

NO₂/NO₃ Assay Kit-FX(Fluorometric) ～ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ～

Technical Manual

はじめに

一酸化窒素 (NO) が情報伝達物質として多くの生理的現象に関与していることが明らかとなり、NO に関する研究が盛んに行われています。NO は水中で加水分解され最終的に NO₂⁻ と NO₃⁻ になるため、NO₂⁻ と同時に NO₃⁻ も測定する必要があります。本 Kit は還元酵素を含み、NO₃⁻ を NO₂⁻ に還元できるので NO₂⁻ と NO₃⁻ 両方の濃度測定が可能です。本キットは 1 ~ 10 μmol/l の濃度域に適しています。より高濃度の場合、「NO₂/NO₃ Assay Kit-C II」をご利用ください。

反応原理

NO₂⁻ の定量法である Griess 法や 2,3-Diaminonaphthalene を用いた蛍光法は、NO の間接的定量法として良く用いられています。2,3-Diaminonaphthalene は Griess 試薬と同様に NO₂⁻ と反応し蛍光を発生することから、より高感度に NO₂⁻ を定量することができます。本 Kit は 2,3-Diaminonaphthalene が酸性条件下で NO₂⁻ と反応して形成される蛍光性のナフタレントリアゾールを検出する方法 (図 1) を利用しています。この反応は pH2 以下で進行し、生成した付加体は pH10 以上で効率よく蛍光を発生します。

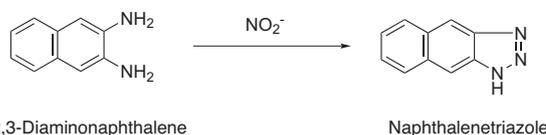


図 1. 2,3-Diaminonaphthalene と NO₂⁻ の反応機構

キット内容

• Buffer Solution	x 1	• Enzyme Cofactors	x 2
• NaNO ₂ Standard Solution (200 μmol/l)	x 2	• Fluorescence Reagent (DAN) Solution	x 1
• NaNO ₃ Standard Solution (200 μmol/l)	x 2	• Stop Solution	x 1
• NO ₃ Reductase	x 2		

保存条件

遮光、冷蔵 (0 ~ 5°C) で保存してください。開封後も遮光、冷蔵保存してください。Standard Solution および酵素が劣化することがありますので冷凍保存は避けて下さい。

使用時の注意

- 本キットにはガラス製容器及びアルミキャップを使用しております。保護手袋を着用するなど取扱にはご注意ください。

キット以外に必要なもの

- 蛍光マイクロプレートリーダー (λ_{ex}=360 nm ~ 365 nm, λ_{em}=450 nm ~ 465 nm のフィルターを備えたもの)
- * 上記のフィルターがない場合は最も近い波長の適当なフィルターを用いて下さい。
- 蛍光測定用 (ブラックまたはホワイト) 96 穴マイクロプレート
- マイクロピペット、チップ及びシリンジ
- * このほかに、測定試料によっては除蛋白用の装置、試薬が必要となります。

溶液の調製

- 1) NaNO₂ Standard Solution 1 本に Buffer Solution (又は培地) 9 ml を加え、20 μmol/l の Standard Solution を調製する。
- 2) NaNO₃ Standard Solution 1 本に Buffer Solution (又は培地) 9 ml を加え、20 μmol/l の Standard Solution を調製する。
- 3) NO₃ Reductase 1 本に Buffer Solution 1.2 ml を加え、NO₃ Reductase Solution を調製する。
- 4) Enzyme Cofactors 1 本に Buffer Solution 1.2 ml を加え、Enzyme Cofactors Solution を調製する。

* NO₃ Reductase 及び Enzyme Cofactors は、凍結乾燥品のため瓶内部が減圧になっています。減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがありますので、必ず Buffer Solution をシリンジで注入し、溶解後開封して下さい。

* 希釈・溶解後の溶液は冷蔵保存の上、2 週間以内に使用して下さい。

* NO₃⁻ を多く含む培地 (RPMI1640 など) は使用できません。

* フェノールレッドを含む培地は使用できません。

検量線の作成

[NO₂⁻] 検量線

- 1) 96 穴マイクロプレートの検量線作成用の各ウェルに Buffer Solution (又は培地) 80 μl を分注する。20 μmol/l NaNO₂ Standard Solution 80 μl をプレート上で系列希釈し、Standard を調製する (図 2 参照)。
- 2) 各ウェルに Buffer Solution 20 μl を加え、全量を 100 μl とする。
- 3) 各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μl を加えよく混和する。
- 4) 室温にて 15 分放置した後、各ウェルに Stop Solution 40 μl を加えよく混和する。
- 5) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}=360 nm ~ 365 nm, λ_{em}=450 nm ~ 465 nm) を測定する。

[NO₂⁻+NO₃⁻] 検量線

- 1) 96 穴マイクロプレートの検量線作成用の各ウェルに Buffer Solution (又は培地) 80 μl を分注する。20 μmol/l NaNO₃ Standard Solution 80 μl をプレート上で系列希釈し、Standard を調製する (図 2 参照)。
- 2) 各ウェルに Enzyme Cofactors Solution 10 μl を加える。
- 3) 各ウェルに NO₃ Reductase Solution 10 μl を加え、よく混和する。
- 4) マイクロプレートに蓋をし、37°C で 30 分間インキュベートする。
- 5) 室温まで放冷後、各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μl を加えよく混和する。
- 6) 室温にて 15 分放置した後、各ウェルに Stop Solution 40 μl を加えよく混和する。
- 7) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}=360 nm ~ 365 nm, λ_{em}=450 nm ~ 465 nm) を測定する。

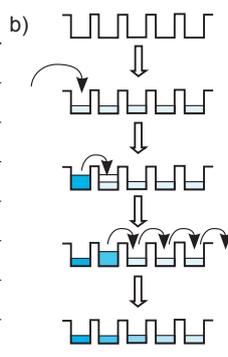
* [NO₂⁻+NO₃⁻] 検量線は、酵素反応を利用して NO₃⁻ を NO₂⁻ に還元して測定します。本マニュアルでは NaNO₃ Standard Solution を用いていますが、NaNO₂ Standard Solution を用いた場合も同じ検量線が得られます。

* [NO₂⁻+NO₃⁻] 検量線は、酵素等の影響により [NO₂⁻] 検量線とはかならずしも一致しません。

* 蛍光光度計で測定する場合は Stop Solution 添加後の溶液を 100 μl 取り、純水で 4 ml に希釈し蛍光強度を測定して下さい。

* NO₃ Reductase Solution と Enzyme Cofactors Solution は、使用前に混合して使用せず、順次、添加して下さい。

a)	1	2	3
A	10 $\mu\text{mol/l}$		
B	5 $\mu\text{mol/l}$		
C	2.5 $\mu\text{mol/l}$		
D	1.25 $\mu\text{mol/l}$		
E	0.63 $\mu\text{mol/l}$		
F	0.31 $\mu\text{mol/l}$		
G	0.16 $\mu\text{mol/l}$		
H	0 $\mu\text{mol/l}$		



- 1) マイクロピペットを用いて 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 80 μl の Buffer Solution (または培地) を分注する。
- 2) 20 $\mu\text{mol/l}$ に希釈した Standard Solution 80 μl を 10 $\mu\text{mol/l}$ 用のウェルに添加する。
- 3) よくピペッティングして 80 μl を取り隣 (5 $\mu\text{mol/l}$ 用) のウェルに添加する。
- 4) 同様に 80 μl を取り隣のウェルに添加する操作を繰り返す。
- 5) 最後に 80 μl 捨てると、2 倍希釈系列で Standard を調製することができる。

図 2. 検量線作成方法の例。 a)96 穴プレートでの検量線レイアウト例。 b)Standard Solution の希釈方法。

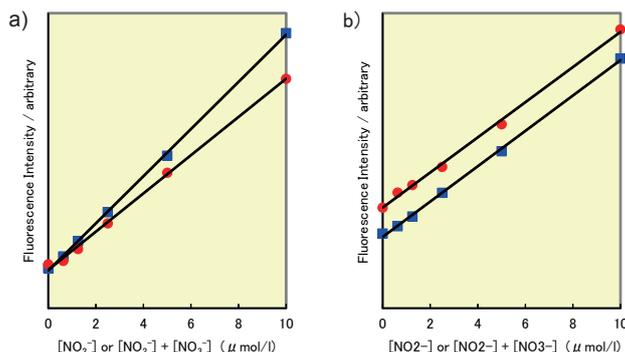


図 3. $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Assay Kit-FX を用いて測定した、 $[\text{NO}_2^-]$ と $[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ の検量線。
a) Buffer Solution 中
b) 培地 (DMEM) 中

検量線の例

試料の調製法

血清、血漿を試料として用いる場合

血清、血漿などのタンパク質を含む試料は除タンパクして使用して下さい。除タンパクの方法として Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane ([UFC801008], Millipore 社) 等の遠心式限外ろ過ユニットが利用できます。トリクロロ酢酸などを用いての除タンパクも利用できますが、酸やアルカリで除タンパクした場合は、酵素反応が阻害を受ける可能性があります。その場合は、測定前に必ず pH を中性に戻してから測定して下さい。

細胞培養液を試料として用いる場合

培養液を 1,000 \times g (RT, 15 分間) で遠心分離し、その上澄みを測定試料として使用して下さい。なお、硝酸イオンを多く含む培地 (RPMI1640 など) はご使用できません。フェノールレッドを含む培地もご使用できません。

濁りがあるものを試料として用いる場合

濁りは測定値に影響を及ぼします。遠心分離、または濾過により濁りを取り除いてから測定試料として使用して下さい。

試料の測定

$[\text{NO}_2^-]$ の測定

- 1) 96 穴マイクロプレートに試料 80 μl を加える。
- 2) 各ウェルに Buffer Solution 20 μl を加え、全量を 100 μl とする。
- 3) 各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μl を加えよく混和する。
- 4) 室温にて 15 分放置した後、各ウェルに Stop Solution 40 μl を加えよく混和する。
- 5) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm} \sim 365\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=450\text{nm} \sim 465\text{nm}$) を測定し、 $[\text{NO}_2^-]$ の検量線から濃度を求める。

$[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ の測定

- 1) 96 穴マイクロプレートに試料 80 μl を加える。
- 2) 各ウェルに Enzyme Cofactors Solution 10 μl を加える。
- 3) 各ウェルに NO_3^- Reductase Solution 10 μl を加え、よく混和する。
- 4) マイクロプレートに蓋をし、37°C で 30 分間インキュベートする。
- 5) 室温まで放冷後、各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μl を加えよく混和する。
- 6) 室温にて 15 分放置した後、各ウェルに Stop Solution 40 μl を加えよく混和する。
- 7) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm} \sim 365\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=450\text{nm} \sim 465\text{nm}$) を測定し、 $[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ の検量線から濃度を求める。

$[\text{NO}_3^-]$ の測定

本 Kit では $[\text{NO}_3^-]$ のみの値は直接的には得られません。測定試料中の $[\text{NO}_3^-]$ は $[\text{NO}_2^-]$ と $[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ を用いて、下記の計算式により求めることができます。

$$[\text{NO}_3^-] = [\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-] - [\text{NO}_2^-]$$

* 蛍光光度計で測定する場合は Stop Solution 添加後の溶液を 100 μl 取り、純水で 4 ml に希釈し蛍光強度を測定して下さい。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。