



一般研究用キット

Albumin Glycation Assay Kit, Glyceraldehyde

アルブミン抗糖化アッセイキット [グリセルアルデヒド]

Cat. No. AAS-AGE-K01

2024 年 8 月 2 日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景と測定原理

糖類は、生命活動において不可欠な栄養素ですが、一方で生体内のタンパク質のリジンやアルギニン残基を修飾し架橋形成することでタンパク質の立体構造が変化し、活性や物性に大きく影響を及ぼすことが知られています。この反応は糖化反応（Glycation）もしくはメイラード反応と呼ばれ、アムドリ転移物が生成する前期反応と、酸化、脱水、縮合などの反応を経て糖化反応後期生成物（advanced glycation end-products: AGEs）に至る後期反応に分けられます。

近年、AGEs は生体内においてグルコースだけではなく、グルコースの代謝中間体や分解物、メイラード反応中間体などからも生成することが報告され、生体内で生成される AGEs の中でも、特に糖代謝中間体由来のグリセルアルデヒド由来の AGEs が疾患の発症や進展に強く関わっていることが報告されています。

本キットは 96 well プレートを用いることにより、無細胞および非酵素的にアルブミンの糖化反応（蛍光性 AGEs の産生）を追うことができるキットです。糖代謝中間体であるグリセルアルデヒドを用いることで、アルブミンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングをより短期間に行うことができます。機能性食品および化粧品開発における抗糖化素材開発にご利用ください。

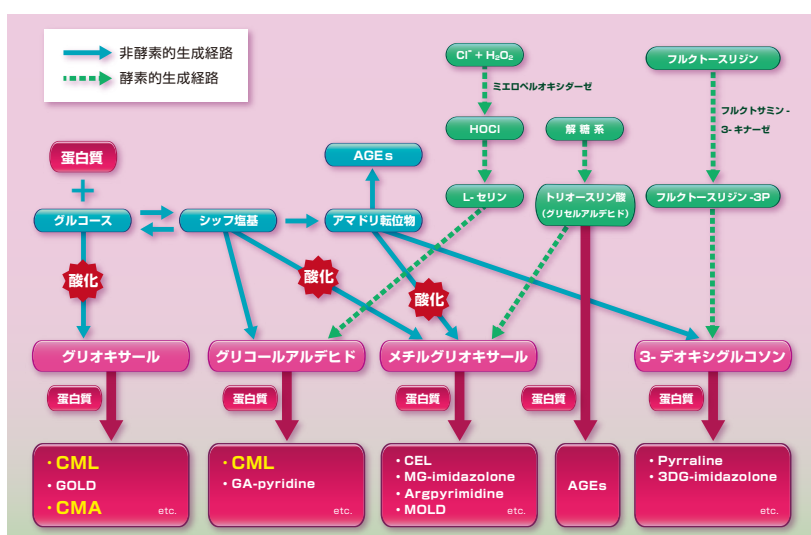


図1 生体内 AGEs の生成経路

【1-2】キットの特長

- 本キットは糖化した BSA 溶液から発せられる蛍光（励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm）を指標として、抗糖化作用成分を探索することに適しています。



【1-3】キット構成

本キットは、96 ウェルプレート 2 枚分のアッセイが可能です。

保存温度：4℃

| 内 容 | 容量 | 数量 | 取扱上の注意 |
|---|--------|-----|--|
| 牛血清アルブミン (BSA) 溶液 (Bovine Serum Albumin (BSA) Solution) | 10 mL | 1 本 | 取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。 |
| グリセルアルデヒド溶液 (500 mM) Glyceraldehyde Solution (500mM) | 2 mL | 1 本 | |
| 緩衝液 Dilution Buffer | 30 mL | 1 本 | |
| アミノグアニジン溶液 (20 mM) ※抗糖化標準物質 Aminoguanidine Solution (20 mM) | 0.5 mL | 1 本 | |

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- 96 ウェルプレートを用いた測定では、96 ウェルブラックプレート（透明底タイプ、滅菌済み）が必要です。
（グライナー社製 μ CLEAR®-PLATE BLACK Cat. No. 655090 または同等品）
- 蛍光プレートリーダー（励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm）が必要です。

μ CLEAR® は、Greiner Bio-One 社の登録商標です。



【II - 1】測定方法

以下の操作は、クリーンベンチ等で無菌的に行なってください。

緩衝液に 3 mM アジ化ナトリウムを添加することによって、無菌でない環境にても操作可能です。

- 1 BSA 溶液は、使用前に室温に戻してください。
- 2 BSA 溶液を 1 ウェルあたり 50 μ L ずつ 96 well プレートに分注してください。
- 3 試験試料は緩衝液で溶解または抽出したものをフィルター（孔径 0.22 μ m）でろ過滅菌し、BSA 溶液が入ったウェルに 40 μ L 重層してください。
- 4 陽性コントロールはアミノグアニジン溶液（20 mM）を緩衝液で 5 倍希釈系列を作製し BSA 溶液が入ったウェルに 40 μ L 重層してください。
- 5 全てのウェルに 500 mM グリセルアルデヒド溶液を 10 μ L 添加し、プレートをプレートミキサー等で撹拌してください。
グリセルアルデヒド溶液を重層することで糖化が開始します。
- 6 グリセルアルデヒド溶液添加後 5 分以内に下方測定の実光プレートリーダーで励起波長 370 nm、実光波長 440 nm の実光強度を測定してください。この測定値を反応 0 時間の実光強度 A とします。（注意 2）
- 7 プレートは、溶液の乾燥を防ぐため湿潤状態下（注意 2）の 37°C インキュベーターで 24 時間静置してください。反応期間は長いほど糖化は進みます。
- 8 下方測定の実光プレートリーダーで励起波長 370 nm、実光波長 440 nm での実光強度を測定して下さい。
この測定値を実光強度 B とします。
- 9 各ウェルの糖化度を、実光強度 B - 実光強度 A とします。

※注意 1：反応時間内で試験試料のみの実光値が変動する可能性がある場合には（6）でグリセルアルデヒド添加なしの値を引いてください。

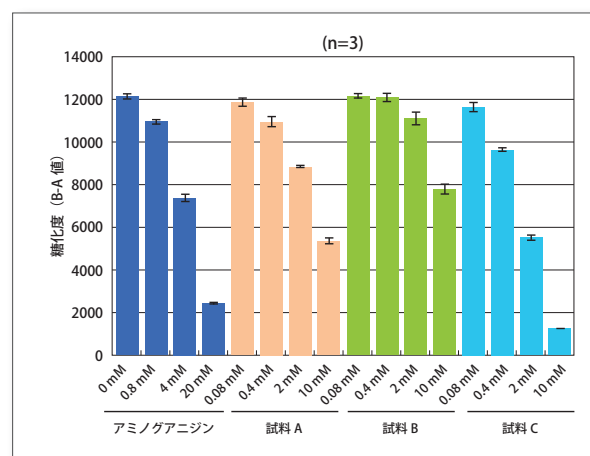
※注意 2：湿潤状態について

糖化反応中にウェル内が乾燥した場合、正確な測定結果を得ることができません。湿潤状態を保つようにしてください。湿度調整付きインキュベーターが無い場合は、蒸留水で湿らせたろ紙などを密閉容器の底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。



【IV】 実施例 —グリセルアルデヒド溶液で糖化させた糖化 BSA 生成の検討—

抗糖化標準物質であるアミノグアニジンと試料 A, B, C における BSA 抗糖化活性を検討した。各試料において濃度依存的に抗糖化活性を有することが認められた。ただし、濃度は試料溶液中の濃度を示す。



【V】 参考文献

- [1] 竹内 正義, AGEs と肝疾患, アンチ・エイジング医学—日本抗加齢医学会雑誌, Vol. 8, No. 1
- [2] Masayoshi Takeuchi *et al.* Immunological Evidence that Non-carboxymethyllysine Advanced Glycation End-products Are Produced from Short Chain Sugars and Dicarbonyl Compounds *in vivo*. *Mol Med.* 2000 Feb; 6 (2): 114-25. PMID: 10859028
- [3] Jun-ichi Takino *et al.* The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J Gastroenterol.* 2010 Jun; 45 (6): 646-55. PMID: 20084527

