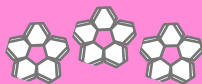


製造元



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301

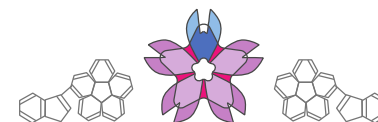
TEL/FAX: 045-353-7244

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

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



研究用試薬



Antioxidant Capacity Assay Kit for Superoxide 2 (chemiluminescence)

Cat. No. SL-2022
(96 tests)

取扱説明書

Ver 1.1 (01/2026)



SAKULABSCIENCE

Made in Japan

1 使用目的・本キットの特徴

- 使用目的** ・被験物質のスーパーオキシドラジカル消去能の評価・スクリーニング
- 本キットの特徴** ・酵素反応に依存しないスーパーオキシドラジカル発生系のため明確な抗酸化作用を検証することができる
 ・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

本キットは検体のスーパーオキシド消去能を検証することができる。従来品も含め多くのスーパーオキシド検証ではキサンチンオキシダーゼ (XOD) により発生したスーパーオキシドの消去作用を検証していたが、被験物質によるキサンチンオキシダーゼ阻害時も間接的にスーパーオキシド消去作用として検出することが問題であった (図1)。

そこで本製品ではスーパーオキシド発生剤として知られるメナジオンにより発生したスーパーオキシドを検証することでスーパーオキシド消去能だけを検証することができるのが特徴である。

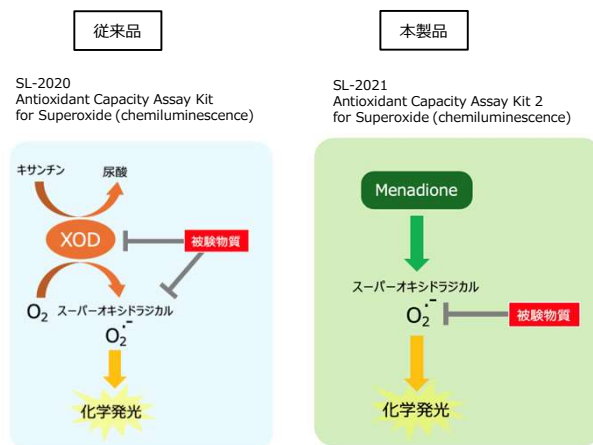


図1 従来品と本製品の測定原理比較

3 製品内容 (96 tests)

- Assay buffer 30 mL
- ROS Reagent A 1.5 mL
- ROS Reagent B 150 μ L
- Detection 150 μ L
- 5mM Gallic acid (Standard) 150 μ L
- 96 well microplate (White plate) 1 plate

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

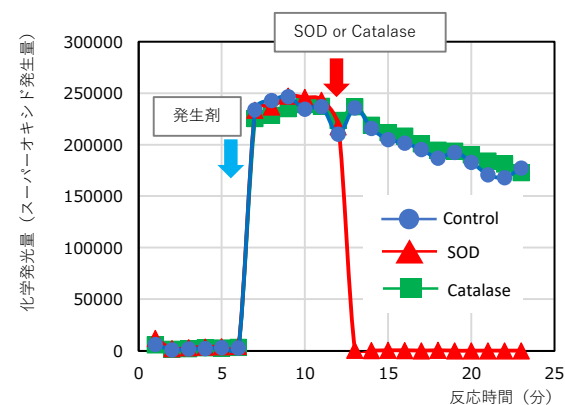
本製品とキサンチンオキシダーゼ (XOD) をスーパーオキシド発生剤として用いた従来品 (SL-2020) との代表的抗酸化物質およびキサンチンオキシダーゼ阻害剤の IC50値

		従来品	本製品
抗酸化剤	N-acetyl-L-Cysteine	Not Detected	1.3mM
	α -lipotic acid	Not Detected	2.3mM
	Glutathione	Not Detected	3.6mM
	Chlorogenic acid	50 μ M	0.9 μ M
	Trolox	150 μ M	4.5 μ M
	Gallic acid	20 μ M	0.3 μ M
XOD阻害剤	Ascorbic acid	100 μ M	6 μ M
	Allopurinol	400nM	Not Detected
	Oxipurinol	700nM	\cong 3mM
	Febuxostat	7nM	\cong 50 μ M

本製品は従来品より検出感度が高く、XOD阻害剤の影響を受けにくい

10-2. 本製品におけるスーパーオキシドラジカルの発生と特異性

スーパーオキシドラジカル添加により発光値が増加し、スーパーオキシド消去酵素 (SOD) の添加により発光が減少する。一方、過酸化水素消去酵素であるカタラーゼの添加ではその発光は影響を受けない

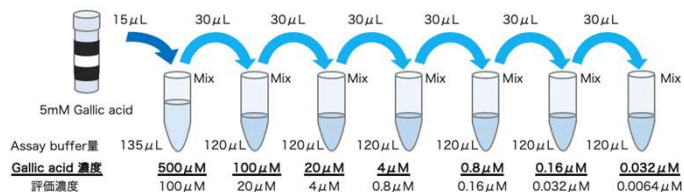


7 試薬の調製

各試薬は使用前に室温に戻し溶解してから使用する

7-1. Standard

キット付属のAssay bufferと5mM Gallic acidを用いて7段階濃度のスタンダード5倍希釈列 (0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 μ M) を調製する。



7-2. Detection solution (Step2 の直前に調製)

使用ウェル数に応じてDetection solutionを調製する。

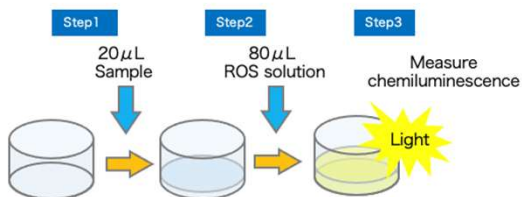
Detection solution

	1 ウェルあたりの使用量
■ Assay buffer	70 μ L
■ Detection	1 μ L
■ ROS Reagent A	8 μ L
ここまでを調製後に軽く攪拌した後に以下の溶液を添加	
■ ROS Reagent B	1 μ L
合計	80 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

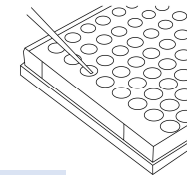


Step1. Sampleの添加

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 20 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。

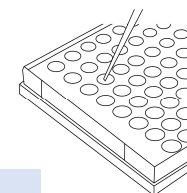
サンプルの評価濃度は添加した溶液濃度の1/5濃度となる。



Step2. Detection solutionの添加

各ウェルに 80 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。

Step2 の直前にDetection solutionを調製し、調製後5分以内に使用すること



Step3. 相対発光値の測定

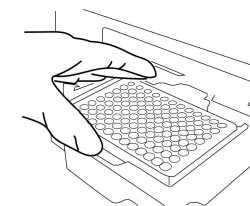
プレートリーダーにて相対発光値 (RLUs: Relative Light Units) を測定する

測定方法

カイネティック測定機能がある場合 (推奨方法)
 ウェルあたりの測定時間: 100 ms - 500ms
 測定間隔: 2分間
 合計測定時間: 10分間 (6回測定)

カイネティック測定機能がない場合
 ウェルあたりの測定時間: 1000 ms
 Step2で攪拌後に測定

ご使用する機器のよって検出感度が異なりますので事前にゲイン調整等の検出感度の検討を行ってください。



測定値の算出

カイネティック測定機能がある場合
 カイネティック測定した測定値 (6回分) の合計値 (Total RLUs)

カイネティック測定機能がない場合
 1回の測定値 (RLUs)

9 消去能の評価



抗酸化能の評価としてサンプルのスーパーオキシド消去率や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。

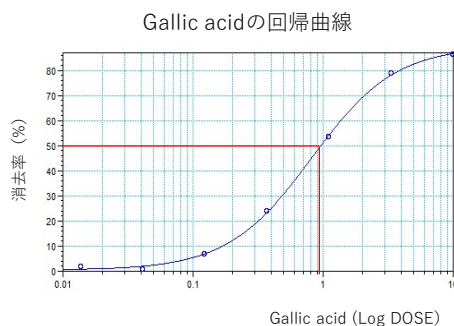
9-1. 消去率の算出

Total RLUsから以下の式から消去率を算出する。

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

9-2. IC50値の算出 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。



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) SampleのIC50: 15 μ M
Gallic acidのIC50: 0.3 μ M

$$\text{GAEAC} = \frac{0.3 \mu\text{M}}{15 \mu\text{M}} = 0.02$$

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 °C保管
	ROS reagent A	4 °C保管
	ROS reagent B	4 °C保管
	Detection	4 °C保管
	5mM Gallic acid	4 °C保管
	96 well microplate	室温保管

有効期限： 上記温度にて、製造日から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

サンプル調製および希釈はキット付属Assay bufferを用いる。

サンプル中の溶媒等の許容濃度を右に示す。Assay buffer以外の溶媒を使用した場合はコントロールとして用いた溶媒を使用する。

溶媒等	サンプル中の最高濃度
Ethanol	10%
DMSO	10%
SDS	2%
Tween20	0.1%
NP40	0.5%
Triton	0.5%
EDTA	1mM
pH	3-11

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°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°C, 10分間遠心分離し、上清をサンプルとして使用する。-80°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°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°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。