

マウス・ヘムオキシゲナーゼ-1の測定に!!

Mouse Heme Oxygenase-1 EIA Kit(Precoated)

Code MK125 96回用 ¥98,000

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にストレス誘導されたヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)を簡便に測定するEIAキットです。

全操作時間は2時間30分です。

ヒト、ウサギ、モルモットのHO-1とは交差反応しません(ラットのHO-1とは交差反応します)

ヘムオキシゲナーゼについて

生物は外的環境から、紫外線、熱ショック、低酸素状態、活性酸素、エンドトキシンや重金属など、絶えず種々のストレスを受けています。それらストレスによって生体内のヘムタンパク質は壊れてヘムを生じますが、ヘムオキシゲナーゼはこのヘムをさらに分解し、胆汁色素(ビリベルジン、ビリルビン)とCOとFeに分解します。この酵素によって生成したビリルビンは強力なラジカル捕捉作用があり、またCOは活性酸素の除去作用があります。ヘムオキシゲナーゼには2つのアイソザイムがあり、ストレスにตอบสนองして細胞内に誘導されるタイプがⅠ型(HO-1)で、構成的に発現しているタイプがⅡ型(HO-2)です。

本キットはこのHO-1を測定するキットです。

ヘム

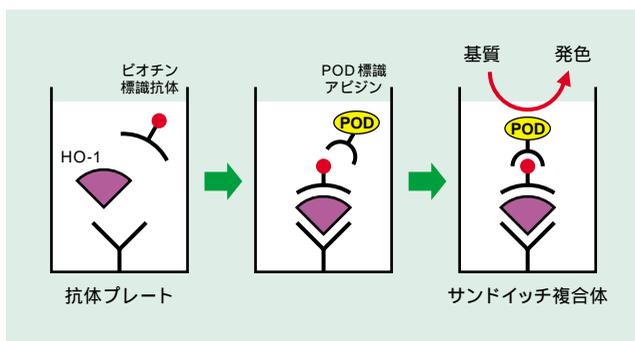
ヘムオキシゲナーゼ

ビリベルジン(胆汁色素)+鉄(Fe)+一酸化炭素(CO)

ビリルビン(ラジカルスカベンジャー)

測定原理

本キットは、固相抗体に抗マウスHO-1モノクローナル抗体(GTS-1)を用いており、まず検体中のHO-1(抗原)をプレート上に捕捉します。同時に、ビオチン標識した抗マウス・ラットHO-1ウサギポリクローナル抗体を加え、プレート上に捕捉されたHO-1と結合させます。続いて、この複合体にペルオキシダーゼ標識アビジンを結合させ、基質発色反応を行って抗原抗体反応を可視化します。



なお、固相抗体に用いるGTS-1は、慶応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HO-1モノクローナル抗体で、マウス、ラット、ヒトの抗原に反応します。標識抗体として抗マウス・ラットHO-1ウサギポリクローナル抗体を用いることで、マウスのHO-1の測定を実現しています。ラットのHO-1標準品を組み合わせることでラットのHO-1の測定も可能ですが、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(Code MK124)の使用をお勧めします。

キットの内容(96回用)

抗マウスHO-1モノクローナル抗体プレート (96 well : 8 well x 12 strips)	1 plate
ビ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(凍結乾燥品)	11 ml 用
ペルオキシダーゼ標識アビジン(凍結乾燥品)	11 ml 用
標準品(マウスHO-1含有脾臓抽出物)(凍結乾燥品)	1 ml 用
検体希釈液	11 ml x 2
基質液(TMBZ : 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)	12 ml
細胞抽出用緩衝液	11 ml
反応停止液(1 N 硫酸)	12 ml

操作法

抗体プレートにサンプルおよび標準品(100 µl)添加、続いてビオチン標識抗HO-1ポリクローナル抗体(100 µl)添加

20 ~ 30 (室温) 1時間反応

洗浄3回(0.1% Tween/PBS)

ペルオキシダーゼ標識アビジン(100 µl)添加

20 ~ 30 (室温) 30分反応

洗浄4回(0.1% Tween/PBS)

基質液(100 µl)添加

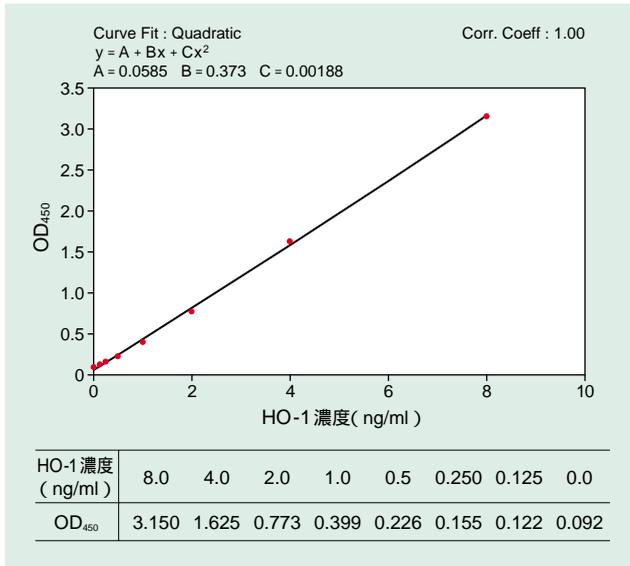
20 ~ 30 (室温) 15分反応

反応停止液(100 µl)添加

450 nm の吸光度測定

性能

(1) 測定範囲および検出感度



(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。

(3) 再現性

同時再現性: 3濃度、n = 16で測定 CV = 6.5 ~ 8.1%

日差再現性: 3濃度、3日間測定 CV = 8%以下

(4) 添加回収率

90 ~ 110%

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、例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、相対評価することをお勧めします。
- (3) 注射の際に行うエーテル麻酔なども、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、対照として麻酔コントロール個体を設定するようにしてください。

実験例1: マウス培養細胞でのカドミウム暴露試験

【方法】

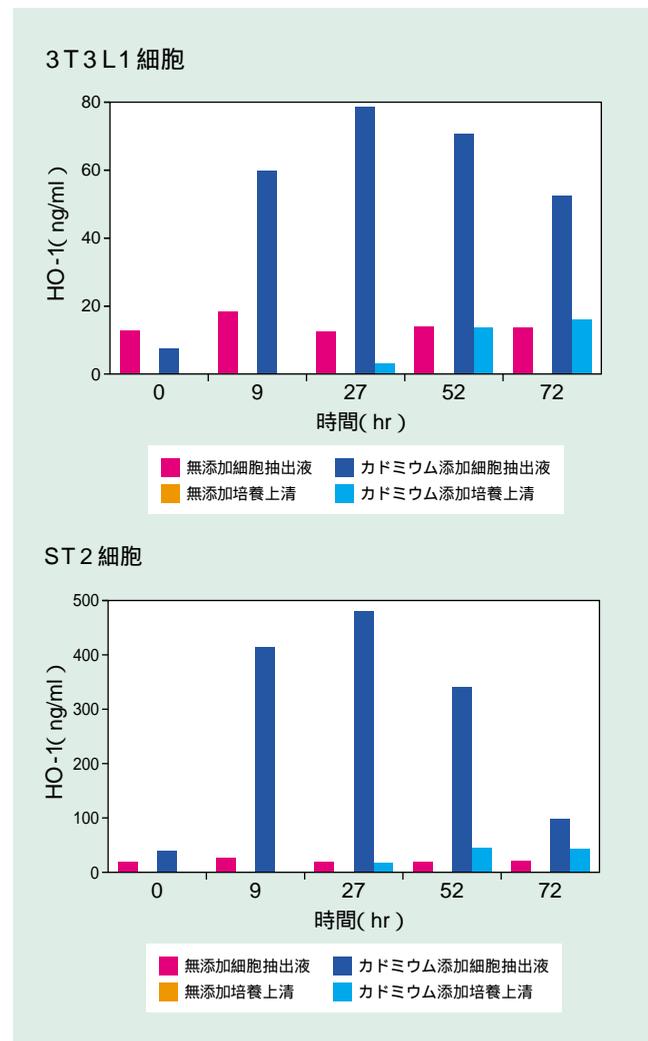
3T3L1細胞(マウス Swiss albino 胎児由来細胞)とST2細胞(マウス・ストローマ細胞)の2種類の培養細胞を用いて以下の実験を行った。継代用にトリプシンで分散させた細胞をウシ血清を含む培地(ウシ血清培地)で懸濁し、24穴プレートの各ウェルに1mlずつ加えた。さらに、ウシ血清培地で調製した20μM塩化カドミウム溶液を1mlずつ添加し(終濃度10μM)、72時間の培養を行った。なお、ウシ血清培地のみの

添加を対照とした。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、ウェルから上清を回収した後、キット中の細胞抽出用緩衝液をウェルに0.2ml加え、軽くピペティングすることによって行った。各サンプルは測定時まで-20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、濃度予測がつかないため、3倍希釈系列を調製してそれぞれについて測定し、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種類の細胞の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。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、細胞数の増加はなく、逆にST2細胞では減少が見られた。



実験例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 3000 rpm)して細胞を沈殿として集め、10 mlのPBSで懸濁して洗浄した後、再び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：溶血成分を含まない)。

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の細胞抽出用緩衝液を加えて懸濁した(未処理サンプル：溶血成分を含む)。

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】

溶血成分の混入により、若干の反応阻害(測定低値)が認められた(表1)。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。

表1 溶血成分による測定への影響

サンプル希釈率		× 5	× 25	× 125	× 625	× 3125
マウス脾細胞	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OD₄₅₀の値を示す。

実験例3：カドミウムの腹腔内投与によるマウスの血中HO-1の誘導

塩化カドミウムをストレス剤としてマウスの腹腔内に投与することによる、血中HO-1の産生量を調べた。

【方法】

塩化カドミウム(20 μmol/kg 体重)をマウス(平均体重25 g)の腹腔内に投与し、経時的に1個体ずつから全採血を行った。血清画分を集め、測定時まで-80℃で保管した。測定時に、血清サンプルの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。

【結果】

投与後、6時間以降に血中のHO-1が上昇し、30時間以降にHO-1の消失が見られた。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、個体差の影響が出ている可能性があるが、投与後8時間から24時間の間にHO-1の誘導ピークが存在すると推察された。

表2 カドミウムの腹腔内投与によるマウス血中HO-1の誘導

	カドミウム投与後の時間(hr)									
	0	1	2	4	6	8	10	24	27	30
実測値	0.074	0.323	0.131	0.323	0.232	2.867	3.003	2.269	0.900	0.631
換算値	0.370	1.615	0.655	1.615	1.160	14.335	15.015	11.345	4.500	3.155

* 実測値：OD₄₅₀、換算値の単位：ng/ml

関連新製品

Anti-Heme Oxygenase-1(GTS-1) Monoclonal, POD

Code M177 0.05 mg ¥58,000

- ・マウス、ラット、ヒトのヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)に反応するモノクローナル抗体(GTS-1)をペルオキシダーゼ標識した製品です。
- ・GTS-1をPODで直接標識しているため、標識二次抗体を必要とせず、またバックグラウンドの低い測定が可能です。
- ・マウス、ラット、ヒト由来のHO-1のウェスタンブロット解析などに有用です。

本製品を用いてウェスタンブロット解析を行った実験例を本誌16～17ページにご紹介しておりますので、ご参照ください。