

Fecal Mucin Assay Kit

Cat. No. CSR-FFA-MU-K01

Edition Date : 2023/03/13

www.cosmobiousa.com

【1-1】 Background

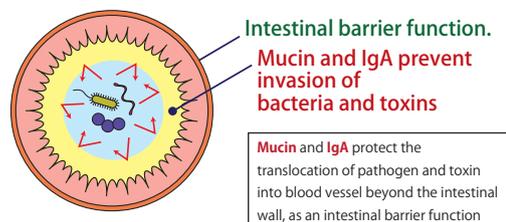
Mucins are a family of heavily glycosylated proteins, and main components of mucosa such as saliva, tear, gastric fluid enteric fluid. Basic configuration of mucin are macromolecules linked ramiform sugar chain to peptide framework.

The heterogeneous property of sugar chain makes them diversity, the molecules has various function, such as specific molecular recognition. Some of the sugar chains recognize a specific protein derived from virus, bacteria. Mucins are positioned in mucosal barrier function in gut, stopping the translocation of pathogen and toxin into blood vessel beyond the intestinal wall.

Fig.1 Structure of Mucin



Fig. 2 Intestinal tract barrier function by mucin



【1-2】 Features

Fecal Mucin Assay Kit is an easy to detection system for content of mutin in feces.

There is a possibility that it can be used for....

- Development of functional food
- Research of intestinal flora
- Food research
- Agricultural research

【I - 3】 Assay Principle

Mucins are a family of high molecular (1000kda-10000kda) and heavily glycosylated protein. Mucin domains within the protein core are rich in threonine, serine and hydroxyproline. The reducing end of sugar chain (GalNAc) are frequently-linked to these amino acid by the post-translational O-glycosylation.

This kit contains components to determine fecal mucin content.

Step1: Extraction and partial purification of mucin from feces.

Step2: Determination of mucin

O-glycosidically linked oligosaccharide chains is β -eliminated by diluted alkali, and reducing end of sugar chain is formed. Reducing carbohydrates are fluorescence-labeled at high temperature to produce intensity fluorescent condensate.

【I - 4】 Kit Components

No.	Component	Volume	Quantity	Storage
1	Buffer A	Tablet for 100mL	3	4-10°C
2	Buffer B	25mL	1	
3	Buffer C	25mL	1	
4	Reagent A	1.0mL	1	
5	Reagent B	1.5mL	2	
6	Standard Solution (GalNAc 250 μ g/ml)	1.0mL	1	
7	Enzyme Solution	1.5mL	1	

This product is designed for the measurement in fluorescence plate readers (96 well plates).

When using Fluorescence plate reader, it can measure 100 samples.

When you measure with a light spectrophotometer, please use it with a microcell.

Required but not provided

- Purified water
- 99.5% ethanol
- Fluorescent microplate reader and black plate
- Micro test tube (2mL, 1.5mL)
- Micro test tube (2mL, 1.5mL)

(When you measure with a light spectrophotometer, please prepare a microcell)

【 II -1 】 Assay Protocol

Working Calibrator: N-acetylglucosamine 250 μ g/ml

- Create a standard curve by serial dilution as indicated in the table below.
- The remaining undiluted Standard Solution should be stored at 2-10°C
- Diluted Calibrator is stable and should be stored at 2-10°C for 1 month.

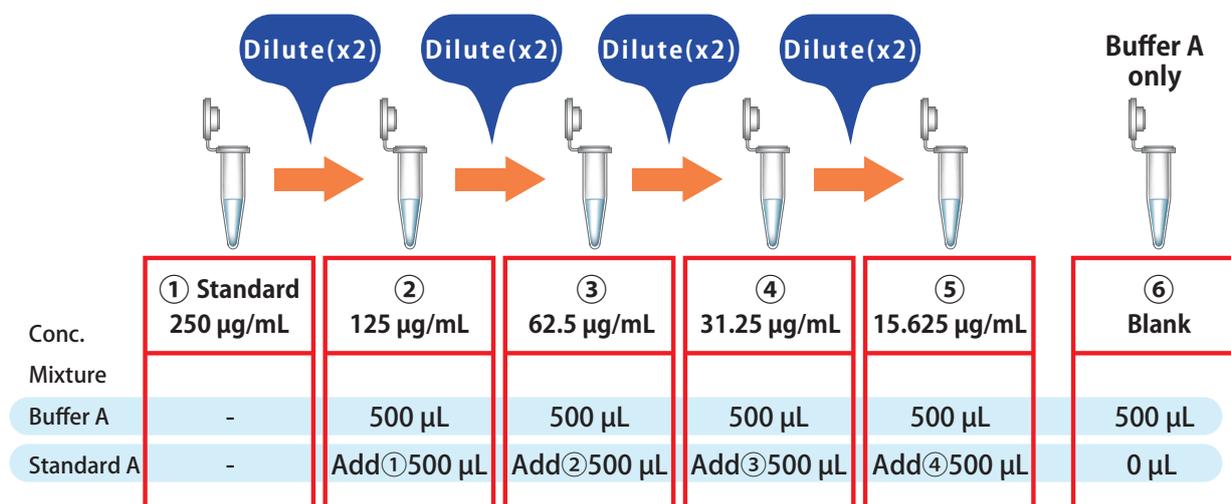
Preparation of Buffer A

Dissolve 1 tablet with 100ml of purified water.

Preparation of feces powder

Feces should be freeze-dried and grounded in a mortar and stored at -20°C until use.

Preparation of standard solution

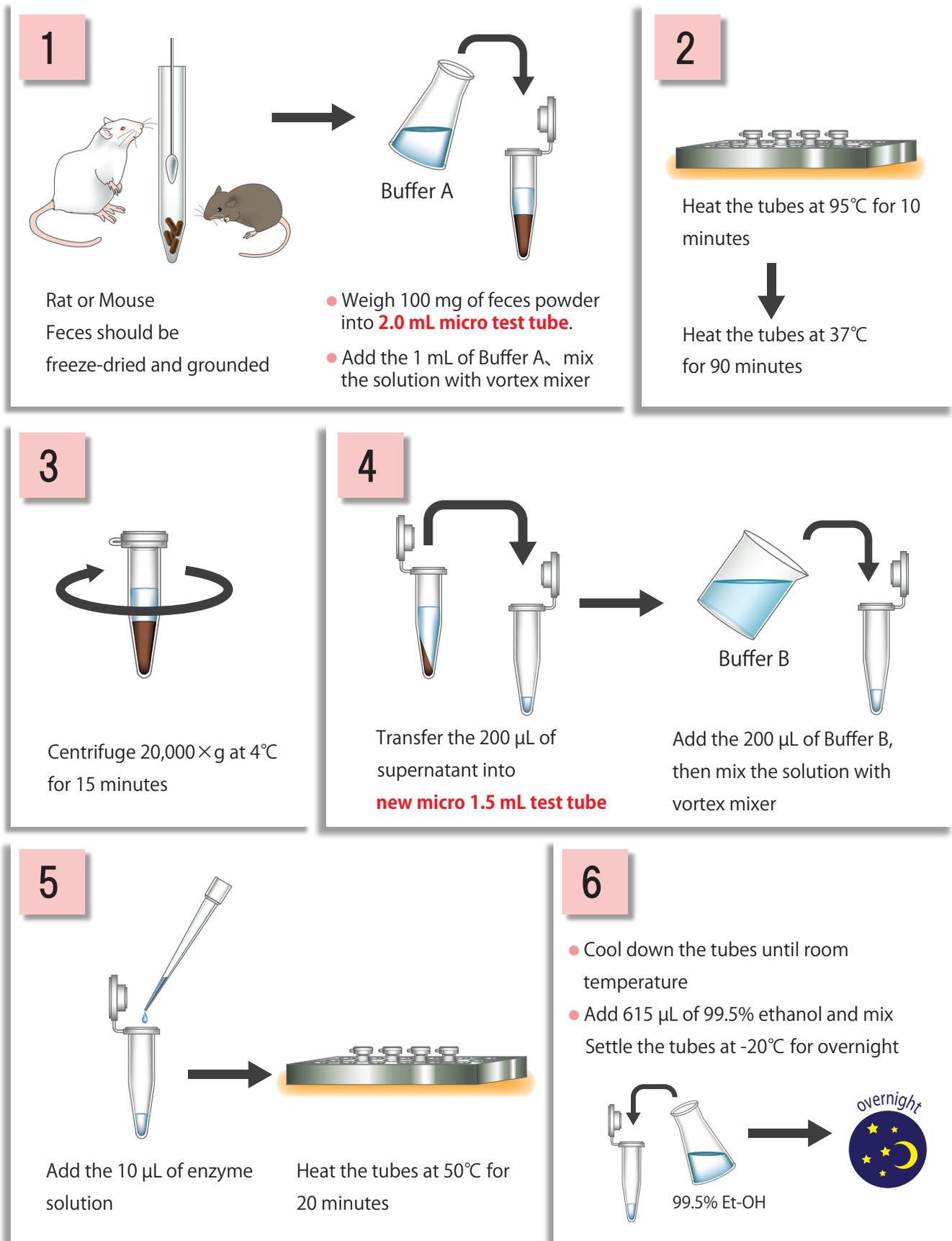


【 III-1 】 Measurement of fecal mucin

- 1 Weigh 100 mg of feces powder into micro test tube, and add the 1ml of Buffer A, then mix the solution with vortex mixer for 30sec.
- 2 Heat the tubes at 95°C for 10 minutes to denature the glycosidase derived from bacteria.
Heat the tubes at 37°C for 90 minutes to extract the mucins from the feces.
- 3 Centrifuge 20,000 × g at 4°C for 15 minutes.
- 4 Transfer the 200ul of supernatant into another micro test tube, and add 200ul of Buffer B, then mix the solution with vortex mixer.
- 5 Add the 10ul of enzyme solution, mix together, and heat the tubes at 50°C for 20 minutes to remove the dietary starch.
- 6 Cool down the tubes until room temperature, add 615ul of 99.5% ethanol. After mixing, settle the tubes at -20°C for overnight.
- 7 Next day, centrifuge the tubes 20,000 × g at 4°C for 10 minutes, remove the supernatant.
- 8 Add the 1ml of Buffer A to the precipitate, resolve the precipitate. (Sample solution).
- 9 Transfer the 20ul of each sample or standard solution (①~⑥) into the another micro test tube (for 500ul).
Add the 24ul of reagent mixture (mix together Reagent A and Reagent B, 1:5, just before use) to the test tubes.
After mixing, heat the tube up at 100° C for 30 minutes.
- 10 Cool down the tube until room temperature, add the 200ul of Buffer C, and mix together with vortex mixer.
- 11 Transfer the 100ul of the solution into the wells of 96 well black plate, and then measure the fluorescence using fluorescence plate reader set at a wavelength (ex: 336nm em: 383nm).
- 12 Create a standard curve by serial dilution as indicated in the below. Draw a smooth curve through these points to construct the calibration curve. Read the concentration for the samples from the calibration curve.
Calculation of mucin contents in the 1 g of feces.
- 13 Value measured at step (12) times 50 is mucin contents in the 1g of feces.

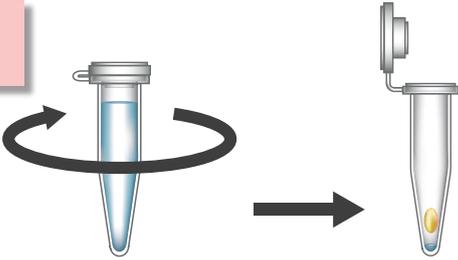
【III-2】 Measurement -flow chart- Step 1~6: 3~4 hrs

www.cosmobiousa.com



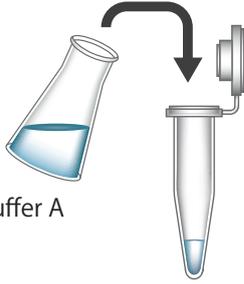
【 III-3 】 Measurement -flow chart- Continued Step 7~13: 1~1.5 hrs

7



20,000×g、4°C、10 min Centrifuge the tubes
 Remove the supernatant
Precipitate can be stored at -20°C

8



Buffer A

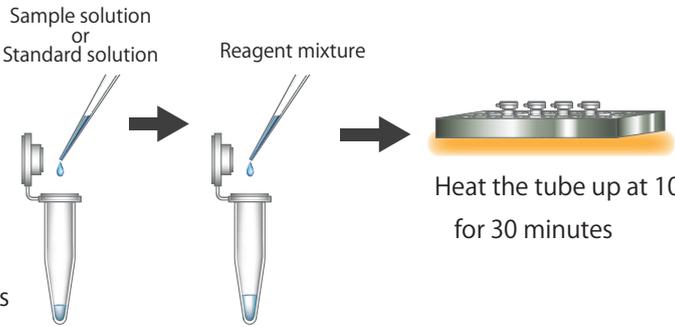
Add the 1 mL of Buffer A to the precipitate
 Mix well and resolve the precipitate
 ☆This solution becomes sample solution

9

- Mix together Reagent A and Reagent B, 1: 5, just before use
 ☆This solution becomes reagent mixture

● Sample solution : 20 μL
 or, Standard solution : 20 μL

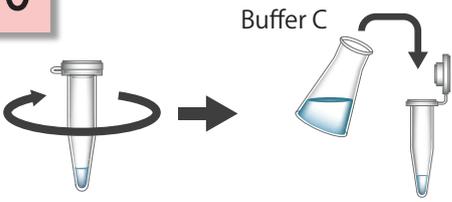
● Reagent mixture : 24 μL
 Move these reagents to new 500 μL tubes



Sample solution or Standard solution
 Reagent mixture

Heat the tube up at 100°C for 30 minutes

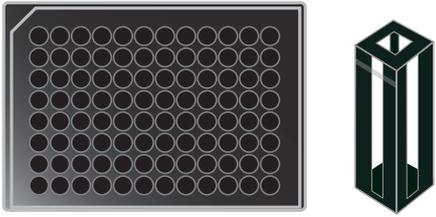
10



Buffer C

Cool down the tube until room temperature, add the 200 μL of Buffer C, and mix together with vortex mixer

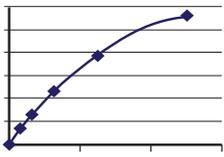
11



Transfer the 100 μL of the solution into the wells of 96 well black plate, and then measure the fluorescence using fluorescence plate reader set at a wavelength (ex:336 nm em:383 nm)

12 Create a standard curve by serial dilution as indicated in the below.

Draw a smooth curve through these points to construct the calibration curve

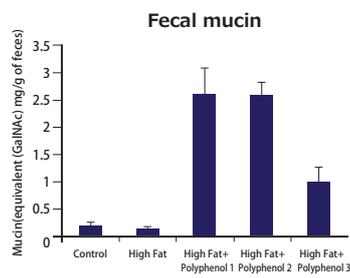
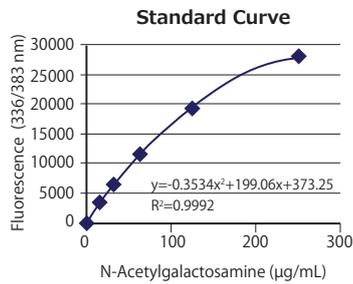


13 Value measured at step (12) times 50 is mucin contents in the 1 g of feces

Mucin

【 IV 】 Example of Results

Effects of polyphenols administration on the intestinal barrier function in high-fat diet fed rats.



Dietary polyphenols derived from aronia, hascup and bilberry, markedly-elevated the amount of fecal mucin. (n=5)

Prepare 5 experimental groups (6 rats per group)

- ① Control ⇒ 4 weeks
- ②③④⑤ High-Fat diet ⇒ 4 weeks



5 experimental groups (6 rats per group)

- ① Control ⇒ 4 weeks
- ② High-Fat diet ⇒ 4 weeks
- ③ High-Fat diet + Polyphenol A ⇒ 4 weeks
- ④ High-Fat diet + Polyphenol B ⇒ 4 weeks
- ⑤ High-Fat diet + Polyphenol C ⇒ 4 weeks

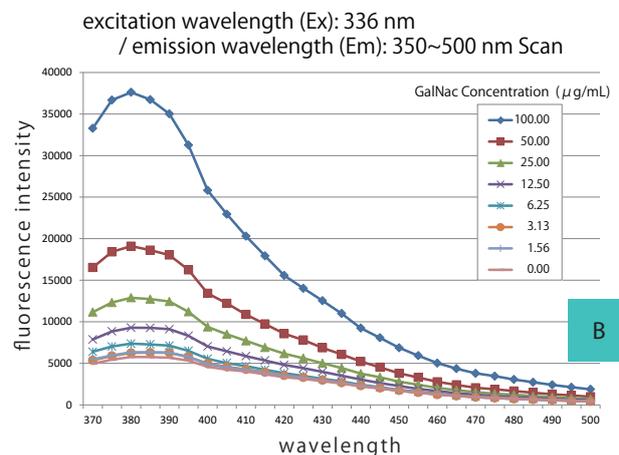
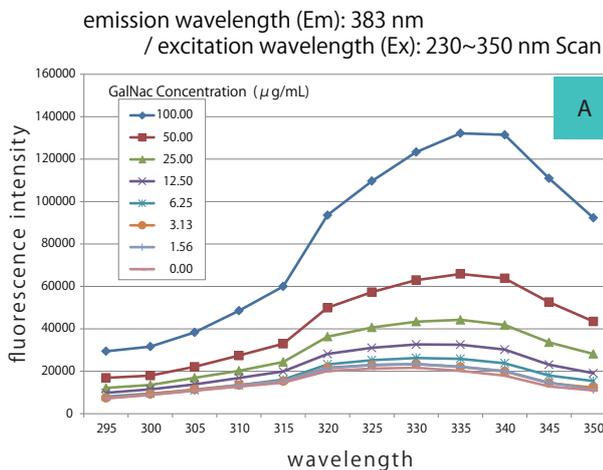


Measure three days worth of feces

Results

The polyphenol addition groups enhanced the amount of mucin as compared to High-Fat diet groups.

【 V 】 Reference data



Changes of excitation wavelength and fluorescent wavelength in standard solution of each density

A : Excitation spectrum for Emission wavelength (Em) 383 nm

B : Emission spectrum for Excitation wavelength (Ex) 336 nm

The recommended measurement wavelengths are 336 nm for Ex and 383 nm for Em, but you might not be able to measure the fluorescence wavelength when fluorescence plate reader with interference filter system is used. In such a case, please shift the fluorescent wavelength to longer.

【 VI 】 References

- [1] Susumu Honda, Yoshikazu Matsuda, Masaye Takahashi, and Kazuaki Kakehi. Fluorimetric Determination of Reducing Carbohydrates with 2-Cyanoacetamide and Application to Automated Analysis of Carbohydrates as Borate Complexes. (1980) *Analytical Chemistry*, Vol.52, No. 7
- [2] Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Heidt PJ, et al.: Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis*: additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut* 40: 497-504, 1997.
- [3] Crowther RS, Wetmore RF: Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 163: 170-174, 1987.
- [4] Okazaki Y, Han Y, Kayahara M, Watanabe T, Arishige H, Kato N. Consumption of curcumin elevates fecal immunoglobulin A, an index of intestinal immune function, in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol* (2010);56(1):68-71.
- [5] Yukako Okazaki, Hiroyuki Tomotake, Kazuhisa Tsujimoto, Masahiro Sasaki, and Norihisa Kato. Consumption of a Resistant Protein, Sericin, Elevates Fecal Immunoglobulin A, Mucins, and Cecal Organic Acids in Rats Fed a High-Fat Diet. (2011) *The Journal of Nutrition*, 21, 10.3945/jn.111.144246.
- [6] Zaki Utama & Yukako Okazaki & Hiroyuki Tomotake & Norihisa Kato, Tempe Consumption Modulates Fecal Secondary Bile Acids, Mucins, Immunoglobulin A, Enzyme Activities, and Cecal Microflora and Organic Acids in Rats. *Foods Hum Nutr* (2013) 68:177–183.



【JAPAN】
TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: +81-3-5632-9619
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



【Outside Japan】
2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: info@cosmobiousa.com
URL: www.cosmobiousa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600

一般研究用キット

Fecal Mucin Assay Kit

糞便ムチン測定キット

Cat. No. FFA-MU-K01

2019年10月28日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景と測定原理

ムチン (Mucin) は糖タンパク質の一種で唾液、涙、胃液、腸液などの粘液の主成分です。基本構造は分子量 100 万～1000 万の糖を多量に含む糖タンパク質で、10～80 残基のペプチドの繰り返し構造をコアとし、セリン (Ser) またはスレオニン (Thr) の水酸基に対し、糖鎖の還元末端の N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が、O-グリコシド結合により、高頻度で結合しています (図1参照)。

ペプチド骨格に糖鎖が枝状に結合した分子で、枝状の糖鎖の構造が不均一であることから多様性を生み、これによって多彩な生理機能を実現しています。この中には特異的分子認識機能を持っておりウイルスや菌などの表面にあるタンパク質などを認識する糖鎖も知られています。このような性質から腸管においては、ウイルス、病原菌、および菌体由来の毒が腸管壁を超え血中に移行することを阻止する働き、すなわち腸管バリア機能物質としても位置付けられています (図2参照)。

本キットはアルカリ条件下で O-グリカン を β 脱離で分解し、同時に糖鎖還元末端に蛍光ラベルさせることで得られる蛍光強度を測定することにより、糞便中のムチン含量を測定することができます。

図1 ムチンの構造

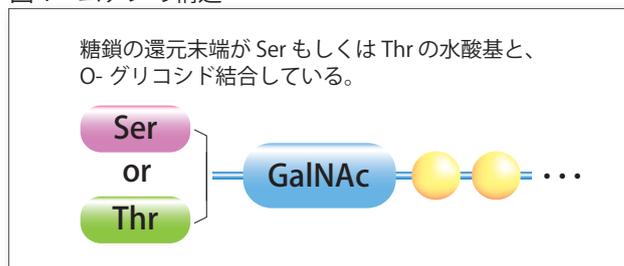
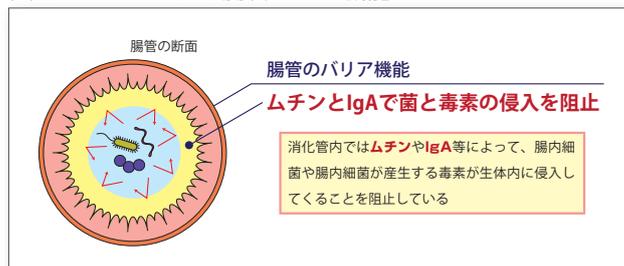


図2 ムチンによる腸管バリア機能



【1-2】キットの特長

糞便中のムチン含量を簡便に測定できます。

- 機能性食品の開発
 - 腸内フローラ研究
 - 食品系の研究
 - 農学系の研究
- …等に利用できる可能性があります。

【1-3】キット構成

保存温度：4～10℃

内 容	容 量	数 量	取扱上の注意
緩衝液 A (Buffer A)	100 mL 用 タブレット	3 個	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。
緩衝液 B (Buffer B)	25 mL	1 本	
緩衝液 C (Buffer C)	25 mL	1 本	
試薬 A (Reagent A)	1.0 mL	1 本	
試薬 B (Reagent B)	1.5 mL	2 本	
標準液 (Standard Solution [GalNAc 250 µg/mL])	1.0 mL	1 本	
酵素溶液 (Enzyme Solution)	1.5 mL	1 本	

本製品は蛍光プレートリーダー(96 ウェルプレート)での測定を想定して設計されています。蛍光プレートリーダーを使用する場合 100 検体を測定できます。蛍光分光光度計を使用して測定する場合は、マイクロセルをご用意ください。

ご準備いただくもの

- 滅菌蒸留水 (精製水)
- 99.5% エタノール
- 蛍光プレートリーダーおよびブラックプレート
- マイクロテストチューブ (2 mL、1.5 mL)
- 蛍光分光光度計で測定の場合は、マイクロセルをご用意ください。

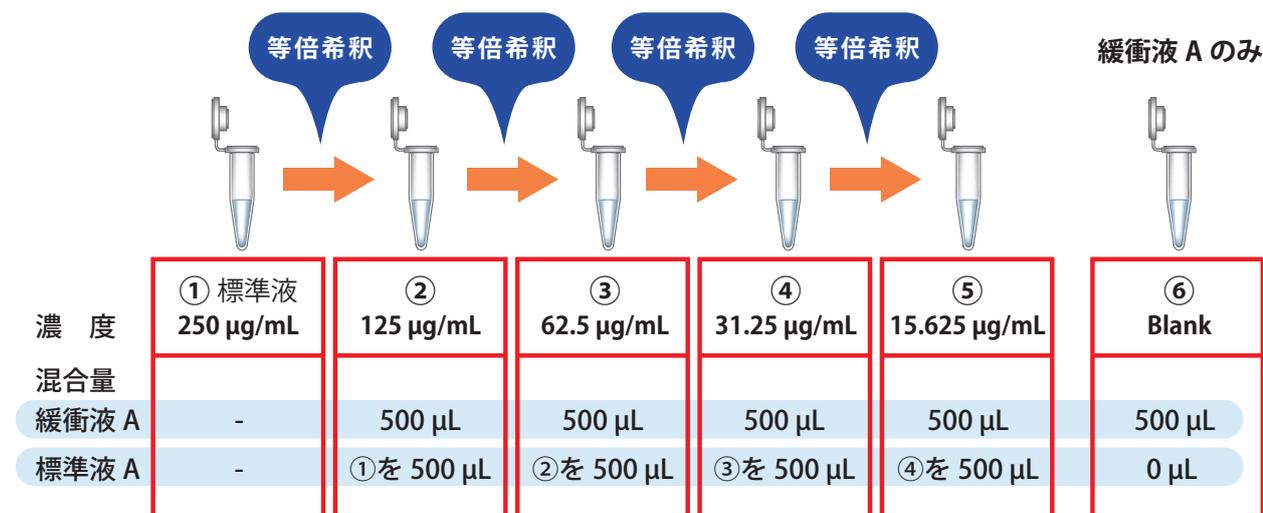
【II -1】 緩衝液 A の調製方法

滅菌蒸留水（精製水）100 mL に対し 1 個のタブレットを溶解し使用します。

【II -2】 標準液の調製方法

標準液（N- アセチルガラクトサミン 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を原液として緩衝液 A にて等倍希釈し、

- ① 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ② 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ③ 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ④ 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⑤ 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 ⑥ ブランク（緩衝液 A のみ）を調製します。



新しい 1.5 mL マイクロテストチューブに②～⑥まで、ナンバリングし緩衝液 A を 500 μL ずつ分注します。

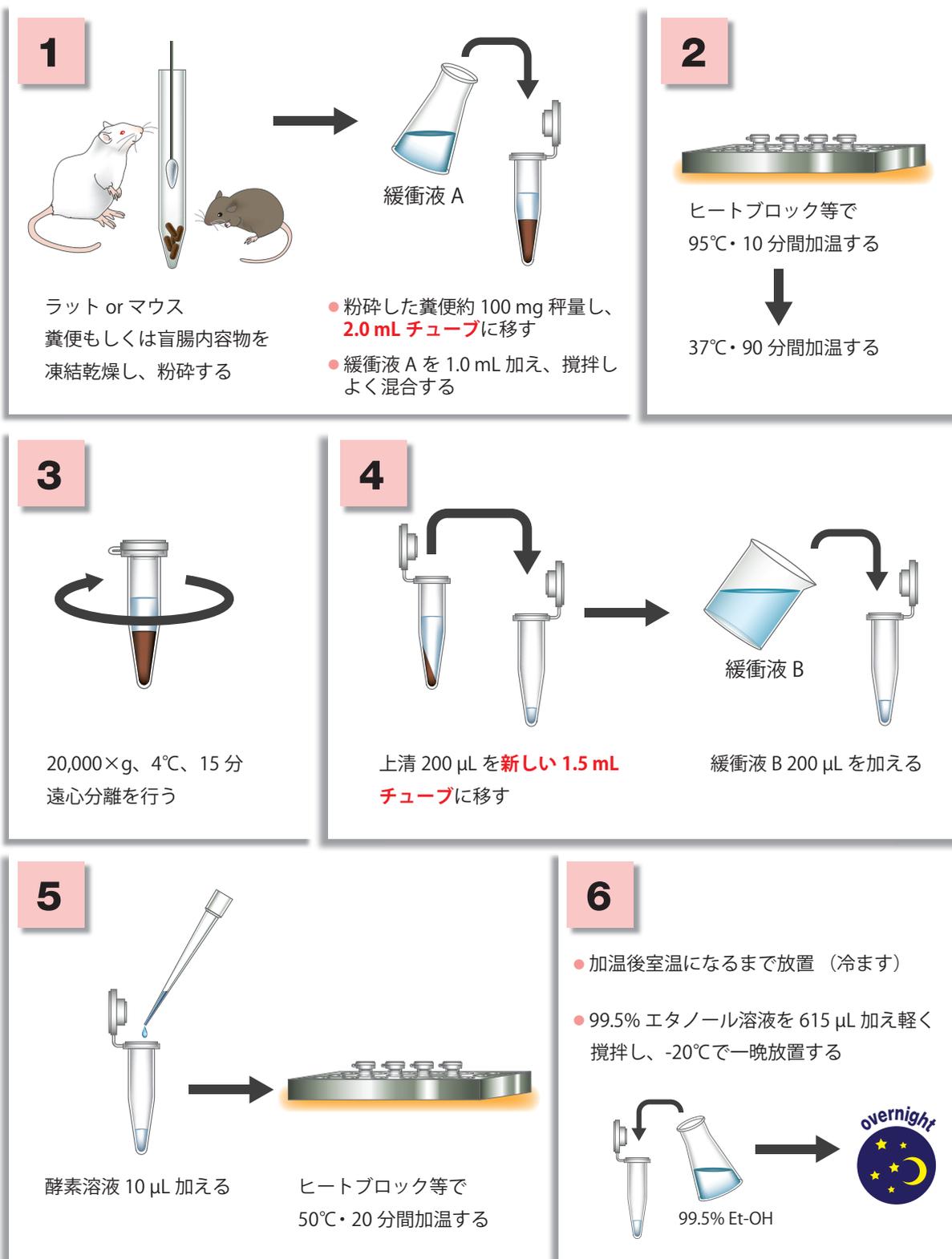
①から 500 μL 取り②へ加え、よく混和します。②から 500 μL 取り③へ加えます。以後⑤まで同操作を繰り返し、スタンダードとします。⑥のブランクは緩衝液 A のみとします。

【III -1】測定方法

- 1 凍結乾燥し、粉碎した糞便（注1）約 100 mg を 2 mL 用マイクロテストチューブに測りとり、1.0 mL の緩衝液 A を加え試験管ミキサーにて 30 秒間混和します。（糞便の形状が崩れていない場合、スパーテル等で糞便をつぶしてください。）
- 2 細菌由来のグリコシダーゼを変性するため、95℃で 10 分間加温し、続いてムチンを可溶化させるために、37℃で 90 分間加温します。
- 3 4℃・20,000 × g・15 分間、遠心分離をしてください。
- 4 上清 200 μL を 1.5 mL マイクロテストチューブに移し、緩衝液 B を 200 μL 加えます。
- 5 次に、酵素溶液 10 μL を加え攪拌後 50℃で 20 分間加温してください（可溶性デンプンの分解）。
- 6 室温で冷ました後、99.5%エタノール溶液を 615 μL 加え攪拌後、-20℃にて一晩放置します。
- 7 翌日、4℃・20,000 × g・10 分間、遠心分離し、上清を除去します。
（途中で作業を中断したい場合はこの段階で得られる沈殿物を -20℃で保存してください。）
- 8 沈殿物に、緩衝液 A を 1.0 mL 加え溶解し検体ムチン測定試料液とします。
- 9 検体ムチン測定試料液もしくは標準液を 20 μL とり、各々 500 μL 用マイクロテストチューブに入れ、使用直前に試薬 A：試薬 B を 1：5（v/v）の比で混合した溶液を 24 μL 加え攪拌後、100℃で 30 分間加温します。（アルカリ処理によって生じるムチンの糖鎖還元末端に試薬 A が反応し蛍光を発します。）
- 10 室温まで冷めたのを確認後、緩衝液 C を 200 μL 加え攪拌してください。
- 11 ブラックプレートに、100 μL/well で分注し、蛍光プレートリーダーにて励起波長 336 nm・蛍光波長 383 nm にて測定してください（蛍光プレートリーダーがない場合には蛍光分光光度計にてマイクロセルを使用して 1 検体ずつ測定してください）。
- 12 標準液の蛍光値より検量線を作成し、検体ムチン測定試料液中のムチン濃度を算出してください。測定時のムチン濃度が 120 μg/ml 以上のときは 2 次曲線回帰で算出してください。60 μg/ml 以下の場合には直線回帰でも大きな差は生じません。
- 13 糞便 1 g 当たりのムチン含量は、(12) で算出された数値に 50 倍した値です。

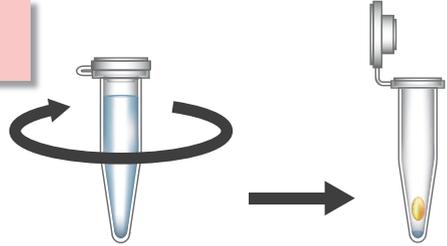
注1：糞便はウェットもしくは、エアードライされた糞便でも測定可能です。ラット、マウスなどの小動物糞便の場合、24 時間プール糞便を乾燥後粉末化して測定することを推奨いたします。

【III -2】測定方法 — フローチャート — 1 ~ 6 : 3 ~ 4 hrs



【Ⅲ -2】 測定方法 ー フローチャート ー つづき 7 ~ 13 : 1 ~ 1.5 hrs

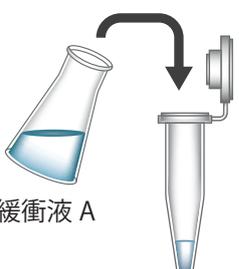
7



20,000×g、4℃、10分
遠心分離を行う

上清を除去する
**沈殿物は -20℃で
保存可能**

8



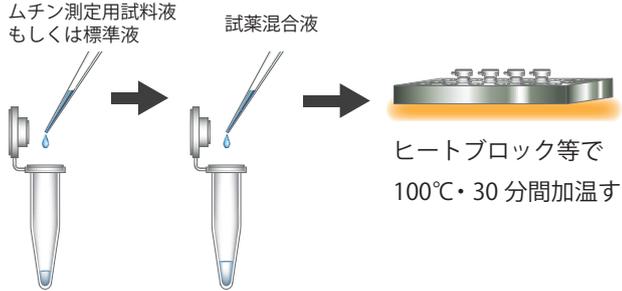
緩衝液 A

緩衝液 A を 1.0 mL 加え、攪拌しよく混合する
☆この溶液が、ムチン測定用試料液となります

9

- 試薬 A を 1 とし、試薬 B を 5 として、混合する
☆この溶液を試薬混合液とする

- ムチン測定用試料液： 20 μL
もしくは標準液： 20 μL
- 試薬混合液： 24 μL
を新しい 500 μL チューブに移す

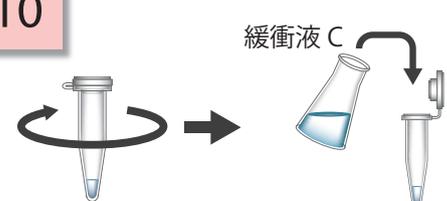


ムチン測定用試料液
もしくは標準液

試薬混合液

ヒートブロック等で
100℃・30 分間加温する

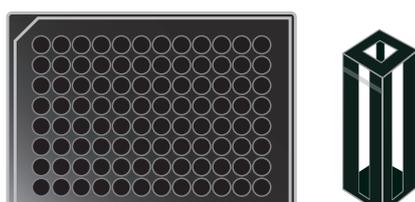
10



緩衝液 C

- 加温後、蓋に溶液が付いている場合があるので、一度スピンドウンを行い、溶液が室温に戻るまで放置後する
- 緩衝液 C を 200 μL 加え攪拌する

11

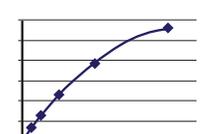


- Black plate の場合、100 μL/well
- ミクロセルの場合、100 ~ 200 μL

入れ、励起 336 nm/ 蛍光 383 nm で測定してください

12

標準液の蛍光値より検量線を作成し、検体ムチン測定試料溶液中のムチン濃度を算出



13

糞便 1 g 当たりのムチン含量は、(12) で算出された数値に 50 倍した値です。



Mucin

6

お問い合わせ先：TEL. 03-5632-9610

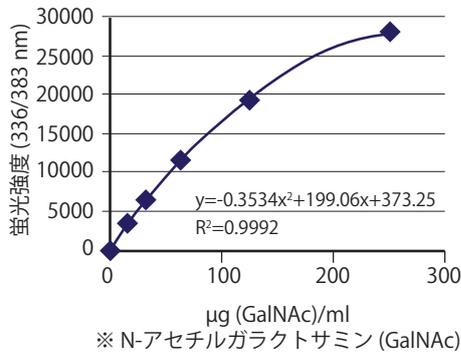
FAX. 03-5632-9619

E-mail. mail@cosmobio.co.jp

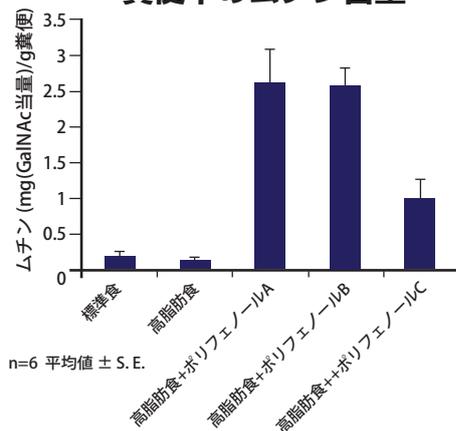
【IV】ムチン定量の例

ポリフェノール投与が高脂肪食摂取ラットの腸内環境におよぼす影響

ムチン定量用検量曲線



糞便中のムチン含量



1群6匹 5群に分ける

① 標準食 → 4週間 ②③④⑤ 高脂肪食 → 4週間



1群6匹 5群

① 標準食 → 4週間
 ② 高脂肪食 → 4週間
 ③ 高脂肪食+ポリフェノールA → 4週間
 ④ 高脂肪食+ポリフェノールB → 4週間
 ⑤ 高脂肪食+ポリフェノールC → 4週間

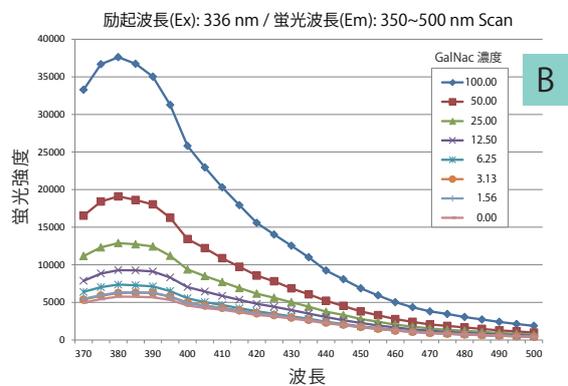
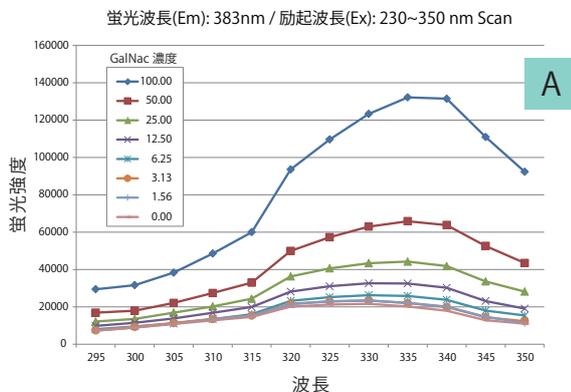


3日間分の糞便を回収し測定

結果

高脂肪食群と比べて、ポリフェノールを添加した群でムチン含量が増加した。

【V】参考資料



参考資料 各濃度の標準液における励起波長および蛍光波長の変化

A: 蛍光波長 (Em) 383 nm に対する励起スペクトル B: 励起波長 (Ex) 336 nm に対する蛍光スペクトル

推奨する測定波長は Ex 336 nm, Em 383 nm ですが、干渉フィルター方式の蛍光プレートリーダーの場合フィルターの半値幅によって推奨測定波長で測定できないケースがあります。その場合は励起波長と蛍光波長の波長差を大きくして測定して下さい。



【VI】参考文献

- [1] Susumu Honda, Yoshikazu Matsuda, Masaye Takahashi, and Kazuaki Kakehi Fluorimetric Determination of Reducing Carbohydrates with 2-Cyanoacetamide and Application to Automated Analysis of Carbohydrates as Borate Complexes. (1980) *Analytical Chemistry*, Vol. 52, No. 7
- [2] Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Heidt PJ, et al.: Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis*: additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut* 40: 497-504, 1997.
- [3] Crowther RS, Wetmore RF: Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 163: 170-174, 1987.
- [4] Okazaki Y, Han Y, Kayahara M, Watanabe T, Arishige H, Kato N. Consumption of curcumin elevates fecal immunoglobulin A, an index of intestinal immune function, in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol* (2010); 56(1): 68-71.
- [5] Yukako Okazaki, Hiroyuki Tomotake, Kazuhisa Tsujimoto, Masahiro Sasaki, and Norihisa Kato. Consumption of a Resistant Protein, Sericin, Elevates Fecal Immunoglobulin A, Mucins, and Cecal Organic Acids in Rats Fed a High-Fat Diet. (2011) *The Journal of Nutrition*, 21, 10.3945/jn.111.144246.
- [6] Zaki Utama & Yukako Okazaki & Hiroyuki Tomotake & Norihisa Kato, Tempe Consumption Modulates Fecal Secondary Bile Acids, Mucins, Immunoglobulin A, Enzyme Activities, and Cecal Microflora and Organic Acids in Rats. *Plant Foods Hum Nutr* (2013) 68: 177-183

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き投稿された論文、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。

12078



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 : <http://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