

# 簡易型・酸性ムコ多糖定量キット

(Acidic Mucopolysaccharide Assay Kit, Code No. AK03)

平成 25 年 9 月 2 日改訂




※本品は、研究目的にのみご使用ください。

軟骨細胞は、コラーゲン、ムコ多糖などの細胞外基質を大量に産生する細胞として知られています。軟骨細胞の分化の指標の一つとしてアイソトープを用いた酸性ムコ多糖の測定がありますが、測定するには RI 管理区域内など使用制限があります。一方、非アイソトープによる測定は、HPLC 分析などが知られておりますが、システムの維持管理やサンプル抽出の煩雑さが問題となることがあります。

本キットは、塩基性色素 Stains All と酸性ムコ多糖との結合を利用した発色法による測定になります。

Stains All は酸性物質などにも作用し発色しますが、本キットは軟骨細胞中の酸性ムコ多糖を選択的に反応するような条件で構築しており、簡便かつ迅速に簡易定量できる反応系です。軟骨細胞培養系の酸性ムコ多糖測定にご利用ください。

## 《I-1. キット構成》

内 容	容量	本数	保存温度	危険表記および取扱上の注意
発色原液	4ml	1 本	4～10℃	(成分としてホルムアミドを 98%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当  警告  ・軽度の皮膚刺激 ・目刺激
緩衝液	130ml	1 本	4～10℃	(成分としてメタノールを 9.6%含む) 労働安全衛生法 第 57 条の 2 に該当  危険     ・引火性の高い液体及び蒸気 ・強い眼刺激 ・飲み込むと有害のおそれ ・眠気又はめまいのおそれ ・呼吸器への刺激のおそれ ・生殖能または胎児への悪影響のおそれ ・臓器の障害 (中枢神経系、視覚器、全身毒性)
検体調製用酵素粉末	10ml 用	5 本	4～10℃	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
標準液 (コト・ロイソ・硫酸 A 100 μg/ml)	2ml	1 本	4～10℃	

- ※ 本製品は、5 回 100 検体分 (1 回に 20 検体) を測定することができます。
- ※ 各種グリコサミノグリカンを個別に定量することはできません。
- ※ 本製品で培養液中の酸性ムコ多糖を測定することはできません。
- ※ 精製水を別途ご用意願います。

## 《I-2. キットの特徴》

- ・可視分光光度計を用いて簡便に簡易定量できる。

## 《Ⅱ-1. 測定方法》

- (1) 軟骨細胞を平面培養もしくは球状細胞塊状で培養した細胞塊（通常はこちらをお勧めします。軟骨細胞は低酸素高密度培養されることで軟骨組織形成が促進されます）をご用意ください。細胞塊の方法は《Ⅲ. 細胞塊での培養方法》をご覧ください
- (2) 検体調製用酵素粉末 1 本に 10ml の精製水を加え溶解し、メンブランフィルターでろ過し不溶物を除去してください。この溶液を検体調製用酵素溶液とします(調製後の溶液は保存することはできません。用時調製になります)。
- (3) 軟骨細胞を培養している上清を除去し、検体調製用酵素溶液を 0.5ml 加え、さらに 60℃、1 時間保温して細胞を完全に溶解してください。得られた溶液を検体溶液とします。
- (4) 検体溶液 100  $\mu$ l もしくは各濃度の標準液 100  $\mu$ l を各マイクロテストチューブに分注し、反応溶液を 1.3ml 加え攪拌した後、静置してください。反応溶液は《Ⅱ-2. 反応溶液の調製》に、標準液は《Ⅱ-3. 標準液の調整》にそれぞれ従って調製してください。
- (5) 反応溶液を添加してから数分程度で青色に呈色することが認められます。反応液を添加してから 10 分から 20 分の間に波長 650nm における吸光度を測定してください。  
※検体中の酸性ムコ多糖濃度が高い場合(120  $\mu$  g/ml 以上)、青色の沈殿を形成する場合があります。この場合は検体濃度を 100  $\mu$  g/ml 以下に希釈して測定して下さい。  
※反応液添加後 20 分以上経過すると青色の沈殿が形成する場合があります。

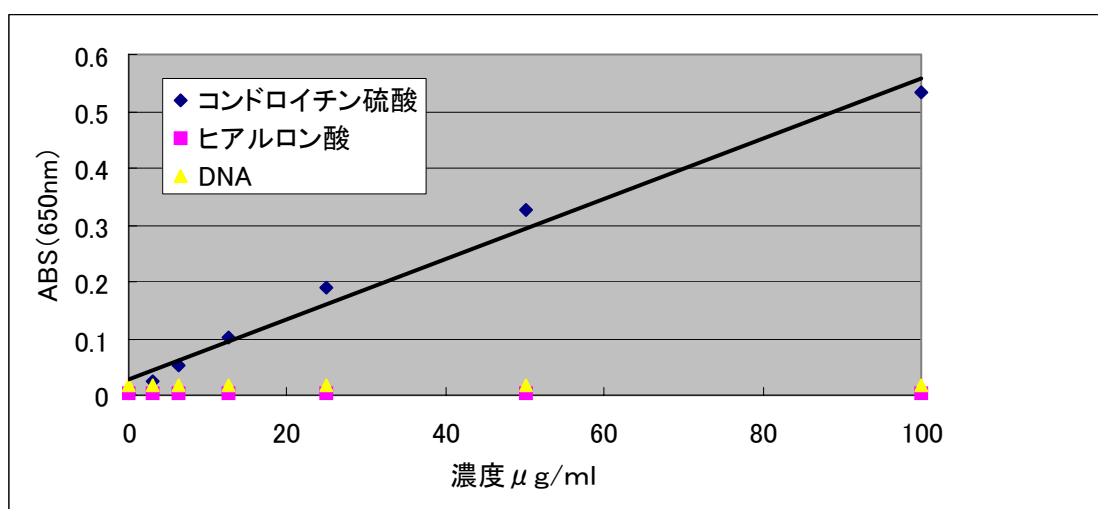


図 1 生体中の代表的な酸性物質とコンドロイチン硫酸の反応性の違い

## 《Ⅱ-2. 反応溶液の調製》

反応溶液は室温に戻した緩衝液 12.6ml と発色原液 0.4ml との割合で混合します。混合直後の溶液は青色を呈していますが、室温で数分間静置すると溶液の色が退色してきます。退色した溶液を反応溶液とします。調製した反応溶液は保存することができませんので、必要量分のみを使用直前に調製してください。

## 《Ⅱ-3. 標準液の調整》

標準液を精製水で希釈し 100  $\mu$  g/ml (原液)、50  $\mu$  g/ml、25  $\mu$  g/ml、12.5  $\mu$  g/ml、0  $\mu$  g/ml 濃度の各標準液を調製してください。調製後の標準液は冷凍保存してください。

### 《Ⅲ. 細胞塊での培養方法》

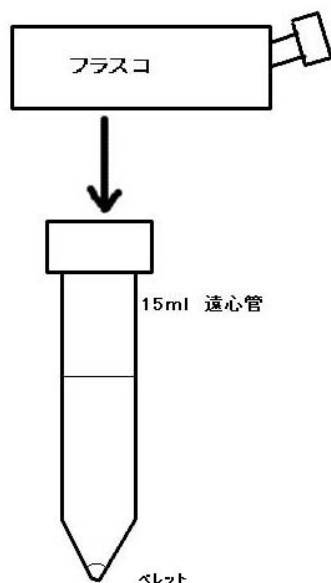


図2、低酸素、球状細胞塊状（スフェロイド状）で培養

12.5 cm<sup>2</sup> フラスコに培養された当社製ウサギ関節軟骨細胞（商品番号 CHC02）をトリプシン処理後、15ml 遠心管へ移し遠心分離。回収した細胞ペレットに 5ml 培養液を加えて培養する。およそ 3 週間後、細胞塊の中心部に軟骨組織が再生される。

#### 《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

#### 送付方法

〒063-0061 北海道札幌市西区西町北 12 丁目 1-12 YS ビル  
コスモ・バイオ株式会社 プライマリーセル事業部 あて郵送  
または primarycell@cosmobio.co.jp あて PDF ファイル送信



コスモ・バイオ株式会社  
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

- 営業部（お問い合わせ）  
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619  
TEL : (03) 5632-9620
- プライマリーセル事業部（技術的なお問い合わせ）  
TEL : (011) 667-5911 FAX : (011) 667-5912  
E-mail : [primarycell@cosmobio.co.jp](mailto:primarycell@cosmobio.co.jp)  
URL : <http://www.primarycell.com/>