

高感度 8-OHdG Check 使用説明書

本キットは、8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) に特異的なモノクローナル抗体を使用する ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キットで、生体試料中の 8-OHdG を簡便に測定するものです。

本キットは研究用です。臨床検査／診断／治療など研究以外の用途に用いることはできません。

1. キットの構成

①反応プレート	: 8-OHdG 固相化プレート(8×12 ウェル、分割式)	1 枚
②第一抗体	: モノクローナル抗体	1 瓶
③第一抗体溶解液	: 1% BSA, 0.05% Tween-20/リン酸緩衝生理食塩液	1 瓶 (約 6ml)
④第二抗体	: 酵素標識抗体	1 瓶
⑤第二抗体溶解液	: リン酸緩衝生理食塩液	1 瓶 (約 12ml)
⑥発色剤	: 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	1 瓶 (約 0.25ml)
⑦発色剤希釈液	: 過酸化水素水/クエン酸リン酸緩衝生理食塩液	1 瓶 (約 12ml)
⑧洗浄液	: 0.05% Tween-20/リン酸緩衝生理食塩液 (5 倍濃縮)	2 瓶 (約 26ml/瓶)
⑨反応停止液	: 1M リン酸	1 瓶 (約 12ml)
⑩8-OHdG 標準液	: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 4, 10 ng/ml	各 1 瓶 (各約 1ml)
⑪プレートシール		2 枚

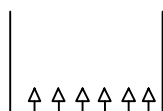
* 保存方法……………冷蔵庫 (2~8℃) に保管してください。

* 有効期間……………製造後 9 ヶ月 (反応プレート及び瓶の開封後は 2 週間以内にご使用ください)。

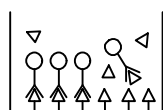
2. 必要な機器

①50μl 用マイクロピペット及びチップ	: 試薬およびサンプルの分注用
②8 チャンネルマイクロピペット及びチップ (50~200μl)	: 試薬の分注用
③8 チャンネルマイクロピペット用トレイ	: 試薬の分注用
④冷蔵庫 (4℃付近で温度が安定していること)	: 一次抗体反応用
⑤マイクロプレートリーダー (測定波長 450nm)	: 吸光度測定用
⑥蒸留水	: 洗浄液調製用

3. 測定原理

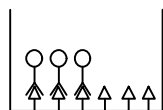


① 8-OHdG を固相化しているマイクロプレートに、調製した試料または 8-OHdG 標準液とモノクローナル抗体を加えます。この抗体は、8-OHdG と特異的に反応するため、固相化 8-OHdG および試料中の 8-OHdG に対し競争的に反応するので、試料中の 8-OHdG 量が多いと、そこに結合する抗体が多くなり、固相化 8-OHdG と結合するモノクローナル抗体量は減少します。



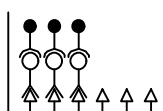
② 洗浄により、試料中の 8-OHdG と結合したモノクローナル抗体が除去されます。(よって、固相化 8-OHdG と結合した抗体のみがここで残ります。)

③ 酵素標識抗体を加えます。これは、固相化 8-OHdG と結合したモノクローナル抗体と結合します。



④ 洗浄により、結合しなかった酵素標識抗体が除去されます。

⑤ 発色液を加えると、酵素標識抗体の酵素活性により呈色 (青色) します。



⑥ 反応停止液を加え、発色反応を停止し、吸光度を測定します(反応液は黄色になります)。試料中の 8-OHdG 量が多いほど、吸光度は低くなります (色が薄くなります)。

4. 実験操作

以下の実験操作は、キットを常温に戻して行ってください。

- ① 第一抗体の瓶に第一抗体溶解液を全量加え、完全に溶かします。（※第一抗体溶解液は希釈せずにそのままご使用ください。）
- ② 8-OHdG 標準液（0.125, 0.25, 0.5, 1, 4, 10 ng/ml）50 μ l をウェルに分注します。同様に、調製した試料 50 μ l も分注します。
- ③ 続いて各ウェルに第一抗体溶液を 50 μ l ずつ分注し、プレートを左右に振動させ、よく混合します。プレートをシールし、4 $^{\circ}$ C で 1 晩反応させます。
- ④ 反応終了後、ウェルの反応液を捨て、蒸留水で 5 倍希釈した洗浄液 250 μ l を分注します。プレートを左右に振動させ、よく洗浄し洗浄液を捨てます。これを 3 回繰り返します。反応液を捨てる際には、プレートを上下反転させ、手作業にて液を完全に切ってください。アスピレーターや自動洗浄装置は適用できません。
- ⑤ 第二抗体の瓶に、第二抗体溶解液を全量加え、完全に溶解します。
- ⑥ 第二抗体溶液 100 μ l を第一抗体と反応させたウェルに分注し、プレートを左右に振動させよく混合します。プレートをシールし、常温で 1 時間反応させます。
- ⑦ 発色剤溶液を調製します。発色剤を発色剤希釈液で 100 倍希釈してください。
- ⑧ 反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液 250 μ l を分注し、④と同様に洗浄を行います。洗浄液がウェルに残っていると発色反応を阻害するので、残らないように注意してください。
- ⑨ ⑦で調製した発色剤溶液 100 μ l を各ウェルに分注しよく混合します。プレートをシールし、常温で 15 分間反応させます。反応中はアルミホイル等でプレートを包み、遮光してください。
- ⑩ 反応停止液 100 μ l をウェルに加え、反応を停止させます。
- ⑪ 定量

反応停止後、プレートを時々振動させ、マイクロプレートリーダーを使用して 450nm における吸光度を測定します。

1) 標準曲線作成

標準液の濃度と吸光度（または透過率）との関係を片対数グラフ用紙（濃度を対数にとる）にプロットし、8-OHdG の標準曲線を作成します。

2) 上記の標準曲線を用い、各サンプルの吸光度（または透過率）から 8-OHdG の濃度を読み取り、試料中の 8-OHdG の濃度を計算します。

注意事項

ホームページ (<http://www.jaica.com/biotech>) に最新の技術情報など掲載しております。

1) サンプルの前処理

下記のようなケースでは正しく測定できない場合がありますので、測定前に前処理を行ってください。またサンプルの凍結融解は避けてください。対象サンプルについて 8-OHdG 標準液を使用した添加回収試験を実施し、前処理を含む測定法の適正を確認されることをお奨めします。サンプル希釈は PBS で行ってください

- a. 尿サンプル：濁り、沈殿物、析出物が見られる場合には 2000~5000G で 10 分程度遠心を行い、上清を測定してください。添加回収試験の結果、回収率が高い場合には PBS にて 3 倍程度希釈してみてください。
- b. 血清サンプル：採血後はできるだけ速やかに血清を分離してください。血清中の高分子成分の影響を除去するため、分画分子量 10,000 の限外濾過膜による濾過処理を行ってください。濾過後のサンプルを PBS で 2 倍以上に希釈すると再現性が高まります。
- c. 組織 DNA：組織から DNA を抽出し、加水分解処理を行ってから測定してください。

2) 測定

- a. サンプル（50 μ L）と一次抗体（50 μ L）の分注精度は測定値に大きな影響を与えます。
- b. インキュベーション時の温度は測定値の精度や再現性に大きな影響を与えます。温度と時間を厳密に管理してください。
- c. サンプルの pH は 6~8 が最適です。
- d. プレート洗浄時に液がウェル内に残っていると測定値に影響を与える場合があります。洗浄後はペーパータオルに叩き付ける等して完全に除去してください。ウェル内には触れないでください。
- e. 発色剤溶液を調製する際の攪拌は穏やかにおこなってください。

3) 分割使用の際の注意点

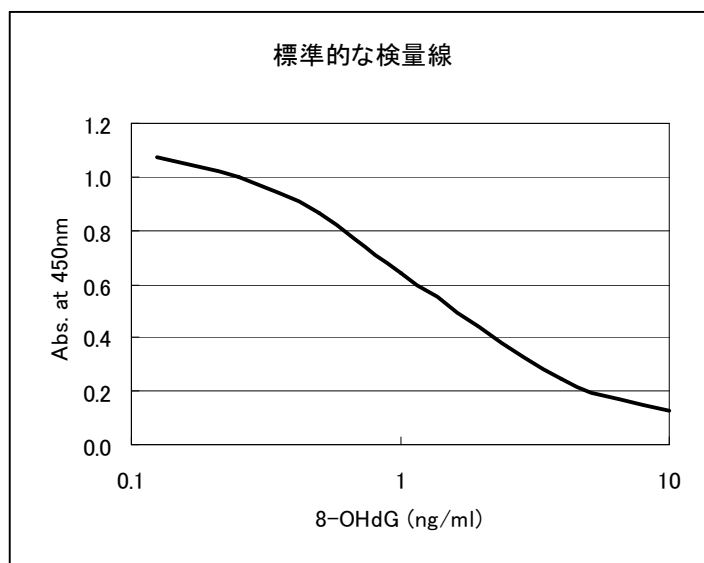
- a. キットを分割使用する場合には、今回使用しないウェルを予め取り外してから操作を開始してください。
- b. 残った反応プレートは入っていた袋に入れ、残った試薬とともに冷蔵保存し 2 週間以内にご使用ください。
- c. 調製した発色剤溶液は保存できません。分割使用される場合にはその都度必要量だけを調製してください。

4) ウェルの配置

- エッジ効果が見られる場合がありますので、最も外側のウェルの使用はご注意ください。各ウェルの温度を一定に保つため、分析に用いないウェルにも他のウェルと同様に分注を行ってください（溶液は試薬でなくてもかまいません）。
- ブランクを用いる場合、実験操作③で第一抗体溶液の代わりにリン酸バッファー等を加えるとそのウェルは発色せず、ブランクウェルとなります。
- 下図はプレート使用の一例です。1サンプルにつき3ウェルずつを使用し、A、H行のウェルは分析に使用していません（図では×印）。この方法では、プレート1枚で18サンプルの分析ができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank (×3)			×	×	×	×	×	×	×	×	×
B	標準 0.125ng/ml (×3)				1	(×3)		7	(×3)		13	(×3)
C	0.25ng/ml (〃)				2	(〃)		8	(〃)		14	(〃)
D	0.5ng/ml (〃)				3	(〃)		9	(〃)		15	(〃)
E	1ng/ml (〃)				4	(〃)		10	(〃)		16	(〃)
F	4ng/ml (〃)				5	(〃)		11	(〃)		17	(〃)
G	10ng/ml (〃)				6	(〃)		12	(〃)		18	(〃)
H	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

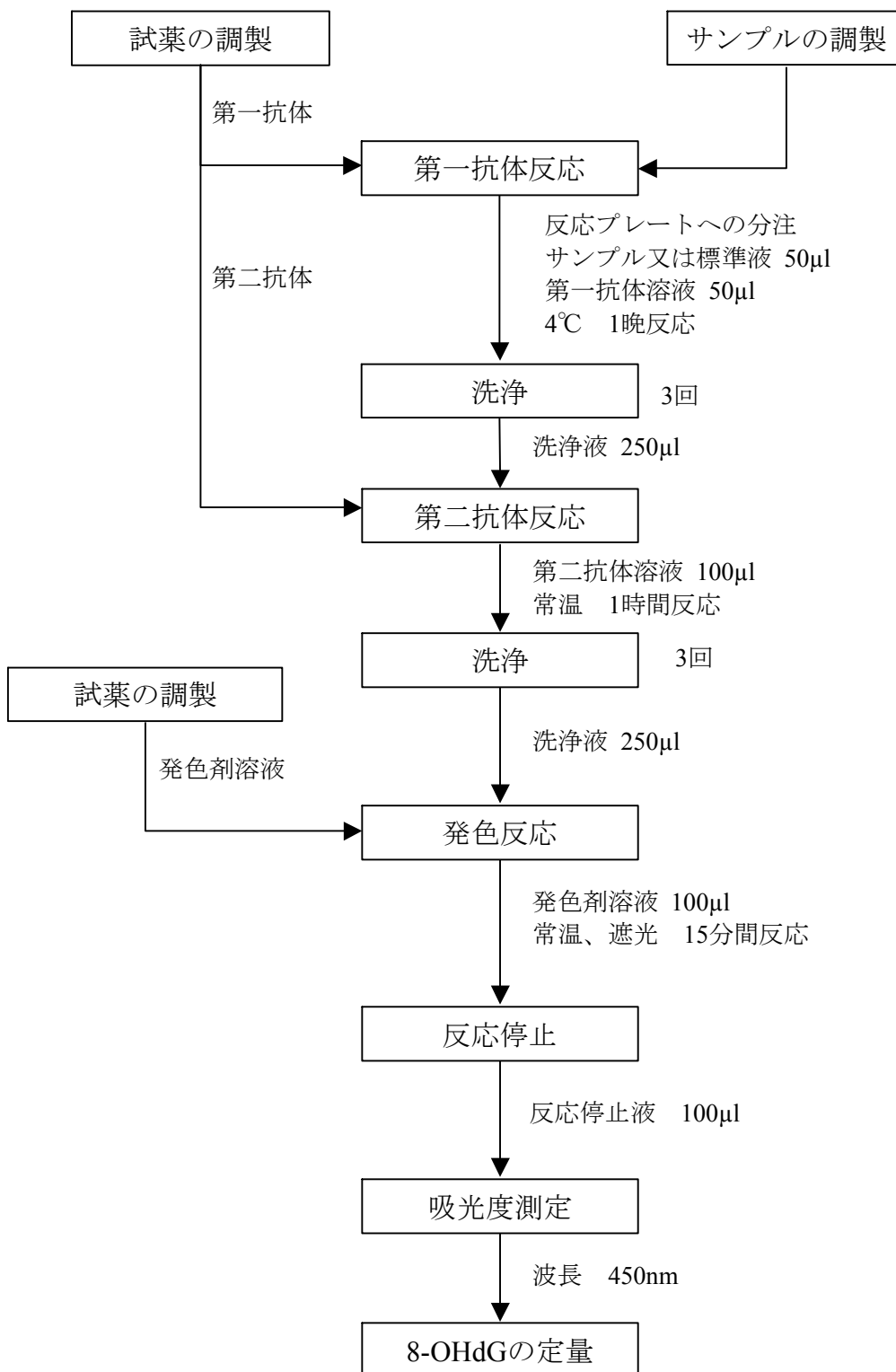
5. 検量線



6. 関連文献

- S.Okamoto, and H.Ochi: *Chemical Abst.* 129859a (1992)
- S.Toyokuni, T.Tanaka, Y.Hattori, Y.Nishiyama, A.Yoshida, K.Uchida, H.Hiai, H.Ochi, and T.Osawa: *Lab.Invest.* 76, 365-374 (1997)
- MD.Evans, MS.Cooke, ID.Podmore, Q. Zheng, KE.Herbert, and J.Lunec: Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: Implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 374-378 (1999)
- MS.Cooke, MD.Evans, KE.Herbert, and J.Lunec: Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine - Source, Significance and Supplements. *Free Radical Research* 32, 381-397 (2000)
- 斉藤 秀、山内 博、蓮井 ゆり、蔵重 淳、越智 宏倫、吉田 勝美: ELISA 法による尿中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの定量法. *臨床検査* 44(8), 913-916 (2000)
- T. Shimoike, T. Inoguchi, F. Umeda, H. Nawata, K. Kawano and H. Ochi: The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism* 49(8), 1030-1035 (2000)
- Wen Ying Fan, Kazunori Ogusu, Katsuyasu Kouda, Harunobu Nakamura, Tomoaki Satoh, Hiroto Ochi and Hiroichi Takeuchi. Reduced oxidative DNA damage by vegetable juice intake: A controlled trial. *J Physiol Anthropol* 19(6) pp287-289 (2000)
- 蔵重 淳. 「DNA 酸化損傷バイオマーカー8-OHdG の測定」 *臨床検査* 45(3) pp271-280 (2001)

7. 測定法フローチャート



【開発・製造元】



日本老化制御研究所

〒437-0122 静岡県袋井市春岡710-1

TEL: 0538-49-0125

Web site: <http://www.jaica.com/>

FAX: 0538-49-1267

E-mail: biotech@jaica.com