

研究用

MMP群活性測定キット

合成基質法 (96テスト)

＜使用説明書＞

コラーゲンは生体内に広く分布し、プロテオグリカン、ラミニン・フィブロネクチン・エラスチン等の協同でコラーゲンの種類(型)に応じて細胞膜・血管・皮膚・臓器組織や基底膜等を構築する、組織骨格形成として極めて重要な役割を担っている。その組織骨格に異常を来たすと、種々の疾病・疾患を招くことが知られている。近年これらの組織構築組成の、コラーゲンやプロテオグリカン等を強力に分解する物質の一つとして、MMP(マトリックスメタロプロテイナーゼ、MMP-1~MMP-24)と呼ばれる一群の酵素群が報告され、ガン転移との関係や各種疾病との関係について富みに注目されている。さて、MMPと疾病・疾患との関係を研究することは、治療及び予防の観点から重要である。これまでこれらの研究手段として、MMPの定性又は活性定量測定キットが開発(ヤガイ製各種MMP測定キット)利用され、疾病の原因究明や治療薬の開発等多くの成果が得られている。これらの活性測定の方式はMMPの基質として、新鮮な原料から精製した変性の少ない蛍光標識された天然コラーゲンが用いられ、極力天然に近い状態で実験出来るよう配慮されていた。しかし、一方で更なる簡便な活性測定法の開発が望まれていた。この要望に添い弊社は、より簡便に短時間に多検体の測定が可能な、蛍光強度プレートリーダーの使用出来る新たな方式のMMP活性測定キットを開発するに到った。

この度開発された活性測定キットは、天然基質の代わりに蛍光合成基質を使用する方法で、かつ、MMPの種類に関係なく非特異的に各種MMPの検出及び、活性定量が可能なMMPスクリーニング用として開発したものです。それ故、検体中のMMPの含有の確認が簡便に、より確実に確認出来ます。

[I]. ＜キットの内容＞

- | | | |
|---|-------|----|
| 1. A-溶液 (MMP群) | 5ml | 1本 |
| 2. 基質原液 (MMP群) | 1ml | 1本 |
| 3. 酵素反応停止液 | 30ml | 1本 |
| 4. 管理用酵素 [活性型MMP-9 0.5u/mlヒト細胞由来] | 0.5ml | 1本 |
| 5. 蛍光測定対応蓋付96穴マイクロプレート(黒) | | 1枚 |
| 6. 使用説明書 | | 1部 |

[II]. ＜使用目的＞

正常な臓器・器管・皮膚等の組織又は、腫瘍等の疾病組織・体液・分泌液・体内細胞及び培養細胞等に含まれている非特異的にMMP酵素群の活性の定量測定。

[III]. ＜測定原理＞

使用の蛍光合成基質は、MMPsの酵素反応により分解されると蛍光を発する。この蛍光強度は基質の分解割合に比例する。即ち酵素活性の強さに依存するため、酵素活性が高いほど蛍光強度が直線的に高くなるので、酵素活性の定量が可能となる。

[IV]. ＜準備する機器々材及び、基質溶液の調整＞

- | | |
|----------------------------------|------------------------|
| 1. 37℃恒温器又は、ウオーターバス | 4. 蛍光強度測定機用0.5mlマイクロセル |
| 2. 蛍光強度プレートリーダー又は、蛍光強度測定機 | 5. マイクロチューブ (1.5ml) |
| 3. マイクロピペット (20・50・300 μ l等) | 6. 試験管又はマイクロチューブ |
- 基質溶液の調整：基質原液の必要量を褐色容器に量り取、A-溶液で2倍に希釈し室温に2時間以上放置後使用。残希釈基質溶液は、冷暗所に密栓保存し3ヶ月以内にご使用下さい。

[V]. ＜製品の保存方法＞

製品は振動等のない1℃~6℃の冷暗所に遮光し保管下さい。早めのご使用をお勧め致します。

[VI] <検体の前処理>

組織及び培養細胞に含まれているMMPは、潜在型又はインヒビターと結合した不活性化型と活性化型と共存している。潜在型の活性測定には活性化処理が必要である。下記に代表的な活性化の処理方法を示した。

1. 4-アミノフェニール水銀酢酸 (APMA) による活性化

APMAの35.5mgに5mlの純水を加え、これに0.5N NaOHを完全に溶解するまで滴下し、保存APMA試薬溶液とする。使用時にこの保存試薬に0.1N塩酸を加えて、pHを10~10.5に調整後純水で10mlに合わせる(使用は当日限り)。この希釈APMA試薬の10 μ lを検体100 μ lに加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間~24時間(処理時間はMMPの種類により異なる)反応し活性化し活性測定に供す。

2. トリプシン、プラスミンによる活性化

酵素で活性化の場合には、酵素の純度・活性値・反応温度・時間のコントロールが重要で活性化条件の決定が必要。

<例1> 細胞培養液の前処理

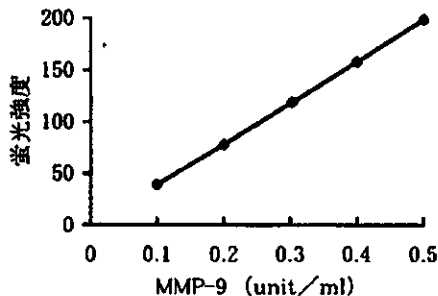
細胞培養液を1,500xGで3分間遠心で細胞を除去し、その上清を上記の方法でProMMPを活性化し、酵素活性測定用に供する。培地に蛍光物質が含有する場合には培地のブランクが必要。

<例2> 生体組織検体の前処理

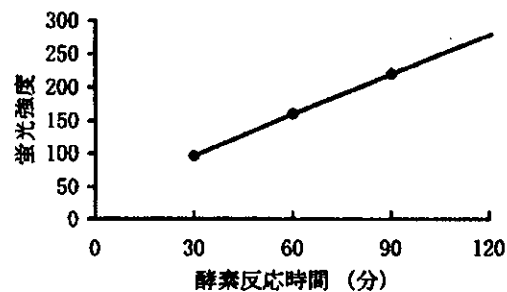
組織の10~50mg(湿重量)をハサミで細切後、0.15M NaClを含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーで数回洗浄し血液を除去後、0.2M NaCl、5mM CaCl₂、0.1% Triton X-100を含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーを検体1mg(湿重量)当り100 μ l加え4 $^{\circ}$ Cでホモジナイズ後、8000xG、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し不溶物のない上清を得、上記同法で活性化しMMP活性測定用に供する。

<例3> 活性化型MMP群の測定例

上記例1・例2で検体を処理後、プロテイナーゼ又はAPMAによる活性化処理なしで酵素活性を測定。



MMP-9の活性濃度変化による、合成基質の分解度合い。37 $^{\circ}$ Cで60分酵素反応。



MMP-9による合成基質の分解反応の経時変化。
MMP-9: 0.5u/ml、37 $^{\circ}$ Cで酵素反応。

[VII] <MMP群活性測定法>

1. 基質溶液の20 μ lを、添付マイクロプレートのホールに入れる。
2. 検体溶液20 μ lを各マイクロプレートに加え蓋をする。尚 Blank 用として検体溶液の代わりに20 μ lのA-溶液の20 μ lを、基質溶液の入ったマイクロプレートのホールに加え蓋をし攪拌。
3. マイクロプレートを、37 $^{\circ}$ Cの恒温器に入れ60分間酵素反応を行う。
4. 30分後酵素反応停止液の260 μ lを加え、室温に10分~20分間放置し酵素反応を停止させる。
5. マイクロプレートを蛍光強度マイクロプレートリーダーにセット。
6. 励起波長: Ex 325 nm。 蛍光波長: Em 395 nmで蛍光強度を測定。
7. 検量線よりMMP活性値を読み取り酵素の活性値を定量。
8. 蛍光マイクロプレートリーダー無き場合は蛍光強度測定機にて、蛍光用マイクロセルに入れ同波長で測定。
9. ミクロセルが無い場合には、上清液の300 μ lに純水3mlを加え希釈後、4mlのセルで測定。