

# DNA の塩基損傷部位の数を測定したい

## 使用製品

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit  
-AP Site Counting- [DK02]

## 解析装置



## I はじめに

生物の遺伝情報を保持している DNA は、複製時の DNA polymerase のエラーに加えて、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝産物により損傷を受ける。これらのエラーや損傷が正しく修復されなければ突然変異を誘発し、これが癌や老化の原因となる。

DNA 損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復がある。この時 AP site (apurinic / apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現する。つまり AP site の検出は DNA 損傷部位を測定し得る有効な方法となる。

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- (Code: DK02) は、AP site と特異的に結合する ARP (N'-Aminoxy methylcarbonylhydrazino-D-biotin) を用いて DNA をビオチン化し、96 穴マイクロプレートに固相化して試料 DNA 中の AP site を簡単に定量できるキットである。

本キットには、AP site 数が既定された標準 DNA が含まれており、既存のビオチン検出法を用いることによって AP site の定量ができる。本プロトコルではこのキットを用いた DNA 中の塩基損傷部位定量方法を紹介する。

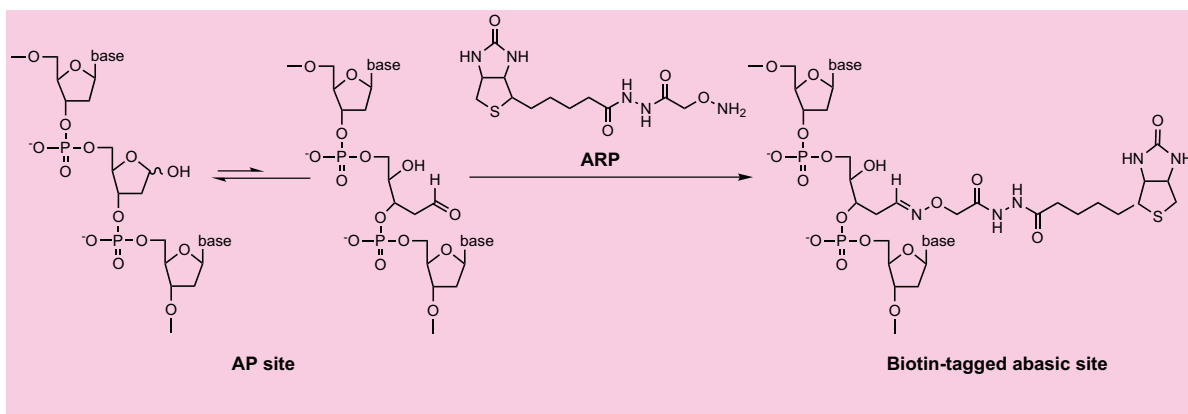


図 1 AP site と ARP との反応

## II キット内容

[20 samples 用]

ARP-DNA standard solution (0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 AP sites / 100,000 bp)	各 250 μl × 1
ARP solution	250 μl × 1
DNA binding solution	10 ml × 1
Washing buffer	× 1
HRP-streptavidin	25 μl × 1
TE buffer	40 ml × 1
Substrate solution	10 ml × 1
Filtration tube	20 tubes
96-well Microplate/U bottom	× 1

※ キット以外に必要なもの

- ・ 10 μl、200 μl マイクロピペッター
- ・ 8 連マイクロピペッター (50 ~ 200 μl)
- ・ 低温恒温槽 (37°C)
- ・ マイクロプレートリーダー
- ・ 0.5 ml、1.5 ml 遠心チューブ
- ・ 遠心機

## III DNA の精製

本キットによる DNA の AP site 数検出は、混在する RNA およびタンパクにより測定誤差を生じる可能性があるため、RNase A 処理後、フェノール/クロロホルムもしくは市販の DNA 精製キット等により精製した DNA を使用することを推奨する。フェノール/クロロホルムによる精製方法は一般的な方法であり、多くの成書があるので詳細はそれを参考にされたい。

また近年、数多くの DNA 精製キットが市販されるようになり、簡単に DNA を単離精製することが可能となった。小社でも各種 DNA 精製キットを販売している。(Code: GK03)

DNA の純度は吸光度比 ( $A_{260}/A_{280}$ ) により検定できる。 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$  の DNA を使用することを推奨する。

## IV 操作方法

### 1. 試料 DNA の ARP 標識

#### (1) 試薬

・ TE buffer (500 ml): 純水 500 ml 弱に Tris を 606 mg (10 mmol/l)、3NA(EDTA·3Na)(Code: N002) を 206 mg (1 mmol/l) 溶解し、6 mol/l の塩酸で pH を 7.5 とした後、液量を 500 ml に調整する。オートクレーブ滅菌して使用する。添付の TE buffer は ARP 標識 DNA の調製に使用する。試料 DNA の調製・精製に別途 TE buffer が必要である。

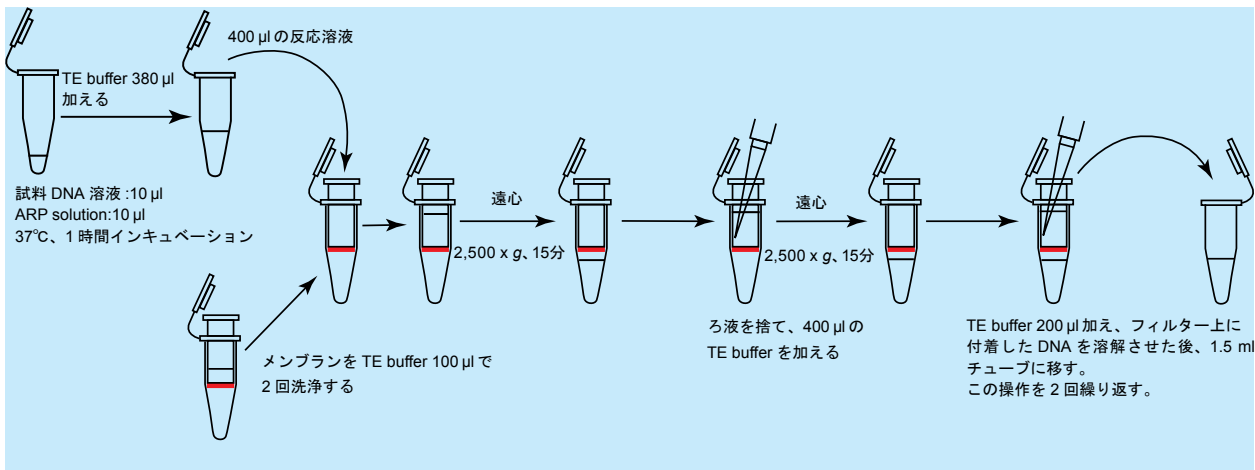


図 2 ARP-DNA の調製法

- 酢酸ナトリウム溶液：3 mol/l 酢酸ナトリウム水溶液を酢酸で pH 5.2 に調整する。
- RNase 溶液：市販の RNase A を滅菌水で希釈し、10 mg/ml に調整する。
- 75% エタノール

(2) 操作

- 精製した試料 DNA を TE buffer に溶解し、溶液の吸光度 (260 nm) を測定する。吸光度から濃度を算出して (DNA 濃度は 50  $\mu$ g/ml の時の吸光度を 1.0 として算出)、100  $\mu$ g/ml の濃度になるように TE buffer で希釈調整する。
- 試料 DNA 溶液 10  $\mu$ l に ARP solution 10  $\mu$ l を 0.5 ml チューブ中で混合する。
- 37°C で 1 時間反応させる。
- 380  $\mu$ l の TE-buffer を添加後、溶液を Filtration tube に入れる (図 2 を参照)。<sup>\*1</sup>
- 遠心分離 (2,500 x g、15 分間) 後、ろ液を捨てる。<sup>\*2</sup>
- 400  $\mu$ l の TE buffer を Filtration tube に加え、フィルター上に付着した DNA をピペッティングにより溶解させる。
- 遠心分離 (2,500 x g、15 分間) 後、ろ液を捨てる。<sup>\*2</sup>
- 200  $\mu$ l の TE buffer を Filtration tube に加え、フィルター上に付着した DNA をピペッティングにより溶解させる。溶解さ

- せた DNA 溶液を 1.5 ml チューブに移す。更に 200  $\mu$ l の TE buffer を Filtration tube に加え、この操作をもう一度繰り返す。
- 9) DNA 溶液を 1.5 ml チューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。<sup>\*3</sup>
- <sup>\*1</sup> Filtration tube の代わりにエタノール沈殿による精製も可能である。  
<sup>\*2</sup> 溶液がメンブラン上に残っている場合は、更に 2,500 x g、5 分間遠心分離する。  
<sup>\*3</sup> Filtration tube を使用した場合、DNA の回収率は 90% である。よって溶液中の ARP 標識 DNA 濃度は 2.25  $\mu$ g/ml となる。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0 ARP DNA Std.					Sample 5			Sample 13		
B		2.5 ARP DNA Std.			Sample 1		Sample 6			Sample 14		
C		5 ARP DNA Std.					Sample 7			Sample 15		
D		10 ARP DNA Std.					Sample 8			Sample 16		
E		20 ARP DNA Std.			Sample 2		Sample 9			Sample 17		
F		40 ARP DNA Std.					Sample 10			Sample 18		
G		Blank		Sample 3			Sample 11			Sample 19		
H				Sample 4			Sample 12			Sample 20		

図 3 プレート配置例



1) DNA 溶液 10  $\mu$ l に ARP solution 10  $\mu$ l を 0.5 ml を加え、37°C で 1 時間インキュベーションする。



2) TE-buffer を添加後、溶液を Filtration tube に入れ、遠心分離する。これを繰り返し行い、ARP 標識 DNA を精製する。



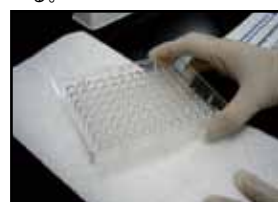
3) ARP-DNA standard solution および ARP 標識 DNA 溶液を各ウェルに入れ、DNA binding solution を添加して室温で一晩静置する。



4) 溶液を除去し、Washing buffer をウェルに加え除く洗浄操作を 5 回繰り返す。



5) 希釈 HRP-streptavidin 150  $\mu$ l を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベートする。



6) 溶液を除去し、Washing buffer をウェルに加え除く洗浄操作を 5 回繰り返す。



7) Substrate solution 100  $\mu$ l を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベートする。



8) マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する。

図 4 AP site 検出操作

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

2. AP site 数の検出

(1) 試薬

- ・ 洗浄用 PBST : Washing buffer 粉末をイオン交換水 1 L に溶解する。
- ・ 希釈 HRP-streptavidin : HRP-streptavidin を洗浄用 PBST で 4,000 倍希釈する (用時調製)。

(2) 操作

- 1) ARP 標識 DNA 90  $\mu$ l に TE buffer 310  $\mu$ l を加える。
- 2) 各 ARP-DNA standard solution を 1 ウェル当たり 60  $\mu$ l ずつ 3 ウェルに添加する (図 3 参照)。
- 3) ARP 標識 DNA を 1 ウェル当たり 60  $\mu$ l ずつ 3 ウェルに添加する。
- 4) DNA binding solution 100  $\mu$ l を DNA の入ったウェルに添加し、数回 ピペティングにより攪拌後、室温にて一夜静置する。<sup>※1</sup>
- 5) ウェル中の溶液を吸引等により除去し、洗浄用 PBST でウェルを 5 回洗浄する。<sup>※2</sup>
- 6) 希釈 HRP-streptavidin 150  $\mu$ l を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベーションする。
- 7) ウェル中の溶液を吸引等により除去し、洗浄用 PBST でウェルを 5 回洗浄する。<sup>※2</sup>
- 8) Substrate solution 100  $\mu$ l を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベートする。
- 9) マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する。630 ~ 670 nm の波長フィルターが使用可能である。
- 10) DNA 中の AP site 数を検量線から算出する (図 5)。

※1 あらかじめチューブ中で標準 ARP-DNA および ARP 標識 DNA と DNA Binding Solution を 3:5 の体積比で混合調製し、その溶液をウェルに各々 160  $\mu$ l 添加しても良い。

※2 洗浄後はペーパータオルなどの上でプレートを叩いてウェル中の洗浄用 PBST を完全に除く。

V 注意事項

- 1) キットは 0 ~ 5°C で保存し、凍結させないで下さい。
- 2) AP-DNA は一般に不安定ですので、測定対象 DNA を単離精製後は直ちに ARP 反応を行って下さい。
- 3) Filtration tube での遠心分離後は、直ちに TE buffer を添加し DNA を溶解させて下さい。長時間 DNA をメンブラン上で放置しておく、DNA のメンブランへの吸着が起こり回収率にバラツキを生じる可能性があります。
- 4)  $\gamma$  線滅菌のチューブは DNA の吸着を生じる可能性があるため、チューブを使用の際は非滅菌チューブを必要に応じてオートクレーブ滅菌して使用することを推奨します。
- 5) 630 ~ 670 nm のフィルターを持ち合わせていない場合は、発色反応後、各ウェルより 50  $\mu$ l 抜き取り新しいプレートに移します。同量の 1 mol/l 硫酸を添加後、450 nm の吸光度で測定することができます。硫酸添加後、速やかに測定する。
- 6) ウェル洗浄後、残存する洗浄液により測定誤差を生じることがあるので完全に除いて下さい。

参考文献

- 1) A. Sancar and G. B. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.*, **1988**, 57, 29.
- 2) T. Lindahl and B. Nyberg, *Biochemistry*, **1972**, 11, 3610.
- 3) M. Liuzzi and M. Talpaert-Borle, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 5252.
- 4) M. Weinfeld, M. Liuzzi, and M. C. Paterson, *Biochemistry*, **1990**, 29, 1737.
- 5) B. X. Chen, K. Kubo, H. Ide, B. F. Erlanger, S. S. Wallace, and Y. W. Kow, *Mutat. Res.*, **1992**, 273, 253.

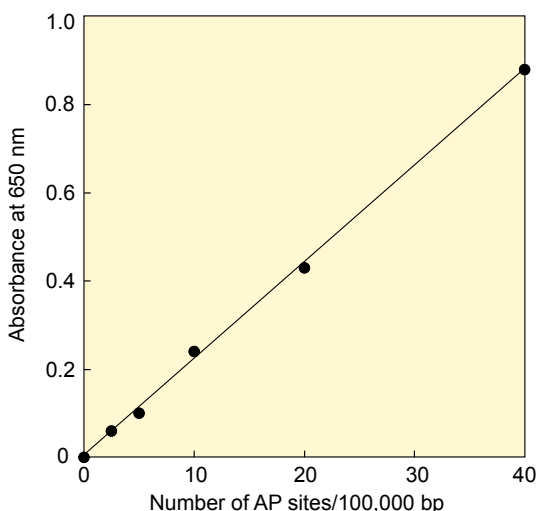


図 5 ARP-DNA standard solution を用いて作成した検量線の例