

一般研究用キット

# 軟骨II型コラーゲン抗糖化アッセイキット (グリセルアルデヒド)

【Cartilage Type II Collagen Glycation Assay kit: Glyceraldehyde, 品番：AK72】

2024年7月1日改訂

※本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

糖類は、生命活動において不可欠な栄養素であるが、一方で生体内のタンパク質のリジンやアルギニン残基を修飾し架橋形成することでタンパク質の立体構造が変化し、活性や物性に大きく影響を及ぼすことが知られている。この反応は糖化反応（Glycation）もしくはメイラード反応と呼ばれ、アマドリ転移物が生成する前期反応と、酸化、脱水、縮合などの反応を経て糖化反応後期生成物(advanced glycation end-products: AGEs)に至る後期反応に分けられる。皮膚、血管壁、骨、軟骨などあらゆる臓器を形作る構造タンパク質であるコラーゲンも例外ではなく糖化反応を受ける。

近年、AGEs は生体内においてグルコースだけではなく、グルコースの代謝中間体や分解物、メイラード反応中間体などからも生成することが報告され、生体内で生成される AGEs の中でも、特に糖代謝中間体由来のグリセルアルデヒド由来の AGEs が疾患の発症や進展に強く関わっていることが報告されている。

本キットは 96well プレートを用いて、無細胞および非酵素的に軟骨 II 型コラーゲンへの糖化反応を追うことができるキットです。関連製品のコラーゲン抗糖化アッセイキット(品番：AK70,71) は皮膚のI型コラーゲンに対する糖化反応を追っているのに対し、本キットは軟骨由来の II 型コラーゲンに対する糖化反応を追うことができます。機能性食品および化粧品開発における抗糖化素材開発にご利用ください。

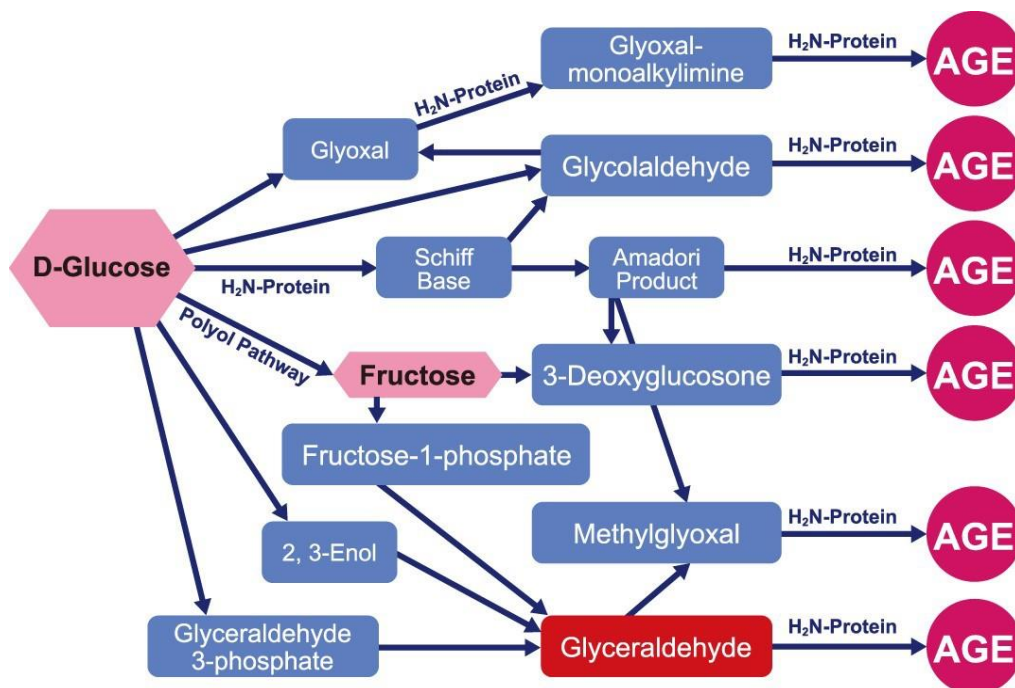


図. 生体内AGEsの生成経路

## 《I-1. キット構成》

キット内容	容量	本数	保存温度
軟骨II型コラーゲン酸性溶液 Type II Collagen solution	5 mL	1本	4°C
中和液 Neutralizing Solution	5 mL	1本	
グリセルアルデヒド溶液 (500mM) Glyceraldehyde Solution	2mL	1本	
緩衝液 Dilution Buffer	30 mL	1本	
アミノグアニジン溶液 (20mM) ※抗糖化標準物質 Aminoguanidine Solution	0.5 mL	1本	

※ 本キットは、96well プレート 2 枚分のアッセイが可能です。

## 《I-2. キットの特徴》

- ・本キットは糖化したコラーゲンから出でくる蛍光（励起波長 370nm、蛍光波長 440nm）を指標として、抗糖化作用成分を探索することに適しています。

## 《II. 試験方法—96well プレートを用いた測定—》

ご用意して頂くもの

- ・96well ブラックプレート（透明底タイプ、滅菌済み）  
（グライナー製  $\mu$ CLEAR-PLATE BLACK Cat.No.655090 または同等品）
- ・下方励起・下方蛍光測定が可能な蛍光プレートリーダー（励起波長 370nm、蛍光波長 440nm）

以下の操作は、クリーンベンチ等で無菌的に行なってください。

緩衝液に 3mM アジ化ナトリウムを添加することによって、無菌でない環境にても操作可能です。

- （1）軟骨II型コラーゲン酸性溶液および中和液は、使用前に十分に氷冷してください。
- （2）コラーゲン酸性溶液が入っているボトルに中和液を全量加え、ピペットを用いて均一に混合してください。コラーゲン酸性溶液は高粘性のために均一に混合されるまで時間が掛かりますが、溶液の温度を低温（10°C以下）に保ちながらゆっくりと泡を立てないように注意深く混和してください。混合した溶液をコラーゲン溶液とします。  
※コラーゲン溶液は保存できませんので使用時に調製し、1回の操作で使い切るようにしてください。
- （3）コラーゲン溶液を 1well あたり 50  $\mu$ L ずつ 96well プレートに分注してください。  
コラーゲン溶液は粘性が高いため 200  $\mu$ L 用マイクロピペットを用いてゆっくり吸い取り、ゆっくり吐き出し、同じ速度で各 well に分注してください。室温が高い場合にはプレートを氷冷しながら分注してください。

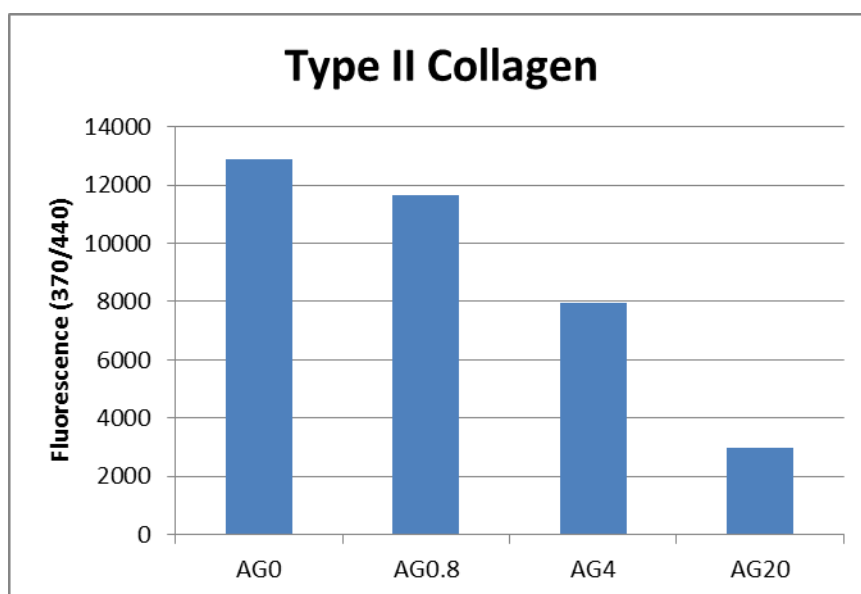
- (4) 試験試料は緩衝液で溶解または抽出したものをフィルター（孔径0.22 $\mu$ m）でろ過滅菌し、コラーゲン溶液が入ったウェルの上に 40  $\mu$ L 重層してください。
- 陽性コントロールはアミノグアニジン溶液（20mM）を緩衝液で 5 倍希釈系列を作製しコラーゲン溶液に 40  $\mu$ L 重層してください。
- (5) 全ての well に500mM グリセルアルデヒド溶液を 10  $\mu$ L 添加し、プレートミキサー等で攪拌してください。グリセルアルデヒド溶液を添加することで糖化が始まります。
- (7) グリセルアルデヒド溶液添加後 5 分以内に下方測定の蛍光プレートリーダーで励起波長 370nm、蛍光波長 440nm での蛍光強度を測定してください。この測定値を反応 0 時間の蛍光強度A とします。
- (8) プレートは、溶液の乾燥を防ぐため湿潤状態下<sup>(注意1)</sup>の 37°Cインキュベーターで 24 時間静置してください。反応期間は長いほど糖化は進みます。
- (9) 下方測定の蛍光プレートリーダーで励起波長 370nm、蛍光波長 440nm での蛍光強度を測定して下さい。この測定値を蛍光強度B とします。
- 各Well の糖化度を、 $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 A}$  とします<sup>(注意2)</sup>。

※注意 1：糖化反応中にウェル内が乾燥した場合、正確な測定結果を得ることができません。アッセイ中は湿潤状態を保つようにご注意ください。湿度調整付きインキュベーターが無い場合は、蒸留水で湿らせたろ紙などを密閉容器の底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。

※注意 2：反応時間内で試験試料のみの蛍光値が変動する可能性がある場合には（6）で試験試料添加群に緩衝液を添加し同様に加温し、励起波長 370nm、蛍光波長 440nm での蛍光強度を測定して下さい。この値を蛍光強度C とし、各Well の糖化度は $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 C}$ として計算してください。

### 《Ⅲ. 実施例》

アミノグアニジン（AG）の抗糖化活性を示す。アミノグアニジン溶液の濃度は 0, 0.8, 4, 20（mM）を 40 $\mu$ L添加しました。その結果、濃度依存的に軟骨II 型コラーゲンに対し抗糖化活性を有することが認められました。



AG : アミノグアニジン (mM)

#### 《IV. 参考論文》

- (1) A. Nishikawa, T. Taira, K. Yoshizato. (1987) In Vitro Maturation of Collagen Fibrils Modulates Spreading, DNA Synthesis, and Collagenolysis of Epidermal Cells and Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 171, p164-177.
- (2) H. Shoda et al.(1997) Inhibitory Effects of Tenilsetam on the Maillard Reaction. *Endocrinology* 138, p1886-1892.
- (3) Jun-ichi Takino et al. (2010) The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J. Gastroenterol* 45: 646-655
- (4) Shizuko Sekiguchi, Toshio Taira, Keitaro Nomoto, Wakako Takabe, Lanny Parengkuan, A. N. M. Mamun Or Rashid, Masayuki Yagi, Yoshikazu Yonei. (2016) Development of a prototype anti-glycation assay kit for assessment of bone and cartilage collagen modification. *Glycative Stress Research* 3: 74-80