

研究用試薬

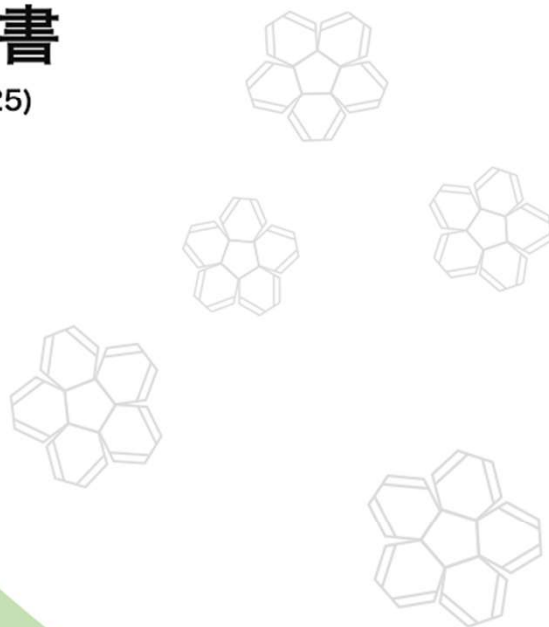


# Neutrophil NADPH Oxidase Inhibitor Screening Kit

Cat. No. SL-3010  
(96 tests)

## 取扱説明書

Ver 1.0 (09/2025)



SAKULABSCIENCE

Made in Japan

# 1 使用目的・本キットの特徴



使用目的 ・ NADPH oxidase (NOX)の阻害被験物質の評価・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

所要時間 ・ 約30分間

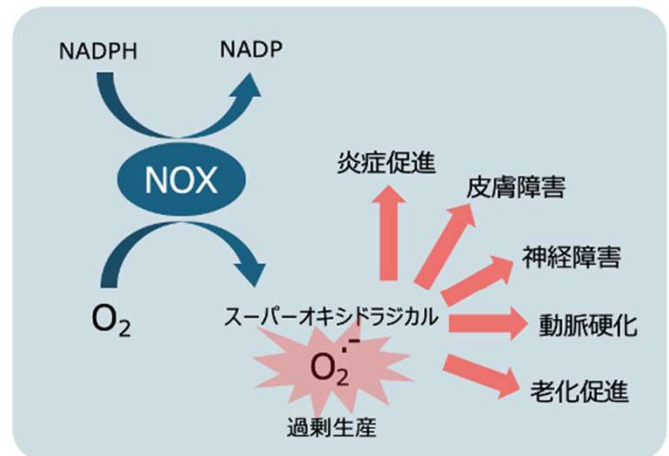
本製品は試験・研究用試薬です。ヒト、動物への治療・臨床診断には使用しないで下さい。

# 2 背景と測定原理



NADPHオキシダーゼ (NADPH oxidase: NOX) は活性酸素の発生を触媒する酵素で、食細胞では感染源に対し活性酸素による殺菌作用をもたらすが、過剰な活性酸素生産は炎症促進、動脈硬化症、神経障害、老化促進の原因となる(図1)。本キットは抗炎症、抗動脈硬化、抗神経障害における効果検証やスクリーニングを目的とする。

本製品では好中球由来のNOXでの阻害活性を検証する。NOXは複数のファミリーが存在し、好中球では主にNOX2が機能する。NOXにより発生したスーパーオキシドラジカルを化学発光で検出することで被験物質のNOX阻害作用を検証することができる。



# 3 製品内容 (96 tests)



	Assay buffer	30 mL
	Enzyme	50 $\mu$ L x 4
	Inducer	100 $\mu$ L
	Detection	100 $\mu$ L
	Inhibitor control (100 $\mu$ M DPI)	300 $\mu$ L
	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（1-1000 $\mu$ L）
- ・ 1.5mL- 10mL チューブ（試薬調製用）

## 5 保管と有効期限



**輸送温度**                    ドライアイス中で輸送して下さい。

**使用前（開封前）**        -80℃で保管し、製造日（外袋ラベルに記載）から3ヶ月以内に使用して下さい。

**使用后（融解後）**        融解後は以下の温度で保存し、製造日から3ヶ月以内に使用して下さい。

**キット付属の Enzyme は-80℃保管です。開封後においても-80℃で保管して下さい。**

	Assay buffer	4℃ 保管
	Enzyme	-80℃保管
	Inducer	-20℃保管※
	Detection	-20℃保管※
	Inhibitor control (100 $\mu$ M DPI)	-20℃保管※
	96 well microplate	室温保管

※ Inducer, Detection, Inhibitor controlは-80℃でも保管可能です

## 6 試薬の調製



### 6-1. 試薬の準備

#### Assay buffer

キット付属のAssay bufferを室温にて融解する。融解後は希釈せずにそのまま使用する。使用后（融解後）は4℃にて保管。

#### Detection

#### Inducer

#### Inhibitor control

キット付属の Detection、Inducer、Inhibitor control を室温にて融解する。融解後はよく攪拌し使用する。使用後は-20℃にて保管。

#### Enzyme




キット付属の Enzymeは使用直前まで -80℃で保管使い切りとなりますので再使用はできません。

## 6-2. Detection solution (直前調製)

Enzyme は使い切りとなります。Enzyme 1本あたり約24ウェル分の最低調製単位となります。使用する分量に応じてDetection solutionを調製してください(下表参照)。

1. **Detection mix の調製**：使用ウェル数に応じてAssay bufferにDetectionを添加し、攪拌する。
2. **Detection solutionの調製**：Enzymeを-80℃超低温庫より取り出し、すぐに1.で調製したDetection mixを全量添加する※。ピペティングで氷状のEnzymeを溶かし、軽く攪拌した後に氷上で保管する。Detection solutionは調製後1時間以内に使用する。



※凍結状態のEnzymeに Detection solutionを添加することが望ましいが、融解後1分程度であれば問題ない。

		使用ウェル数			
		1~24ウェル	1~48ウェル	1~72ウェル	1~96ウェル
Detection mix	 Assay buffer	1,188 $\mu$ L	2,376 $\mu$ L	3,564 $\mu$ L	4,752 $\mu$ L
	 Detection	12 $\mu$ L	24 $\mu$ L	36 $\mu$ L	48 $\mu$ L
	合計	1,200 $\mu$ L	2,400 $\mu$ L	3,600 $\mu$ L	4,800 $\mu$ L
Detection solution	Detection mix	1,200 $\mu$ L	2,400 $\mu$ L	3,600 $\mu$ L	4,800 $\mu$ L
	 Enzyme	50 $\mu$ L (1本)	100 $\mu$ L (2本)	150 $\mu$ L (3本)	200 $\mu$ L (4本)
	合計	1,250 $\mu$ L	2,500 $\mu$ L	3,750 $\mu$ L	5,000 $\mu$ L

損失分を考慮し実際は使用量より多く調製しています。

## 6-3. Inducer solution (直前調製)

使用直前に使用ウェル数に応じて Inducer solutionを調製する。調製後のInducer solutionは室温で保管し、10分以内に使用する。

		1ウェル分の調製量	例：24ウェル分の調製量
Inducer solution	 Assay buffer	39.6 $\mu$ L	1,188 $\mu$ L
	 Inducer	0.4 $\mu$ L	12 $\mu$ L
	合計	40 $\mu$ L	1,200 $\mu$ 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

## 6-4. Sample & Inhibitor control

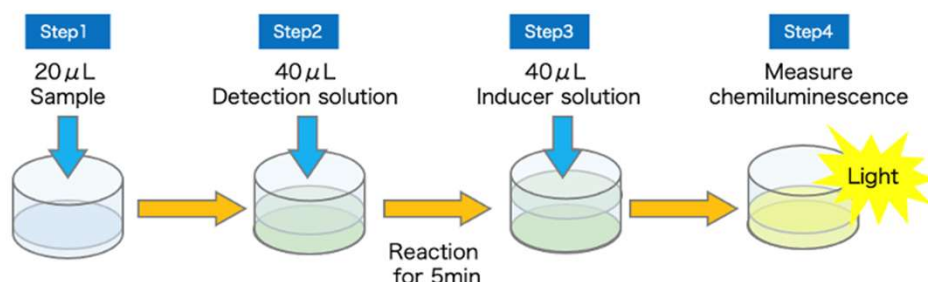
Sampleを希釈する場合は各Assay bufferにて希釈する。事前に希釈濃度検討を行うことを推奨する。サンプル中の溶媒等の許容濃度を右に示す。

Inhibitor control は希釈せずにそのまま使用する。測定時の終濃度は20  $\mu$ M DPI (Diphenyleneiodonium chloride) となる。

溶媒等	サンプル中の最高濃度
EtOH	10%
DMSO	50%
Tween 20	1%
Triton X100	0.05%
EDTA	0.05M
pH	2-11
NP40	使用できません
SDS	使用できません

# 7 プロトコール

## プロトコール概略



### Step1. Sampleの添加

付属のマイクロプレートの各ウェルに 20  $\mu$ LのAssay buffer (Control)、Inhibitor control、Sample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 40  $\mu$ Lの Detection solution (調製は6-2に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。

室温で5分間反応

### Step3. Inducer solutionの添加

各ウェルに 40  $\mu$ LのInducer solution (調製は6-3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

#### 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)

測定値の算出: カイネティック測定した測定値 (6回分) の合計値 (Total RLU)

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で攪拌後に測定した測定値 (RLUs)

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。

## 8 阻害率の算出



Total RLUsもしくはRLUs から以下の式から消去率を算出する。

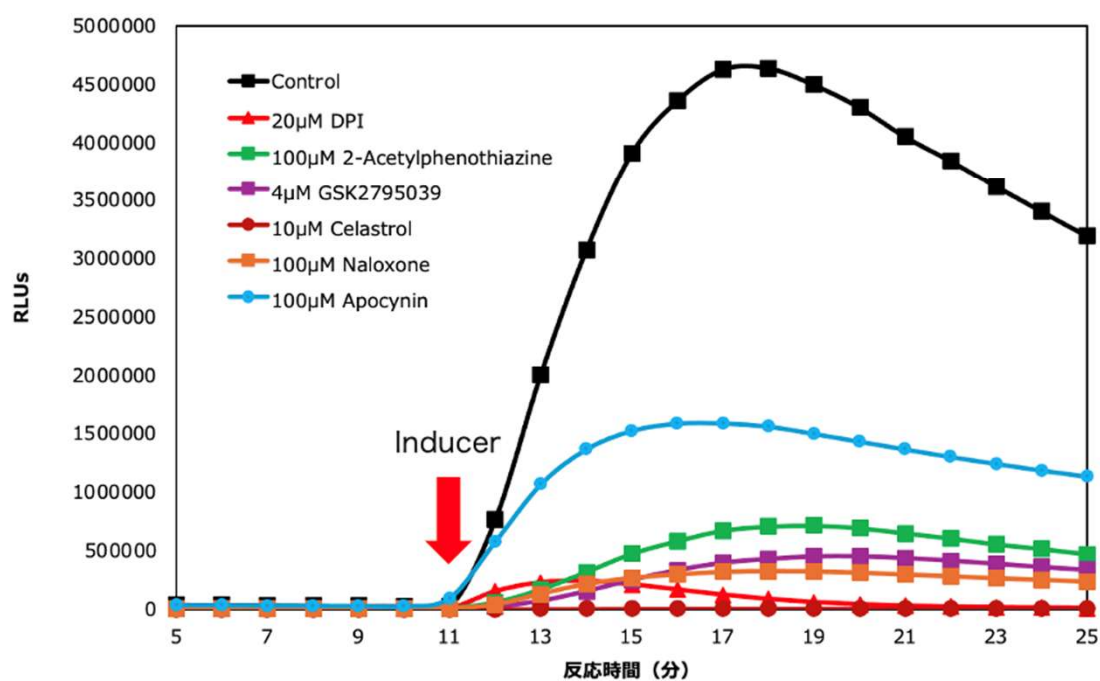
$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \frac{\text{Total RLUs (Inhibitor control or Sample)}}{\text{Total RLUs(Control)}} \times 100$$

## 9 基本データ



### 代表的 NOX 阻害剤の阻害作用

本キットを用いた代表的なNOX阻害剤による阻害作用  
赤矢印は Inducer 添加を示す



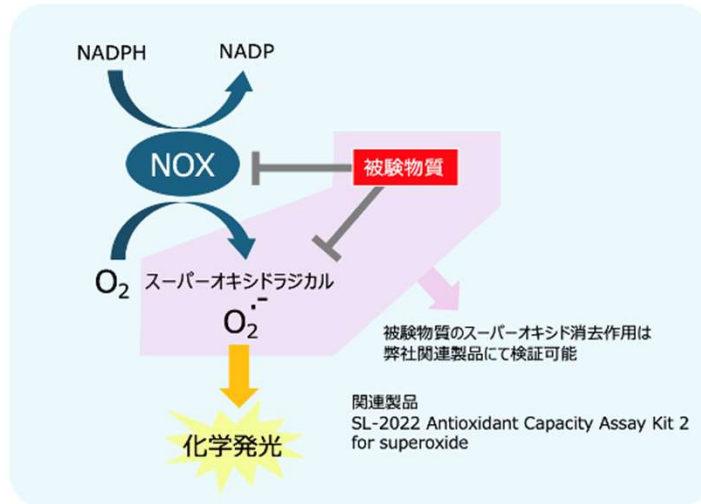
代表的なNOX阻害剤のIC50値

NOX阻害剤	IC50
DPI	0.5 µM
2-Acetylphenothiazine	0.8 µM
GSK2795039	0.05 µM
Celastrol	0.8 µM
Naloxone	3.5 µM
Apocynin	60 µM

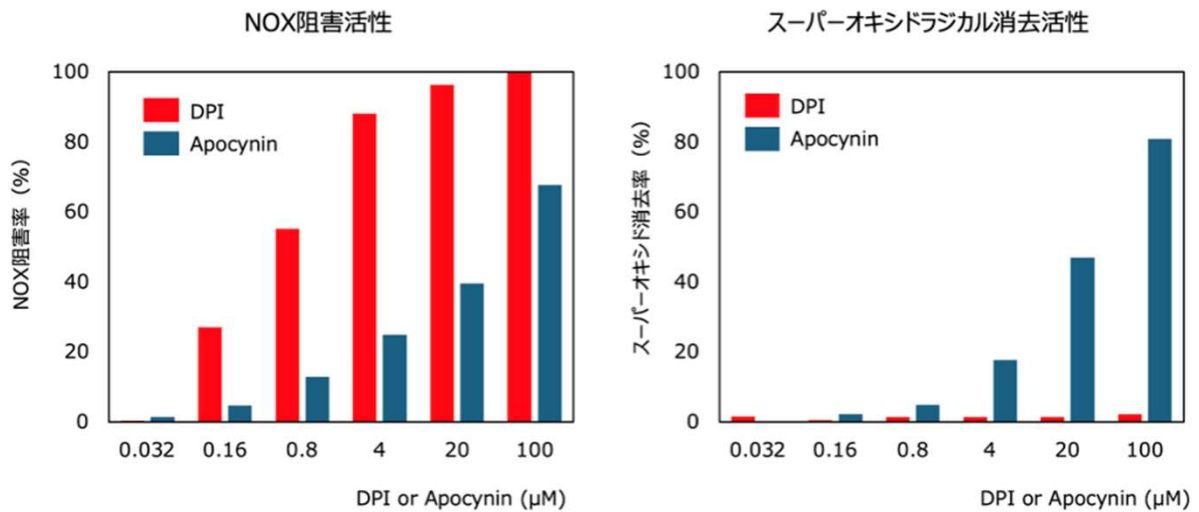
# 10 抗酸化作用の確認



測定原理上、NOXにより生成されたスーパーオキシドを被験物質により消去した場合でもNOX阻害活性として評価される。そこで両者を区別するためにスーパーオキシド抗酸化能検証キット (SL-2022, Antioxidant Capacity Assay Kit2 for superoxide) で抗酸化能の有無を検証することを推奨する。



DPI および ApocyninはともにNOX阻害剤であるがApocyninは抗酸化作用も持つ (参考論文1)。一方、DPIには抗酸化作用は認められなかった。



参考論文1 : Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. Heumüller et al., Hypertension, 2008, 51(2) 211-217

関連製品  
SL-2022 Antioxidant Capacity Assay Kit 2 for Superoxide

## 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](mailto:info@sakulab-sci.co.jp)

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

