

MMP-7 活性測定キット

蛍光合成基質法 (96テスト)

＜使用説明書＞

生体組織はコラーゲ、プロテオグリカン、ラミニン・エラスチン・フィブロネクチン等の協同で細胞膜・血管・皮膚・臓器組織や基底膜等を構築している。これらの構成成分が過剰に分解代謝されると、生体組織構築の崩壊を招き種々の疾病・疾患を誘発する。さて、これらの分解物質として、プラスミン・トリプシン・カテプシン・好中球エラスターゼ・カリクレン・硫酸多糖体分解酵素等が知られている。近年これらの物質に加え、より強力な分解能を有す酵素として「マトリックスメタロプロテナーゼ」(MMP-1～MMP-28)が注目されている。さて、MMPファミリー中でより低分子(MW19,000)のMatrilysin(MMP-7)が、ガン発症との関わりの可能性より注目されている。これまでMMP-7は、IV型コラーゲン・エラスチン・ラミニン・フィブロネクチン・アグリン・デコリン・プロテオグリカン等の組織骨格成分を強力に分解することが報告されている。更には潜在型MMP(ProMMP-1等)を活性化する。又、胃ガン・前立腺ガン・乳ガン・頭頸部ガン及び、特に大腸ガン組織等に多量にMMP-7の存在が確認されている。更には、これらのがん細胞自身からこの酵素が多量に産生されることが認められ、MMP-7とがん発症とが密接な関係にあることが示されている。さて、MMP-7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活性の定性又は定量方法として、天然コラーゲン基質を用いた測定キットが開発(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た。しかし、MMP-7の活性を特異的に測定出来なかった。一方より簡便にMMP-7活性を、特異的に測定出来る方法の開発が望まれていた。これらを背景に種々開発した結果、合成基質による活性測定法を開発するに到った。この新活性測定法は簡便で、蛍光強度プレートリーダーの使用が可能な、短時間に多検体の測定が可能で、かつ、MMP-7の活性を特異的に定量出来ます。

[I]. ＜キットの内容＞

- | | | |
|-----------------------------------|-------|----|
| 1. A-溶液 (MMP-7) | 10ml | 1本 |
| 2. 基質原液 (MMP-7) | 1ml | 1本 |
| 3. 酵素反応停止液 | 20ml | 1本 |
| 4. 管理用酵素 [活性型MMP-7 0.1u/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・間接軟骨等の組織又は、リュウマチ・関節炎・腫瘍等の疾病組織・体液・分泌液・生体内細胞及び培養細胞等に含まれているMMP-7の活性を特異的に定量測定。

[III]. ＜測定原理＞

蛍光合成基質に酵素(MMP-7)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0.5ml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・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量り取、A-溶液で5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

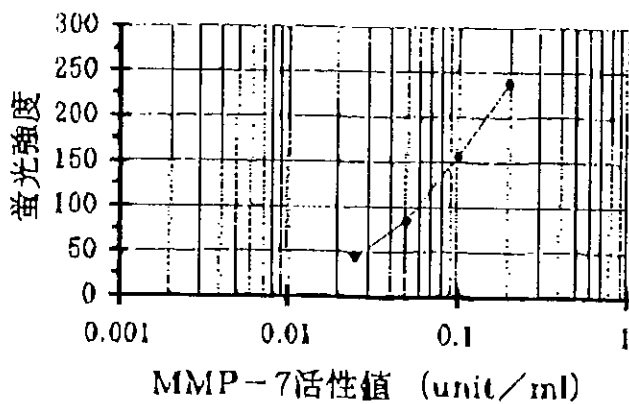
細胞培養液を1,500 \times Gで3分間遠心で細胞を除去し、その上清を上記の方法でPro MMP-3を活性化し、酵素活性測定用に供す。培地に蛍光物質が含有する場合には培地のブランクが必要。

<例2> 生体組織検体の活性化処理

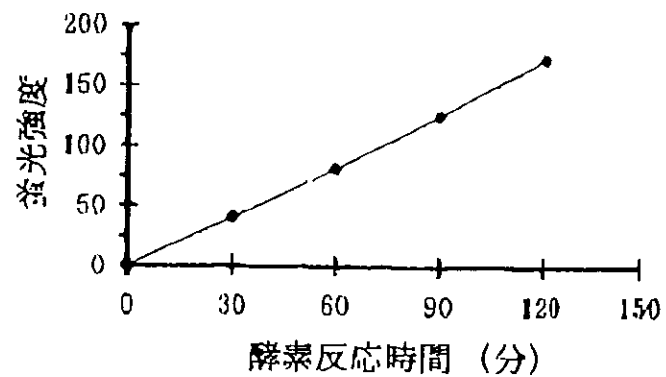
組織の10~50mg(湿重量)をハサミで細切後、0.15M NaClを含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーで数回洗浄し血液を除去後、0.2M NaCl、5mM CaCl₂、0.1% Triton X-100を含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーを検体1mg(湿重量)当り100 μ l加え4 $^{\circ}$ Cでホモジナイズ後、8,000 \times G 4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し不溶物のない上清を得、上記同法で活性化しMMP活性測定用に供す。

<例3> 活性化型MMP-7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-7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分間酵素反応。



MMP-7による合成基質の分解反応の経時変化。
MMP-7 0.05unit/ml、37 $^{\circ}$ Cで酵素反応。

[VII]. <MMP-7 (Matrilysin) 活性測定法>

1. 基質溶液の50 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50 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A-溶液の50 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. 酵素反応停止液の200 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 290nm。 蛍光波長: Em 370nm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。

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