

## セリンプロテアーゼ検出ザイモ電気泳動キット

(特異的な Serin-Proteases 検出法)

### <使用説明書>

蛋白分解酵素は、生体の代謝にとって極めて重要な役割を担っている。しかし、過剰産生・過剰活性化は生体にとって重大な障害をもたらす、時として生命を脅かす。さて、蛋白分解酵素の「セリンプロテアーゼ」(SP)は代表的で古くから研究されているが、今尚、疾病・疾患の関係から重要視され活発に研究されている。この酵素群は、膵炎・循環器不全・腎不全・呼吸不全・心不全及び多臓器不全、肺気腫、血栓症・脳梗塞・心筋梗塞、出血症・脳溢血、組織破壊によるがん転移の亢進等、多義に渡り重篤な疾病の原因として知られている。近年これらの疾病が他のMMP、システイン酵素群等との共同で、誘発及び進行が促進されるとの研究が多く報告されている。これらの研究の実施に当たり、この酵素群の検出確認が重要である。酵素の検出確認として種々の方法が知られているが、特に重要な方法としてザイモ電気泳動法が知られている。

この分析法は前処理を必要とせず、非常に高感度な優れた方法である。しかし、これまで「セリンプロテアーゼ」を特異的に検出々来る「ザイモ電気泳動法」は無く、その開発が望まれていた。弊社はこれらを背景に種々研究を重ねこの度、「セリンプロテアーゼ検出ザイモ電気泳動キット」を開発するに至った。本キットは、高感度で低活性の酵素を再現性良く、確実にかつ、特異的に検出確認が可能である。更には煩雑な泳動プレートの作成・各種使用バッファーの調整等の必要も無く、簡便に熟練を要せず安定した結果を得ることが出来ます。

### [ I ]. <キットの内容>

1. SPザイモ泳動ゲルプレート (12検体用) …110 (W) x 100 (H) x 1mm ……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. 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・尿・組織、細胞及び細胞培養溶液に含まれている、Trypsin、Chymotrypsin、Elastase、Plasmin、Cathepsin-G等の[セリンプロテアーゼ] 類の検出確認。

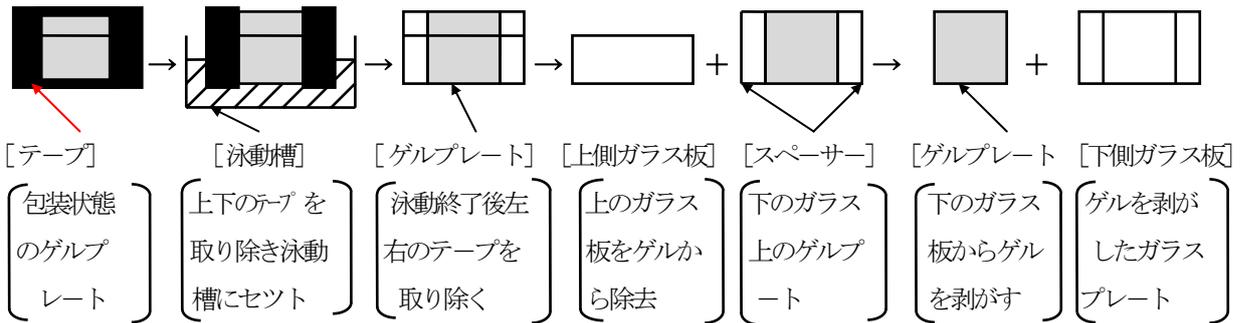
### [ III ]. <使用器具器材・試薬>

- |                              |                 |
|------------------------------|-----------------|
| 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)  |
- ライフ研究所製ザイモ電気泳動槽：LL-W型 が便利
- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| 2. スタビライザー (0~100mA, 0~500V)            | 11. 氷酢酸 (一級)                  |
| 3. メスシリンダー (100ml, 1, 000ml)            | 12. 純水                        |
| 4. マイクロシリンジ (10 $\mu$ l 又は 100 $\mu$ l) | 13. 振盪器 (あれば便利)               |
| 5. キャップ付きボトル (1, 000~2, 000ml)          | 14. 恒温槽 (37 $^{\circ}$ C設定可能) |

[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を加え攪拌調整。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を加え攪拌調整。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を加え攪拌調整。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枚の染色に充分量で繰り返し使用出来ます。室温安定。
6. 脱色液の調製；酢酸：メタノール：水=50ml：300ml：650mlの混合液を調整。室温1年以上使用可能。
7. 泳動用検体の調整例：検体50 $\mu$ ～100 $\mu$ lに添付サンプル調整用バッファー50 $\mu$ ～100 $\mu$ lを加え混合し（等量）室温に15分間放置後泳動用検体に供す。

[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]. < セリンプロテアーゼ検出ザイモ電気泳動法 >

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. SPザ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. スタビライザーの電源をON（入）にし、20mA/1枚で60分間泳動。その後電源をOFFに切断して下さい。
5. 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。
6. 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）。
7. 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）。
8. 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]。
9. ゲルプレートのテープを取り除き、上部のガラス板をゲルを破かぬように慎重に取り除く。
10. 下部のガラス板から平面なスペーサーを用いて、ゲルを破かぬように取りはずす。
11. ゲルプレートを洗浄用希釈A溶液200mlが入っている、バットに移し室温で30分間振盪。
12. ゲルプレートを洗浄用希釈B溶液200mlが入っている、バットに移し同様に30分間振盪。
13. 酵素反応用希釈バッファーの50ml入っているバットに、ゲルプレートを移しフタをし完全に密閉後、37℃の恒温器に入れ16時間～30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。
14. 酵素反応終了後、ゲルプレートを染色液の入っている、バットに移し30分間室温で蛋白染色を行う。
15. 最後に脱色液の入っているバットにゲルを移し3時間脱色、この間3～4回脱色液を交換（脱色が早く完了する）。
16. 脱色が終了したらゲルをろ紙に移し、ゲル表面をラップで包み減圧加熱乾燥。又はゲルプレート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テープで固定）恒温器で乾燥（フィルム状になる）。

[VII]. < 製品の保存方法 >

有効期限：製品に記載

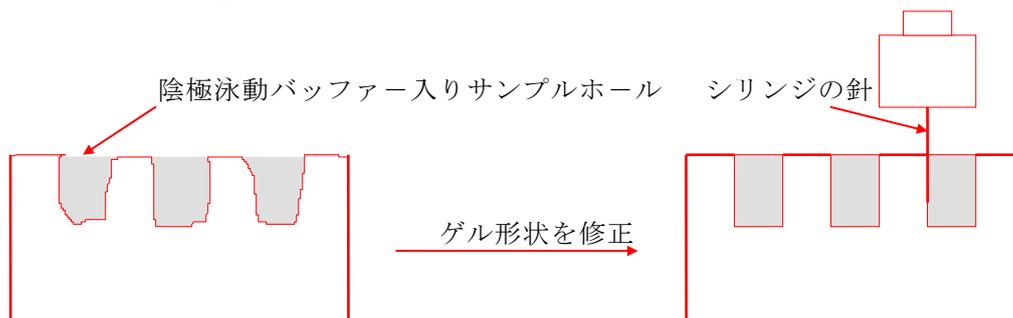
セリンプロテアーゼ検出ザイモ泳動ゲルプレート・各濃縮バッファー類：1℃～6℃の冷暗所(4℃)で保管下さい。

ゲルプレートの取扱注意事項：プレートは上向きに水平に保管。プレート上に物を乗せない。移動時ゲルプレート平面を手等で挟んで圧力をかけないようにし、硝子切断面横の両サイドを挟み込むようにして移動して下さい。

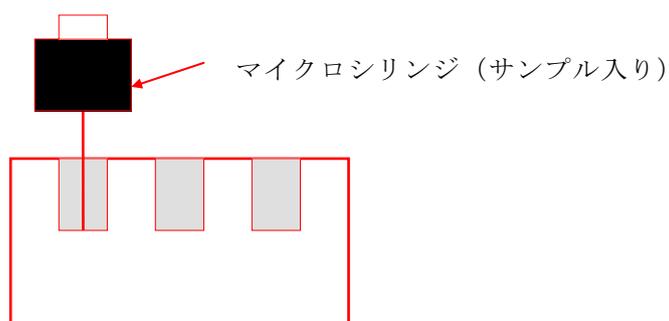
ゲルプレートは絶対凍結させないで下さい、使用不能になります。極力早めのご使用をお勧め致します。

＜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＞

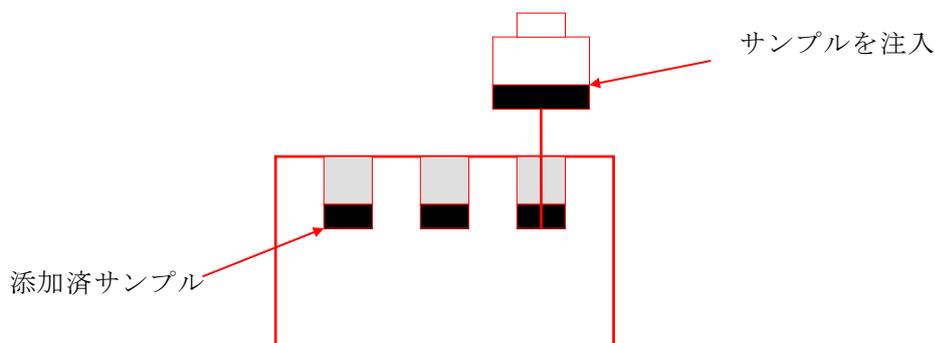
1. ゲルプレートの外包装を開封。
2. ゲルプレートの個包装を開封 [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
3. ゲルプレートの上下のテープを静かに取り除く [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
4. ゲルプレートを泳動槽に、添付クリップで固定セット [泳動ゲルプレートの取扱参照]。
5. 陽極・陰極の両泳動槽に、それぞれの泳動用バッファを規定量入れる。
6. サンプルゲルホールに乱れがある場合には、シリンジの針（外系 0.9mm 以下）を用いてサンプルホールのゲル形状を整える。



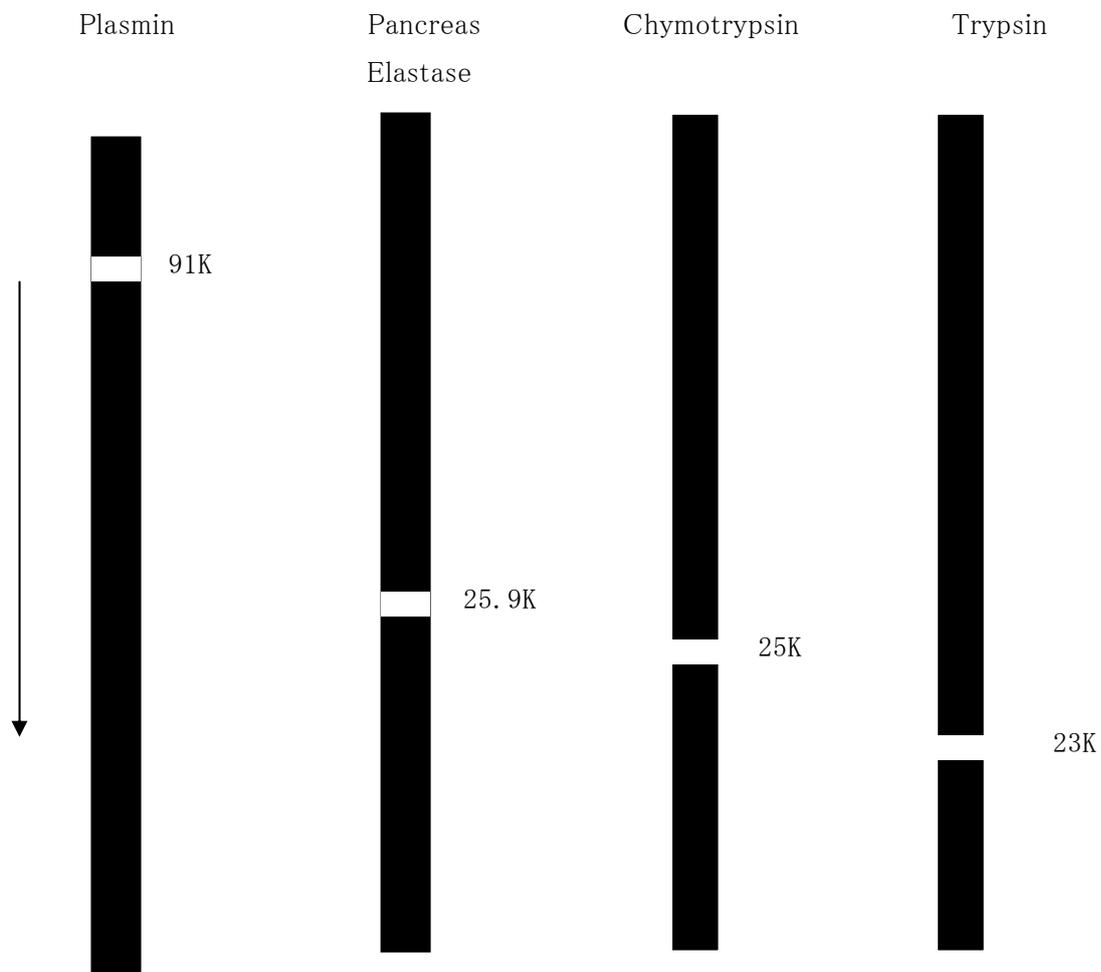
7. 泳動サンプルをマイクロシリンジ（外系 0.9 mm 以下の針を使用）に入れ、マイクロシリンジの針の先端を泳動バッファを満したサンプルホールの底に入れる。



8. 慎重にサンプルをバッファ内に規定量注入重層する



<セリンプロテアーゼ検出ザイモ電気泳動参考 Pattern>



代表的な Serin-Protease 群の電気泳動を実施、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