



Acidic Mucopolysaccharide Assay Kit

Catalog No. AK03

July 1, 2024

Introduction

Chondrocytes produce extracellular matrix such as collagen, mucopolysaccharide and so on. There are conventional methods to measure acidic mucopolysaccharides using radioisotopes, but the area and the amount used regarding radioisotopes are restricted. On the other hand, HPLC analysis is complicated to maintain the system and to extra for making samples. Acidic Mucopolysaccharide Assay Kit (PMC-AK03) provides a convenient system for mucopolysaccharides visualization using Stains All, which combines with acidic mucopolysaccharides, with ease. Stains All normally combines with acidic substance, however the Stains All in this kit stains only acidic mucopolysaccharides of chondrocytes selectively

Components/Storage

Components	Quantity	Store
Staining Solution	4ml	4 -10°C
Buffer	130ml	4 -10°C
Enzyme Reagent	10ml 用	4 -10°C
Chondroitin Sulfate Standard (100 µg/ml)	2ml	4 -10°C

One kit contains regents for 100 (20 samples × 5 times) samples

This kit cannot quantify various glycosaminoglycans individually.

This kit cannot quantify the mucopolysaccharides in culture medium.

Additional Materials Required

- distilled water

Prepare reagents

- Reaction Buffer

Warm Staining Solution and Buffer to room temperature. Mix 0.4 mL of Staining Solution and 12.6 mL of Buffer.

Note: After mixing, the solution is blue, but the color will fade in several minutes. This faded solution is the working solution. This working solution cannot be stored.

- Standard Solution

Dilute the Standard Stock Solution in distilled water to 100, 50, 25, 12.5 and 0 µg/mL.

Note: This working solution can be stored at -20°C.

- Enzyme Solution

Add 10 mL of distilled water to one vial of Enzyme Reagent and mix. Filter the solution with a membrane filter.

Note: This working solution cannot be stored.

Protocol

1. Prepare cultured chondrocyte layers or spheroid cell clusters
2. Note: Using cell clusters is recommended. Refer to culture spheroid cell clusters method to know how to prepare spheroid cell clusters
3. Remove culture medium and add 0.5 mL of Enzyme Solution. Digest the cells by incubating at 60°C for 1 hour.
4. Add 100 μ L of digested cell samples or 100 μ L of Standard Solution to tube and add 1.3 mL of Reaction Buffer to each tube, and then leave the tubes.
5. The solution will become blue in a few minutes from the addition. Measure the absorption at 650 nm after the addition of 10 to 20 minutes.
6. Note: When the concentration of acidic mucopolysaccharides is more than 120 μ g/mL. Acidic mucopolysaccharides will precipitate. In the case, the sample must be diluted to obtain a concentration of less than 100 μ g/mL. After the addition more than 20 minutes, acidic mucopolysaccharides will form blue precipitation

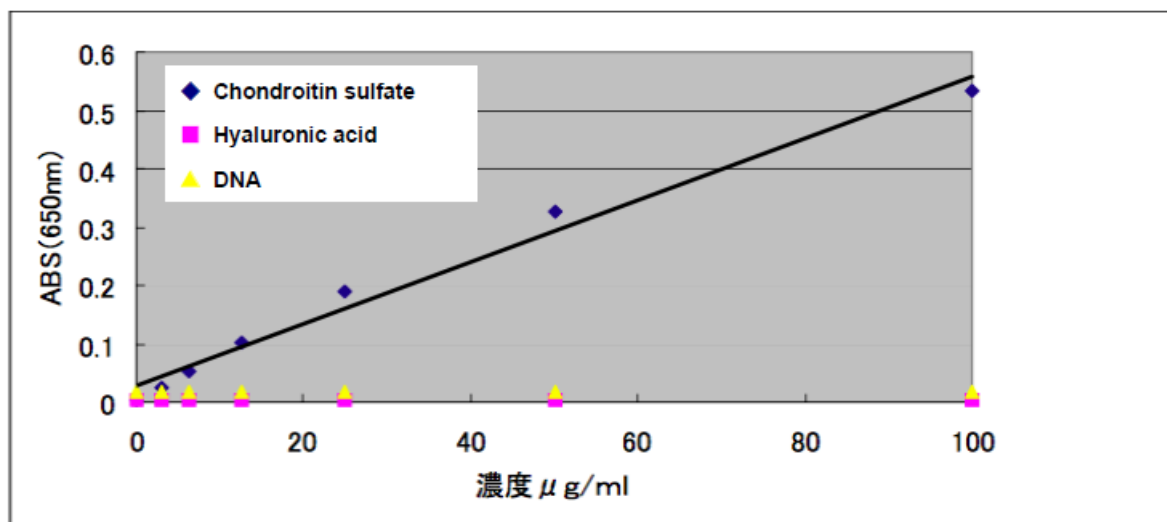


Fig.1

Acidic Mucopolysaccharide and acidic substances detected by Acidic Mucopolysaccharide Assay Kit

This kit stains only acidic mucopolysaccharides of chondrocytes selectively.

Culture Spheroid Cell Clusters Method

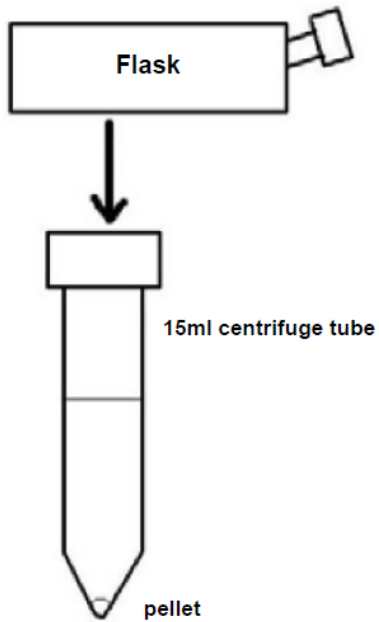


Fig.2 Cells form spheroid clusters under Hypoxia condition

Prepare cultured chondrocytes and cells are detached by the treatment of trypsin solution. Transfer detached cells to 15 mL centrifuge tube and centrifuge the centrifuge tube. Remove supplement and add 5 mL of medium to the centrifuge tube. In about 3 weeks, cells will form cartilage-like spheroids.

References

- (1) Obayashi, K., Miyagawa Tomita, S., Matsumoto, H., Koyama, H., Nakanishi, T., Hirose, H. Effects of Transforming Growth Factor beta3 and Matrix Metalloproteinase 3 on The Pathogenesis of Chronic Mitral Valvular Disease in Dogs. Am. J. Vet. Res. 72, 194-202 (2011)

一般研究用キット

簡易型・酸性ムコ多糖定量キット

(Acidic Mucopolysaccharide Assay Kit, 品番 : AK03)

2024 年 7 月 1 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
発色原液 Staining Solution	4ml	1 本	4 ~ 10°C
緩衝液 Buffer	130ml	1 本	4 ~ 10°C
検体調製用酵素粉末 Enzyme Reagent	10ml 用	5 本	4 ~ 10°C
標準液 Chondroitin Sulfate Standard (100 µg/ml)	2ml	1 本	4 ~ 10°C

- ※ 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 μ l もしくは各濃度の標準液 100 μ 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 μ 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 μ 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。

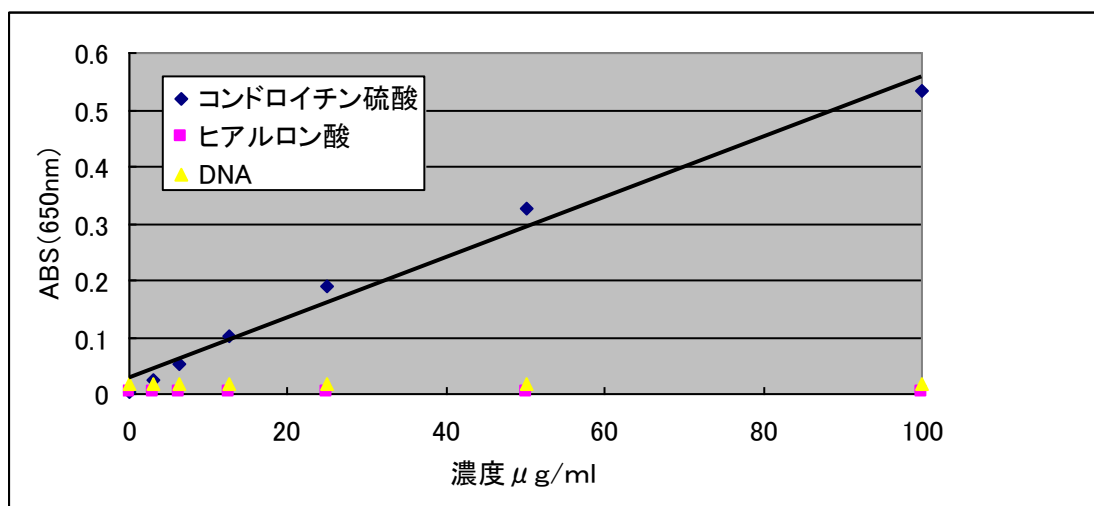


図 1 生体中の代表的な酸性物質とコンドロイチン硫酸の反応性の違い

《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 μ g/ml (原液)、50 μ g/ml、25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、0 μ 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》

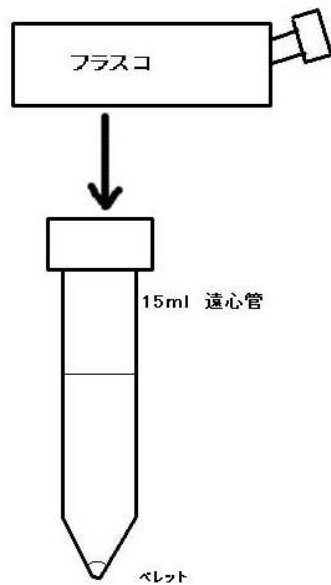


図 2、低酸素、球状細胞塊状（スフェロイド状）で培養

12.5 cm² 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。

《Ⅳ．参考文献》

(1) Obayashi, K., Miyagawa Tomita, S., Matsumoto, H., Koyama, H., Nakanishi, T., Hirose, H. Effects of Transforming Growth Factor beta3 and Matrix Metalloproteinase 3 on The Pathogenesis of C hronic Mitral Valvular Disease in Dogs. Am. J. Vet. Res. 72, 194 202 (2011)