

製品コード MK125

研究用

---

**Takara**

**Mouse Heme Oxygenase-1  
EIA Kit**

---

説明書

v201901Da

生体が環境からストレスを受けると、生体内の各臓器は恒常性を維持するために即座に多様な応答をします。例えば、カドミウム、鉛、水銀などの重金属やエンドトキシンが生体内に侵入した場合、あるいは生体が熱ショック、紫外線、活性酸素、低酸素状態にさらされた場合、臓器内ではストレス応答として様々なタンパク質や酵素が誘導され、生体防御機能が作動します。そのひとつに、ヘモグロビンを始めとするヘムタンパク質の補欠分子族であるヘムに作用するヘムオキシゲナーゼが挙げられます。ヘムオキシゲナーゼにより、ヘムは胆汁色素（ビリベルジン、ビリルビン）と一酸化炭素と還元鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) に分解されます（図1）。この反応により生じるビリルビンには強力なラジカル捕捉作用を介した抗炎症作用があり、一方、一酸化炭素には血管拡張作用を介した臓器血流維持作用やストレス時の精巣の造精機能制御作用が知られています。

ヘムオキシゲナーゼには少なくとも2つのアイソザイム（ヘムオキシゲナーゼ-1とヘムオキシゲナーゼ-2）が確認されています。ヘムオキシゲナーゼ-2 (HO-2) は構成型酵素であるのに対し、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は上記の種々のストレスに反応して細胞内に誘導発現される酵素です。そのため、HO-1のモニタリングはストレス検出に有効であると考えられます。

本キットは、マウスHO-1を認識する二種類の抗体を用いたサンドイッチタイプのELISAキットです。ストレス誘導により発現したマウスのHO-1を簡便かつ高感度に検出することができます。なお、ラットHO-1の測定には、Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit（製品コードMK124）をご利用ください。

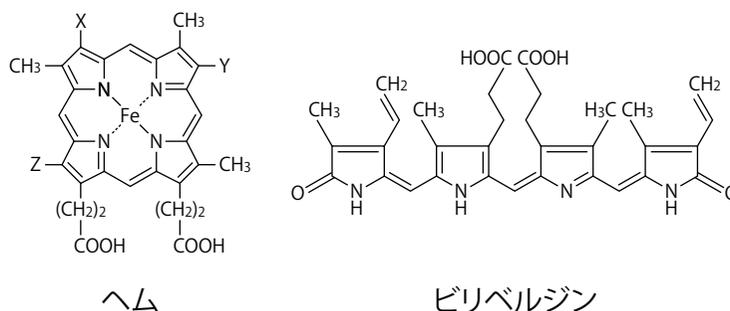
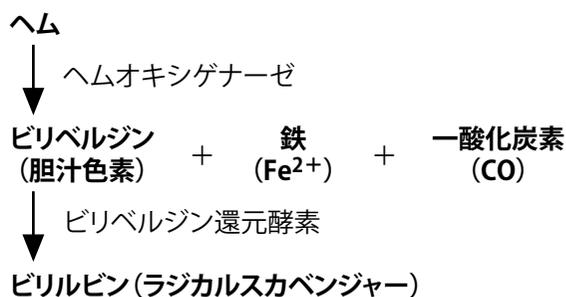
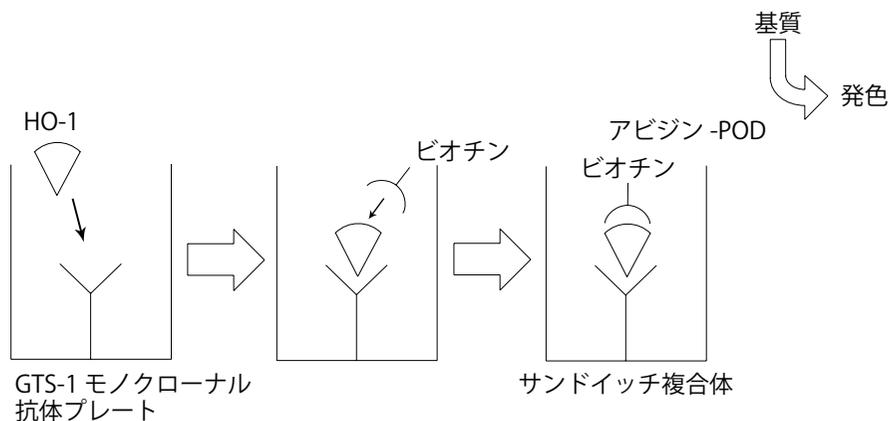


図1. ヘムオキシゲナーゼの反応

## I. キットの測定原理



※ 固相抗体に用いる GTS-1 は、慶應義塾大学医学部医化学教室 末松 誠教授によって開発された抗体です。

## II. キットの内容 (96 回用)

- |  |           |
|--|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate<br>抗マウス HO-1 モノクローナル抗体プレート<br>(96 ウェル : 8 ウェル × 12 strips) | 1 plate   |
| (2) Antibody-Biotin Conjugate (凍結乾燥品)<br>バイオチン標識抗マウス・ラット HO-1 ウサギポリクローナル抗体                     | 11 ml 用   |
| (3) Standard (凍結乾燥品)<br>8 ng HO-1 を含むマウス脾臓抽出物  | 1 ml 用    |
| (4) Sample Diluent<br>25% ブロックエース含有 PBS 含防腐剤   | 11 ml × 2 |
| (5) Avidin-POD Conjugate (凍結乾燥品)<br>ペルオキシダーゼ標識アビジン   | 11 ml 用   |
| (6) Substrate Solution (TMBZ)<br>3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液                                       | 12 ml     |
| (7) Extraction Buffer<br>1% NP40 含有 PBS 含防腐剤   | 11 ml     |

---

### III. キット以外に必要な試薬や器具 (主なもの)

- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)  
洗浄液成分 (10 × PBS; 50 ml × 5 本, Tween 20; 3 ml) と反応停止液 (60 ml) \* のセットです。  
\* : 本品は、1N 硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液です。
- 反応停止液として 1N 硫酸も使用できます。  
1N 硫酸の取扱いには充分にご注意ください。  
<ご注意> 1N 硫酸は腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手や粘膜についた場合は、ただちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)

### IV. 保存 4°C

### V. 使用目的

マウスの血清や組織、あるいはマウスの培養細胞や培養上清中の HO-1 量の測定

### VI. 使用方法

#### 1. 検体

- マウス培養細胞抽出液、細胞培養上清および血漿、血清等を用いる。
- 検体は測定時に調製するのが望ましい。12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- マウス血清および臓器抽出物の場合、検体を (4) Sample Diluent を用いて 2 倍から 8 倍に希釈して測定するのが適当である。誘導の程度により希釈倍率が変わることが予想される。
- 臓器は秤量後、(7) Extraction Buffer を用いてホモジナイズし、その遠心上清を測定用サンプルとする。(標準: 1.5 ml のマイクロチューブにより 10,000 rpm、5 分)

#### 2. 試薬の調製

- 抗体プレート ((1) Antibody Coated Microtiterplate)  
使用前に室温に戻してから開封する。
- ビオチン標識抗体液およびペルオキシダーゼ標識アビジン溶液  
(2) Antibody-Biotin Conjugate は蒸留水 11 ml で溶解する。  
(5) Avidin-POD Conjugate は蒸留水 11 ml で溶解する。  
溶解後、4°C で 1 週間は安定である。それ以上保存する場合には -20°C 以下で凍結する。この状態で 1 か月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- Mouse HO-1 標準液  
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加え溶解し、Mouse HO-1 標準液 (8 ng/ml) を調製する。  
これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。ゼロ濃度は (4) Sample Diluent を用いる。  
Mouse HO-1 標準液 (8 ng/ml) は -80°C 以下保存で 1 週間安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。なお、希釈した標準液はその日のうちに使用すること。

- 
- 基質液 ((6) Substrate Solution (TMBZ))  
反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色する恐れがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。  
数回に分けて使用する場合はあらかじめ必要量を取り分けるようにする。
  - 反応停止液 (Stop Solution) \*  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。  
\* : 粘度の高い溶液であるため、投入後プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
  - 洗浄用 0.1% Tween 20 含有 PBS  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の 10 × PBS 1 本 (50 ml) を蒸留水で 500 ml に希釈し、さらに Tween 20 を 500 μl 添加する。十分に混合後、洗浄用バッファー (0.1% Tween 20/PBS) として使用する。

### 3. 操作法

測定は二重測定で行う。キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

1. 各濃度の Mouse HO-1 標準液およびサンプルを 100 μl ずつマイクロピペットで 2 連ずつ各ウェルに加え、さらに調製したビオチン標識抗体液を 100 μl ずつ添加する。室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。試薬ならびにサンプルはあらかじめ別の 96 穴プレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 加える。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。  
[第一反応]
2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジン溶液を 100 μl ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。  
[第二反応]
3. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、基質液を 100 μl ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 10 ~ 15 分反応させる。  
[第三反応]
4. 反応停止液を 100 μl ずつ、基質液を入れた順番に各ウェルに加え、反応を停止させた後よく混和する。
5. 蒸留水を対照としてゼロ調整し、波長 450 nm で吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。
6. グラフ用紙の横軸に各 Standard の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、サンプルの吸光度から対応する Mouse HO-1 濃度を読み取る。

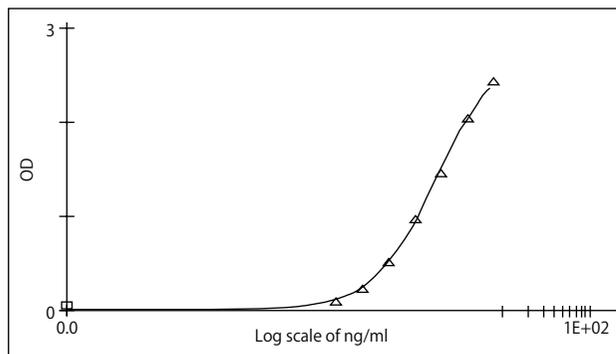
## VII. 性能

### 1. 標準曲線 (Mouse HO-1 EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最小検出感度：0.125 ng/ml

Curve Fit ; 4-Parameter  
 $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$   
A = 0.0349 B = 1.20 C = 1.85 D = 2.86  
Corr. Coeff : -1.00



Mouse HO-1 濃度 (ng/ml)	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.250	0.125	0.0
A450	2.444	2.065	1.474	0.982	0.543	0.238	0.115	0.064

(発色時間：15分)

### 2. 特異性

マウスおよびラット HO-1 に反応し、HO-2 には反応しない。ヒトおよびウサギ、モルモット HO-1 に対しては反応せず、測定対象とはならない。ラットの HO-1 標準品を組み合わせることでラット HO-1 の測定も可能であるが、その目的には2つのモノクローナル抗体を用いた Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit (製品コード MK124) の使用を推奨する。

### 3. 再現性

<同時再現性試験>

マウス脾臓抽出物を希釈して作製した3種類の濃度コントロールを用いて再現性試験を実施した。

検体 (n = 16)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	2.629	7.36
コントロール B	1.124	8.14
コントロール C	0.521	6.47

<日差再現性試験>

3日間にわたり3種類の濃度コントロールの定量を行い、再現性試験を実施した。

検体 (n = 3)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	3.197	3.01
コントロール B	1.035	3.80
コントロール C	0.446	4.13

#### 4. 添加回収試験

さまざまな濃度の検体サンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値とから回収率を調べた。

サンプル A	サンプル B	A + B (実測値)	A + B (理論値)	回収率 (%)
2.620	1.076	1.854	1.848	99.8
2.620	0.554	1.802	1.587	113.5
2.620	0.296	1.411	1.458	96.8
2.620	0.157	1.203	1.389	86.6
1.179	0.554	0.975	0.870	112.0
1.179	0.296	0.763	0.738	103.4
1.179	0.157	0.703	0.668	105.2
0.602	0.157	0.406	0.380	106.8
0.345	0.296	0.371	0.321	116.0
0.345	0.157	0.265	0.251	105.6

単位 ng/ml

#### 5. サンプルの凍結融解の影響

凍結融解の Mouse HO-1 濃度に対する影響を調べた。マウス脾臓抽出物を 3 段階に希釈して作製した検体サンプルを用いて、25℃と - 80℃で凍結融解を繰り返して、その融解ごとにサンプリングを行った。最終サンプルを得たのち、すべてのサンプルを同時に定量した。表に示す結果から、サンプルの凍結融解の影響を比較的受けにくい系であると判断された。

融解回数	検体濃度		
	高	中	低
1	4.036	2.237	1.070
2	4.311	2.244	1.137
3	5.343	2.722	1.167
4	4.899	2.188	1.383
5	4.439	2.424	1.183
6	4.333	2.387	1.232
7	4.083	2.341	1.172
8	4.215	2.168	1.120
CV (%)	10.07	7.95	9.293

#### 6. 測定上の注意

- (1) ストレスの程度により誘導される HO-1 の発現量は大きく異なりますので、たとえばサンプル測定の際には、2 倍希釈系列などを調製してから測定し、検量線内に入ったところで濃度換算してください。
- (2) ひとつの実験系では、できるだけ同一の希釈倍率で測定し、相対評価されるようにお勧めします。
- (3) 注射の際に行うエーテル麻酔などでも、強力なストレス要因となりますので、その影響を見極めるために、麻酔のみという対象個体を設定するようにしてください。

## VIII. 実験例

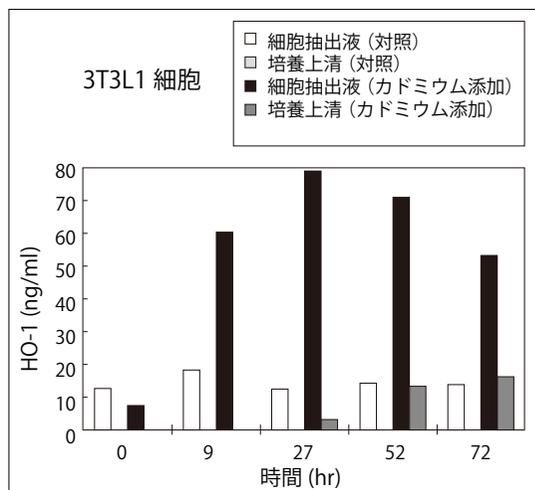
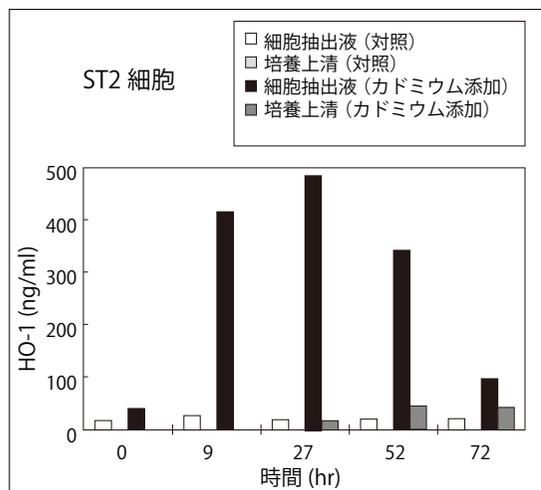
### 1. マウス培養細胞でのカドミウム暴露試験

#### 【方法】

3T3L1 細胞（マウス Swiss albino 胎児由来細胞）と ST2 細胞（マウスストローマ細胞）の 2 種類の培養細胞を用いて以下の実験を行った。継代用にトリプシンで分散させた細胞をウシ血清を含む培地（ウシ血清培地）で懸濁し、24 穴プレートの各ウェルに 1 ml ずつ加えた ( $10^5$  cell/ml/well)。さらにウシ血清培地で調製した 20  $\mu$ M 塩化カドミウム溶液を 1 ml ずつ添加し（終濃度 10  $\mu$ M）、72 時間の培養を行った。なお、ウシ血清培地からのみ添加と対照とした。経時的（0、9、27、52、72 時間）にウェル中の培養上清の回収と細胞抽出液の調製を行った。細胞抽出液の調製は、ウェルから上清回収した後、キット中の細胞抽出用緩衝液をウェルに 0.2 ml 加え、軽くピペティングすることによって行った。各サンプルは測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。所定の各時点のサンプル（上清および細胞抽出液）がすべてそろった後、それらのサンプル中の HO-1 の産生量を本キットを用いて一度に測定した。測定に際しては、濃度予測が見つからないため、3 倍希釈系列を調製して測定し、検量線測定範囲に入った希釈サンプルの濃度換算値をデータとして採用した。

#### 【結果】

2 種類の細胞いずれにおいても、塩化カドミウム添加後、9 時間あたりで細胞内に HO-1 の強い誘導が見られた。その後、細胞内濃度がピークを過ぎた頃から、培養上清中への HO-1 の流失が見られた。顕微鏡観察すると、いずれの細胞でもカドミウムによるダメージが観察され、細胞数の増加は無く、逆に ST2 細胞では減少が見られた。



## 2. 溶血成分による測定への影響

溶血成分の混入により測定が影響を受けるかどうかを検討した。

### 【方法】

マウスの脾臓 5 個体分を 10 ml PBS を含むステンレスメッシュ上ですりつぶし、細胞を分散させた。遠心（卓上遠心機 3,000 rpm）して細胞を沈殿として集め、10 ml の PBS で再び懸濁して洗浄後、再度沈殿として回収した。この洗浄操作を計 2 回繰り返した後、マウスの脾細胞懸濁液をそれぞれ 2 本の 15 ml 遠心チューブに 5 ml ずつ分注した。一方のチューブに対しては、遠心して上清を除いた後、塩化アンモニウムを含む溶血剤を 5 ml 加え、室温で 5 分放置して赤血球をバーストさせた。遠心して細胞を集め、PBS で 1 回洗浄後、1 ml の細胞抽出用緩衝液を加えて懸濁した。（溶血処理サンプル：ヘモグロビンを除去）他方のチューブに対しては、そのまま遠心して細胞を集め、1 ml の細胞抽出緩衝液を加えて懸濁した（未処理サンプル：ヘモグロビン類をサンプル中に含む）これらのサンプルについて、本キットを用いて測定を行った。

### 【結果】

溶血成分（ヘモグロビン類）の混入により、若干の反応阻害（測定低値）が認められた。したがって、測定の際にはサンプルの状態に注意する必要がある。

サンプル希釈率		× 5	× 25	× 125	× 625	× 3125
マウス脾臓	未処理	3.449	1.084	0.304	0.157	0.099
	溶血処理	3.575	1.736	0.616	0.234	0.107

※数値は A<sub>450</sub> の値を示す

### 3. カドミウムの腹腔内投与によるマウス血中 HO-1 の誘導

塩化カドミウムをストレッサーとしてマウスの腹腔内に投与することにより、血中への HO-1 の産生量を調べた。

#### 【方法】

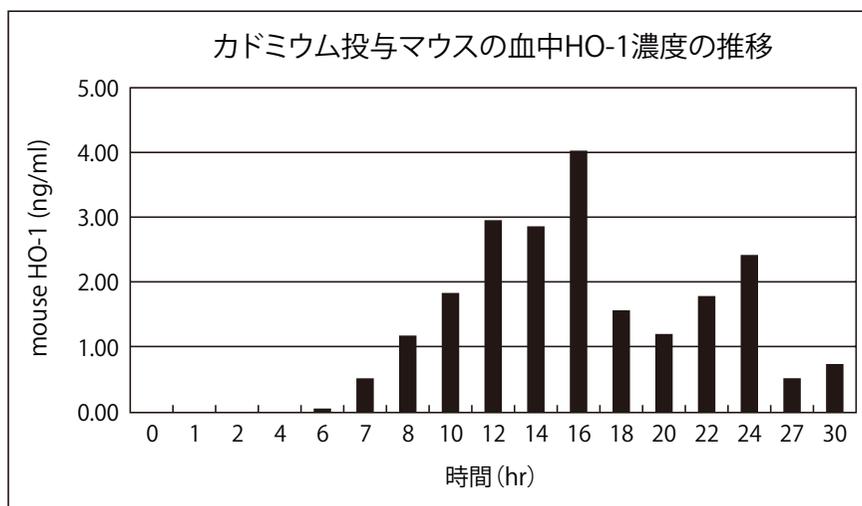
塩化カドミウム (20  $\mu\text{mol/kg}$  体重) を BALB/c マウス (平均体重 25 g) 腹腔内に投与し、経時的に 1 個体ずつ全採血を行った。血清画分を集め、測定時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定時に、血清サンプルは 5 倍希釈系列を作製し、測定に供した。最終的に、5 倍希釈物での実測値を採用し、濃度換算値を算出した。なお、測定は 2 度に分けて行っており、投与後 1 時間から 30 時間までの間に 9 ポイント\*と、別系列で、7 時間から 22 時間までの間に 9 ポイント▲の測定を行った。

#### 【結果】

投与後、7 時間経過ごろから血中で有意に HO-1 が検出できるようになった。30 時間以降に HO-1 の消失がみられた。今回、所定時の測定で、1 個体のサンプルしか用いていないため、個体差の影響が生じている可能性があるが、投与後 12 時間から 16 時間の間に HO-1 の誘導ピークが存在するということがわかった。

	ブランク 0 hr.*▲	カドミウム投与後の時間							
		1 hr.*	2 hr.*	4 hr.*	6 hr.*	7 hr.▲	8 hr.▲*	10 hr.*▲	12 hr.▲
濃度換算値 (ng/ml)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.505	1.175	1.835	2.945

	カドミウム投与後の時間							
	14 hr.▲	16 hr.▲	18 hr.▲	20 hr.▲	22 hr.▲	24 hr.*	27 hr.*	30 hr.*
濃度換算値 (ng/ml)	2.840	4.020	1.550	1.195	1.765	2.420	0.515	0.720



## IX. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットや試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に、試薬に強い光が当たらないようにしてください。
3. (6) Substrate Solution (TMBZ) および反応停止液に用いるピペット等は、金属が使用されていないものを用いてください。
4. 皮膚や粘膜に (6) Substrate Solution (TMBZ) や反応停止液がつかないようにご注意ください。
5. 着色した (6) Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
6. 各反応は時間と温度の影響を受けますので、測定ごとに標準曲線を作成してください。
7. 血液検体の取扱いには充分注意してください。

## X. 関連製品

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)  
Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit (製品コード MK124)

## XI. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**