

製品コード MK124

研究用

TAKARA

**Rat Heme Oxygenase-1
EIA Kit**

説明書

v201608Da

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たんぱく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、ヘモグロビンをはじ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 (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巢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ッサーに反応して細胞内に誘導発現される酵素です。そのため、ヘムオキシゲナーゼ-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、ラットヘムオキシゲナーゼ-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ヘムオキシゲナーゼ-1を簡便かつ高感度に検出することができます。

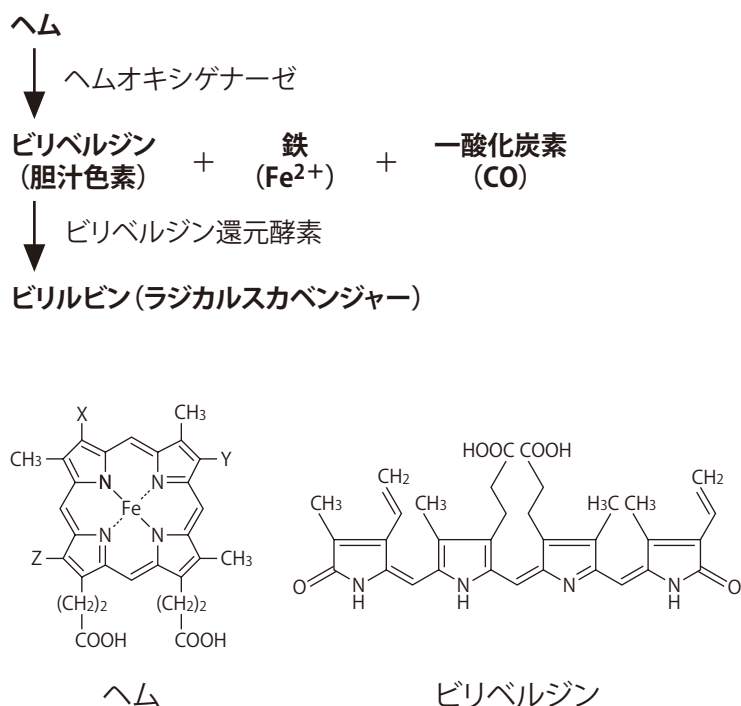
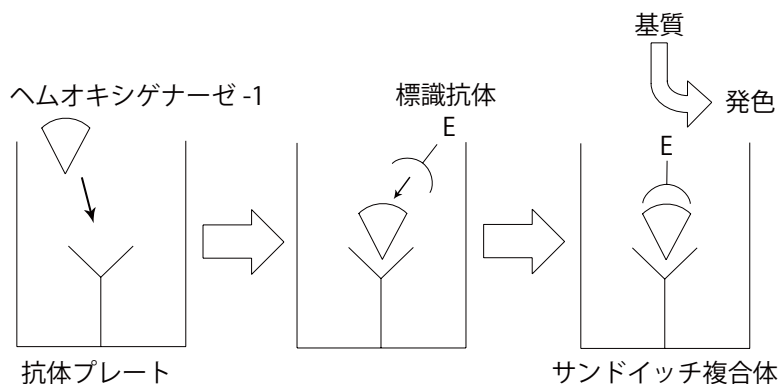


図. ヘムオキシゲナーゼの反応

I. 測定原理



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗ラット HO-1 モノクローナル抗体コーティングプレート (96 ウェル：8 ウェル× 12 strips)	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品) ペルオキシダーゼ標識抗ラット HO-1 モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) ラット HO-1 含有標準物質 8 ng	1 ml 用
(4) Sample Diluent 25% ブロックエース含有 PBS 含防腐剤	11 ml×2
(5) Substrate Solution (TMBZ) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液	12 ml
(6) Extraction Buffer 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

ラットの細胞培養上清中及び血液や各種臓器中に誘導発現したヘムオキシゲナーゼ-1の定量。使用している抗体の性質上、ヒトのヘムオキシゲナーゼ-1は測定できない。

VI. 使用方法

1. 検体の調製方法

- ・ 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。
- ・ 血液検体としては主に血清を用いる。
- ・ ラット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、(6) 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。
- ・ 標識抗体液
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。溶解後は4℃で1週間安定である。それ以上保存する場合は-20℃で凍結保存する。この場合、1ヵ月安定であるが、凍結融解は1回が限度である。
- ・ ラット HO-1 標準液
(3) Standard に蒸留水 1 ml を加えて溶解し、ラット HO-1 標準液を調製し、最高濃度とする (8 ng/ml)。これを (4) Sample Diluent で段階希釈して 4、2、1、0.5、0.25 および 0.125 ng/ml の各濃度の標準液を調製する。0 濃度は (4) Sample Diluent を用いる。希釈した標準液はその日のうちに使用する。希釈前の標準液 (8 ng/ml) は-80℃保存で1ヶ月間安定である。凍結融解による影響は比較的少ないが(後述データ参照)、3回程度にとどめるのがよい。
- ・ 基質液 (5) Substrate Solution (TMBZ)
反応に用いる前に室温に戻し、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青色に変色していないことを確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないように注意する。数回に分けて使用する場合は、あらかじめ必要量を分注しておくようにする。
- ・ 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検体は使用前に室温に戻し、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。
1. 各濃度のラット HO-1 標準液および検体を、マイクロピペットで 96 ウェル抗体プレートの各ウェルに 100 μ l ずつ 2 連で加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応させる。この場合、サンプルをあらかじめ別の 96 ウェルプレートに用意しておき、8 連ピペットなどで速やか (5 分以内) に抗体プレートに移すようにする。プレート内の測定値の信頼性を高めるためにも、1 列目と 12 列目の両方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、8 連ピペットなどを用いて標識抗体液を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応する。
[第二反応]
 3. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、8 連ピペットなどを用いて (5) Substrate Solution (TMBZ) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 10 ~ 15 分反応させる。[第三反応]
 4. (5) Substrate Solution (TMBZ) を加えた順番で Stop Solution を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、反応を停止させた後よく混和する。
 5. マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間まで安定である。
 6. グラフ用紙の横軸に各標準液の濃度を、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、検体の吸光度から対応するラット HO-1 濃度を読みとる。

<測定上の注意>

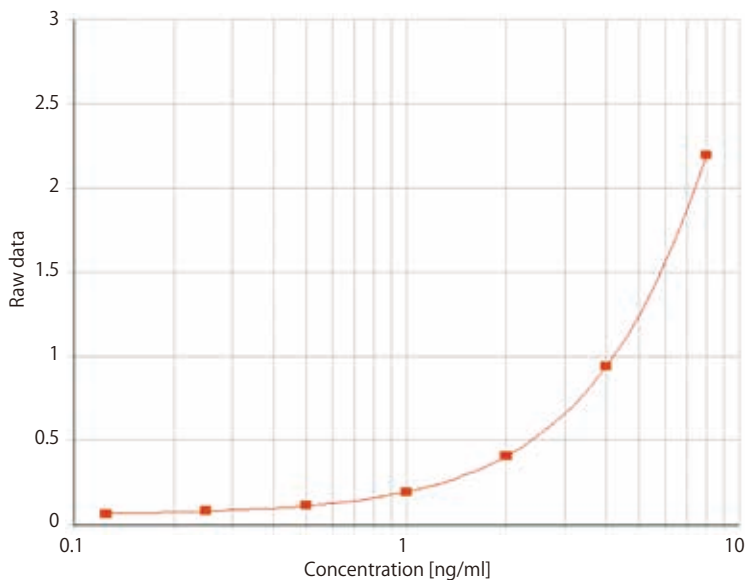
- 1) ラット組織抽出物やラット血清を測定サンプルとして用いる場合、ストレスの程度によりヘムオキシゲナーゼ -1 の発現量が大きく異なりますので、例えば 2 倍希釈系列などを調製してから測定し、検量線内に入ったところで濃度換算してください。
- 2) 原液をサンプルとして用いた場合の測定値は、血清中や組織中の高濃度のタンパク質の影響により、2 倍希釈液をサンプルとして用いた場合の測定値よりも低値に測定される傾向があります。継続的に行う実験では、常に同一の希釈倍率で測定することをお勧めします。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Rat 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



Rat HO-1 濃度 (ng/ml)	8.000	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.000
A450	2.194	0.938	0.404	0.193	0.112	0.081	0.062	0.050

2. 再現性

<同時再現性>

ラット HO-1 陽性サンプル (肝臓、脳由来) を希釈して作製した 3 種類のサンプルを用いて同時再現性試験を実施した。(n = 16)

平均濃度 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
5.646	0.117	2.07
3.600	0.079	2.18
0.726	0.018	2.52

<日差再現性>

ラット HO-1 陽性サンプル (肝臓、脳由来) を希釈して作製した 4 種類のサンプルを用いて、3 日間にわたり測定を行い、日差再現性試験を実施した。(n = 3)

平均濃度 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	CV (%)
11.901	0.280	2.35
4.441	0.210	4.73
2.907	0.106	3.65
0.673	0.033	4.87

3. 添加回収率

様々な濃度のサンプルを足し合わせ、理論値と実測値から添加回収率を算出した。

サンプル濃度		A + B/2 実測値	A + B/2 理論値	回収率 %
A	B			
8.97	8.97	8.97	8.97	100
8.97	4.96	7.26	6.97	104
8.97	3.60	6.41	6.29	102
8.97	1.73	5.45	5.35	102
4.96	4.96	4.96	4.96	100
4.96	3.60	4.55	4.28	106
4.96	1.73	3.28	3.35	98
3.60	3.60	3.60	3.60	100
3.60	1.73	2.62	2.67	98
3.60	0.66	2.36	2.13	111
1.73	1.73	1.73	1.73	100
1.73	0.66	1.23	1.20	103
0.66	0.66	0.66	0.66	100
0.66	0.00	0.37	0.33	112

単位 ng/ml

VIII. 測定に関する参考資料

1. 抗体の特異性

測定系に用いている2種の抗体は、ラット・ヘムオキシゲナーゼ-1に特異的に反応し、ラット・ヘムオキシゲナーゼ-2には反応しない。ヒト抗原、ウサギ抗原、モルモット抗原、マウス抗原は測定対象にならない。

捕捉用抗体 (GTS-3) (文献 4)

標識用抗体 (GTS-1) (文献 1、2、3)

2. 抗原の安定性

異なる濃度のラット HO-1 陽性サンプル (4 濃度) を用いて、強制的に $-80^{\circ}\text{C} \sim +20^{\circ}\text{C}$ までの凍結融解を 10 回くり返した時の測定値を求めた。具体的には、一定量のサンプルから凍結融解ごとに、二重測定用として 0.3 ml ずつのサンプリングを行い、10 回目のサンプリングが終了した時点で一度に測定を実施した。

【結果】

4 濃度とも変動計数が 3% 以下となり、凍結融解による測定値への影響は少ないと判定された。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sample A	1.361	1.374	1.372	1.345	1.375	1.364	1.355	1.400	1.390	1.423
Sample B	2.302	2.306	2.303	2.351	2.289	2.346	2.283	2.343	2.339	2.437
Sample C	2.668	2.666	2.627	2.634	2.600	2.643	2.621	2.649	2.675	2.706
Sample D	6.631	6.602	6.494	6.546	6.488	6.431	6.411	6.402	6.556	6.521

最上段は凍結融解回数、下段の数値は測定濃度値

	平均濃度 (ng/ml)	標準偏差 (ng/ml)	変動係数 (%)
Sample A	1.376	0.024	1.7
Sample B	2.330	0.055	2.4
Sample C	2.649	0.037	1.4
Sample D	6.508	0.090	1.4

3. 溶血の影響

溶血によってサンプルの測定が影響を受けるか否かについて検討した。

【方法】

エーテル麻酔下で、直ちにラットの脾臓と肝臓をそれぞれ摘出し、1個の脾臓と1/5個の肝臓をそれぞれ個別に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回転)して細胞を沈査として集め、10 mlのPBSで1回懸濁して洗浄した後、再び遠心して細胞を回収した。この洗浄操作を計2回繰り返した後、ラットの脾細胞および肝細胞のPBS懸濁液(10 ml)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に、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回洗浄した後、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)。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)。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】

溶血処理により赤血球成分を除いた場合と、未処理のままとを比較したところ、混入した赤血球溶血成分による極端な反応妨害はないと考えられる。

		× 5	× 25	× 125	× 625	ブランク
脾臓	未処理	4.173	1.298	0.164	0.083	0.043
	溶血処理	4.000	1.536	0.220	0.082	0.044
肝臓	未処理	1.782	0.243	0.073	0.053	0.044
	溶血処理	1.575	0.189	0.067	0.053	0.046

A450 吸光度値

4. ストレッサーとしてのカドミウムの影響

ラット培養細胞を用いて、カドミウム曝露試験を実施した。

【方法】

1. 細胞の培養

- 1) NRK49F(ラット正常腎細胞)および3Y1(ラット繊維芽細胞)を、 $5 \sim 10 \times 10^4$ cell/ml濃度で、24ウェル培養プレートのウェルに1 mlずつ加え、培養した。
- 2) 翌日、終濃度として20 μ Mになるように1 mM CdCl₂溶液を添加した。対照にはPBSを用いた。
- 3) 3時間後にCdCl₂添加群とPBS群(対照)の各1ウェルについて、培養上清を除いてPBSで洗浄し、0.25%トリプシン液0.5 mlで細胞を分散して細胞数をカウントした。

2. 細胞の回収方法とタイムコース

カドミウム曝露開始後、3時間、8時間、12時間、22時間、52時間、72時間後に、CdCl₂添加群とPBS群の各1ウェルから培養上清を回収し、さらに1 ml/wellの細胞抽出用緩衝液を加えて細胞抽出液を得た。各サンプルは測定を行うまで-20℃で保存した。

【結果】

表 A. 培養細胞でのカドミウム曝露試験 (HO-1 産生量および細胞数)

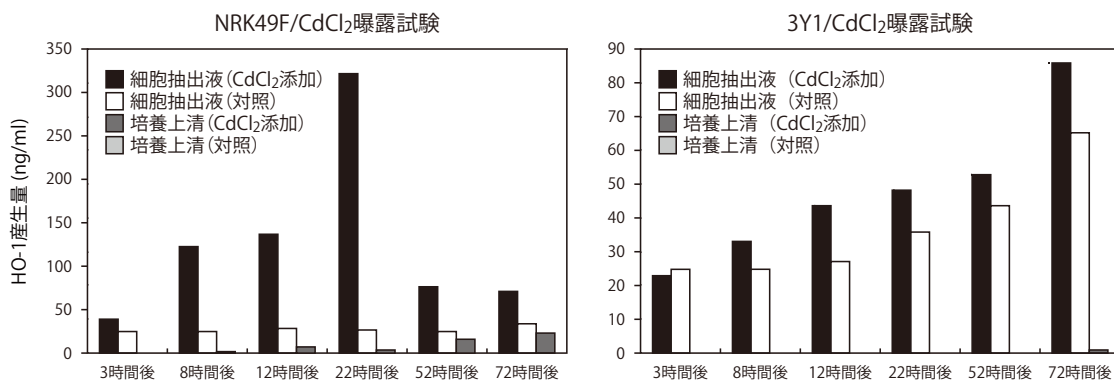
< NRK49F >

		3 時間	8 時間	12 時間	22 時間	52 時間	72 時間
細胞抽出液中の HO-1 (ng/ml)	CdCl ₂ 添加	38.70	123.30	137.37	321.30	76.98	71.01
	対照	25.07	25.07	27.97	26.06	25.27	33.69
培養上清中の HO-1 (ng/ml)	CdCl ₂ 添加	0.00	2.17	6.57	4.29	15.58	23.91
	対照	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1 ウェル細胞数	CdCl ₂ 添加	90000					430000
	対照	90000					440000

< 3Y1 >

		3 時間	8 時間	12 時間	22 時間	52 時間	72 時間
細胞抽出液中の HO-1 (ng/ml)	CdCl ₂ 添加	22.84	32.94	43.47	48.15	52.59	85.71
	対照	24.66	24.66	27.16	35.64	43.83	65.40
培養上清中の HO-1 (ng/ml)	CdCl ₂ 添加	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.05
	対照	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1 ウェル細胞数	CdCl ₂ 添加	14000					550000
	対照	14000					630000

グラフ B. 培養細胞でのカドミウム曝露試験



各サンプル中の HO-1 の測定値を表 A およびグラフ B に示す。また、表 A には 3 時間後と 72 時間後の細胞数も示したが、カドミウム添加群と PBS 群 (対照) で細胞数に大きな違いはなく、カドミウム (20 μ M) 投与による増殖阻害はないと思われる。一方、HO-1 の産生量はカドミウム投与によって増大することが認められた。NRK49F 細胞では、カドミウム投与 52 時間以降に培養上清中に HO-1 が検出されたが、これは細胞から培地中に放出されたものと考えられる。2 種類の培養細胞では、カドミウムを投与した場合の HO-1 の産生量や経時的な産生パターンが異なっており、細胞の種類によってストレス応答が異なることが推察された。

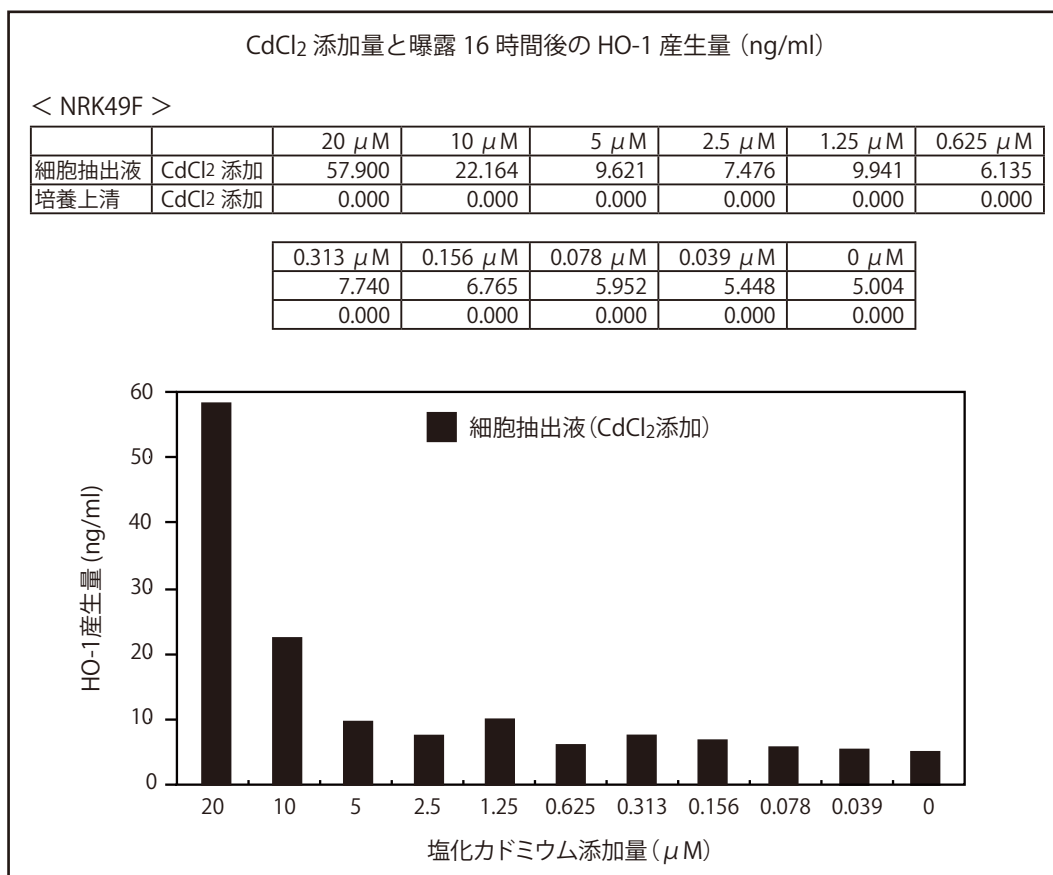
5. カドミウムの添加量とヘムオキシゲナーゼ-1 産生量

NRK49F 細胞を用いて、カドミウムの添加量と HO-1 の産生量との関係を調べた。

【方法】

塩化カドミウムの 2 倍希釈系列を作り、終濃度が 0 ~ 20 μM となるように、種々の濃度の塩化カドミウムを NRK49F 培養細胞 (培地量 1 ml/well) に加えて培養した。16 時間後に培養上清を回収した後、キット中の細胞抽出用緩衝液をウェルに 1 ml 加え、細胞を回収・抽出した。この細胞抽出液と培養上清中の HO-1 の量を本キットを用いて測定した。

【結果】



細胞抽出液中の HO-1 の測定結果をグラフに示す。なお、16 時間では、培養上清中への HO-1 の放出はみとめられなかった。

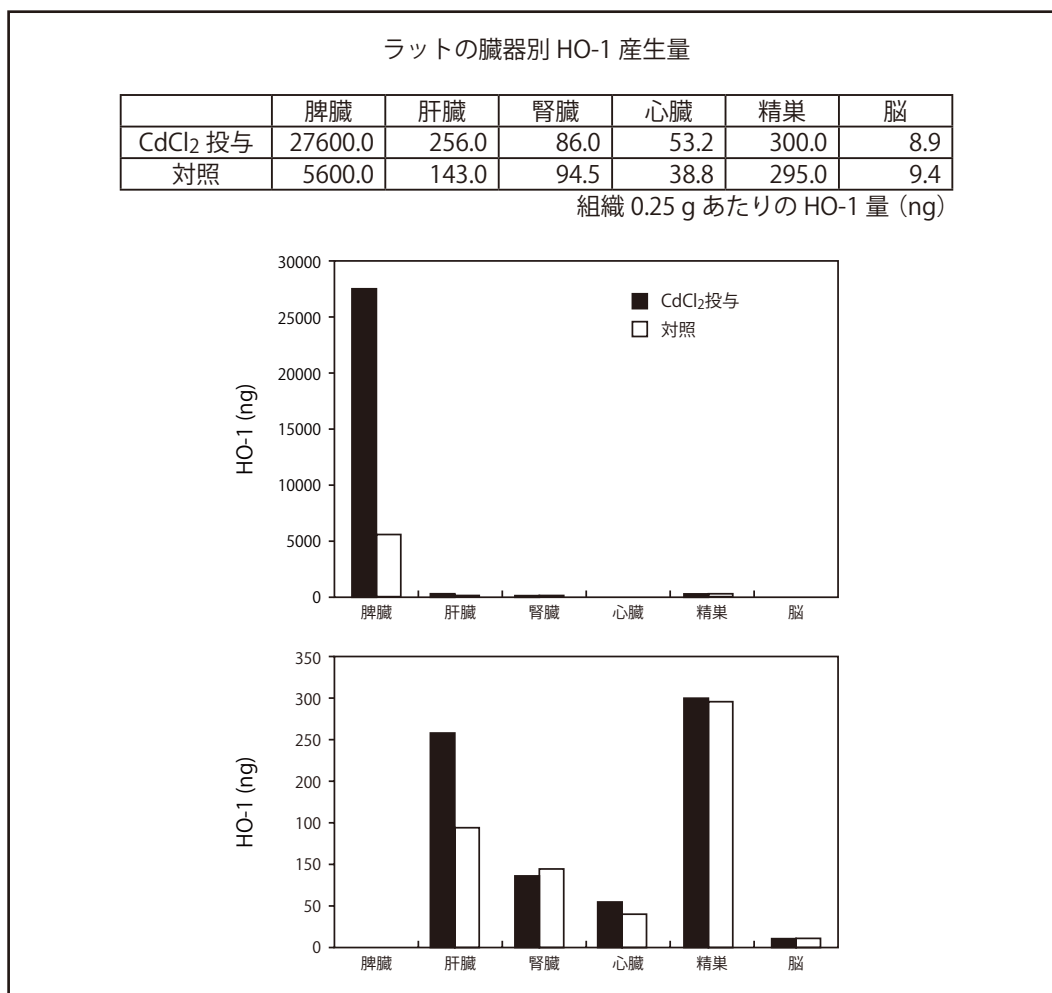
6. カドミウム投与によるラットの各種臓器中のヘムオキシゲナーゼ-1の誘導

塩化カドミウムをストレスラーとしてラットの腹腔内に投与することにより、各種臓器中のHO-1の産生量がどのように変動するかどうか調べた。

【方法】

塩化カドミウム (20 μ M/kg 体重) または PBS (対照) をラットの腹腔内に投与し、16時間後に麻酔して各種臓器を摘出した。キット中の細胞抽出用緩衝液を各臓器に 0.25 g (臓器湿重量) /ml となるように加え、ホモジナイズした。本キットを用いてこれらのホモジネート中のHO-1の量を測定した。

【結果】



各臓器によってストレス応答が異なることが示された。

【ラット血清サンプル調製上の注意】

測定対象がストレスにより誘導発現するため、注射の際に行うエーテル麻酔も、十分なストレス要因となり、データに影響を与える恐れがあります。その影響を除外するために、必ず麻酔コントロール個体についても同時に測定するようにしてください。また、血中濃度を測定する実験の場合、採血部位付近の局所組織から産生されるヘムオキシゲナーゼ-1を血中由来の酵素として測りこむ恐れがありますので、採血方法をよく検討した上で行ってください。

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. (5) Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution 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 (5) Substrate Solution (TMBZ) や Stop Solution がつかないようにご注意ください。
5. 着色した (5) 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. 参考文献

- 1) Goda, N., *et al. J Clin Invest.* (1998) **101** (3), 604-612.
- 2) Hayashi, S., *et al. Circ Res.* (1999) **85**, 663-671.
- 3) Makino, N., *et al. Hepatology.* (2001) **33**, 32-42.
- 4) Ozawa, N., *et al. J Clin Invest.* (2002) **109** (4), 457-467.

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