

**MMP-3 活性測定キット**  
蛍光合成基質法 (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、ラミニン等の協同で細胞膜・血管・皮膚・臓器組織や基底膜等の構築に重要な役割を担っている。その組織骨格に異常を来すと、種々の疾病・疾患を招くことが知られている。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（ライフ研究所製各種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。さて、これまでの活性測定の方法はMMPの基質として、変性の少ない新鮮な原料から精製した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。このことより、弊社は合成基質による活性測定キットの開発により、より簡便でプレートリーダーの使用が可能な、短時間に多検体測定が出来る新たな方式による、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、他のMMPの混入に関係なくMMP-3の活性定量を特異的に測定可能にした製品です。

[I]. <キットの内容>

- |                                     |       |    |
|-------------------------------------|-------|----|
| 1. A-溶液 (MMP-3)                     | 5ml   | 1本 |
| 2. 基質原液 (MMP-3)                     | 1ml   | 1本 |
| 3. 酵素反応停止液                          | 30ml  | 1本 |
| 4. 管理用酵素 [活性型MMP-3 0.1 u/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-3酵素群の活性の定量測定。

[III]. <測定原理>

蛍光合成基質に酵素 (MMP-3) を反応させると、特異的に基質が分解され蛍光を発する。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、ウォーターバス        | 4. 蛍光強度測定機用0.5 ml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・300µl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、冷暗所に密栓し保存し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。  
使用有効期限：キット製品に表示してあります。

[VI]. <検体の活性化処理>

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)による活性化法

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10µlを検体100µlに加え、37℃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法

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> 細胞培養液中の潜在型酵素の活性化処理

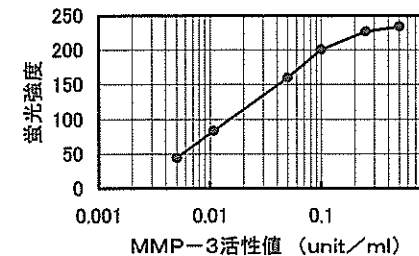
細胞培養液を1,500xGで3分間遠心で細胞を除去し、その上清を上記の方法でPro MMP-3を活性化し、酵素活性測定用に供す。培地に蛍光物質が含有する場合には培地のブランクが必要。

<例2> 生体組織検体の活性化処理

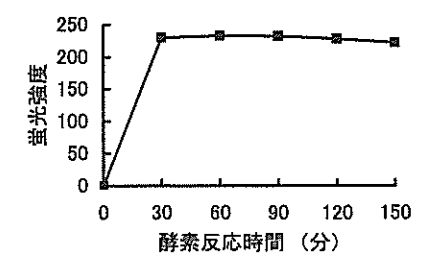
組織の10～50mg (湿重量) をハサミで細切後、0.15M NaClを含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーで数回洗浄し血液を除去後、0.2M NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100を含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーを検体1mg (湿重量) 当り100µlに加え4℃でホモジナイズ後、8,000xG 4℃で15分間遠心し不溶物のない上清を得、上記同法で活性化しMMP活性測定用に供す。

<例3> 活性型MMP-3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-3の活性濃度変化による、合成基質の分解度合い。  
37℃で30分間酵素反応。



MMP-3による合成基質の分解反応の経時変化。  
MMP-3 0.1unit/ml, 37℃で酵素反応。

[VII]. <MMP-3 (Stromelysin-1) 活性測定法>

1. 基質溶液の20µlを、添付マイクロプレートのホールに入れる。
2. 検体溶液20µl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A-溶液の20µl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℃の恒温器に入れ30分間酵素反応を行う。
4. 酵素反応停止液の260µl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 330nm。 蛍光波長：Em 395nm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300µlに純水3mlを加え希釈後、4mlのセルで測定。

製造元：有限会社ライフ研究所  
〒990-0832 山形県山形市城西町三丁目8番3号  
TEL：023-645-1392 FAX：023-645-1392