



# Gelatin-Zymography Kit (ATTO type)

Catalog No. AK45

July 1, 2024

## Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to the family of metalloproteinases, which consists of at least 20 members, and known to be involved in the metabolism of extracellular matrix proteins. MMPs are widely detected by zymography. The Gelatin-Zymography Kit (Cat.No.AK45) provides an easy system of the electrophoresis for zymography. This product is used for detecting ProMMP-2, MMP-2 and ProMMP-9 in blood, body fluid, secretion, cell lysate, cell culture medium, and other samples.

## Components/Storage

Component	Quantity	Storage
Precast gel for 12 samples	5 pieces	4°C
Electrophoresis Buffer (x10)	100 mL x 2	4°C
Washing Buffer (x10)	100 mL x 1	4°C
Reaction Buffer (x10)	25 mL x 1	4°C
Sample Preparation Buffer	5 mL x 1	4°C
Staining Solution	100 mL x 1	room temperature
MMP markers (ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9)	200 µL	4°C

The size of the glass plate gel is 120(W)x100(H) and the thickness is 1mm. One kit contains reagents for 60 samples

## Materials required but not provided

- Acetic acid
- Methanol
- Distilled water

## Preparation of reagents

- Electrophoresis Buffer

Dilute Electrophoresis Buffer (x10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

**Note:** Diluted buffer should be stored at 4°C.

- Washing Buffer

Dilute Washing Buffer (x10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

**Note:** Diluted buffer should be stored at 4°C.

- Reaction Buffer

Dilute Reaction Buffer (x10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

**Note:** Diluted buffer should be stored at 4°C.

- De-staining Solution

This solution is not included in this kit. Mix Acetic acid: Methanol: Distilled water = 5 : 30 : 65.

**Note:** De-staining Solution should be stored at Room Temperature.

## **Protocol**

1. Load 100-150 mL of Electrophoresis Buffer to the lower chamber (anode). Refer to the instruction manual of your electrophoresis tank/chamber to know appropriate volume of the buffer.
2. Take out the comb on precast gel carefully and set the gel to electrophoresis chamber. The side of sample holes should be set on the upper side. If the sample holes are disturbed, fix them up with needle etc.
3. Load around 100 mL of Electrophoresis Buffer to the upper chamber (cathode).
4. Mix samples with equivalent volume of sample preparation buffer. Incubate for 15 minutes at Room Temperature. (Do NOT heat the samples.)
5. Apply the samples and MMP markers to gel plate. (Fig.1: 10ul of MMP markers applied and enzymatic reacted for 24 hrs. at 37°C) Run electrophoresis at 15 mA constant current. (If you use 2 gels, set the current at 30 mA)  
\*MMP markers can be used without sample preparation buffer.
6. After the run is completed, turn off the electrophoresis chamber. And take out the gel plate from the chamber.
7. Remove the upper glass plate of the gel plate and peel off the gel carefully with a spatula.
8. Put the gel in the tray with 200 mL of Washing Buffer. Incubate with shaking at Room Temperature.
9. Put the gel in the container with 50 mL of Reaction Buffer and seal up the container. Incubate the gel in the container in incubator at 37°C for 20-40 hrs (Lower enzyme concentration needs longer reaction time.).
10. After enzymatic reaction, put the gel in the container with Staining solution. Incubate for 30 minutes at Room Temperature to stain protein.
11. Put the gel in the container with De-staining solution. And incubate for 30minutes – several hours to de-stain.

## **Application example**

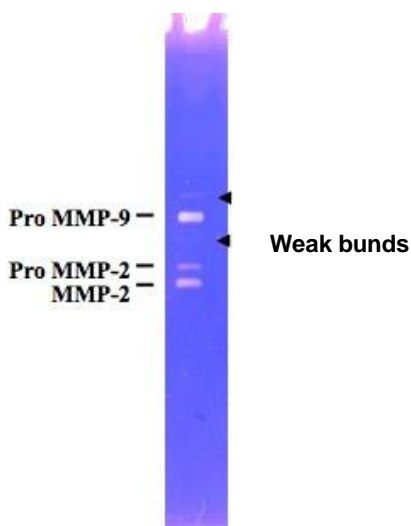


Fig. 1 10ul of MMP markers applied and enzymatic reacted for 24 hrs. at 37°C

## **References**

- (1) Miyazaki, K., Ohta, Y., Nagai, M., Morimoto, N., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T., Abe, K. Disruption of Neurovascular Unit Prior to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 89, 718-728 (2011)
- (2) Fujiwara, M., Kashima, T. G., Kunita, A., Kii, I., Komura, D., Grigoriadis, A. E., Kudo, A., Aburatani, H., Fukayama, M. Stable Knockdown of S100A4 Suppresses Cell Migration and Metastasis of Osteosarcoma. *Tumour Biol.*
- (3) Aoki, T., Kataoka, H., Ishibashi, R., Nozaki, K., Hashimoto, N. Simvastatin Suppresses the Progression of Experimentally Induced Cerebral Aneurysms in Rats. *Stroke.* 39, 1276-85 (2008)
- (4) Kuramochi, D., Unoki, H., Bujo, H., Kubota, Y., Jiang, M., Rikihisa, N., Udagawa, A., Yoshimoto, S., Ichinose, M., Saito, Y. Matrix Metalloproteinase 2 Improves The Transplanted Adipocyte Survival in Mice. *Eur. J. Clin. Invest.* 38, 752-759 (2008)
- (5) Fujimoto, M., Takagi, Y., Aoki, T., Hayase, M., Marumo, T., Gomi, M., Nishimura, M., Kataoka, H., Hashimoto, N., Nozaki, K. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Protect Blood-brain Barrier Disruption in Focal Cerebral Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1674-1685 (2008)



一般研究用キット

# ゼラチンザイモ電気泳動キット (アトー型)

## (Gelatin-zymography kit, 品番 : AK45)

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。

MMPs(マトリックスメタロプロテアーゼ)は、メタロプロテアーゼファミリーの1つで、生体内で細胞外マトリックス成分の代謝に関与している酵素として 20 数種類同定されています。その MMPs の検出方法の1つとして、電気泳動で分離し酵素活性を検出する方法(ザイモグラフィ)が広く利用されております。

本キットはプレート、バッファー調製などを極力簡略化し、手軽にゼラチンを基質タンパクとしたゼラチンザイモ電気泳動を行えるように構成しております。ヒトおよび各種動物の血液・体液・分泌液・組織・細胞・細胞培養溶液中に含まれている ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9 などのゼラチナーゼ検出確認にご利用下さい。

### 《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度
ゼラチンザイモ泳動プレキャストゲル Precast Gel	12 検体用	5 枚	4°C (禁凍結)
洗浄液 (10 倍濃縮) Washing Buffer	100mL	1 本	4°C
酵素反応用バッファー (10 倍濃縮) Reaction Buffer	25mL	1 本	4°C
泳動用バッファー (10 倍濃縮) Electrophoresis Buffer	100mL	2 本	4°C
サンプル調整バッファー Sample Preparation Buffer	5mL	1 本	4°C
MMP Markers (ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9)	200 µL	1 本	4°C
染色液 Staining Solution	100mL	1 本	室温

※ガラスプレートサイズは 120(W)×100(H)、ゲルの厚みは 1 mm です。

※本製品は、アトー株式会社製の電気泳動槽に対応です。

※ゼラチンザイモ泳動ゲルプレートは、早めにご使用することをお勧めいたします。

また凍結した場合、変性しますので保存温度にご注意ください。

※プレートの素材はガラス製のため取り扱いにご注意ください。

※酢酸、メタノール、精製水を別途にご用意願います。

## 《Ⅰ-2. キットの特徴》

- ・ザイモグラフィーに必要なプレキャストゲル、試薬類がパッケージングしています。

## 《Ⅱ. 試薬調製および保存温度》

### 1. 泳動用バッファー

泳動用バッファー（10倍濃縮）を精製水で10倍希釈して使用して下さい。4℃保存。

### 2. 洗浄液

洗浄液（10倍濃縮）を精製水で10倍希釈して使用して下さい。4℃保存。

### 3. 酵素反応用バッファー

酵素反応用バッファー（10倍濃縮）を精製水で10倍希釈して使用して下さい。4℃保存。

### 4. 染色液

そのまま使用できます。

ただし一度使用した染色液を再度使用することはできませんので、ご注意ください。室温保存。

### 5. 脱色液

お客様でご用意して頂きます。酢酸:メタノール:精製水=5:30:65で混合して下さい。室温保存。

## 《Ⅲ. 操作手順》

- (1)泳動陽極槽（下）に、泳動用バッファーを100～150mL入れる。泳動用バッファーの適量は、電気泳動槽の取扱説明書に従ってください。
- (2)ゼラチンザイモ泳動プレキャストゲルに挿されているコームを慎重に抜き取り、泳動槽にセットする。サンプルホールがある辺が上になります。ホールに乱れがある場合は、針などを用いて形状を整えて下さい。
- (3)泳動陰極槽（上）に、泳動用バッファーを100mL程度入れる。
- (4)サンプルを等量のサンプル調整バッファーと混合し、室温で15分間放置する（加熱処理は行わないでください）。
- (5)ゲルプレートにサンプル、MMPマーカを添加する。  
(MMPマーカを10 $\mu$ L添加し、37℃で24時間酵素反応を行った泳動パターンが図1になります)  
※MMPマーカは、サンプル調整バッファーと混合せずにそのままご使用できます。
- (6)15mAの定電流で泳動する（ゲルが2枚の場合は30mA）。
- (7)泳動が終了したら電源を切り、泳動槽からゲルプレートを外す。
- (8)ゲルプレートの上部のガラス板を取り除き、下部のガラス板（最も大きなガラス）からスパーテルやスパチュラなどを用いて、ゲルを取り外す。
- (9)ゲルを洗浄液200mlが入っている容器に移し、室温で1時間振盪する。
- (10)酵素反応用バッファー50mLが入っている容器にゲルを移して密封し、37℃に設定した恒温器に入れ20～40時間（酵素濃度が低いほど長時間反応させる）酵素反応を行う。
- (11)ゲルを染色液が入っている容器に移して30分間室温でタンパク染色を行う。
- (12)ゲルを脱色液の入っている容器に移し、30分～数時間脱色を行う。

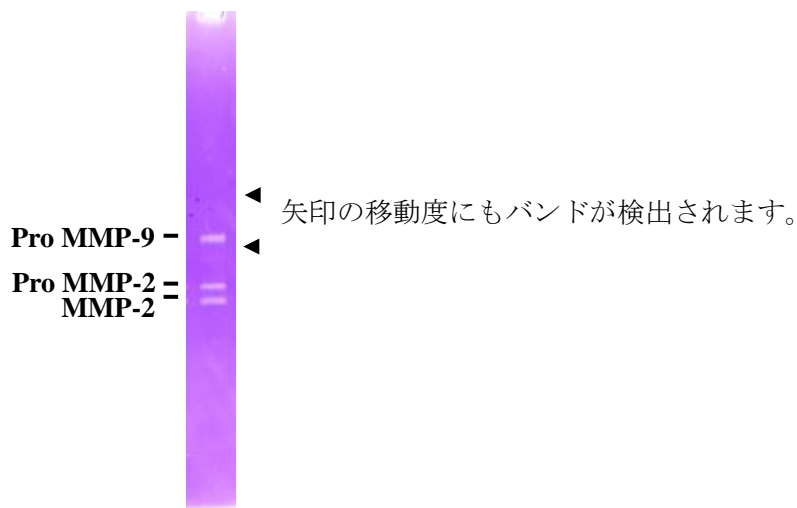


図1. MMP マーカーの泳動パターン

《IV. 参考文献》

- (1) Miyazaki, K., Ohta, Y., Nagai, M., Morimoto, N., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T., Abe, K. Disruption of Neurovascular Unit Prior to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 89, 718-728 (2011)
- (2) Fujiwara, M., Kashima, T. G., Kunita, A., Kii, I., Komura, D., Grigoriadis, A. E., Kudo, A., Aburatani, H., Fukayama, M. Stable Knockdown of S100A4 Suppresses Cell Migration and Metastasis of Osteosarcoma. *Tumour Biol.*
- (3) Aoki, T., Kataoka, H., Ishibashi, R., Nozaki, K., Hashimoto, N. Simvastatin Suppresses the Progression of Experimentally Induced Cerebral Aneurysms in Rats. *Stroke.* 39, 1276-85 (2008)
- (4) Kuramochi, D., Unoki, H., Bujo, H., Kubota, Y., Jiang, M., Rikihisa, N., Udagawa, A., Yoshimoto, S., Ichinose, M., Saito, Y. Matrix Metalloproteinase 2 Improves The Transplanted Adipocyte Survival in Mice. *Eur. J. Clin. Invest.* 38, 752-759 (2008)
- (5) Fujimoto, M., Takagi, Y., Aoki, T., Hayase, M., Marumo, T., Gomi, M., Nishimura, M., Kataoka, H., Hashimoto, N., Nozaki, K. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Protect Blood-brain Barrier Disruption in Focal Cerebral Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1674-1685 (2008)