コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

一般研究用キット

Aging/Glycation Assay Kit Series ―老化 / 糖化研究関連シリーズ―

RAGE Reactive AGEs Assay Kit, Glyceraldehyde

RAGE 反応性 AGEs 生成阻害アッセイキット

Cat. No. AAS-AGE-K04

※ 本キットは北海道大学名誉教授、菅原 一幸先生の発案、技術指導の下に開発されました。

2023 年 10 月 19 日作成

www.cosmobio.co.jp

【Ⅰ－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、この反応生成物は糖化反応後期生成物 (advanced glycation end-products: AGEs) と呼ばれています。近年、AGEs の組織内蓄積そのものが老化の一要因であるとする考え方が主流になってきました。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などからも生成することが報告されています。特に糖代謝異常状態で作り出されるグリセルアルデヒド（図 1 参照）によって糖化された 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。

一方、生体内では AGEs と結合する受容体が存在し、それらを介する AGEs のクリアランスやシグナル伝達等、様々な生理機能を有するとされています。古くは酸化 LDL をリガンドとする受容体として知られる CD36 や SR-A は AGEs とも結合し、生体内で生じた AGEs の除去に関与することが知られています。Receptor for AGEs（RAGE）は、単球やマクロファージの他に神経や腎臓、血管平滑筋細胞等での発現が見られる AGEs 受容体の一種です。RAGE は AGEs と結合すると炎症や酸化ストレスに対して亢進的に作用することが示唆されており、特に生体内での AGEs 産生に関与する加齢性疾患のバイオマーカーとして注目されてきました。また RAGE は AGEs の中でも、疾患に強く関与するとされるグリセルアルデヒドに由来 AGEs に高い選択性をもって結合し、特に近年アルツハイマーに代表される神経変性疾患への関与も報告されています。したがって RAGE とグリセルアルデヒド由来 AGEs との相互作用を検証することは、糖化反応を介した疾患発症の病態解明において有用かつ新規の知見を与えうることを示しています。近年では、RAGE が癌細胞表面にある特定フォームのコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸といった硫酸化グリコサミノグリカンと結合し、癌転移のメカニズムに関与するとの報告もあり、その研究需要の範囲は拡大の傾向にあります。

本キットは 96 ウェルプレートに固相化されたアルブミンをグリセルアルデヒドで糖化反応させたときに生じる AGEs (Glyceraldehyde-AGEs) をリコンビナント RAGE-Fc を用いて検出するキットです。本キットを用いることにより Glyceralaldehyde-AGEs の形成を阻害する物質のスクリーニングが可能になります。抗糖化をテーマとした機能性食品および化粧品開発、さらに糖化反応を介した加齢性疾患、神経疾患等のバイオマーカー探索研究、予防医学の研究にもご活用ください。

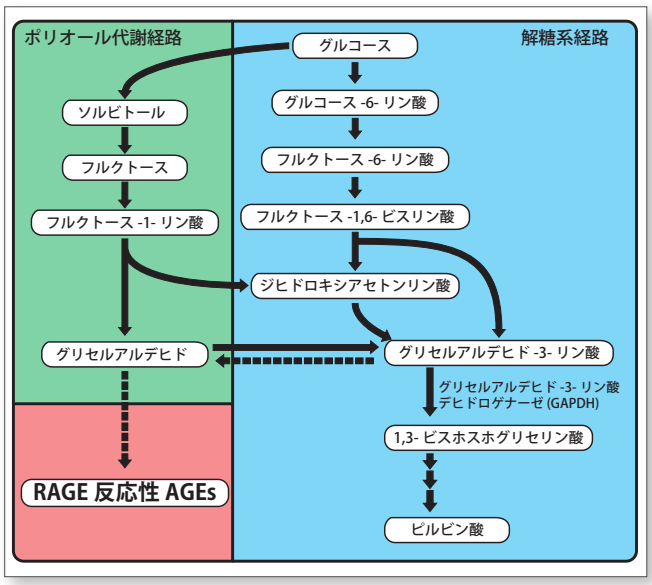


図 1　糖代謝と RAGE 反応性 AGEs の生成経路

【Ⅰ－2】キットの特長

- RAGE-FC を用いて Glyceraldehyde-AGEs 生成を阻害する物質を探索することができます。
- 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。

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。
本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

【Ⅰ－3】キット構成品

本キットは、96 ウェルプレート 1 枚分のアッセイが可能です。

保存温度：4℃

No.	内　容	容量	数量	取扱上の注意
1	アルブミン固相化 96 ウェルプレート	96 well	1 枚	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。
2	プレートシール	96 well 用	2 枚	
3	検体希釈液	30 mL	1 本	
4	グリセルアルデヒド溶液（100 mM）	5 mL	1 本	
5	アミノグアニジン溶液（100 mM） ※ 抗糖化標準物質	500 µL	1 本	
6	洗浄バッファー（× 10）	30 mL	1 本	
7	ブロッキングバッファー	10 mL	1 本	
8	RAGE-FC（凍結乾燥）	50 µL 用	1 本	
9	ALP 標識プロテイン A/G 原液（× 1000）	5 µL	1 本	
10	発色液用タブレット	5 mL 用	3 個	
11	発色液調製用緩衝液	15 mL	1 本	
12	RAGE，ALP 標識プロテイン A/G 用希釈液	10 mL	1 本	

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

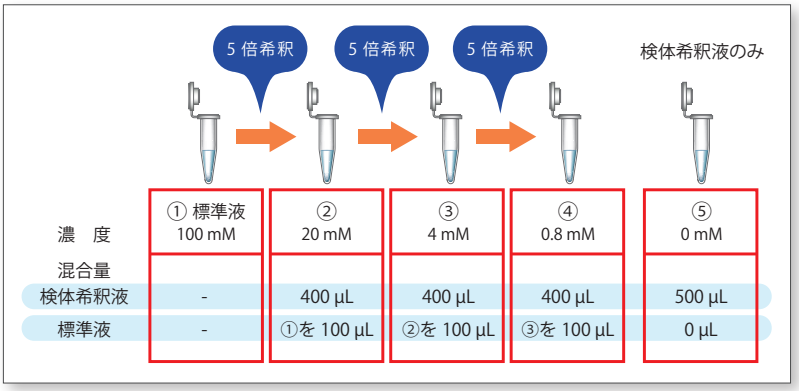
- 精製水
- 10 µL ～ 1000 µL マクロピペット
- 50 µL ～ 200 µL マルチチャネルマイクロピペット
- リサーバー
- プレートリーダー（波長 405 nm）
- 37 ℃恒温器（湿潤状態）

【Ⅱ】サンプルの調製方法

- 陽性コントロールの調製

アミノグアニジン溶液 (AG 100 mM) を検体希釈液で 5 倍希釈系列を作製し陽性コントロールにします。
100 mM , 20 mM, 4 mM, 0.8 mM, 0mM を用意ください。

※冷蔵で 1 週間は保存可能です



濃　度	① 標準液 100 mM	② 20 mM	③ 4 mM	④ 0.8 mM	⑤ 0 mM
混合量					
検体希釈液	-	400 µL	400 µL	400 µL	500 µL
標準液	-	①を 100 µL	②を 100 µL	③を 100 µL	0 µL

- 検体の調製方法

検体に検体希釈液を加えて溶解し、必要に応じて 0.22 µm メンブランフィルターでろ過し、不溶物および細菌等を除去後、検体希釈液で 5 倍希釈系列を作製してください。

- 洗浄液の調製

洗浄液原液（10 倍濃度、30 mL）に 270 mL の蒸留水を加えて撹拌してください。

- RAGE-FC 原液の調製

RAGE-FC（凍結乾燥）に 50µL の超純水を加え溶解し、RAGE-FC 原液とします。
RAGE-FC 原液は -70℃で 1 か月保管できます。凍結融解の繰り返しは避けてください。

- RAGE-FC 溶液の調製（用事調製）

必要な量の RAGE-FC 原液を取り、「RAGE,ALP 標識プロテイン A/G 用希釈液」にて 100 倍希釈してください。
※添加する直前に調製ください。保存はできません。

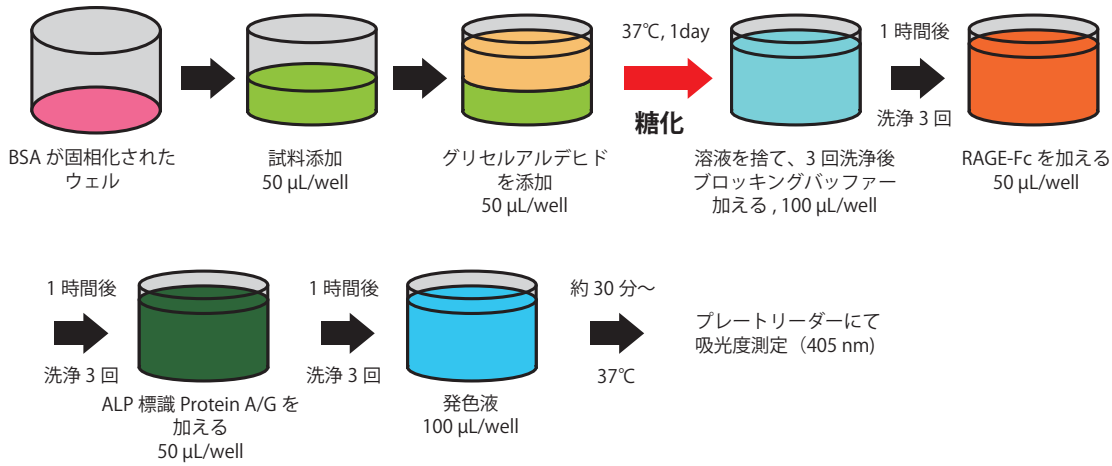
お問い合わせ先：TEL. 03-5632-9610　FAX. 03-5632-9619　E-mail. mail@cosmobio.co.jp

【II】サンプルの調製方法　つづき

● ALP 標識プロテイン A/G の調製（用事調製）　※添加する直前に調製ください。保存はできません。
必要な量の ALP 標識プロテイン A/G 原液を取り、「RAGE, ALP 標識プロテイン A/G　用希釈液」にて 1000 倍希釈してください。

● 発色液の調製
発色液用タブレットを 1 個取り出し、5 mL の発色液調製用緩衝液を加え完全に溶解してください。
※注：発色液の調製は発色操作直前に行ってください。

【III】測定方法

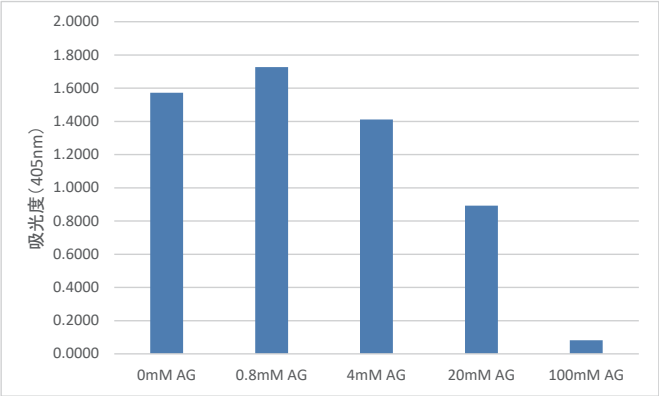


1. 必要なウェル数を準備する。縦 1 列ずつ分離できます。シールは必要分切ってお使いください。
2. 陽性コントロールおよび試験試料液を 50 µL/well 分注してください。
3. 100 mM グリセルアルデヒド溶液 (GA) 溶液を 50 µL/well 添加し、プレートにシールをしてください。
※糖化しないウェル（Blank）が必要な場合、グリセルアルデヒド溶液を添加しないウェルを 1 well 用意してください。
Blank には検体希釈液のみを 100µL 入れてください。
4. 湿潤状態下（注意 1 ）の 37℃インキュベーターで 24 時間静置し固相化 BSA を糖化させてください。
5. 反応溶液を捨て、洗浄液 200 µL/well で 3 回洗浄してください。
6. ブロッキング液 100 µL/well を添加して室温 1 時間静置してください。
7. ブロッキング液を捨て、洗浄液 200 µL/well で 3 回洗浄してください。
8. RAGE-FC 溶液は用事調製したものを 50uL/well 添加します。室温で 1 時間静置してください。
9. RAGE-FC 溶液を捨て、洗浄液 200 µL/well で 3 回洗浄してください。
10. ALP 標識プロテイン A/G 溶液は用事調製したものを 50uL/well 添加します。室温で 1 時間静置してください。
11. ALP 標識プロテイン A/G を捨て、洗浄液 200 µL/well で 3 回洗浄してください。
12. 発色液を 100µL/well 添加して 37℃で 30 分～ 1 時間静置後、発色度合いを見て波長 405nm で吸光度を測定してください。

※注意 1：**湿潤状態について**
溶液が乾燥してしまうと正確な測定結果を得ることができません。アッセイ中は湿潤状態を保つようにご注意ください。湿度調整付きインキュベーターが無い場合は、ろ紙などを蒸留水で湿らせたものをタッパーの底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。CO_2 インキュベーターの使用は避けてください。溶液の pH が変化するため糖化スピードが低下します。

【IV】実施例 ― RAGE 反応性 AGEs 生成阻害試験―

アミノグアニジンの RAGE 反応性 AGEs 生成阻害効果



【V】参考文献

[1] Schmidt, A. M. *et al., J. Biol. Chem.* **267**, 14987-14997, 1992.

[2] S. Mizumoto *et al. J. Biol. Chem.* **287** (23), 18985-18994, 2012.

[3] A. Nishikawa, T. Taira, K. Yoshizato. (1987) *In Vitro* Maturation of Collagen Fibrils Modulates Spreading, DNA Synthesis, and Collagenolysis of Epidermal Cells and Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **171**, p164-177.

[4] H. Shoda *et al.* (1997) Inhibitory Effects of Tenilsetam on the Maillard Reaction. *Endocrinology* **138**, p1886-1892.

[5] Jun-ichi Takino *et al.* (2010) The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J. Gastroenterol* **45**: 646-655.

[6] M. Takeuchi (2012) Participation of toxic AGEs (TAGE) in a variety of diseases. *Folia Pharmacol. Jpn.* **139**, p193-197.

[7] S. Mizumoto *et al. FEBS Journal.,* Vol. **280** Issue 10, p2462-2470, 2013.

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵　送　〒047-0261　北海道小樽市銭函 3 丁目 513 番 2
コスモ・バイオ株式会社　札幌事業所 宛

E-mail　primarycell@cosmobio.co.jp　※ PDF ファイルにてお送りください。

12079

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : https://www.cosmobio.co.jp/
● 営業部（お問い合わせ）
TEL :（03）5632-9610　FAX :（03）5632-9619
TEL :（03）5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）
TEL :（0134）61-2301　FAX :（0134）61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp