



Urinary Diacetylspermidine ELISA Kit

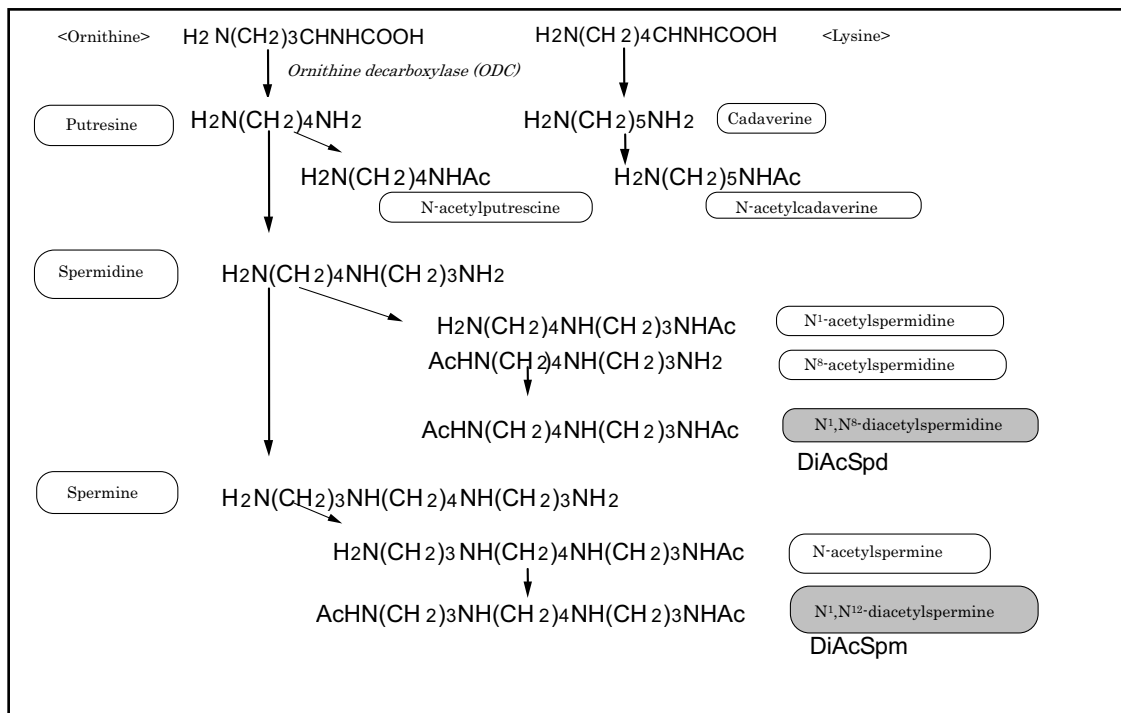
Polyamines are generally believed to function both in protein synthesis and DNA synthesis leading to control cell proliferation. In 1971, Russel firstly reported that total amount of urinary polyamines elevated in cancer patients. And quantitative kit of urinary polyamines were already developed and 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 diacetylspermidine by using ELISA method. This kit is only for research use, not for diagnosis.

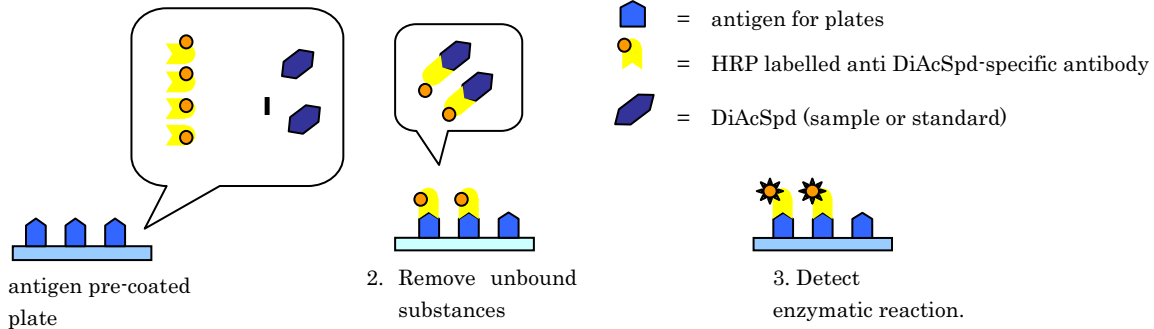
- Highly sensitive and specific
- Strip type well, antigen pre-coated microplate
- Assay range: 9.375~600nM





[measurement principle]

1. Incubate with sample.



[Kit Contents]

- | | |
|--|--|
| (1) Antigen coated microtiter plate,96 wells | 1 plate |
| (2) Diacetylspermidine standard | 250 μ l \times 2 |
| (3) Reference standard and sample diluent | 15 mL \times 1 |
| (4) Antibody diluent | 20mL \times 1 |
| (5) HRP- anti Diacetylspermidine antibody concentrate(\times 100) | 60 μ l \times 1
(mouse monoclonal antibody) |
| (6) OPD (o-phenyldiamine) tablets | 2 tab. |
| (7) Substrate solution | 30 mL \times 1 |
| (8) Stop solution | 15 mL \times 1 |
| (9) Wash buffer concentrate (\times 20) | 30 mL \times 1 |
| (10) Dilution plate | 1 plate |

[Equipments to be supplied by the user]

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

② Diacetylspermidine Standard

Prepare 6 standards by serial dilution of diacetylspermidine standard concentrate (600 nM) as followings

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

		300	150	75.0	37.5	18.75	9.375 (nM)
Standard solution	600nM (μ L)	100	100	100	100	100	100
Deionized water	(μ L)	100	100	100	100	100	100



- ③ HRP-anti Diacetylspermidine antibody ($\times 100$)
Dilute $40 \mu\text{l}$ of Anti Diacetylspermidine antibody concentrate ($\times 100$) with 4 mL of Dilution solution for 96 well reaction. Diluted antibody should not be stored.
- ④ 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% Na_2N_3 at final concentration.
- ② After centrifugation at 1500rpm for 5min, dilute the resulted supernatant over 4 times with Sample diluent.
- ③ Measure the amount of creatinine in remaining diluted supernatant for compensation.
※Prepared urine sample should be kept below -30°C if necessary.

(3) Assay procedure

- ① Pre-reaction
Prepare standard control wells containing $70\mu\text{L}$ of anti Diacetylspermidine antibody solution and $70\mu\text{L}$ of 6 standards (600,300,150,75.0,37.5,18.75,9.375 nM) in dilution plate. Likewise prepare experimental wells containing $70\mu\text{L}$ of anti Diacetylspermidine antibody solution and $70\mu\text{L}$ of prepared urinary sample in the same plate. After settlement, incubate at room temperature for 30 minutes.
*Above reaction volumes can be applied for double measurements of primary reaction. If single measurement, reduce to $40\mu\text{L}$ of each solution.
- ② Preparation of reaction plate
 - ②-1 Add wash solution $300 \mu\text{l}$ to each well and wait another 30 minutes.
 - ②-2 Discard the wash solution from the wells completely and wash with $300 \mu\text{l}$ wash solution.
Repeat this step another 2 times
- ③ Primary reaction
 - ③-1 Apply $50 \mu\text{l/well} \times 2$ (In the case of measuring double wells) pre-reaction solution(See ①) and incubate for 1 hour.
 - ③-2 After the incubation, discard the reaction solution and wash with $300 \mu\text{l}$ wash solution. Repeat this step another 2 times.
- ④ Coloring
Apply $100 \mu\text{l}$ Coloring solution to each well and incubate for 10 minutes at room temperature.
- ⑤ Stop reaction
Apply $100 \mu\text{l}$ of Stop solution to stop the enzymatic reaction
- ⑥ Read absorbance
Read absorbance of 490nm or 492 nm with a microplate reader .
- ⑦ Measure concentration
Measure the Diacetylspermidine concentration using standard curve.

* If actual measurements of sample exceed over 600nM, dilute those urine samples again as possible as to evaluate within the range of 18.75~600nM.



Code No.KAL-KK123

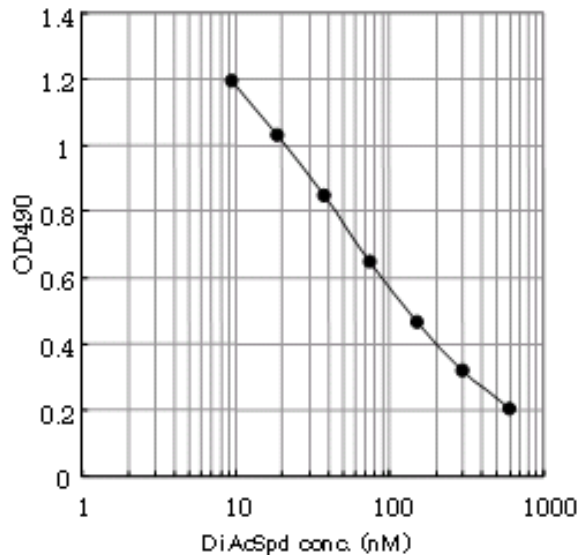
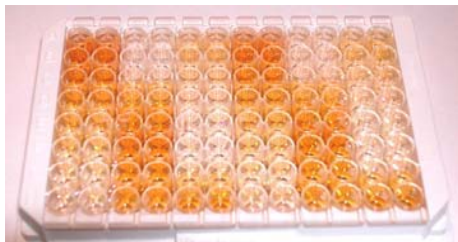
- * Concentration of diacetylspermine needs to be calculated from actual measurements by consideration of dilution ratio.
- * For the comparison of clinical data, actual measurements need compensation with the concentration of urinary creatinine (nmol/g · cre) .

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 Diacetylspermidine concentration (nM) in urine with creatinine concentration (mg/dl) , as followings,

$$\text{Data correction : nmol/g · cre} = \frac{\text{Diacetylspermidine concentration (nM)}}{\text{Creatinine concentration (mg/dL)}} \times 100$$

[Standard curve]



[Reproducibility]

- Domain of standard curve : 9.375~600nM
- Minimum measurement range for detection : 18.75nM
- Minimum dilution number of urine sample : ×2
- Minimum sensitivity for detection : 37.5nM
- Within-run (n=20, 2 concentration) : CV(%) = 5.76, 2.58
- Between-run (n=20, 2 concentration) : CV(%) = 6.76, 4.25
- Recovery test : In the recovery study, recoveries between 96% and 108% were obtained for 2, 4, 8times dilutions of the sample urine
- Coexistence substance : No influence to Hemoglobin 4500mg/dL · Bilirubin 180mg/dL · Glucose 1000mg/dL · Ascorbic acid 40mg/dL



[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-phenyldiamine) is harmful, handle with care.
- ⑦ Since Stop solution, $1\text{N H}_2\text{SO}_4$, is strong acid, handle with care.
- ⑧ The kit is constructed with well-adjusted combination in each lot. Replaced combination among different lots may cause unexpected results.
- ⑨ This kit is only for research use. Do not use for medicinal or any other purposes.
- ⑩ When using the reagents, take care to avoid them from touching to skin, mucous membrane, clothes, and getting into eye.
- ⑪ If the reagents happen to get into eye or mouth, wash out them and consult a doctor if you need.
- ⑫ After using the kit, wash your hand very carefully.
- ⑬ If you find that the packages of the reagents are broken or something wrong, do not use them.
- ⑭ When you store the reagents, make sure to avoid them from vaporizing, falling down.
- ⑮ After using the reagents, the packages should be discarded under the established rule.
- ⑯ We do not guarantee the quality of the packages and accompaniments if not used according this direction.

[Storage]

All reagents: -30°C



Code No.KAL-KK123

[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;demomstration of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12-diacetylspermine 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



This product is generated from GANP® mice.

Distributor



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

Phone : +81-3-5632-9617

FAX : +81-3-5632-9618

尿中ジアセチルスペルミジン測定用 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)。

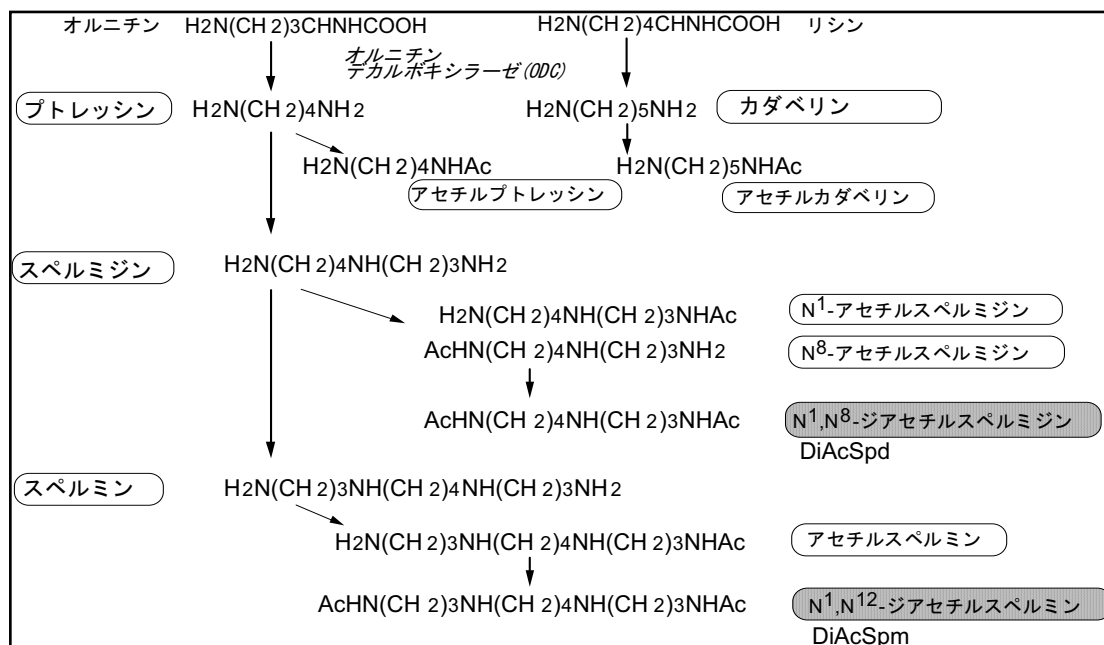
多価カチオンであるポリアミンは、核酸その他のアニオンとの相互作用を通じて蛋白質合成や核酸合成の過程に影響を与えることが知られておりますが、その生理的機能は多年にわたる研究にも関わらずまだ十分には解明されておられません。しかし活発に増殖する組織にはポリアミンが多量に含まれているだけでなく、そのような組織ではポリアミン代謝が活発であり、また、細胞内レベルも精密に制御されていることから、ポリアミンは細胞増殖およびその制御の過程で重要な役割を果たす物質の一つであると考えられております。

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ジン量を 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。

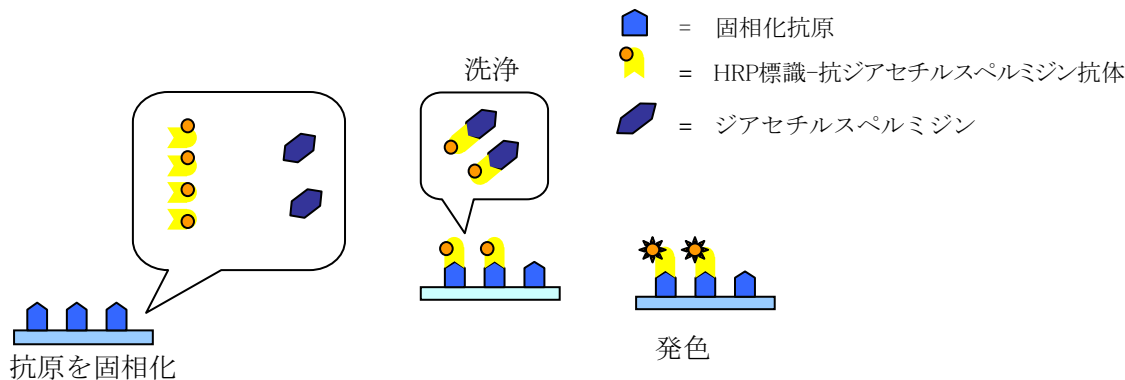
図 1 ポリアミンとそのモノおよびジアセチル体



〔測定原理〕

本キットは、ジアセチルスペルミジ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ジン)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ジアセチルスペルミジンと HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジ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ジンと結合します。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 ジアセチルスペルミジン標準品 (STD) 600nM | 250 μ L \times 2 本 |
| ③ 標準品及び検体共通希釈液 | 15mL \times 1 本 |
| ④ 抗体希釈液 | 20 mL \times 1 本 |
| ⑤ HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体 (\times 100)
(マウスモノクローナル抗体) | 60 μ L \times 1 本 |
| ⑥ OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠 | 2 錠 |
| ⑦ 基質液 | 30 mL \times 1 本 |
| ⑧ 反応停止液 | 15 mL \times 1 本 |
| ⑨ 濃縮洗浄液 (\times 20) | 30 mL \times 1 本 |
| ⑩ 希釈用プレート | 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

① 洗浄液

濃縮洗浄液 (\times 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 (\times 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 600nM より標準品希釈液にて 2 倍段階希釈し、300、150、75、37.5、18.75、9.375nM 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ジ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。

標準液濃度 (nM)	300	150	75	37.5	18.75	9.375
標準品 600nM (μ L)	100	100	100	100	100	100
標準品希釈液 (μ L)	100	100	100	100	100	100

- ③HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体 (×100) ※使用時調製して下さい。
 HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体(×100)40 μL 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、その上清を検体希釈液にて 4 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、アジ化ナトリウムを添加し冷蔵保管してください。
 (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

① プレ反応

希釈用プレートに HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体溶液 70 μL+各濃度の標準液 (600、300、150、75.0、37.5、18.75、9.375nM) 70 μL および HRP 標識-抗ジアセチルスペルミジン抗体溶液 70 μL+希釈した各尿サンプル 70 μL (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 分間インキュベートします。
 ※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 μL: 40 μL 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 μL/ウェルに加え、室温で 20 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 μL 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 μL/ウェル×2 ウェル (ダブル測定の場合) ずつに加え、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 μL 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 μL ずつシステムティックに加え、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 μL ずつに加え、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ム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、ジアセチルスペルミジンの濃度を算出します (nM)。

- *実測値が 600nM を超える検体については、18.75~600nM 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)。

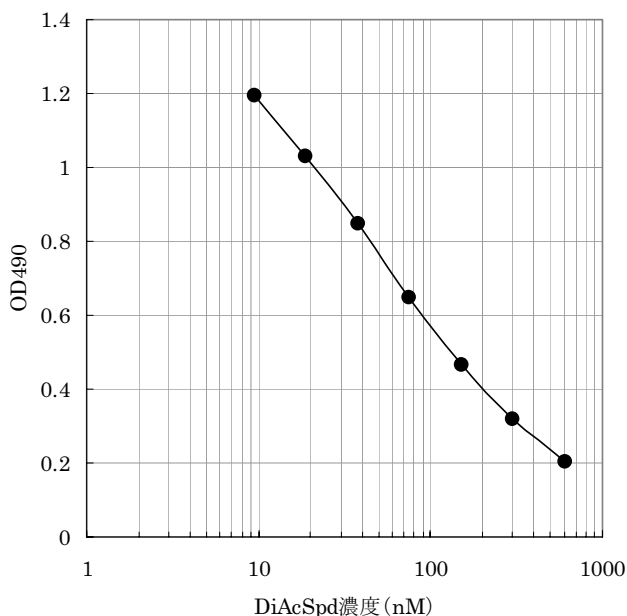
臨床データ算出方法

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ジン濃度 (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。

$$\text{補正式: } \text{nmol/g} \cdot \text{cre} = \frac{\text{尿中ジアセチルスペルミジン濃度}}{\text{尿中クレアチニン濃度 (mg/dl)}} \times 100$$

〔標準曲線〕



〔キット性能〕

標準曲線領域: 9.375~600nM

最低検出実測域: 18.75nM

最低尿希釈倍数: ×2

検体最低検出感度: 37.5nM

日内再現性 (n=10, 2 濃度): CV(%)= 5.76, 2.58

日間再現性 (n=10, 2 濃度): CV(%)= 6.76, 4.25

添加回収試験: ×2, ×4, ×8 正常尿に既知濃度(200nM)のジアセチルスペルミジンを添加した場合: 96%~108%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 40mg/dL まで影響なし

〔使用上の注意〕

- ① 試薬は -30°C 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 10 倍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。
- ⑥ OPD (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. 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;demomstration of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12- diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine.
J. Biochem., 117:107-112,1995
5. 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）

This product is generated from GANP® mice.



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620