

MCK #K-11

研究用試薬

「コラゲノキット CLN-100」  
コラゲナーゼ活性測定法

初めに

コラーゲン分解酵素であるコラゲナーゼの活性異常は、慢性関節リウマチ、肝硬変症、悪性腫瘍等、各種疾患において観察されます。

「コラゲノキット」は、このコラゲナーゼ活性の測定法を世界で初めて製品化したものです。

操作は簡便で、微量の酵素を高感度に検出します。

また、アイソトープを使用しませんので、汚染の心配や、場所の制約もありません。本キットの使用が上記疾患の発生解明、ひいては治療法確立の一助になれば幸いです。

### 1. 測定原理

コラゲナーゼは、コラーゲンに作用し分解物を産する。

この分解物とコラーゲンとは変性温度が異なり、熱変性した分解物はエタノールに溶解するが、未変性コラーゲンは不溶である。

本キットは以上の特性を用いたものである。

すなわち、①FITC標識コラーゲンを溶液中でコラゲナーゼと反応後、②分解産物のみを35℃で選択的に変性させ、③エタノールで抽出し、④この抽出された分解物の蛍光光度を測定することにより、コラゲナーゼ活性を定量する。

### 2. キット内容

A液：基質

蛍光標識コラーゲン0.1%/0.01M酢酸

B液：緩衝液 A液の中和及び検体の調整等に使用

0.1Mトリス-HCl、pH7.5(含NaCl、CaCl<sub>2</sub>、NaN<sub>3</sub>)

C液：酵素反応停止液

80mM オーフエナントロリン (含エタノール)

D液：抽出液

70%エタノール(含トリス-HCl緩衝液、NaCl)

### 3. キットの保存性

A液：遮光下、-20℃で4ヵ月有効

遮光下、4℃で2週間有効

B液：-20℃で4ヵ月有効

4℃で2週間

C、D液：4℃以下にて保存

### 4. 準備する装置

褐色試験管：φ0.8cm×6cm

ピペット：10、100、200、400μl他

ボルテックスミキサー

ウォーターバス インキュベーター：35℃

温度計：精度の良いもの

遠心分離機：3000rpm

蛍光分光光度計

同上用マイクロセル：0.5ml

アイスボックスと氷

## 5. 試薬の調製

①使用前に、全試薬を1~4℃にする。

②「基質溶液」：A液1容をB液1容に静かに滴下しながら攪拌する。  
これを「基質溶液」とし、4℃下に置く。

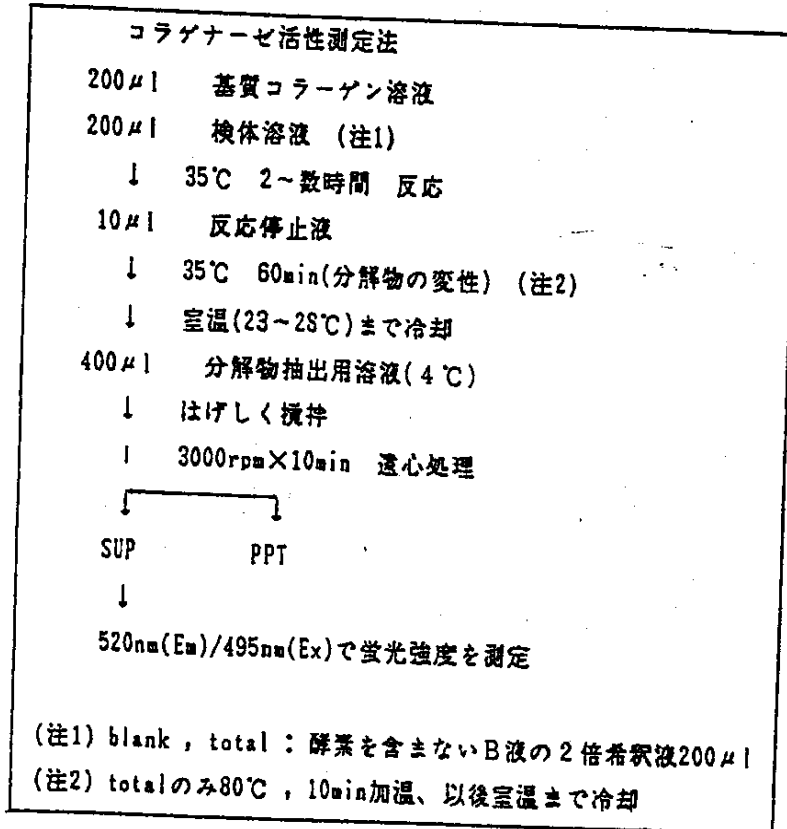
③1. B液をA液に加えない。

2. 「基質溶液」は3時間以内に使い切る。

④「調整液」：蒸留水1容とB液1容とを混和する。

これを「調整液」とし、4℃下に置く。

## 6. 操作法



下記、手順にて操作する。

①指定温度以外は、全試験管を4℃下で操作するか氷上にて取扱う。

②あらかじめ全試薬を1~4℃にする。

③実験は、デュプリケートで行う。

④褐色試験管に番号をつける。

⑤全試験管に「基質溶液」200μlを分注する。

⑥検体200 $\mu$ lを加える。

total用及びblank用試験管には「調整液」200 $\mu$ lを加える。

⑦必要に応じ、検体は「調整液」で希釈する。

⑧ボルテックスミキサーで2～3秒間あわだてないで攪拌する。

⑨全試験管を35 $^{\circ}$ C( $\pm$ 0.05 $^{\circ}$ C)で必要時間(通常2 hrs)温温する。

⑩全試験管にC液10 $\mu$ lを加える。

⑪ボルテックスミキサーで、2～3秒間攪拌する。

⑫試験管を再度、35 $^{\circ}$ C、60分間インキュベーションする。

totalのみ80 $^{\circ}$ C、10分間加温する。

⑬全試験管を、冷水にて冷却する。

⑭ただちに、D液400 $\mu$ lを加える。

⑮ボルテックスミキサーで、10～20秒間十分に攪拌する。

⑯3000rpm、10分間遠心分離する。

⑰上清約500 $\mu$ lを採取し、520nm(Em)/495nm(Ex)にて蛍光強度(FI)を測定する。

⑱totalのFIを100%とする。

#### 7. コラゲナーゼ活性計算法

コラゲナーゼ(unit/ml)

$$= \frac{\text{FI sample} - \text{FI blank}}{\text{FI total} - \text{FI blank}} \times 100(\mu\text{g}) \times \frac{1}{\text{反応時間}(\text{min})} \times \frac{1}{\text{検体量}(\text{ml})}$$

但し、1unit=1 $\mu$ gのコラーゲン分解/minとする。