

MMP-8 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。それらの内Ⅱ型コラーゲンは、プロテオグリカン、ラミニン等の協同で肝臓の脈管、動脈枝、肺臓等及び、特に間接の硝子軟骨に多量に存在している。Ⅱ型コラーゲンは、生体内で、血管の伸縮、間接可動の重要な役割を担っている。又、Ⅱ型コラーゲンに異常を来すと、肺線維症や心臓の僧帽逸脱による心疾患等が報告されている。更には、間接軟骨に重大な障害が予測される。Ⅱ型コラーゲンを分解する物質の一つとして、マトリックスメタロプロテナーゼの一種であるMMP-1 (Ⅰ型コラーゲナーゼ) が知られているが、その分解活性は弱い。一方MMP-8 (Collagenase-2) はより強力にⅡ型コラーゲンを分解する。この活性化コラーゲン分解酵素が生体内で、極度に多くなった場合過剰にⅡ型コラーゲンの分解が促進され、上記のような疾病を引き起こすことが予測される。さて、MMPと疾病・疾患との関係を明らかにすることは、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。さて、これまでの活性測定の方式は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、より簡便で蛍光プレートリーダーの使用が出来、短時間で多検体の測定可能な新たな方式による、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-8の活性を特異的に定量測定を可能にした製品です。

[I]. <キットの内容>

1. A-溶液 (MMP-8)10ml 1本
2. 基質原液 (MMP-8)1ml 1本
3. 酵素反応停止液20ml 1本
4. 管理用酵素 [活性型MMP-8 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・間接軟骨等の組織又は、リュウマチ・間接炎・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-8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-8) 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
2. 蛍光強度プレートリーダー又は、蛍光強度測定機
3. マイクロピペット (20・50・300μl等)
4. 蛍光強度測定機用0.5mlマイクロセル
5. マイクロチューブ (1.5ml)
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

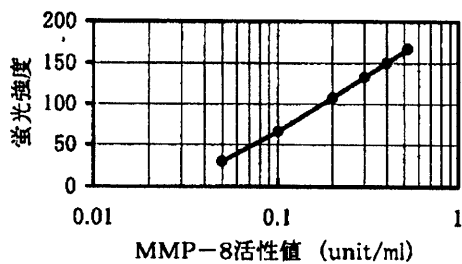
細胞培養液を1,500xGで3分間遠心で細胞を除去し、その上清を上記の方法でProMMP-3を活性化し、酵素活性測定用に供する。培地に蛍光物質が含有する場合には培地のブランクが必要。

<例2> 生体組織検体の前処理

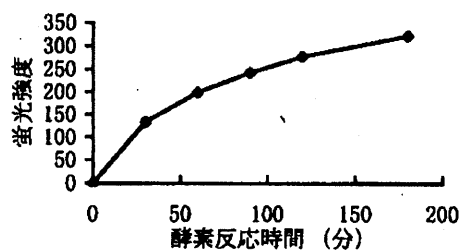
組織の10~50mg(湿重量)をハサミで細切後、0.15M NaClを含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーで数回洗浄し血液を除去後、0.2M NaCl、5mM CaCl₂、0.1% Triton X-100を含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バッファーを検体1mg(湿重量)当り100 μ l加え4 $^{\circ}$ Cでホモジナイズ後、8,000xG 4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心し不溶物のない上清を得、上記同法で活性化しMMP活性測定用に供す。

<例3> 活性化型MMP-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-8の活性濃度変化による、合成基質の分解度合い。
37 $^{\circ}$ Cで2時間酵素反応。



MMP-8による合成基質の分解反応の経時変化。
MMP-8 0.5unit/ml, 37 $^{\circ}$ Cで酵素反応。

[VII]. <MMP-8(Collagenase-2)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20 μ lの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2時間酵素反応を行う。
4. 30分後酵素反応停止液の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 350nm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. マイ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