

**アンジオテンシンーI変換酵素活性測定キット  
96テスト用 (ACE)**

**<使用説明書>**

肝臓で合成されたアンジオテンシンノーゲンは、血中でレニンによってアンジオテンシンーI分子に解離される。本ペプチドは生理活性を有しないが、アンジオテンシンーI変換酵素(ACE)によって更に分解され、アンジオテンシンーIIを生成する。生成されたアンジオテンシンーIIは生体組織中のAT受容体に結合し、血管収縮活性を発現する。生体内でACE活性が過剰に発現すると、アンジオテンシンーIが過剰分解され大量のアンジオテンシンーIIが生成される。この結果AT受容体との結合が急激に増加し、極度な血管収縮を起こし異常な血圧上昇を招くその結果として、心筋梗塞、脳梗塞等の各種血管系疾患・疾患を誘発することが知られている。一方近年他の要因による血圧調節機構についても種々研究が進められており、今後多くの知見が得られるものと期待されている。さて、生体組織、血液等に含まれているACE活性を測定することは、これらの血圧調節機構を解明する観点からも重用である。しかし、これまでのACE活性測定法は高度な分析技術を要し、更には操作が煩雑等の難点が指摘され、定量性にすぐれかつ、簡便な活性測定法の開発が望まれていた。これらの背景のもと弊社は種々研究を重ねた結果、ACE活性定量測定キットを開発するに至った。本測定キットは、再現性が良く、簡便で熟練した技術を必要とせずかつ、プレトリーダーの使用が出来多検体を短時間に測定可能で、更には煩雑な試薬調整も必要としません。

**[I]. <キットの内容>**

1. 96穴蛍光用マイクロプレート (蛍光測定対応、黒)	1枚
2. A-溶液	30ml 1本
3. B-溶液	30ml 1本
4. C-溶液	2ml 1本
5. D-溶液	8ml 1本
6. 基質	96検体相当量 1本
7. 蛍光標準物質	5回測定 (5濃度で) 相当量 1本
8. 管理用酵素 [ACE (0.5m unit/ml)]	1ml 1本
9. 使用説明書	1部

**[II]. <試薬の調整>**

基質溶液の調整：基質ボトルにA-溶液の3mlを加え溶解し、2時間以上4℃に放置後使用。

蛍光標準品の調整：標準品ボトルにA-溶液の4mlを加え溶解し、2時間以上4℃に放置後使用。

両調整後の残試薬は、1℃～6℃の遮光冷暗所で保管下さい。

**[III]. <使用目的>**

臓器・組織・血清等に含まれているアンジオテンシンーI変換酵素(ACE)活性値の定量測定。

**[IV]. <測定原理>**

バッファーに溶解した基質に酵素ACEを反応することにより、基質が解離し蛍光を発する。基質の解離の度合いにより蛍光強度が異なる。酵素活性値と基質解離の度合いが比例関係になるとより、解離した基質(蛍光標準物質)を用いた蛍光強度の検量線より、酵素活性値の定量が可能。



## [V]. <準備する機器々材>

1. 蛍光マイクロプレートリーダー又は、蛍光強度測定機 (励起: 360 nm、蛍光: 480 nm)
2. 試験管又はマイクロチューブ
3. マイクロピペット (10, 25, 50, 200 μl)
4. 試験管ミキサー (ボルテックス)
5. マイクロチューブ (1.5 ml)
6. オーターバス
7. 蛍光測定用ミクロセル (蛍光強度測定機使用の場合)

## [VI]. <アンジオテンシン変換酵素活性の定義>

酵素活性 1 unit = 37°C の条件下で 1 分間に 1 μmol の基質を分解する酵素量。

## [VII]. <酵素活性値の求め方>

### A). 標準物質による酵素活性の検量線作成方法:

1. 標準溶液各濃度の 50 μl を 96 穴マイクロプレートのそれぞれのウェルに入れる。  
Blank として A-溶液 50 μl を他のウェルに入れる。
2. 蓋をし 37°C で 30 分間 オーターバス 中で インキュベーション。
3. 各ウェルに B-溶液の 200 μl を最初に入れた順番に 3~7 秒間隔で 加え 搅拌。
4. 10 μl の C-溶液を各ウェルに加え、搅拌後 15 分間 室温 放置。
5. D-溶液の 40 μl を各ウェルに加え 搅拌。
6. 5 分後に マイクロプレートごと マイクロプレートリーダー 蛍光測定機 に セット。  
(又は、上記測定機なき場合には、各溶液を他の 蛍光強度測定機 にて 測定)
7. 励起波長: 360 nm、蛍光波長: 480 nm で 测定し、標準液の検量線より 酵素活性値を 定量。

### B). 酵素活性値の計算方法:

$$ACE \text{ unit/ml} = A \times 10^{-3} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0.025} \times \text{検体の希釈倍率}$$

A : 蛍光標準物質の各濃度の絶対量と [標準物質の蛍光強度 - Blank の蛍光強度] 处理した、蛍光強度をプロットし 検量線を作成。

[検体の蛍光強度 - Blank の蛍光強度] 处理した蛍光強度を、作成した検量線から読み取った値を A (nmol) とする。

30 : 反応時間 (分)。 0.025 : ACE 酵素 (又は検体) 液量 (ml)。

検体の希釈倍率 : 検体を希釈した場合のみ、その希釈倍率を乗じる。

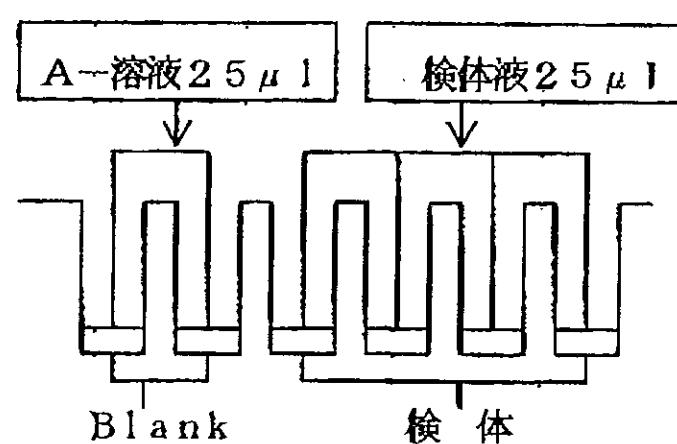
## [VIII]. <アンジオテンシン変換酵素活性測定法>

1. 検体溶液の 25 μl を 96 穴マイクロプレートのウェルに入れる。  
Blank として A-溶液 25 μl を他のウェルに入れる。
2. 上記各ウェルに基質溶液の 25 μl を 3~7 秒間隔 (一定間隔) で 加え、蓋をし 均一に 搅拌。
3. 37°C で 30 分間 酵素反応を行なう。
4. 各ウェルに B-溶液の 200 μl を 2. で 加えた順番に 3~7 秒間隔 (一定間隔) で 加え 搅拌。
5. 10 μl の C-溶液を上記の順番に各ウェルに加え、搅拌後 15 分間 室温 放置。
6. D-溶液の 40 μl を上記の順番に各ウェルに加え 搅拌。
7. 5 分後に マイクロプレートごと マイクロプレートリーダー 蛍光強度測定機 に セット。  
(又は、マイクロプレートリーダー 蛍光測定機 なき場合には、各溶液を他の 蛍光強度測定機 にて 測定。この場合 ミクロセル なき場合には、測定検体を純水で 希釈し 4 ml 蛍光用セル で 測定)。
8. 励起波長: 360 nm、蛍光波長: 480 nm で 蛍光強度を 测定し、上記 酵素活性値の求め方 に従つて 酵素活性を 定量する。



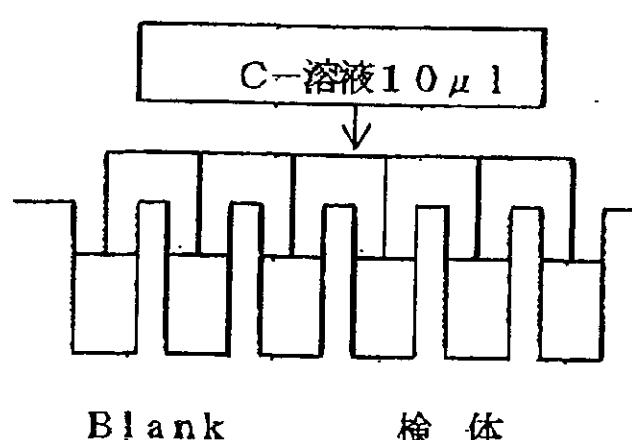
[X]. <ACE活性測定操作手順>

(A)



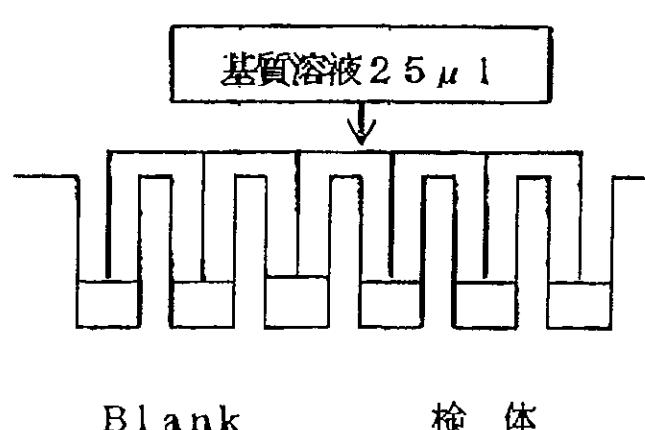
[検体溶液及び、A-溶液(Blank)を各ウェルにそれぞれ $25\mu l$ 加える]

(D)



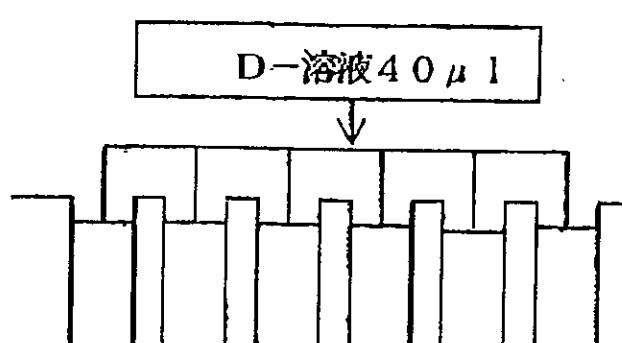
[C-溶液 $10\mu l$ を各ウェルに加え、攪拌後15分間室温に放置]

(B)



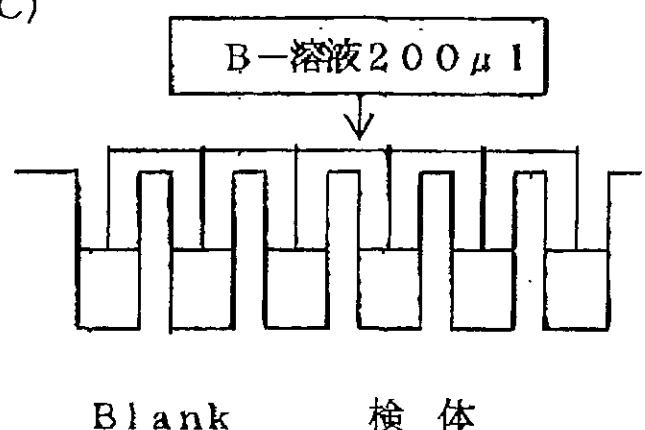
[各ウェルに3~7秒間隔で同一順番に基質溶液の $25\mu l$ 加え蓋をし、37°Cで30分間酵素反応]

(E)



[D-溶液 $40\mu l$ を各ウェルに添加攪拌後5分間放置]

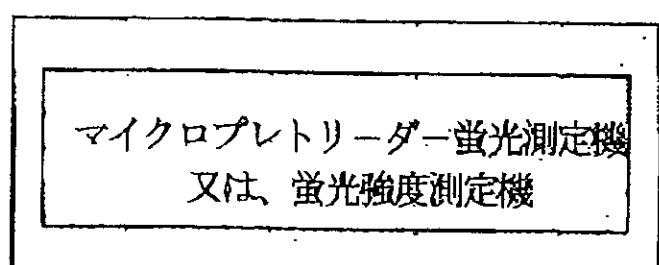
(C)



B l a n k      検 体

[酵素反応後B-溶液の $200\mu l$ を、各ウェルに上記順番で3~7秒間隔に加え攪拌]

(F)



[マイクロプレトリーダー蛍光測定機、又は、蛍光強度測定機にて、励起波長： $360\text{nm}$ 、蛍光波長： $480\text{nm}$ で蛍光強度を測定し規定の方法にてACE活性値を定量]

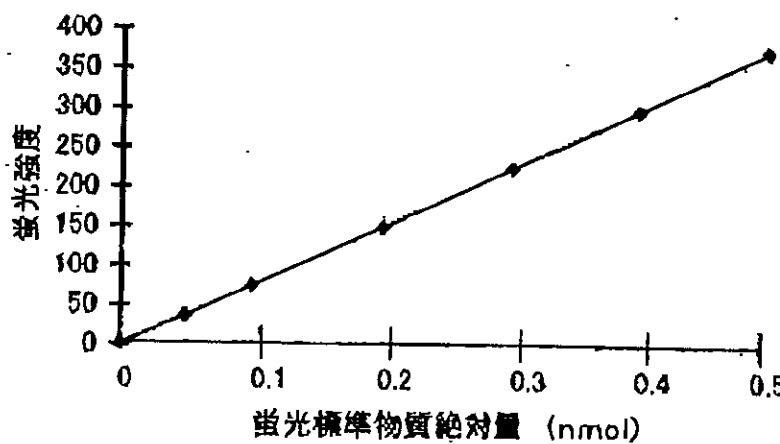


### [XI]. <検量線作成の参考例>

添付蛍光標準物質 ( $10 \text{ nmol}/\text{ml}$ ) を、下記の要領でA-溶液で希釀した各濃度の絶対量での蛍光強度値を測定後、グラフ用紙にプロットし検量線を作成する。

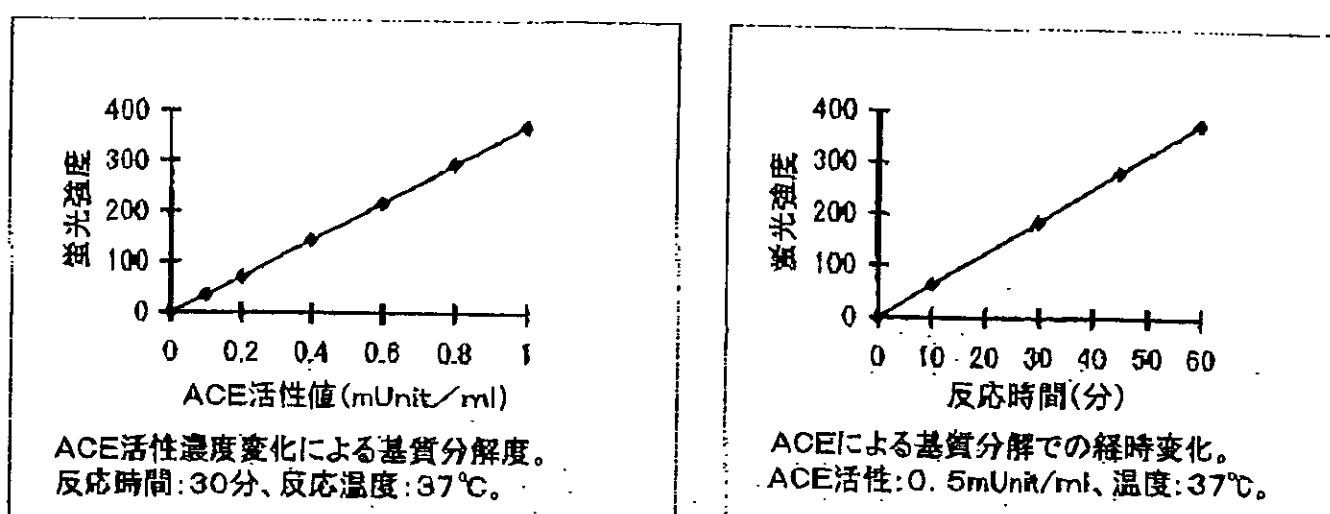
蛍光標準物質の絶対量：蛍光標準物質濃度 ( $\text{nmol}/\text{ml}$ )  $\times 0.05$  (測定量、 $\text{ml}$ )

内容	蛍光標準物質濃度 ( $\text{nmol}/\text{ml}$ )					
	0	2	4	6	8	10
蛍光標準物質絶対量 ( $\text{nmol}$ )	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛍光標準溶液 ( $\mu\text{l}$ )	0	30	60	90	120	150
A-溶液 ( $\mu\text{l}$ )	150	120	90	60	30	0



ACE活性定量測定の為の蛍光標準物質による検量  
線。蛍光強度: 検体蛍光強度 - Blank蛍光強度

### [XII]. <添付管理用アンギオテンシン-1 変換酵素を用いた参考データー>



### [XIII]. <保存方法>

1°C~6°Cの冷暗所に保存下さい。製品は早めのご使用をお薦め致します。凍結厳禁

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



コスモ・バイオ株式会社