

## ゼラチンザイモ電気泳動キット

(MMPs酵素マーカー添付)

### <使用説明書>

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、生体組織を構成している各種コラーゲン、組織骨格を構成しているプロテオグリカン、細胞接着因子のラミニン・ファイブロネクチン等を分解する酵素として知られている。近年特にこれらの酵素群は、関節炎・心筋梗塞・更には癌転移における有力な原因物質と目され、各方面から注目されている。これらの研究の実施に当たりマトリックスメタロプロテアーゼの検出確認が重要である。この酵素検出又は確認の方法として種々の方法が知られている。そのうちでも重要な方法として、IV型コラゲナーゼの検出用としてのゼラチンザイモ電気泳動法がある。この方法はこれらの酵素の確認に優れているが、その反面取り扱いに若干時間を要する。本キットは泳動ゲルプレートの作成・各種使用バッファーの調整等の煩雑さからの開放、及び熟練を必要とせず安定した泳動が可能ないように、特に吟味して開発された製品です。

### [ I ]. <キットの内容>

1. ザイモ泳動ゲルプレート (12検体用) ……110 (W) x 100 (H) x 1mm (T) ……5枚
2. 泳動用バッファー (10倍濃縮液) ……150ml ……1袋
3. 洗浄用A溶液 (10倍濃縮液) ……100ml ……1袋
4. 洗浄用B溶液 (10倍濃縮液) ……100ml ……1袋
5. 酵素反応用バッファー (10倍濃縮液) ……25ml ……1本
6. サンプル調整用バッファー ……5ml ……1本
7. 蛋白染色液 ……100ml ……1袋
8. MMP混合マーカー (ProMMP-2、MMP-2、ProMMP-9) ……0.2ml ……1本
9. 使用説明書 ……1部

### [ II ]. <使用目的>

ヒト及び、各種動物の血液・体液・分泌液・組織、細胞又は、細胞培養液に含まれている、Pro MMP-2、MMP-2、MMP-3、Pro MMP-9、MMP-9等の各マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の検出確認。

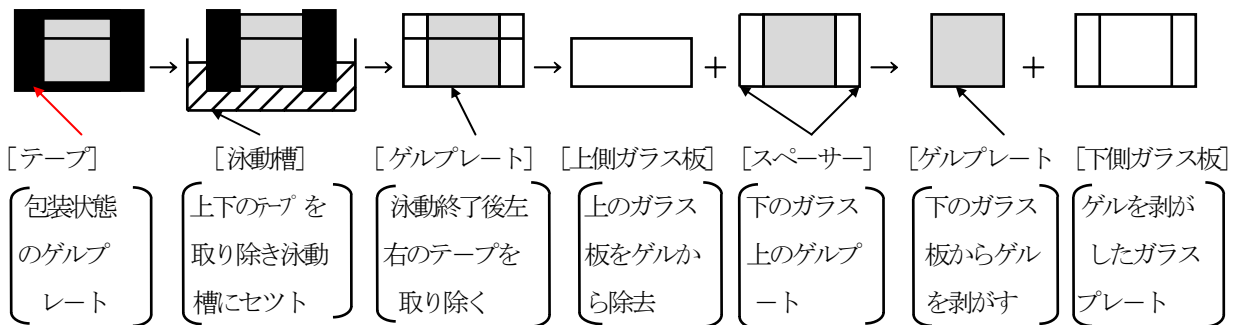
### [ III ]. <使用器具器材・試薬>

- |                                         |                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 電気泳動装置；参考槽サイズ                        | 6. スーパーテル (平面)                |
| 一枚用：陰極槽 [8 x 4 x 3.5 cm]                | 7. 密閉可能なバット                   |
| 陽極槽 [11 x 4 x 3 cm]                     | 8. 染色用・洗浄用バット                 |
| 二枚用：陰極槽 [7.8 x 7.2 x 2.6 cm]            | 9. 1ml マイクロチューブ               |
| 陽極槽 [12.2 x 11 x 2.5 cm]                | 10. メタノール (一級)                |
| <u>ライフ研究所製ミニザイモ電気泳動槽：Life-W型</u>        | 11. 氷酢酸 (一級)                  |
| 2. スタビライザー (0~100mA, 0~500V)            | 12. 純水                        |
| 3. メスシリンダー (100ml, 1,000ml)             | 13. 振盪器 (あれば便利)               |
| 4. マイクロシリンジ (10 $\mu$ l 又は 100 $\mu$ l) | 14. 恒温槽 (37 $^{\circ}$ C設定可能) |
| 5. キャップ付きボトル (1,000ml, 2,000ml)         |                               |

[IV]. < 試薬類の調整方法 >

1. 泳動用希釈バッファー：添付泳動バッファー150ml全量を、純水1,350mlを加え攪拌調整。4℃で1年。
2. 洗浄用希釈A溶液：添付洗浄用A溶液100ml全量を、純水900mlに加え攪拌調整。4℃で1年。
3. 洗浄用希釈B溶液：添付洗浄用B溶液100ml全量を、純水900mlに加え攪拌調整。4℃で1年。
4. 酵素反応用希釈バッファー：添付酵素反応用バッファー25ml全量を、純水225mlに加え攪拌調整。4℃で1年。
5. 蛋白染色液：添付蛋白染色液をそのままご使用下さい。プレート5枚に繰返し使用出来ます。室温安定。
6. 泳動用検体の調整例：検体10 $\mu$ ～100 $\mu$ に添付サンプル調整用バッファーの等量加え混合、室温に15分間放置後泳動用検体に供す。
7. 蛋白染色での脱色液：「酢酸：メタノール：水=50ml：300ml：650ml、v/v」、室温で1年以上安定。

[V]. < 泳動ゲルプレートの取り扱い > (御注意: ガラスで手を切らないよう)



[VI]. < ゼラチンゼイモ電気泳動方法 >

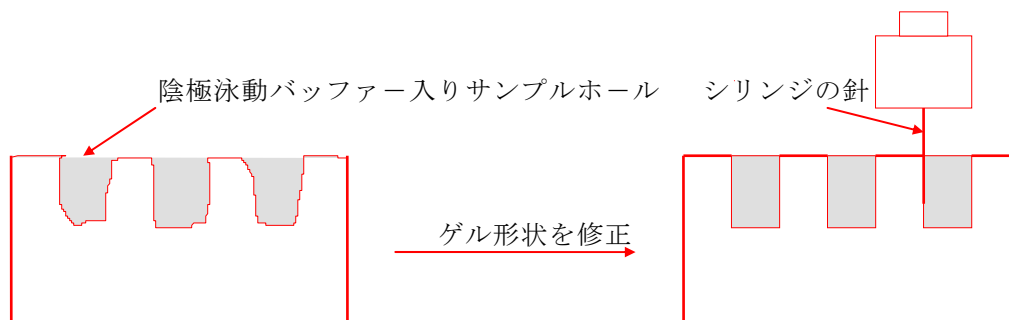
1. 泳動陽極槽（下）に、泳動用希釈バッファーの100mlを入れる。（2枚泳動槽の場合には150ml入れる）。
2. ゼラチンゼイモ泳動ゲルプレートを泳動用バッファーの入っている陽極泳動槽（下）と陰極泳動槽（上）にセット。
3. 泳動陰極槽（上）に、泳動用希釈バッファーの100mlを入れる。（2枚泳動槽の場合も100ml）。
4. ゲルプレートのホルダーの底に、静かに検体をマイクロシリンジで5～40 $\mu$ l（酵素量で異なる）添加。
5. スタビライザーの電源をON（入）にし10mAで20分間泳動。（2枚同時泳動の場合には20mA）。
6. 続いて20mAに電流を上げ、定電流で80分間泳動（2枚同時泳動の場合40mA）。
7. 電源を切りゲルプレートを泳動槽から取り出す。〔感電しますので**必ず電源をOFF**にして操作して下さい〕。
8. ゲルプレートの上部のガラス板を、ゲルを破かさない様に取り除く。
9. 下部のガラス板から平面なスペーサーを用いて、ゲルを破かさない様に取りはずす。
10. ゲルを洗浄用希釈A溶液100～200ml入バット中で、室温30分間激しく（破れない程度）振盪洗浄。
11. ゲルを洗浄用希釈B溶液100～200ml入バット中で、同様に30分間激しく（破れない程度）振盪洗浄。
12. 酵素反応用希釈バッファーの50ml入っているバット中に、ゲルを移しフタをし完全に密閉後、37℃の恒温器に入れ20時間～40時間（酵素濃度により異なる。酵素含有量少ない場合長時間反応）酵素反応を行う。
13. 酵素反応終了後、ゲルを染色液（100ml）の入っているバットに移し、30分間室温で蛋白染色を行う。
14. 最後に脱色液の入っているバットにゲルを移し、約3時間脱色（3～4回液交換すると早く脱色）。
15. 脱色が終了したらゲルをろ紙（No. 不問）に移し、ゲル表面をラップで包み減圧加熱乾燥。ゲル乾燥器なき場合には、ゲル全体をセロハン紙で包みガラス板に乗せ、（ゲル部分に気泡を入れないようにガラス板の裏側をテープで固定）恒温器で一晩乾燥（30～50℃、透明なフィルム状になり永久保存可能）。

[VII]. < 製品の保存方法 >

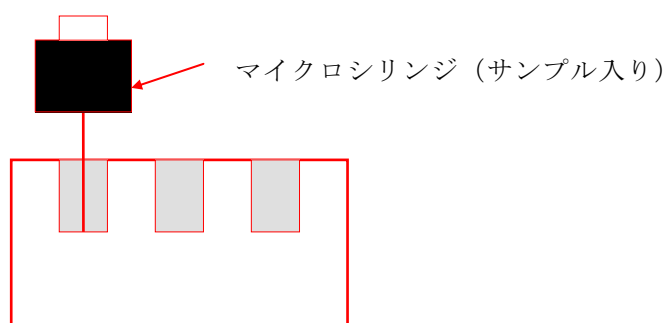
ゼラチンゼイモ泳動ゲルプレート・各濃縮バッファー類・MMPs混合マーカー：冷蔵（1～6℃）で保管下さい。  
 取扱注意：ゲルプレートを凍結しないで下さい、使用不能になります。早めのご使用をお薦め致します。  
 有効期限：製品に記載

＜ゲルプレートの取扱及びサンプルの添加方法についての補足＞

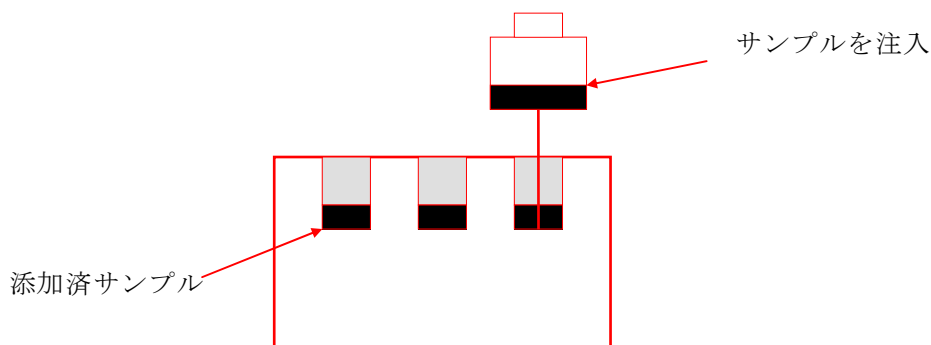
1. ゲルプレートの外包装を開封。
2. ゲルプレートの個包装を開封 [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
3. ゲルプレートの上下のテープを静かに取り除く [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
4. ゲルプレートを泳動槽に、添付クリップで固定セット [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
5. 陽極・陰極の両泳動槽に、それぞれの泳動用バッファを規定量入れる。
6. サンプルゲルホールに乱れがある場合には、シリンジの針（外系 0.9mm 以下）を用いてサンプルホールのゲル形状を整える。



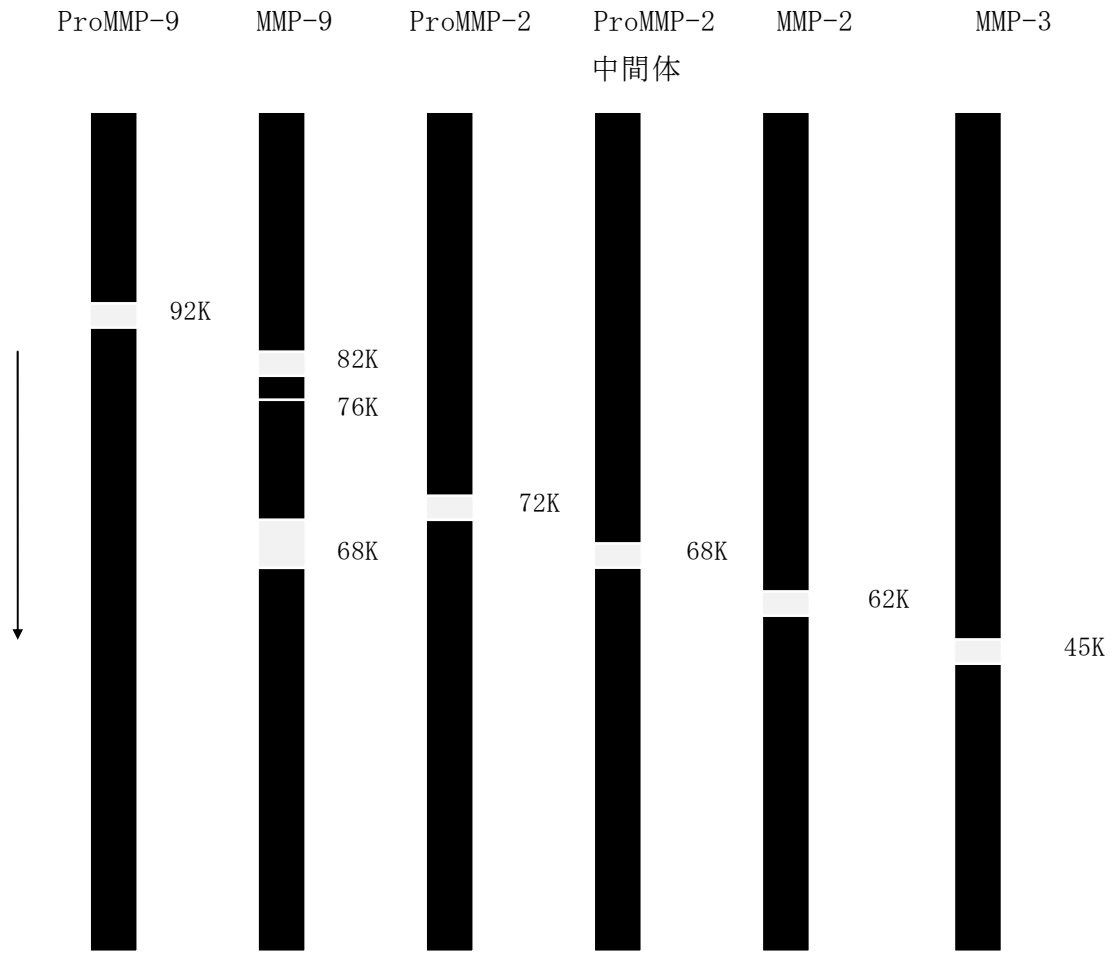
7. 泳動サンプルをマイクロシリンジ（外系 0.9 mm 以下の針を使用）に入れ、マイクロシリンジの針の先端を泳動バッファを満したサンプルホールの底に入れる。



8. 慎重にサンプルをバッファ内に規定量注入重層する



<ゼラチンザイモ電気泳動参考 Pattern>



各MMP 酵素の電気泳動を実施、その後酵素反応終了時蛋白染色

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