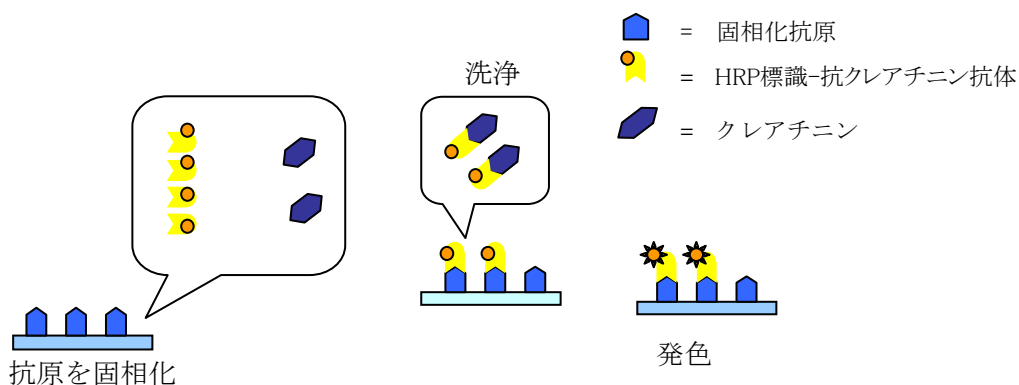


Urinary Excretion

〔測定原理〕

本キットは、クレアチニ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(クレアチニン)がコートされており、あらかじめ尿サンプル及び標準液中のクレアチニンと HRP 標識-抗クレアチニ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クレアチニンと結合します。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 クレアチニン標準品(STD) 20mg/dl                   | 250 $\mu$ L × 2 本 |
| ③ 抗体希釈液                                    | 20 mL × 1 本       |
| ④ HRP 標識-抗クレアチニン抗体(×100)<br>(マウスモノクローナル抗体) | 60 $\mu$ L × 1 本  |
| ⑤ OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠                     | 2 錠               |
| ⑥ 基質液                                      | 30 mL × 1 本       |
| ⑦ 反応停止液                                    | 15 mL × 1 本       |
| ⑧ 濃縮洗浄液(×20)                               | 30 mL × 1 本       |
| ⑨ 希釈用プレート                                  |                   |

〔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、塩類が沈殿してい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20mg/dlより超純水にて2倍段階希釈し10、5、2.5、1.25、0.625 mg/dlの各濃度を調製します。

標準液濃度 (mg/dl)	10	5	2.5	1.25	0.625 (mg/dl)
標準品 20mg/dl ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100
超純水 ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100

- ③HRP 標識-抗クレアチニン抗体 (×100) ※使用時調製して下さい。  
HRP 標識-抗クレアチニン抗体(×100)40 $\mu$ L 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、その上清を超純水にて20 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、-80°Cに保管して下さい。

## (3)測定操作法

### ① プレ反応

希釈用プレートに HRP 標識-抗クレアチニン抗体溶液 70 $\mu$ L+各濃度の標準液 (20,10,5,2.5,1.25,0.625 mg/dl) 70 $\mu$ L および HRP 標識-抗クレアチニン抗体溶液 70 $\mu$ L+希釈した各尿サンプル 70 $\mu$ L (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 分間静置します。

※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=40 $\mu$ L:40 $\mu$ L 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 300 $\mu$ L/ウェル加え、室温で 30 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 300 $\mu$ L 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 50 $\mu$ L/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 時間静置します。

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 300 $\mu$ L 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 100 $\mu$ L 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 100 $\mu$ L 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。

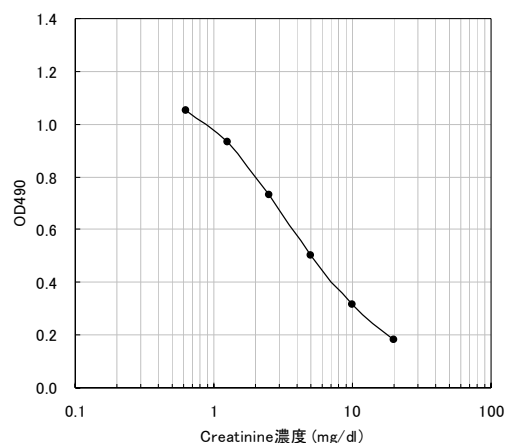
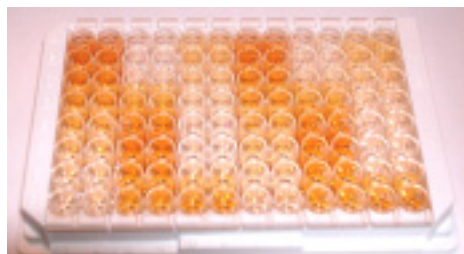
### ⑧ 濃度換算

標準曲線より、クレアチニンの濃度を算出します (mg/dl)。

\*実測値が 20mg/dl を超える検体については、0.625 - 20mg/dl 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、測定して下さい。

\*実測値に希釈倍数を乗じてください。

[標準曲線]



[キット性能]

標準曲線領域:0.625-20mg/dl

最低検出実測域:1.25mg/dl

最低尿希釈倍数:×20

検体最低検出感度:25mg/dl

日内再現性 (n=15、2 濃度):CV(%)= 8.40、6.50

日間再現性 (n=10、2 濃度):CV(%)= 8.04、7.41

添加回収試験:×20、×40 正常尿に既知濃度(10mg/dl)のクレアチニンを添加した場合:92%~109%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 500mg/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下さい。)
- 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20倍以上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.	Iyengar MR, Coleman DW, Butler TM. Phosphocreatinine, a high-energy phosphate in muscle, spontaneously forms phosphocreatine and creatinine under physiological conditions. J Biol Chem. 1985 Jun 25;260(12):7562-7.
2.	Furter R, Kaldis P, Furter-Graves EM, Schnyder T, Eppenberger HM, Wallimann T. Expression of active octameric chicken cardiac mitochondrial creatine kinase in Escherichia coli. Biochem J. 1992 Dec 15;288 ( Pt 3):771-5.
3.	Wang ZM, Gallagher D, Nelson ME, Matthews DE, Heymsfield SB. Total-body skeletal muscle mass: evaluation of 24-h urinary creatinine excretion by computerized axial tomography. Am J Clin Nutr. 1996 Jun;63(6):863-9.
4.	Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. Physiol Rev. 2000 Jul;80(3):1107-213. Review.
5.	Miller RC, Brindle E, Holman DJ, Shofer J, Klein NA, Soules MR, O'Connor KA. Comparison of specific gravity and creatinine for normalizing urinary reproductive hormone concentrations. Clin Chem. 2004 May;50(5):924-32. Epub 2004 Mar 11.

This product is generated from GANP® mice.



製造元



〒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