

コラゲナーゼアッセイキット

(collagenase assay kit, Code No. AK37)

令和7年7月24日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

コラゲナーゼは、9種類知られているコラーゲンファミリーの一つであるコラーゲンを1/4および3/4のフラグメントに分解する酵素として知られており、コラーゲン代謝の重要な役割を担っております。

本キットは、蛍光標識コラーゲンを基質としたコラゲナーゼ活性測定キットです。炎症部位の組織液などのコラゲナーゼ活性測定にご利用下さい。

《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
蛍光標識コラーゲン Fluorescent-labeled collagen	6ml	2本	4~10°C	
緩衝液A Buffer A	100ml	1本	4~10°C	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。
緩衝液B Buffer B	150ml	1本	4~10°C	(成分としてエタノールを41.6%含む) 労働安全衛生法 第57条の2に該当 危険   <ul style="list-style-type: none"> ・引火性の高い液体及び蒸気 ・強い眼刺激 ・遺伝性疾患のおそれ ・肝臓の障害 ・眠気またはめまいのおそれ ・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

※本製品は、蛍光分光光度計(セミマイクロセル利用)で240検体分、蛍光プレートリーダー利用で480検体分測定することができます。

※本製品の測定は、蛍光(蛍光試薬 FITC)を測定できる機器が必要になります。

※精製水を別途にご用意願います。

《I-2. キットの特徴》

- コラゲナーゼ活性を測定することができる。

《II. 試薬調製》

(1) 基質液

蛍光標識コラーゲンと緩衝液Aを等量混合し、使用するまで遮光した状態で氷冷します。用事調製のため必要量調製してください。

(2) 検体希釈液

緩衝液Aと精製水を等量混合し、使用するまで氷冷します。

《III. 測定方法-セミマイクロセルを使用した蛍光分光光度計の測定の場合》

はじめに測定する検体の本数および2本(反応基質総量用、ブランク用)のチューブを用意します。

- (1) 各チューブに基質液を $100\mu\text{l}$ ずつ分注する。
- (2) 基質液が入っているチューブに検体 $100\mu\text{l}$ を加えてよく混合させる。反応基質総量用およびブランク用のチューブには検体希釈液 $100\mu\text{l}$ を加えてよく混合させる。検体に含まれる酵素量が多い場合は検体希釈液で希釈してから添加する。
- (3) 反応基質総量用チューブを除く全てのチューブを 35°Cでインキュベートする (1~3 時間程度)。反応基質総量用チューブのみ 80°Cで 3 分間インキュベートする。
- (4) 全ての各チューブに冷却した緩衝液 B $600\mu\text{l}$ を加え、強く攪拌し氷上で 15 分間静置した後、冷却遠心(4°C 、 $10,000\text{rpm}$ 、10 分間)する。
- (5) 上清を回収し、励起フィルター (Excitation filter) : 495nm , 蛍光フィルター (Emission filter) : 520nm で蛍光を測定してください。
※蛍光プレートリーダーで測定する場合は、上記の試薬容量を全て半量にしてご使用ください。

《IV. コラゲナーゼ活性の計算方法》

コラゲナーゼの活性(unit)は、1 分間に $1\mu\text{g}$ のコラーゲンを消化するものと定義されています。基質液中に含まれるコラーゲン濃度は 0.5mg/ml になりますので以下のように求めることができます。

コラゲナーゼ活性(units/ml) =

$$\frac{(\text{検体の蛍光強度}) - (\text{ブランクの蛍光強度})}{(\text{反応基質総量の蛍光強度}) - (\text{ブランクの蛍光強度})} \times \frac{50(\mu\text{g:コラーゲン})}{\text{反応時間 (分)}} \times \frac{1}{0.1(\text{ml:検体量})}$$

※基質液 $100\mu\text{l}$ 、検体 $100\mu\text{l}$ で測定した場合の計算式になります。