

SOD測定キットRANSOD

Radox Laboratories Ltd.,

取扱説明書
Ver60RA0411

使用目的

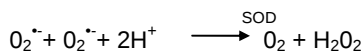
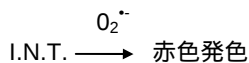
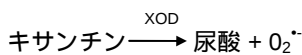
RANSODキットは、血液などの生体中に含まれるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)レベルを分析する研究用試薬です。

製品品番並びに包装内容（粉末の場合は調整後の容量）

SD 125	1. Mixed Substrate	5 x 20 ml
5 x 11 t	2. Buffer	1 x 105 ml
	3. Xanthine Oxidase	3 x 10 ml
	4. Standard	5 x 10 ml

測定原理

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の役割は、スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)を消去し、酸素毒性から生体を防衛する役割を担います。RANSODではスーパーオキシドアニオン $O_2^{\cdot-}$ の生成に、キサンチン—キサンチンオキシダーゼ(XOD)系を利用しています。スーパーオキシドラジカルはI.N.T. [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride]と反応し赤色の溶液を作ります。SOD活性は、この赤色染色反応を阻止する率によって求められます。1単位のSODはI.N.T.を還元し、50%の阻止率を示します。



検体サンプル

ヘパリン又はEDTAを添加した全血サンプルを使用してください。赤血球は0.9%塩化ナトリウム溶液で4回洗浄することをお勧めします。

0.5 ml の全血サンプルを10 分間3000 rpmで遠心分離してください。その後、血漿を吸引分離してください。そして、赤血球を3 ml の0.9% 塩化ナトリウムで4回洗浄してください。各洗浄時には遠心分離を10 分間3000 rpmで行ってください。

洗浄並びに遠心分離された赤血球に、蒸留水を添加し2.0 mlの溶液にします。攪拌後、+4℃で15分間静置します。この溶解産物は、0.01 mol/l リン酸緩衝液 pH 7.0で希釈することにより30%～60%の阻止率を得ることが出来ます。この溶解産物の希釈倍率は、人血液の場合25倍希釈（最終希釈倍率＝100）そして、ウシ血液の場合50倍希釈（最終希釈倍率＝200）をお勧めします。

試薬組成

内 容	濃 度
1. Mixed Substrate	
Xanthine	0.05 mmol/l
I.N.T.	0.025 mmol/l
2. Buffer	
CAPS	40 mmol/l, pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/l
3. Xanthine Oxidase	80 U/l
4. Standard	ロット記載

安全にご使用頂く為の注意

RANSODキットは研究用試薬です。経口吸引ピペットは使用しないで下さい。研究試薬取扱い上の安全基準に従ってください。試薬の廃棄は、ガイドラインに従ってください。このキットは適切な実験室で、実験操作の訓練を受けた方のみがご使用下さい。

試薬調整並びに安定性

1. Mixed Substrate

Mixed Substrateバイアルに20 mlのBufferを添加します。その混合液を使用します。この混合液は+2～+8℃で保存された場合10日間安定です。

2. Buffer

そのまま使用します。試薬は+2～+8℃で保管された場合、有効期限まで使用することが出来ます。

3. Xanthine Oxidase

Xanthine Oxidaseバイアルに10 mlの蒸留水を添加します。この混合液を使用します。この混合液は+2～+8℃で保管された場合2週間安定です。

4. Standards

Standardバイアルに10 mlの蒸留水を添加します。

引き続き希釈を行う場合は0.01 mol/l Phosphate Buffer, pH 7.0(Ransod Diluentとして入手可能)で行ってください。スタンダードカーブを作成する為には、下記のStandard 4 (又は S6)溶液を使用することをお勧めします。

希釈スタンダード	スタンダード溶液	サンプル希釈液 (0.01 mol/l PBS, pH 7.0)
S6	Standardバイアル+10ml蒸留水	-
S5	5 ml の S6	5 ml
S4	5 ml の S5	5 ml
S3	5 ml の S4	5 ml
S2	3 ml の S3	6 ml

S1 = サンプル希釈液

上記すべての希釈濃度のスタンダードは、+2～+8℃で2週間安定です。

本キットで供給されている物

Mixed Substrate
Buffer
Xanthine Oxidase
Standard

本キットで供給されていない物

Ransod Diluent (0.01 mol/l Phosphate Buffer, pH 7.0)
Ransod Control (品質確認用)

測定手順

波長:	505 nm
吸収セル:	光路長1 cm
測定温度:	37°C
ブランク:	大気

ピペットワーク:

	サンプル希釈液(=S1) (0.01 mol/l PBS, pH 7.0)	スタンダード (S2 - S6)	希釈 サンプル
希釈サンプル	---	---	0.05 ml
スタンダード	---	0.05 ml	---
サンプル希釈液	0.05 ml	---	---
Mixed substrate	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml

その後よく攪拌。

Xanthine Oxidase	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
------------------	---------	---------	---------

Xanthine Oxidase を添加しよく攪拌します。30秒経過後、初期吸光度absorbance A_1 を測定します。その3分後に最終吸光度absorbance A_2 を測定します。

算出方法

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = A/\text{min (スタンダード/サンプル)}$$

サンプル希釈液の反応速度 (S1反応速度) = 非阻止反応の速度 = 100 %

パーセンテージ阻止率を得る為には、スタンダードの反応速度とサンプルの反応速度をサンプル希釈液の反応速度に対する%比で表わし100%から差し引く必要があります。

$$100 - \frac{(A_{\text{std/min}} \times 100)}{(A_{\text{S1/min}})} = \% \text{ inhibition}$$

$$100 - \frac{(A_{\text{sample/min}} \times 100)}{(A_{\text{S1/min}})} = \% \text{ inhibition}$$

各濃度のスタンダードにおける阻止率(%)を Log_{10} (スタンダード濃度SOD units/ml)に対してプロットします。

サンプルのSOD units/ml濃度をスタンダードカーブから得る為には、サンプルの阻止率(%)を使用します。

全血サンプルのSOD units/ml濃度 =

スタンダードカーブから得られるSOD units/ml x 希釈倍率

SOD units/g Haemoglobinへの換算

$$\frac{\text{SOD units /ml}}{\text{g Haemoglobin/ml}} = \text{SOD units/g Haemoglobin}$$

算出例

(a) ウシ血液サンプルをRansod Diluent (0.01 mol/l Phosphate Buffer, pH 7.0)で300倍希釈します。希釈されたサンプルが33 %の阻止率を与えました。
スタンダードカーブより:

サンプル中のSOD units = 0.575

(b) 全血中のSOD units/mlへの換算

$$0.575 \times 300 = 172.5 \text{ SOD units/ml}$$

(c) SOD units/g Haemoglobinへの換算

サンプルhaemoglobin 値 = 0.118 g/ml

$$(\text{SOD units/ml})/(\text{g Haemoglobin/ml}) = \frac{172.5}{0.118} = 1461.9$$

品質管理

Ransod キットを御使用になる場合には、Ransod コントロールを使用し、1日1回の品質確認をお勧めします。このコントロールを使用して得られた測定値が、一定範囲の値になっていることを確認します。もし、品質確認検査で連続して範囲外の値が得られた場合は下記の事項を御確認願います。

1. 測定機の設定と光源をチェックしてください。
2. 測定機並びに御使用のガラス器具に汚れがないか確認してください。
3. 使用した溶液のコンタミネーションがないか確認して下さい。(例 微生物汚染など)
4. 反応温度を確認して下さい。
5. キットの有効期限と試薬の調整方法を確認して下さい。

参考値

1102 - 1601 U/g Hb
164 - 240 U/ml

各ラボラトリーは年齢、性別、体重、母集団の地理的位置などを反映した独自の参考値を確立してください。

直線性

サンプルは阻止率が30 % ~ 60 % の値が得られるように希釈する必要があります。

参考文献

1. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH Research in Veterinary Science 1983, **34**: 253-256.
2. Suttle NF The Veterinary Record 1986, **119**: 519-522.
3. Suttle NF, McMurray CH Research in Veterinary Science 1983; **35**: 47-52
4. Arthur JR, Boyne R Life Sciences 1985 **36**: 1569-1575.

製造元

英国Randox Laboratories Ltd.,

輸入発売元(問い合わせ先)

三洋貿易株式会社 科学機器事業部
〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 4-2-5
トライエッジ御茶ノ水ビル
TEL03-5296-9577 FAX03-3252-2882
www.sanyo-si.com