

New 8-OHdG Check 使用説明書

このキットは、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。本製品は研究用試薬です。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	: 抗 8-OHdG モノクローナル抗体 (N45.1)	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	: 0.5, 2, 8, 20, 80, 200 ng/ml	各 1 瓶 (各約 1ml)
⑪プレートシール		2 枚

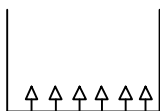
* 保存方法……………未開封の状態冷蔵庫 (2～8℃) に保管して下さい。凍結不可。

* 有効期間……………製造後 1 年 (外箱に記載)。

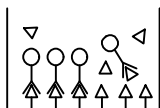
2. 必要な機器

①50μl 用マイクロピペット及びチップ	: 試薬の分注
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
③8 チャンネルマイクロピペット用トレイ	: 試薬の分注
④37℃インキュベーターもしくは恒温水槽	: 反应用
⑤マイクロプレートリーダー (450 nm)	

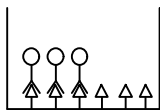
3. 測定原理



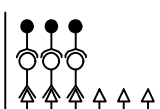
① 8-OHdG を固相化しているマイクロプレートに、調製した試料または 8-OHdG 標準液と抗 8-OHdG モノクローナル抗体を加えます。この抗体は、8-OHdG と特異的に反応するため、固相化 8-OHdG および試料中の 8-OHdG に対し競争的に反応するので、試料中の 8-OHdG 量が多いと、そこに結合する抗体が多くなり、固相化 8-OHdG と結合する抗体量は減少します。



② 洗浄により、試料中の 8-OHdG と結合した抗 8-OHdG 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 と結合した抗 8-OHdG 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下さい。

- ① 第一抗体の瓶に第一抗体溶解液を加え、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下さい。)
- ② 8-OHdG 標準液 (0.5, 2, 8, 20, 80, 200 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、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させます。
- 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、よく洗浄してから洗浄液を捨てます。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ります。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、接触が良くなるようにします。プレートをシールし、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させます。
- ⑦ 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下さい。
- ⑧ 発色剤を発色剤希釈液で 100 倍希釈します。発色剤溶液 100 μ l を反応を行ったウェルに分注し、接触が良くなるようにします。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、遮光して下さい。
- ⑨ 反応停止液 100 μ l をウェルに加え、反応を停止します。
- ⑩ プレートを振動させ、反応停止した後、マイクロプレートリーダーで 450nm における吸光度を測定します。
 - 1) 標準曲線の作成
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

1) 試料の前処理

試料によっては正しく測定できない場合がありますので、下記のように前処理を行ってから測定して下さい。また、試料は凍結融解を繰り返さないよう、予め分注凍結して保存するようにして下さい。対象になる試料について、標準 8-OHdG を用いて添加回収試験を実施し、前処理を含む測定法の適性を確認することをお勧めします。

- a. 尿: 試料が濁っている場合は、2000~5000g で 10~15 分程度の遠心を行い、不溶物を除去してください。上述の添加回収試験での回収率が高い場合は 3 倍程度に希釈して測定することをお勧めします。
- b. 血清: 採血後、速やかに血清を分離して下さい。血清中の反応阻害物質を除去するため、分画分子量 10,000 の限外濾過膜で濾過を行って下さい。なお、限外ろ過はメーカーのマニュアルに従い、行って下さい。また、精度向上のため測定濃度範囲に留意して、2 倍以上に希釈して測定することをお勧めします。
- c. 組織 DNA: 組織から DNA を抽出し、加水分解してから測定して下さい。

2) 測定

- a. インキュベート時の管理について、インキュベート時の条件(温度等)は、特に第 1 抗体反応時、測定値に大きく影響するため、以下の点に注意して下さい。
 - ・ プレート内及びプレート間での温度差をなくし、温度を厳密に一定に保つ。
 - ・ インキュベート用機器としては、ウォーターバスを使用することを推奨する。
- b. 試料(pH 等)について、第 1 抗体反応液(第一抗体溶液とサンプルの混合液)の pH は、6~8 に入るようにするのが望ましい。特に、緩衝力の強い試料は、希釈して測定に用いるのが望ましい。
- c. プレート洗浄方法について、プレート洗浄時、洗浄液がウェルに残っていると、測定値に影響を与えることがあるため、ペーパータオルにプレートをたたきつけるなどして、完全に除去するようにする。
- d. 使用器具について、チップ、マルチピペット用トレイ等の器具は、きれいなものを使用する。特に、トレイは、洗浄して繰り返し使用する場合、煮沸、アルカリ洗剤に浸すなどした後、洗剤等が残らないようによくすすぎ、よく乾燥させた後に使用する。
- e. 発色剤溶液調製の際、希釈時に激しく振りすぎないようにして下さい。

3) 本キットを分割使用する際の注意

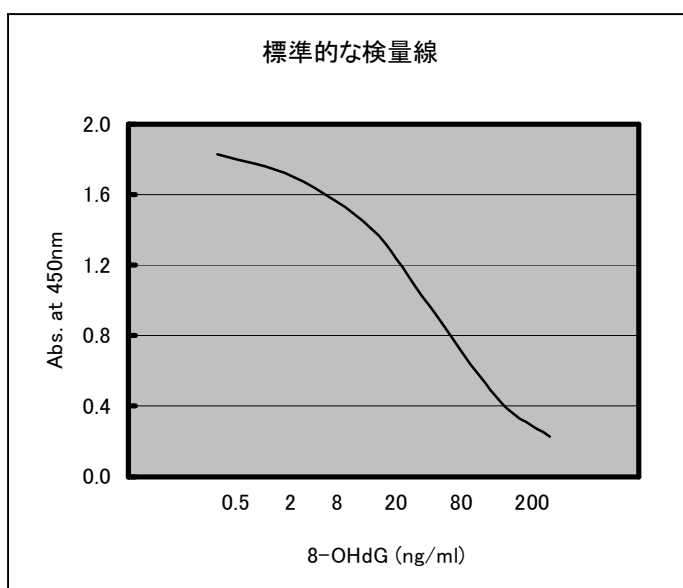
- a. キット開封後、残った試薬などは冷蔵保存して下さい。また、開封後は 2 週間以内に使用して下さい。
- b. 測定時に試薬類を室温に戻す際は、使用する分のみを室温に戻して下さい。
- c. 発色剤(TMBZ)は光が当たらないように注意し、使用相当量のみ希釈するようにして下さい。

4) ウェルの使用

- a. 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）。
- b. 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。
- c. 下図はプレート使用の一例です。1 試料につき 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 試料の分析ができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank (×3)			×	×	×	×	×	×	×	×	×
B	標準 0.5ng/ml (×3)				1	(×3)		7	(×3)		13	(×3)
C	2ng/ml (〃)				2	(〃)		8	(〃)		14	(〃)
D	8ng/ml (〃)				3	(〃)		9	(〃)		15	(〃)
E	20ng/ml (〃)				4	(〃)		10	(〃)		16	(〃)
F	80ng/ml (〃)				5	(〃)		11	(〃)		17	(〃)
G	200ng/ml (〃)				6	(〃)		12	(〃)		18	(〃)
H	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

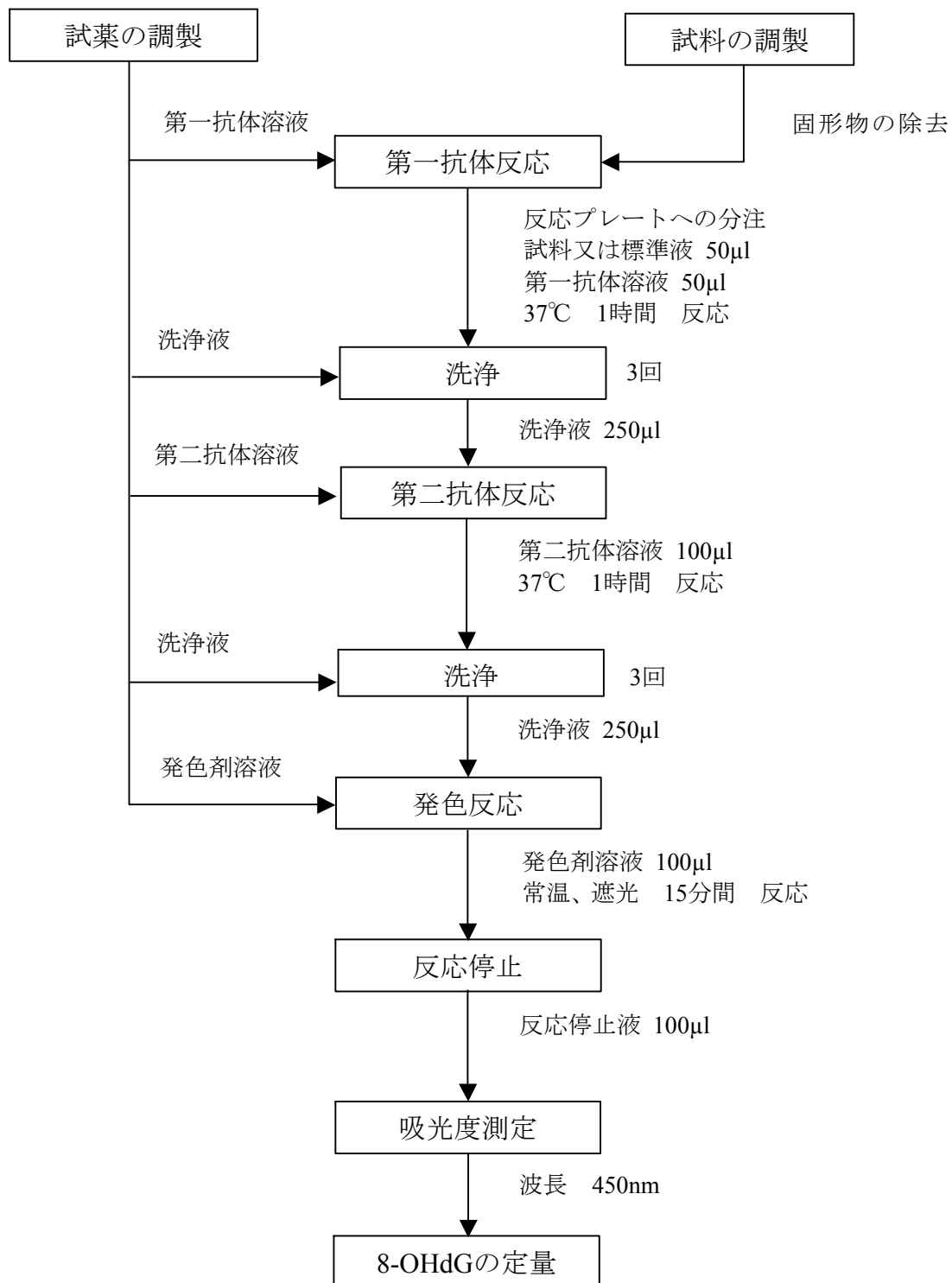
5. 標準曲線



6. 関連文献

1. S.Okamoto, and H.Ochi. *Chemical Abst.* 129859a (1992)
2. S.Toyokuni, T.Tanaka, Y.Hattori, Y.Nishiyama, A.Yoshida, K.Uchida, H.Hiai, H.Ochi, and T.Osawa. *Lab.Invest.* **76**, pp365-374 (1997)
3. M.D.Evans, M.S.Cooke, I.D.Podmore, Q.Zheng, K.E.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** pp374-378 (1999)
4. M.S.Cooke, M.D.Evans, K.E.Herbert, and J.Lunec. Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine - Source, Significance and Supplements. *Free Radical Research* **32** pp381-397 (2000)
5. 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)** pp913-916 (2000)
6. Tomoko Shimoike, Toyoshi Inoguchi, Fumio Umeda, Hajime Nawata, Katsumi Kawano and Hiroto Ochi. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism* **49(8)** pp1030-1035 (2000)
7. WenYing 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)
8. 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

FAX: 0538-49-1267

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

E-mail: biotech@jaica.com