

一般研究用キット

Elastin Glycation Assay Kit, Glyceraldehyde

エラスチン抗糖化アッセイキット [グリセルアルデヒド]

Cat. No. AAS-AGE-K05

2024 年 9 月 9 日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景と測定原理

エラスチンはコラーゲンと共に細胞外マトリックスのひとつであり、疎水性アミノ酸が多くアラニン、グリシン、バリン、プロリンが大半を占めます。エラスチンは大動脈、靱帯、肺、皮膚、結合組織などに多く分布する弾性線維性のタンパク質で、生体内ではコラーゲンにコイル状に巻きつき（図1）組織の形状を維持し、弾力性・伸縮性を与えています。

血管壁の中膜部分にエラスチンが多く含まれ、太くて血圧がかかる動脈ほどその含有率は高くなります。血管に働く弾力性・柔軟性はエラスチンにより維持されています（図2）。

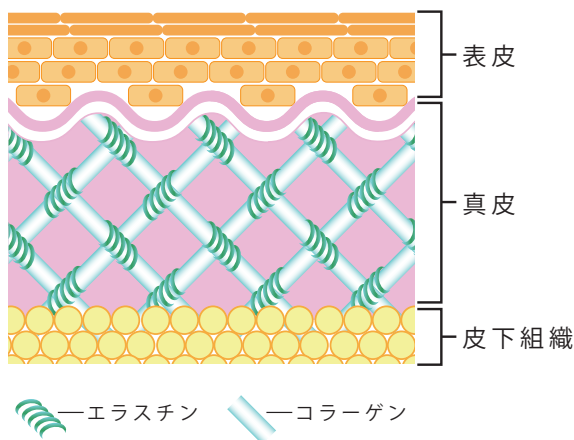


図1 皮膚組織中のエラスチン

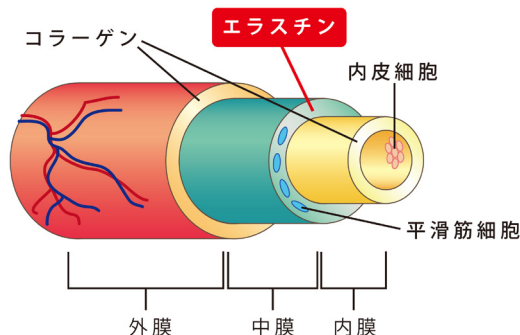


図2 動脈壁中のエラスチン

加齢や糖尿病などの疾患により血管壁や皮膚組織中のエラスチンにも糖化（glycation）が起こり、血管や皮膚の硬化・老化の原因となることが報告されています。

本キットは96wellプレートを用いることにより、無細胞および非酵素的にエラスチンの糖化反応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、エラスチ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。生活習慣病および老化予防研究や血管や靱帯などに焦点をあてた機能性素材開発にご利用ください。

【1-2】キットの特長

- 本キットは糖化したエラスチン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
エラスチン溶液	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）	2 mL	1 本	
緩衝液	30 mL	1 本	
アミノグアニジン溶液（20 mM） ※抗糖化標準物質	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（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】測定方法

- 1 エラスチン溶液は、使用前に室温に戻してください。
- 2 エラスチン溶液を 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、エラスチン溶液が入ったウェルに 40 μ L 添加してください。
- 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、エラスチン溶液が入ったウェルに 40 μ L 添加してください。
- 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、プレートのふた（シール）を閉じてプレートミキサー等で攪拌してください。
グリセルアルデヒド溶液を添加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 分以内に蛍光プレートリーダーで励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm の蛍光強度を測定してください。この測定値を反応 0 時間の蛍光強度 A とします。
- 7 プレートは、溶液の乾燥を防ぐため湿潤状態下（注意 1）の 37°C インキュベーターで 3～6 日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 蛍光プレートリーダーで励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm での蛍光強度を測定して下さい。この測定値を蛍光強度 B とします。
- 9 各ウェルの糖化度を、 $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 A}$ とします。

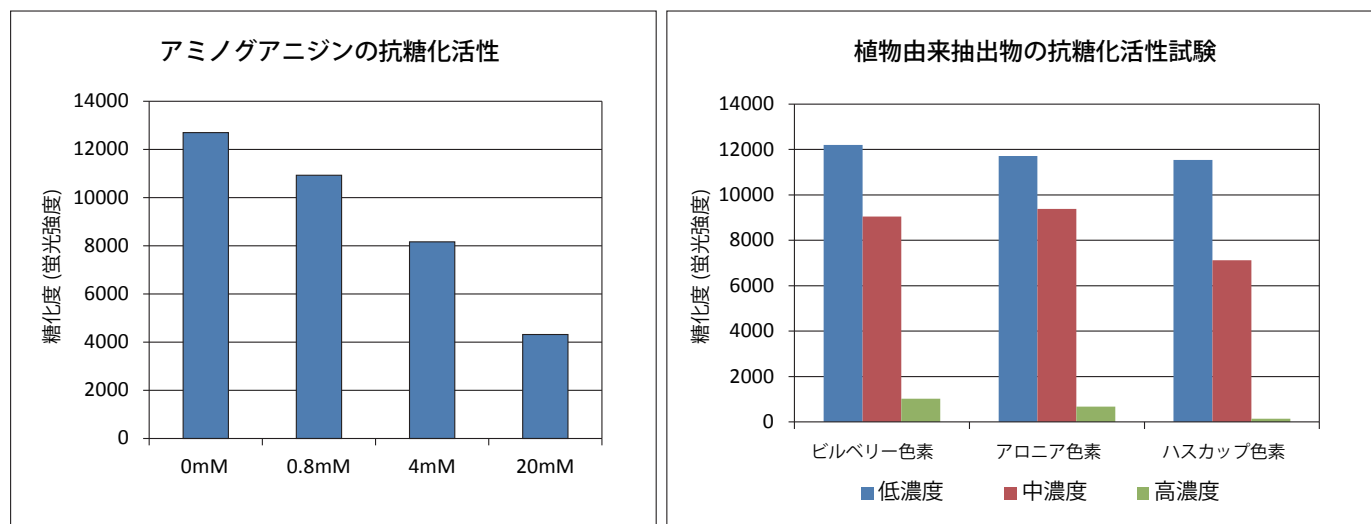
※注意 1：湿潤状態について

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。



【Ⅲ】実施例

抗糖化標準物質であるアミノグアニジンと植物由来抽出物におけるエラスチン抗糖化活性を検討した（糖化3日目の結果を示す）。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。



【Ⅳ】参考文献

- [1] E. Konova et al. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Experimental Gerontology* 39 (2004) 249-254
- [2] G. Nicoloff et al. Serum AGE-elastin derived peptides among diabetic children. *Vascular Pharmacology* 43 (2005) 193-197

