

(75 × 190mm Size)

**FUJIFILM**

**Wako**

〈For Research Use Only〉  
Code No. 292-67801(50 reactions)

for Genomic Research  
**8-OHdG Assay Preparation  
Reagent Set**

**[Introduction]**

The 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set contains nuclease, buffer and reagents which are used for the preparation of the assay of 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine), a marker for oxidative stress. This set is able to reduce the variation of the enzyme reaction by addition of each reagent to the sample DNA in accordance with the protocol. Therefore, you are able to get stable assay results for a marker of oxidative stress.

**[Features]**

- 1) All reagents for the preparation of 8-OHdG assay are included.
- 2) Get stable assay results for a marker of oxidative stress with reduced variation of the reaction.

**[Kit contents]**

- |                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 1) Acetic Acid Buffer            | 950 $\mu$ L × 1 |
| 2) Nuclease P <sub>1</sub>       | 500 units × 1   |
| 3) Tris Buffer                   | 1 mL × 1        |
| 4) Alkaline Phosphatase Solution | 50 $\mu$ L × 1  |

**[Materials needed]**

**Reagent :**

- 1) Deionized distilled water (DDW) : Code No. 316-90101

**Equipments :**

- 1) Centrifugal ultrafiltration device (10,000 M.W.) (e.g. : Sartorius VIVASPIN 500 code. VS0102)
- 2) High speed refrigerated microcentrifuge
- 3) Incubator (98°C, 37°C)

**[Storage]**

Store at -20°C.

**[Package size]**

50 reactions

**[Method]**

**(Preparation)**

Add 500  $\mu$ L of Nuclease P<sub>1</sub> (lyophilized form) to 500  $\mu$ L of DDW in order to prepare 1 unit/ $\mu$ L Nuclease P<sub>1</sub> Solution. Refrigerate the Nuclease P<sub>1</sub> Solution. The Nuclease P<sub>1</sub> Solution may be used for approx. 6 months after preparation.

**(Protocol) Standard conditions**

It is possible to change the concentration of DNA sample for assay of 8-OHdG by HPLC.

- (1) Heat the DNA sample which is prepared 200  $\mu$ g/150  $\mu$ L (= 1.33 mg/mL) at approx. 98°C for 2 minutes.
- (2) Chill in ice water and leave for 5-10 minutes.
- (3) Flash centrifuge.
- (4) Add 19  $\mu$ L of Acetic Acid Buffer and 10  $\mu$ L of Nuclease P<sub>1</sub> Solution.
- (5) Incubate at 37°C for 30 minutes.
- (6) Flash centrifuge.
- (7) Add 20  $\mu$ L of Tris Buffer and 1  $\mu$ L of Alkaline Phosphatase Solution. (Final concentration of DNA : 1 mg/mL)
- (8) Incubate at 37°C for 30 minutes.
- (9) Flash centrifuge.
- (10) Transfer to a filter cup of a Centrifugal ultrafiltration device (10,000 M.W.) (e.g. : Sartorius VIVASPIN 500 code. VS0102).
- (11) Centrifuge at 15,000 × G at 4°C for approx. 20 minutes.
- (12) Collect the filtrate. Proceed to the assay of 8-OHdG.

The Oxidation of DNA advances early in the state of the filtrate after the treatment of Nuclease P<sub>1</sub> Solution. We recommend you to proceed to the assay of 8-OHdG as soon as possible, on the day if possible.

**Flow chart**

**Standard conditions**

200  $\mu$ g DNA/150  $\mu$ L DDW

98°C, 2 min.

Chill on ice, 5-10 min.

← 19  $\mu$ L **Acetic Acid Buffer**

← 10  $\mu$ L **Nuclease P<sub>1</sub> Solution**

37°C, 30 min.

← 20  $\mu$ L **Tris Buffer**

← 1  $\mu$ L **Alkaline Phosphatase Solution**

37°C, 30 min.

Centrifugal ultrafiltration (10,000 M.W.), 15K×G, 4°C, 20 min.

Filtrate (1 mg/mL DNA)

8-OHdG assay (ELISA or HPLC)

It is possible to change the concentration of DNA sample for assay of 8-OHdG by HPLC.

**[Related product]**

Code No.	Description	Package Size
307-07921	High Sensitive 8-OHdG Check	96 tests

**FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation**

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : + 81-6-6203-3741  
Facsimile : + 81-6-6201-5964  
<http://www.wako-chem.co.jp>

**FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation**

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.  
Telephone : + 1-804-271-7677  
Facsimile : + 1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

**FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**

Fuggenstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telefona : + 49-2131-3111-0  
Facsimile : + 49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 292-67801(50 回用)

## 遺伝子研究用 8-OHdG 測定前処理試薬セット

### 〔はじめに〕

8-OHdG 測定前処理試薬セットは、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG (8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン) 等の測定の前処理に使用するヌクレアーゼ等酵素や buffer 類をセット化した試薬です。測定対象となる DNA 試料に対して、各々の試薬を所定量添加し、反応を進めることによって、ヌクレアーゼ処理状態のバラツキを軽減し、安定したストレスマーカーの測定に寄与します。

### 〔特長〕

- 1) 8-OHdG 測定の前処理に必要な酵素類や buffer 類をすべてセット化しています。
- 2) 反応のバラツキを軽減し、安定したストレスマーカーの測定に寄与します。

### 〔キット内容〕

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| 1) 酢酸バッファー               | 950 $\mu$ L $\times$ 1 本 |
| 2) ヌクレアーゼ P <sub>1</sub> | 500units $\times$ 1 本    |
| 3) トリスバッファー              | 1mL $\times$ 1 本         |
| 4) アルカリホスファターゼ溶液         | 50 $\mu$ L $\times$ 1 本  |

### 〔キット以外に使用する物〕

#### 試薬：

- 1) 滅菌蒸留水 (DDW) : Code No. 316-90101

#### 器具：

- 1) 分子量 10,000 スピン濾過型限外濾過器 (例：ザルトリウス社 VIVASPIN 500 code. VS0102)
- 2) 冷却式微量高速遠心機
- 3) インキュベーター (98℃、37℃)

### 〔保存条件〕

冷凍保存 (-20℃)

### 〔包装〕

50 回用

### 〔操作方法〕

#### (準備)

ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> (凍乾品) に、DDW を 500  $\mu$ L 添加し、ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 溶液 (1U/ $\mu$ L) を調製します。ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 溶液は、冷蔵にて保管して下さい。調製後、約半年間ほど使用可能です。

#### (操作) 標準的な条件としてご利用下さい。

HPLC 分析の場合、DNA 濃度の変更が可能です。

- (1) 200  $\mu$ g/150  $\mu$ L (= 1.33mg/mL) に調製した DNA 試料を、約 98℃ で 2 分間煮沸処理します。
- (2) 氷水等で急冷して、5 分間 (~ 10 分間) 放置します。
- (3) フラッシュ遠心します。
- (4) 酢酸バッファー 19  $\mu$ L、ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 溶液 10  $\mu$ L を添加します。
- (5) 37℃ で 30 分間インキュベーションします。
- (6) フラッシュ遠心します。
- (7) トリスバッファー 20  $\mu$ L、アルカリホスファターゼ溶液 1  $\mu$ L を添加します。(最終 DNA 濃度：1mg/mL)
- (8) 37℃ で 30 分間インキュベーションします。
- (9) フラッシュ遠心します。
- (10) 分子量 10,000 スピン濾過型限外濾過器 (例：ザルトリウス社 VIVASPIN 500 code. VS0102) の上カップに移し換えます。
- (11) 15,000  $\times$  G、4℃ で約 20 分間遠心分離します。
- (12) 濾液を回収し、8-OHdG 濃度を ELISA または HPLC 等ご希望の方法で測定します。

ヌクレアーゼ処理した後 (濾液の状態) は、DNA 酸化の進行が早いので、なるべく早めに (できれば当日) 8-OHdG の測定に進むことをお勧めします。

### フローチャート：標準的な条件

HPLC 分析の場合は DNA 濃度の変更が可能です。

200  $\mu$ g DNA/150  $\mu$ L DDW

↓  
98℃、2 min.

↓  
急冷(氷上)、5min.~10min.

← 19  $\mu$ L 酢酸バッファー  
← 10  $\mu$ L ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 溶液

↓  
37℃、30 min.

← 20  $\mu$ L トリスバッファー  
← 1  $\mu$ L アルカリホスファターゼ溶液

↓  
37℃、30 min.

↓  
10,000 M.W. 限外濾過(スピン濾過 15K $\times$ G、4℃、20 min.)

↓  
濾液(DNA濃度：1 mg/mL)

↓  
8-OHdG測定(ELISA法 or HPLC法)

### 〔関連商品〕

コード No.	品 名	容 量
307-07921	高感度 8-OHdG チェック	96 回用

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**  
大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号  
Tel : 06-6203-3741

1801KA1