



コスモ・バイオ株式会社  
COSMO BIO CO., LTD.



Code No. StDtc-3

Research Reagent Only

## OKD Oxidative Stress Detector

Cellular stresses, which are implicated in various diseases, include stresses caused by intra-tissue factors such as low oxygen status and intracellular stresses such as endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress. Oxidative stress conditions enhance the production of reactive oxygen species and are associated with various human diseases, including neurodegenerative disorders, inflammation and various cancers.

**OKD Oxidative Stress Detector** utilizes the expression regulation system of Nrf2 transcriptional factor. Under normal condition, Nrf2 is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway through the association with Keap1. Upon exposure to oxidative stress, reactive cysteine residues in Keap1 are covalently modified, leading to the liberation of Nrf2 from Keap1-mediated degradation. The stabilized Nrf2 is then translocated to the nucleus, and activates the transcription of a wide range of oxidative stress responsive genes. OKD Oxidative Stress Detector is a reporter gene in which luciferase gene is fused with Nrf2 cDNA corresponding to ubiquitination domain. In cells introduced with this detector gene, oxidative stress stabilizes the luciferase fusion protein and induce the luciferase activity.

For detection of oxidative stress in living mouse, Tg type OKD-Luc mouse which is introduced with ERAI ER Stress Detector is suitable.

Material	Plasmid DNA
Quantity	5 µg DNA/vial, 20 µL TE (sterilized)
Storage	- 20°C

Plasmid is not treated in endotoxin free condition.

### Manufacturer



7-1-14Minatojimaminami-machi, Chuo-ku, Kobe, Japan 650-0047  
Telephone: +81-78-306-0295 FAX:+81-78-306-0296  
URL:<http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp

**【An example of experimental procedure】**

Cultured cells are transfected with OKD Oxidative Stress Detector and stimulated with oxidative stress inducer arsenite.

- 1) One day prior to transfection, cells are plated in 35 mm culture dish. Cell number should be 50 - 80% confluent after overnight culture (approximately  $1 - 3 \times 10^5$  cells/dish for adherent cells).
- 2) OKD Oxidative Stress Detector plasmid is transfected. Detail of transfection method follows the manufacturer's instruction of transfection reagent.
- 3) After 24 - 48 hours, culture medium is exchanged to new one with 10  $\mu\text{M}$  arsenite. Note that the optimum concentration of tunicamycin depends on each cell line.
- 4) After 6 hours incubation with tunicamycin, cells are harvested and assayed for luciferase activity by Luciferase Assay System (Promega). Please see detailed method in instruction of product.

**【References】**

Oikawa D., Akai R., Tokuda M., Iwawaki T. Sci. Rep. 2, 229 (2012)

**【License statements】**

The use of this product is strictly limited for research purpose only in the organization that purchaser belongs to.

The purchaser should not make any copies or derivatives of this product. The purchaser should not transfer and/or resell copies and/or derivatives of this product to any third parties.

Production of gene modified animals introduced with this product is prohibited.

In the case of order, please check the License statements and submit the signed License Agreement to Transgenic Inc.

**Manufacturer**

7-1-14 Minatojimaminami-machi, Chuo-ku, Kobe, Japan 650-0047

Telephone: +81-78-306-0295 FAX: +81-78-306-0296

URL: <http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp



## OKD Oxidative Stress Detector

酸化ストレス検出試薬

細胞レベルのストレスには、低酸素ストレスなどの組織内要因で生じるストレスと、小胞体ストレスや酸化ストレスなど細胞内のストレスがあり、様々な疾患に関与することが報告されています。そのなかで、細胞レベルで酸化反応が亢進する状況が酸化ストレスであり、DNA、脂質やタンパク質などの生体成分の酸化変性、細胞機能の障害を引き起こします。さらに、これら変性生体成分が、動脈硬化、糖尿病、リウマチなどの要因になると考えられています。

**OKD Oxidative Stress Detector** には、Nrf2 転写因子の発現制御システムが利用されています。通常、Nrf2 は、ユビキチン化による速やかな分解を受けます。しかし、酸化ストレス条件下では、ユビキチン化と分解が阻害され、酸化ストレス応答遺伝子の発現を活性化させます。OKD Oxidative Stress Detector には、Nrf2 のユビキチン化ドメインとルシフェラーゼを融合した cDNA が組み込まれているため、OKD Oxidative Stress Detector を導入した細胞では、ルシフェラーゼ活性によるルシフェリンの発光によって酸化ストレスを検出することができます。

個体レベルでの酸化ストレスの観察には、OKD Oxidative Stress Detector を導入した Tg 型 OKD-Luc マウスをご利用ください。

内容	plasmid DNA
容量	5 µg DNA/vial, 20 µL TE
保管方法	-20°C以下

※エンドトキシンフリーでの処理はしていません。

製造元



株式会社トランスジェニック

〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14

TEL: 078-306-0295 FAX:078-306-0296

URL:<http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp

**【実験例】**

OKD Oxidative Stress Detector を培養細胞に導入し、亜ヒ酸ナトリウム処理による酸化ストレスを付加する。

- 1) トランスフェクション前日に、細胞を 35mm 培養プレートに播種する（接着細胞の場合、 $1\text{-}3 \times 10^5$  細胞程度が目安）。一晩の培養で、50~80%コンフルエントになるように調節する。
- 2) トランスフェクションにより、1) で用意した培養細胞に、OKD Oxidative Stress Detector を導入する。トランスフェクション法は、リン酸カルシウム共沈殿法や一般的に販売されているトランスフェクション試薬を用いた方法で行うことができる。詳細は、これらの方法とトランスフェクション試薬のマニュアルに準じる。
- 3) 約 24~48 時間の培養後、ルシフェラーゼアッセイのために細胞を回収する 6 時間前に、 $10\mu\text{M}$  亜ヒ酸ナトリウムを含む新しい培地と交換する。酸化ストレス誘導に必要な亜ヒ酸ナトリウムの濃度は、細胞種により異なるので、注意が必要。
- 4) プロメガ社のアッセイキットを用いてルシフェラーゼ活性を測定する。細胞の回収とライゼートの作製方法は、キットのマニュアルに従う。

**【参考文献】**

Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T.  
A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress.  
Sci Rep. 2, 229. (2012).

**【ライセンス条項】**

- 本製品は、ご購入者の自施設における研究目的のみにご使用いただけます。
- 本製品、および、その派生物の第三者への譲渡・配布・再販を禁止いたします。
- 本試薬、改変した本製品を導入した動物個体の作製はできません。
- 本製品のレポーター配列について、いかなる改変もできません。
- 本製品のご購入の際には、別紙、ライセンス確認同意書のご提出をお願いしております。

製造元

 株式会社トランジジェニック

〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-14

TEL: 078-306-0295 FAX: 078-306-0296

URL: <http://www.transgenic.co.jp> techstaff@transgenic.co.jp