

Pembuatan antibodi poliklonal anti 8-hidroksi - 2'Deoksiguanosin (8-OHdG)

Endang Sri Mulyaningsih, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=85428&lokasi=lokal>

Abstrak

Ruang lingkup dan metode penelitian : Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh menimbulkan berbagai macam penyakit. 8-OHdG merupakan petanda adanya kerusakan oksidatif DNA. Oleh karena itu perlu diketahui adanya kerusakan tersebut dengan pengukuran 8-OHdG. Pengukuran 8-OHdG dapat dilakukan dengan berbagai macam metoda, seperti GC-MS, LC-MS, TLC, HPLC, RIA dan Comet assay.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu metoda yang sederhana, murah, sensitif dan spesifik. Metoda yang digunakan adalah metoda ELISA, yang berdasarkan reaksi pembentukan kompleks antigen antibodi. Pembuatan antibodi poliklonal anti 8-OHdG dilakukan dengan cara menyuntikkan konjugat 8-OHdG-KLH pada kelinci. Antibodi yang diperoleh direaksikan dengan menambahkan 8-OHdG yang dilabel dengan avidin, disusul dengan penambahan biotin peroksidase dan akhimya 11202 - ortofenildiamin. Pengujian ini dilakukan pada berbagai pengenceran antibodi dan berbagai antibodi dan berbagai konsentrasi konjugat 8-OHdG - avidin.

Hasil dan kesimpulan : Dengan menggunakan pengenceran antibodi antara 112.500 sampai 1120.000 (kelipatan 2) dan konjugat 0,375 µg/ml, pada panjang gelombang 490 nm, diperoleh hasil berupa garis lurus yang menurun dengan $R^2 = 0,9346$. Dengan menggunakan pengenceran antibodi 1/2.500 dan penambahan konjugat antara 0,1 - 0,8 µg/ml, diperoleh hasil berupa garis lurus yang meningkat dengan $R = 0,9571$.

Disimpulkan : Antibodi yang dihasilkan mengikat 8-OHdG. Konjugat 8-OHdG-avidin dengan demikian dapat berikatan secara kuantitatif dengan antibodi.

Scope and the Method : Prolonged oxidative stress can produce various diseases. Oxidative stress may damage biomacromolecules. DNA, a very importance macromolecule, will be modified by an oxidative stress. 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) will be produced and this compound can be used as an indicator of the oxidative DNA damage. Currently, 8-OHdG is assayed by HPLC, a very special technique that needs a special apparatus and a well trained personal.

The objectives of this study are to explore the possibilities of 8-OHdG assays by immunochemical methods, i.e. ELISA. The antibody anti 8-OHdG was developing by injecting rabbits with 8-OHdG - key limpet hemocyanin (8-OHdG-KLH complex). Antibodies obtained were mixed with a 8-OHdG-avidin conjugate. The addition of peroxidase labeled biotin, followed by 1-1202-Orthophenylendiamine as a chromogenic substrate resulted in a coloured product, which indicated that the antibodies reacted with 8-OHdG.

Results and conclusions : A serial dilution of the antibodies, started with 1/2500 to 1/120000, reacted 0,375 μ g 8-OHdG - avidin conjugate/ ml and read at 490 nm, resulted in a straight line with $R^2 = 0,9346$.

We conclude that (1) the antibodies could bind 8-OHdG; and (2) 8-OHdG-avidin could be bound quantitatively by the antibodies.</i>