

For research use only

Urinary Diacetylspermine ELISA Kit

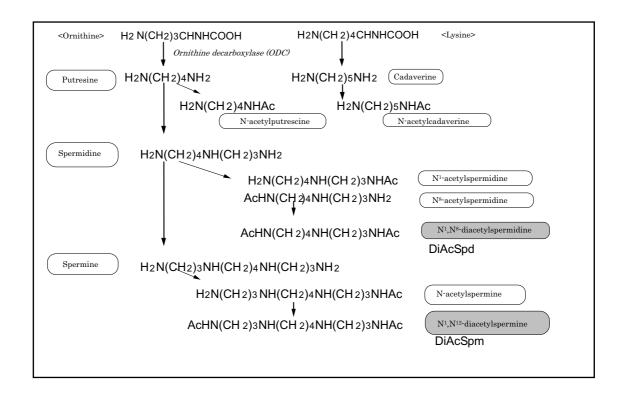
Polyamines are generally believed to function both in protein synthesis and DNA synthesis leading to control cell proliferation. In 1971, Russel firstly reported that total amount of urinary polyamines elevated in cancer patients. And quantitative kit of urinary polyamines were already developed and utilized as a general biochemical examination.

Recently two diacetyl-derivatives, N1, N12-diacetylspermine and N1, N8-diacetylspermidine, were found to be excreted in urine and form 0.6% and 1.4% of total polyamines respectively.

Comparing urine of diseased person with urine of healthy person, some reports suggested the possibility that diacetyl-derivatives correlate to the status of disease more closely than total amount of polyamines.

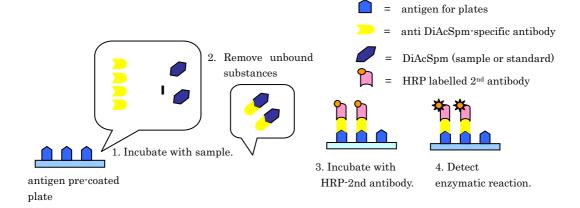
Our kit is convenient to quantify amount of urinary diacetylspermine by using ELISA method. This kit is only for research use, not for diagnosis.

- •Highly sensitive and specific
- •Strip type well, antigen pre-coated microplate
- •Assay range: 6.25∼200nM





[measurement principle]



[Kit Contents]

(1)	Antigen coated microtiter plate,96 wells	1 plate			
(2)	Diacetylspermine standard	$250\mu\mathrm{l}$	\times 2	2	
(3)	Antibody diluent	20 mL	\times 1		
(4)	Anti Diacetylspermine antibody concentrate	$(\times 100)$	60μ]	\times	1
(5)	HRP-anti Rabbit IgG Antibody concentrate(\times 80)	80μ	$1 \times$	1
(6)	OPD (o-phenylendiamine) tablets	2 tab.			
(7)	Substrate solution	30 mL	\times]		
(8)	Stop solution	$15 \mathrm{mL}$	\times 1	_	
(9)	Wash buffer concentrate ($\times 20$)	30 mL	\times]	L	



[Equipments to be supplied by the user]

- (1) A microplate reader
- (2) A micropipet

(10) Dilution plate

(3) A microplate washer

[Assay Method]

- (1) Preparation of working solution
 - ① Wash solution

Make sure that wash buffer concentrate does not contain any crystallized material prior to use. Working solution is prepared by dilution 30 mL of wash buffer concentrate with 570 mL of distilled deionized water. For convenience this solution can be kept at 2-8°C up to 14 days.

1 plate

2 Diacetylspermine Standard

Prepare 6 standards by serial dilution of diacetylspermine standard concentrate (200 nM) as followings

We recommend a polypropylene tube for preparation of standard solution. A glass or polystylene tube may cause non-specific adsorption of diacetylspermine, so that you may not get reliable results.

			200	100	50.0	25.0	12.5	6.25	(nM)
Standard solution	200nM	(μL)	250	100	100		100	100	
Deionized water		(μL)	ر ر 0	100	100_	100	100	100	



③ Anti Diacetylspermine antibody ($\times 100$)
Dilute $40 \,\mu$ l of Anti Diacetylspermine antibody concentrate ($\times 100$) with 4 mL of

Dilution solution for 96 well reaction. Diluted antibody should not be stored. 4 HRP- anti Rabbit IgG Antibody (\times 80) Dilute 65 μ l HRP- anti Rabbit IgG Antibody concentrate (\times 80) with 5.2 mL of Dilution solution for 96 well reaction. Diluted antibody should not be stored..

⑤ Coloring solution Add one OPD tablet to 13 mL of Substrate buffer to reconstitute the coloring solution just before use. This solution should not be stored.

(2) Preparation of urine sample

- ① Collect urine in sampling tube on demand. Add 0.1% Na₂N₃ at final concentration.
- ② After centrifiguration at 1500rpm for 5min, dilute the resulted supernatant over 4 times with distilled deionized water.
- 3 Measure the amount of creatinine in remaining diluted supernatant for compensation.

 $\mbox{\%}$ Prepared urine sample should be kept below -30°C if necessary .

(3) Assay procedure

① Pre-reaction

Prepare standard control wells containing $70\mu L$ of anti Diacetylspermine antibody solution and $70\mu L$ of 6 standards (200,100,50.0,25.0,12.5,6.25nM) in dilution plate. Likewise prepare experimental wells containing $70\mu L$ of anti Diacetylspermine antibody solution and $70\mu L$ of prepared urinary sample in the same plate. After settlement, incubate at room temperature for 1 hour.

*Above reaction volumes can be applied for double measurements of primary reaction. If single measurement, reduce to 40µL of each solution.

2 Preparation of reaction plate

- ②-1 Add wash solution 300μ l to each well and wait another 30 minutes.
- ②-2 Discard the wash solution from the wells completely and wash with 300 μ l wash solution.

Repeat this step another 2 times

③ Primary reaction

- ③-1 Apply $50~\mu$ l/well \times 2 (In the case of measuring double wells) pre-reaction solution(See ①) and incubate for 1 hour.

4 Secondary reaction

- 4-1 Apply 50 μ l HRP anti Rabbit IgG Antibody and incubate for 1 hour. Equilibrate substrate buffer to room temperature prior to use.
- 4-2 After incubation, discard the reaction solution and wash with 300 μ l wash solution. Repeat this step another 2 times.

5 Coloring

Apply $100\,\mu\,l$ Coloring solution to each well and incubate for 10 minutes at room temperature.



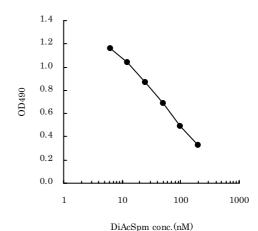
- 6 Stop reaction Apply 100 μ l of Stop solution to stop the enzymatic reaction
- Read absorbance
 Read absorbance of 490nm or 492nm with a microplate reader .
- Measure concentration
 Measure the Diacetylspermine concentration using standard curve.
- * If actual measurements of sample exceed over 200nM, dilute those urine samples again as possible as to evaluate within the range of 6.25~200nM.
- * Concentration of diacetylspermine needs to be calculated from actual measurements by consideration of dilution ratio.
- * For the comparison of clinical data, actual measurements need compensation with the concentration of urinary creatinine (nmol/g cre) .

Calculation method of clinical data

In general, the amount of urine change easily by amount of water take or environment even in renal disease patients and healthy persons, and concentrations of excrement depend on their amount. The amount of urinary creatinine depends on the amount of muscle and their measurements correlate positively. Therefore, correct actual measurement of Diacetylspermine concentration (nM) in urine with creatinine concentration (mg/dl), as followings,

[Standard curve]







[Reproducibility]

Domain of standard curve: 6.25~200nM

Minimum measurement range for detection: 12.5nM Minimum dilution number of urine sample: ×4

Minimum sensitivity for detection: 50.0nM

Within-run (n=20, 2 concentration) : CV(%) = 4.87, 5.20 Between-run (n=20, 2 concentration) : CV(%) = 7.98, 9.50

Recovery test: In the recovery study, recoveries 99.8% and 98.2%, 108%, 100% were obtained for 2, 4, 8times dilutions of the sample urine

Coexistence substance : No influence to Hemoglobin $400 \text{mg/dL} \cdot \text{Bilirubin } 10 \text{mg/dL} \cdot \text{Glucose } 1000 \text{mg/dL} \cdot \text{Ascorbic acid } 100 \text{mg/dL}$

Comparision between the ELISA kit and HPLC precedures : Y = 1.01X + 73.2 R²=0.978

[Usage notes]

- ① The Reagents should be stored at recommended temperature, -30° C.
- ② Do not use the reagents which is expired the date of usage.
- ③ Urine sample should be diluted more than 4 times with Dilution solution.
- ④ Do not leave the standard and Antibody for long time under room temperature.
- ⑤ The glassware for making coloring solution should be clean.
- 6 Since OPD (o-phenylendiamine) is harmful, handle with care.
- The Since Stop solution, 1N H₂SO₄, is strong acid, handle with care.
- ® The kit is constructed with well-adjusted combination in each lot. Replaced combination among different lots may cause unexpected results.
- This kit is only for research use. Do not use for medicinal or any other purposees.
- When using the reagents, take care to avoid them from touching to skin, mucous membrane, clothes, and getting into eye.
- ① If the reagents happen to get into eye or mouth, wash out them and consult a doctor if you need.
- ② After using the kit, wash your hand very carefully.
- ③ If you find that the packages of the reagents are broken or something wrong, do not use them.
- When you store the reagents, make sure to avoid them from vaporizing, falling down.
- (5) After using the reagents, the packages should be discarded under the established rule.
- (b) We do not guarantee the quality of the packages and accompaniments if not used according this direction.

[Storage]

All reagents: -30° C



[References]

1) Russell DH:Increased polyamine concentration in the urine of human cancer patients.

Nature New Biol 233:144-145,1971

- 2) Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, and Kawakita M:Determination of amounts of polyamines excreted in urine;demonstration of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine.
 - J. Biochem., 117:107-112,1995
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Hiramatsu K,Miura H, Kamei S, Iwasaki K, and Kawakita M:Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)system that can replace HLPC analysis for the determination of N1,N12- diacetylspermine in human urine.
 - J. Biochem., 124:231-236,1998

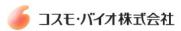
Manufactured by TransGenic Inc.



COSMO BIO CO., LTD.

Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN http://www.cosmobio.co.jp e-mail: export@cosmobio.co.jp





研究用試薬

尿中ジアセチルスペルミン測定用 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)。

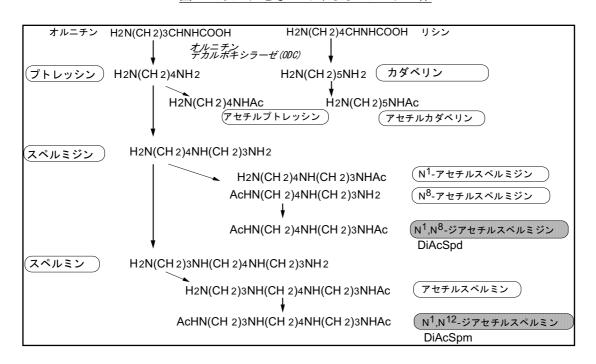
多価カチオンであるポリアミンは、核酸その他のアニオンとの相互作用を通じて蛋白質合成や核酸合成の過程に影響を与えることが知られておりますが、その生理的機能は多年にわたる研究にも関わらずまだ十分には解明されておりません。しかし活発に増殖する組織にはポリアミンが多量に含まれているだけではなく、そのような組織ではポリアミン代謝が活発であり、また、細胞内レベルも精密に制御されていることから、ポリアミンは細胞増殖およびその制御の過程で重要な役割を果たす物質の一つであると考えられております。

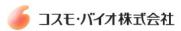
癌患者において尿中ポリアミン排泄量が増加することは 1971 年に Russel によって最初に報告され、それ以後 多くの研究が行われてきました。すでに、尿中総ポリアミン量測定キットが開発され一般生化学検査として利用されております。

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



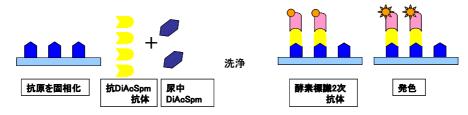




〔測定原理〕

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ンと抗ジアセチルスペルミ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ンと結合します。さらに、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、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)
- ② ジアセチルスペルミン標準品(STD)200nM
- ③ 抗体希釈液
- ④ 抗ジアセチルスペルミン抗体(×100)
- ⑤ HRP 標識-抗ウサギ IgG 抗体(×80)
- ⑥ OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠
- ⑦ 基質液
- ⑧ 反応停止液
- ⑨ 濃縮洗浄液(×20)
- ⑩ 希釈用プレート

1枚 250 μ× 2本 20 mL × 1本 60 μ× 1本 80 μ× 1本 2錠 30 mL × 1本



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
 - 洗浄液

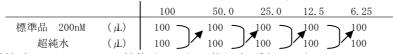
濃縮洗浄液 (×20) を室温に戻し、塩類が沈殿してないか確かめて下さい。

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 200nM より超純水にて 2 倍段階希釈し、100、50.0、25.0、12.5、6.25nM の各濃度を調製します。

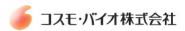
※標準品の調製にガラス容器は使用しないでください。ジアセチルスペルミンがガラスに非特異吸着します。 調製にはポリプロピレン素材のものをご推奨いたします。



- ③抗ジアセチルスペルミン抗体 (×100) ※使用時調製して下さい。
 - 抗ジアセチルスペルミン抗体(×100)40 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。
- ④HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 $(\times 80)$ ※使用時調製して下さい。 HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 $(\times 80)$ 65 \bot を抗体希釈液 5.2mL 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。
- ⑤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4倍(以上)に希釈して使用して下さい。 (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

プレ反応

希釈用プレートに抗ジアセチルスペルミン抗体溶液 70 μ +各濃度の標準液 (200、100、50.0、25.0、12.5、6.25nM) 70 μ および抗ジアセチルスペルミン抗体溶液 70 μ +希釈した各尿サンプル 70 μ (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 1 時間インキュベートします。

※標準液、尿サンプルとも1次反応にてダブル測定分の液量調整となっております。シングル測定の場合は、抗体:サンプル=40 止:40 止 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 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 L 分注し、デカントで除去します(1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 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 300 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 2次反応

- ④-1 各ウェルに HRP 標識-抗ウサギ IgG 抗体溶液を 50 止 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。このとき基質液を室温に戻しておきます。
- ④-2 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 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。)
- ⑤ 発色

各ウェルに基質液を100 止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。

⑥ 反応停止

各ウェルに反応停止液を 100 山 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。

⑦ 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ンの濃度を算出します(nM)。

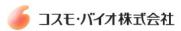
- *実測値が 200nM を超える検体については、6.25~200nM の範囲で測定できるように希釈倍数を上げて尿を再調整し、 測定してください。
- *実測値に希釈倍数を乗じてください。
- *臨床データとしての比較には、尿中クレアチニン濃度による補正が必要です(nmol/g・Cre)。

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。

補正式:	nmol/g · cre	_		~	100
тт.т.	1111101/8 010			\wedge	100
			尿中クレアチニン濃度(mg/dl)		



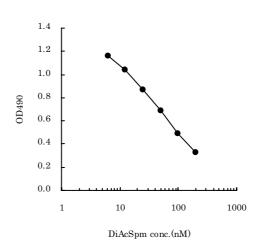


[標準曲線]

Code No.KK073

標準曲線





〔キット性能〕

標準曲線領域:6.25~200nM 最低検出実測域:12.5nM 最低尿希釈倍数:×4 検体最低検出感度:50.0nM

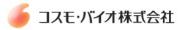
日内再現性(n=20、2 濃度):CV(%)=4.87、5.20 日間再現性(n=20、2 濃度):CV(%)=7.98、9.50

添加回収試験: \times 2、 \times 4、 \times 8 正常尿に既知濃度(100nM)のジアセチルスペルミンを添加した場合: 98.2%、108%、100% 共存物質: ヘモグロビン 400mg/dL・ビリルビン 10mg/dL・グルコース 1000mg/dL・アスコルビン酸 100mg/dL まで影響なし HPLC との相関: Y = 1.01X + 73.2 R2=0.978

[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 2N 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。
- ②取り扱い後には手洗いを十分に行なって下さい。
- ③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。
- ④使用後の容器は廃棄物に関する規定に従って処理して下さい。
- (5)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】

 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; demonstration of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12- diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine. J. Biochem., 117:107-112,1995

 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.

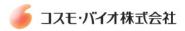
J. Cancer Res. Clin. Oncol.,121:317-319,1995

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)

8. Hiramatsu K,Miura H, Kamei S, Iwasaki K, and Kawakita M: Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)system that can replace HLPC analysis for the determination of N1,N12- diacetylspermine in human urine. J. Biochem., 124:231-236,1998





このたびは尿中ジアセチルスペルミン測定用 ELISA キット(研究用試薬)をご購入いただきまして、誠に有難う ございます。キット添付の説明書に従いご使用くださいますよう、よろしくお願い申し上げます。 今後ともお引き立てのほどよろしくお願い申し上げます。

Information

1. 管理検体について:

管理検体を2種類(UG、UH)お付けしております。

弊社におきましては、下記の範囲で測定管理しております。ご参考になれば幸いです。

管理検体	日間平均	±1SD	±2SD
UG (nM)	19.21	16.94~ 21.49	14.67~ 23.75
UH (nM)	105.69	93.00~118.38	80.31~131.07

注)ロットによりデーターが異なります

2. プレートについて

2 列ずつのセパレートタイプになっております。使用分ずつ分割してのご使用が可能です。

3. キット梱包試薬について:

②ジアセチルスペルミン標準品(STD)、⑥OPD 錠、⑨濃縮洗浄液、⑦基質液は1キットで2回(2 サイクル) 測定可能量を梱包しております。

③抗体希釈液、④抗ジアセチルスペルミン抗体、⑤HRP標識-抗ウサギ IgG 抗体、⑧反応停止液は、96ウエル分を梱包しておりますので、分割ご使用の際は必要分を分取してご使用ください。

- 4. 商品は凍結にて出荷いたしますが、③抗体希釈液、⑦基質液、⑧反応停止液、⑨濃縮洗浄液は測定前日に冷蔵庫に移し、あらかじめ解凍しておくことをお奨めいたします。(解凍に若干時間を要します。)また試薬類は再凍結することなく、解凍後は 4week 以内にご使用ください。
- 5. ②ジアセチルスペルミン標準品(STD)の調整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ンがガラスに非特異吸着します。標準品の調整にはポリプロピレン素材のものをご推奨いたします。

