



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 —

Collagen AGEs Assay Kit, CMA-Specific, Glyoxal

コラーゲン AGEs 抗糖化アッセイキット, CMA 特異的, グリオキサル

Cat. No. AAS-AGE-K03

2024 年 11 月 15 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あるが、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タンパク質の荷電を変化させて立体構造が変化し、酵素の活性や構造タンパク質の立体構造に大きく影響を及ぼすことが知られています。この反応はメイラード反応（Glycation）もしくは糖化と呼ばれ、アマトリ転位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後期生成物（Advanced Glycation End-products: AGEs）に至る後期反応に分けられます。皮膚、血管壁、骨などあらゆる臓器を形成する構造タンパク質であるコラーゲンも例外ではなく糖化反応を受けます。

カルボキシメチルアルギニン：N^ω-(carboxymethyl) arginine: CMA は、AGEs の 1 種でグリオキサルとアルギニンが反応して生成されます。また、CMA は非蛍光性・非架橋性 AGEs という特徴があり、コラーゲンに特異的に生成することが報告されています⁽¹⁾。生体コラーゲンに AGEs が蓄積すると、コラーゲンの変性に伴って線維芽細胞にも悪影響を及ぼし、血管のみならず肌の老化の要因になると言われています。

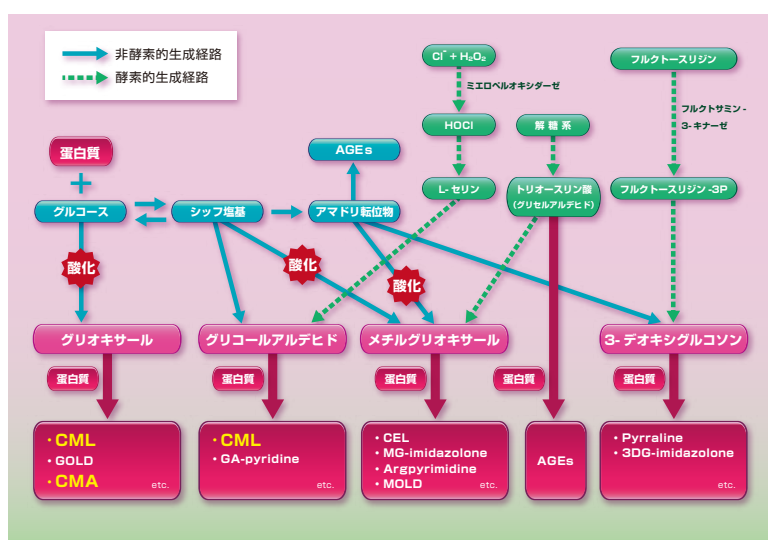


図1 生体内 AGEs の生成経路

本キットはプレート上に固相化されたコラーゲンをグリオキサルで糖化をさせたときに生成される CMA を迅速に ELISA 法によって検出するキットです。コラーゲンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングを簡便に行うことができます。コラーゲンに特化した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。

【1-2】キットの特長

- コラーゲンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングを簡便に行うことが可能
- 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有用



【I-3】キット構成

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	コラーゲン固相化 96 ウェルプレート (アルミパウチ入り)	8-well × 12 strips	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	-	2 枚	
3	アミノグアニジン溶液 (10 mM) ※抗糖化標準物質	250 µL	1 本	
4	検体希釈液	30 mL	1 本	
5	グリオキサル溶液 (4 mM)	5 mL	1 本	
6	洗浄バッファー (× 10)	50 mL	1 本	
7	ブロッキングバッファー	50 mL	1 本	
8	抗 CMA 抗体 (× 100)	100 µL	1 本	
9	HRP 標識二次抗体 (× 100)	100 µL	1 本	
10	発色液	10 mL	1 本	
11	停止液	10 mL	1 本	

96 ウェルコラーゲン固相化プレートを長期間保存する場合は、冷凍 (-20℃) にて保存ください。

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
- リサーバー
- 50 µL ~ 200 µL マルチチャネルマイクロピペット
- プレートリーダー (波長 450 nm)
- 37 °C 恒温器 (湿潤状態)

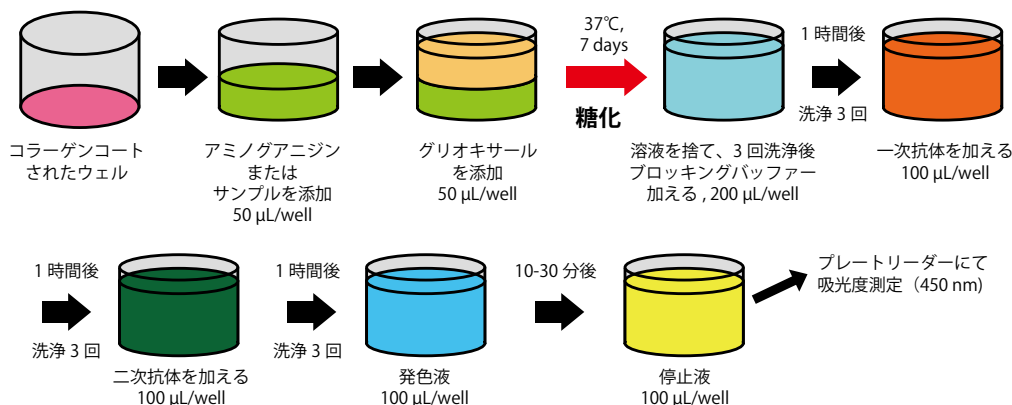
【I-4】キットの原理

コラーゲンを固相化したプレート上にグリオキサルを添加することによって糖化が起こり、7 日間、37℃でインキュベーションすることによって AGEs が生成されます。抗 CMA 抗体を用いることで、グリオキサルを介して生成された CMA を検出できます。アミノグアニジン (抗糖化標準物質) やサンプルの CMA 生成阻害活性を評価することができます。

【II】サンプルの調製方法

- 洗浄バッファーの調製
洗浄バッファー (× 10) を精製水で 10 倍希釈してください。
- 抗糖化標準物質アミノグアニジンの調製
アミノグアニジン溶液 (10 mM) は検体希釈液にて調製してください。
- サンプルの調製
検体希釈液にて溶解し、0.2 µm フィルターにてろ過滅菌をしてください。
※検体希釈液でサンプルを溶解した際、沈殿が生じるような溶けにくいサンプルは測定できない場合があります。
- 抗体の調製 (用事調製)
一次抗体は、抗 CMA 抗体 (× 100) をブロッキングバッファーで 100 倍希釈してください。
二次抗体は、HRP 標識二次抗体 (× 100) をブロッキングバッファーにて 100 倍希釈してください。
※ 調製した抗体は冷蔵で 1 週間保存可能です。

【Ⅲ】測定方法 — フローチャート —



- 1 コラーゲン固相化プレートとシールは使用前に室温に戻し、アルミパウチから必要数を取り出してください。(シールは必要ウェル数によってカットしてお使いください。)
- 2 抗糖化標準物質としてのアミノグアニジン溶液 (0, 0.4, 2, 10 mM) もしくはサンプル溶液を1ウェルあたり 50 μ L ずつ加えてください。
- 3 さらに全てのウェルにグリオキサール溶液を1ウェルあたり 50 μ L 加えてください。
- 4 プレートにシールをし、湿潤状態下 (注意 1) の 37 $^{\circ}$ C インキュベーターで7日間静置し糖化反応を行います。
- 5 ウェル内の溶液を完全に除去してください。各ウェルに 200 μ L の洗浄バッファーを加え、ウェルを洗浄してください。この操作を3回繰り返します。
- 6 ウェル内の洗浄バッファーを完全に除去し、ブロッキングバッファーを各ウェルに 200 μ L 加えて、室温で1時間静置してください。
- 7 ウェル内のブロッキングバッファーを完全に除去してください。各ウェルに 200 μ L の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。一次抗体を各ウェルに 100 μ L 加えて、室温で1時間静置してください。
- 8 一次抗体を完全に除去してください。各ウェルに 200 μ L の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。HRP 標識二次抗体を各ウェルに 100 μ L 加えて、室温で1時間静置してください。
- 9 二次抗体を完全に除去してください。各ウェルに 200 μ L の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。発色液を各ウェルに 100 μ L 加えて、室温で10~30分間静置してください。
- 10 発色の濃度差を確認後、各ウェルに 100 μ L の停止液を加え、発色を停止してください。
- 11 すぐにプレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定してください (測定波長は 450 nm)。

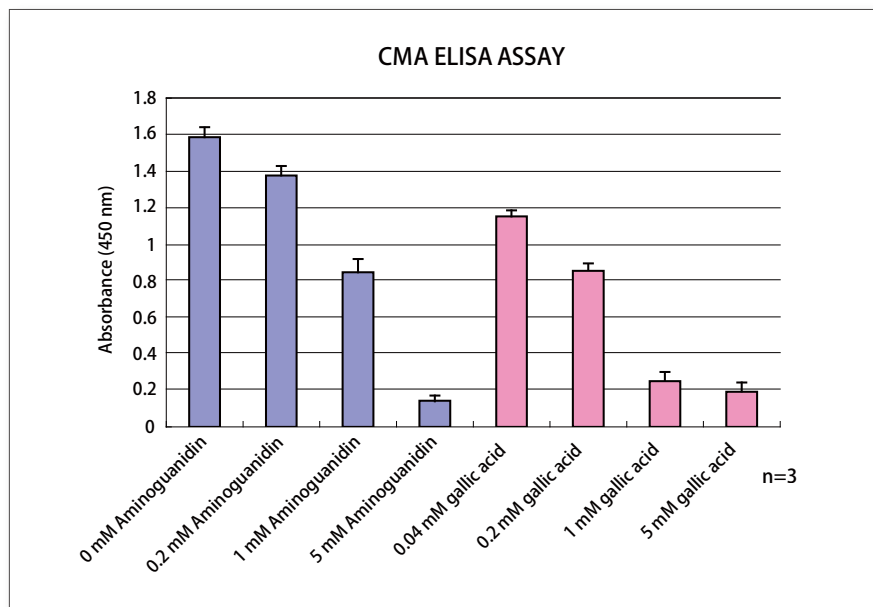
※注意 1: 湿潤状態について

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。



【IV】 実施例 - グリオキサールで糖化させた糖化コラーゲンから生成する CMA を用いた抗糖化素材の探索 -

本キットを使用して、没食子酸（gallic acid）の抗糖化活性を評価した。



【V】 参考文献

- [1] Shimasaki S, Kubota M, Yoshitomi M, Takagi K, Suda K, Mera K, Fujiwara Y, Nagai R. N ω -(carboxymethyl)arginine Accumulates in Glycated Collagen and Klotho-deficient Mouse Skin. *Anti-Aging Medicine* 8 (6) : 82-87, 2011

