



FITC-labeled Gelatin-zymography Kit (Atto-type)

Catalog No. AK80

December 17, 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 FITC-labeled Gelatin-Zymography Kit 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

Component	Quantity	Storage
Precast gel for 12 samples	5 pieces	4°C, Do not freeze
Electrophoresis Buffer (× 10)	100 mL × 2	4°C
Washing Buffer (× 10)	100 mL × 1	4°C
Reaction Buffer (× 10)	25 mL × 1	4°C
Sample Preparation Buffer	5 mL × 1	4°C
MMP markers (ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9)	0.2 mL	4°C

The size of the glass plate gel is 120 mm (W) × 100 mm (H) and the thickness is 1mm. One kit contains reagents for 60 samples.

Additional Materials Required

- Distilled water

Features

- Precast gel and reagents for zymography are included in this kit.
- You can check the enzyme reaction continuously.

Preparation of reagents

- Electrophoresis Buffer

Dilute Electrophoresis Buffer (× 10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

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

- Washing Buffer

Dilute Washing Buffer (× 10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

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

- Reaction Buffer

Dilute Reaction Buffer (× 10) with distilled water to a 1x concentrated solution.

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

Preparation of samples

Mix Sample Preparation Buffer and a samples in the ratio of 1 to 1 and leave it in room temperature for 15 minutes.

Note: Do not heat the samples.

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. Apply samples and MMP markers to gel plate. (Fig.1: 10 μ L of MMP markers applied and enzymatic reacted for 24 hrs at 37°C).
5. Run electrophoresis at 15 mA constant current. (If you use 2 gels, set the current at 30 mA)
6. *MMP markers can be used without sample preparation buffer.
7. After the run is completed, turn off the electrophoresis chamber and take out the gel plate from the chamber.
8. Remove the upper glass plate and peel off the gel from the lower glass plate (the biggest glass plate) carefully with a spatula.
9. Put the gel in a tray with 200 mL of Washing Buffer. Incubate with shaking at Room Temperature.
10. Put the gel in a container with 50 mL of Reaction Buffer and seal up the container. Incubate the gel at 37°C for 20-40 hrs. (Lower enzyme concentration needs longer reaction time.)
11. After enzymatic reaction, remove the gel and take a photo by gel imaging system. (fluorescent wavelength: 535 nm)

Electrophoresis patterns

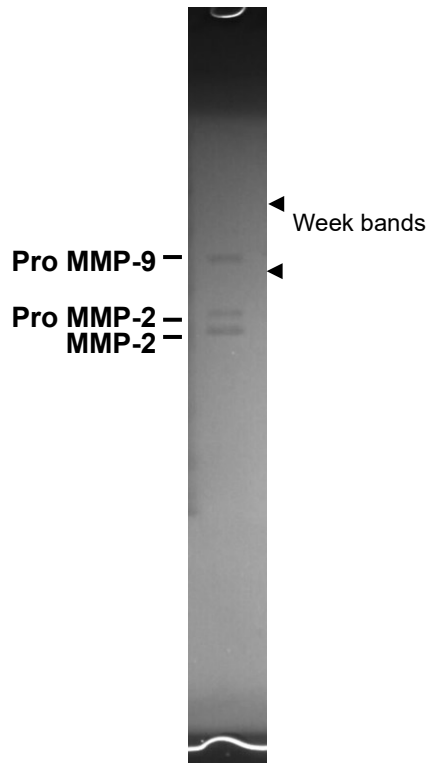


Fig 1. Electrophoresis pattern of MMP marker

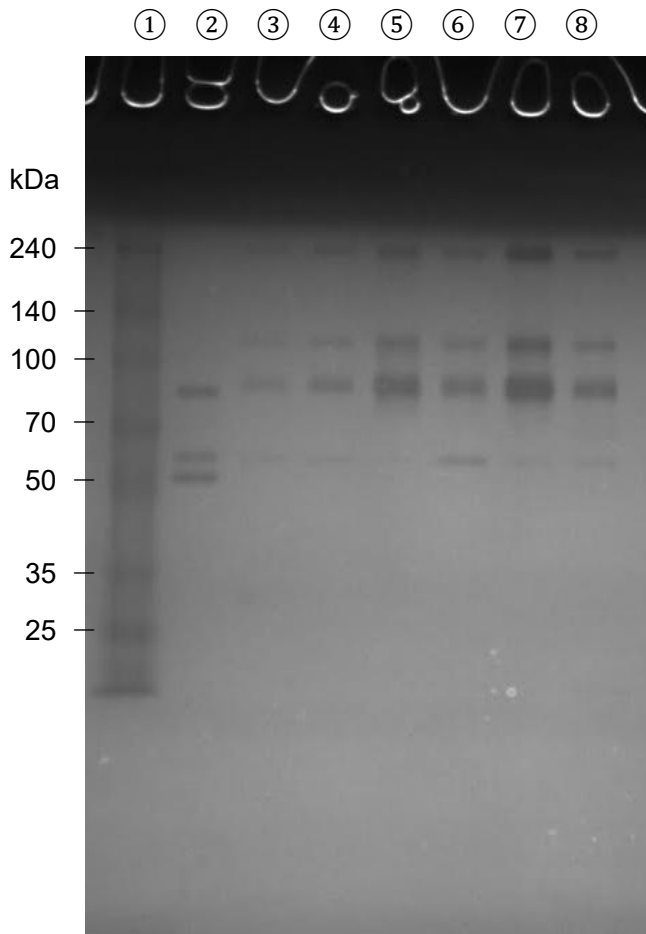


Fig 2. Electrophoresis pattern for human tear samples

- ① Molecular-weight marker
- ② MMP marker
- ③~⑧ Human tear samples (6 lanes)



一般研究用キット

蛍光標識ゼラチンザイモ電気泳動キット (アトー型)

(FITC-labeled Gelatin-zymography Kit, ATTO-type, 品番 : AK80)

2024年12月17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。

本キットは蛍光標識したゼラチンを基質タンパクとしたプレキャストゲルとプレート、バッファー調製などを極力簡略化し、手軽にゼラチンザイモ電気泳動を行えるように構成しております。また、蛍光標識したゲルは、酵素反応を継時的に確認することができます。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
蛍光標識ゼラチンザイモ電気泳動プレキャストゲル Precast Gel	12 検体用	5 枚	4~10°C (禁凍結)
MMP Markers (ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9)	0.2mL	1 本	4~10°C
サンプル調製バッファー Sample Preparation Buffer	5mL	1 本	4~10°C
泳動用バッファー (10 倍濃縮) Electrophoresis Buffer	100mL	2 本	4~10°C
洗浄液 (10 倍濃縮) Washing Buffer	100mL	1 本	4~10°C
酵素反应用バッファー (10 倍濃縮) Reaction Buffer	25mL	1 本	4~10°C

※ガラスプレートサイズは120(W)×100(H)、ゲルの厚みは1mm。

※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。

※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る。
- ・酵素反応を継時的に確認することができる。

《Ⅱ-1. 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。

《Ⅱ-2. サンプル調整および保存温度》

サンプル調整バッファーとサンプルを 1 : 1 で混合し、室温で 15 分間静置して下さい。

注意) 加熱処理は行わないでください。

《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) ゲルプレートにあらかじめ調製したサンプル、および MMP マーカーを 10 μ L/well で添加する。
(MMP マーカーを 10 μ 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 マーカーは、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。
- (5) 15mA の定電流で泳動する（ゲルが 2 枚の場合は 30mA）。
- (6) 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。
- (7) 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）からスパチュラなどを用いて、ゲルを取り外す。
- (8) 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。
- (9) 別の容器に酵素反応用バッファー 50mL を入れ、この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。
- (10) ゲルを 20 時間~40 時間の間に適時取り出し、ゲル撮影装置で撮影する（蛍光波長は 535nm）。または FITC の波長（励起波長 495nm、蛍光波長 520nm）を参考にしてください。

《IV. 泳動パターン例》

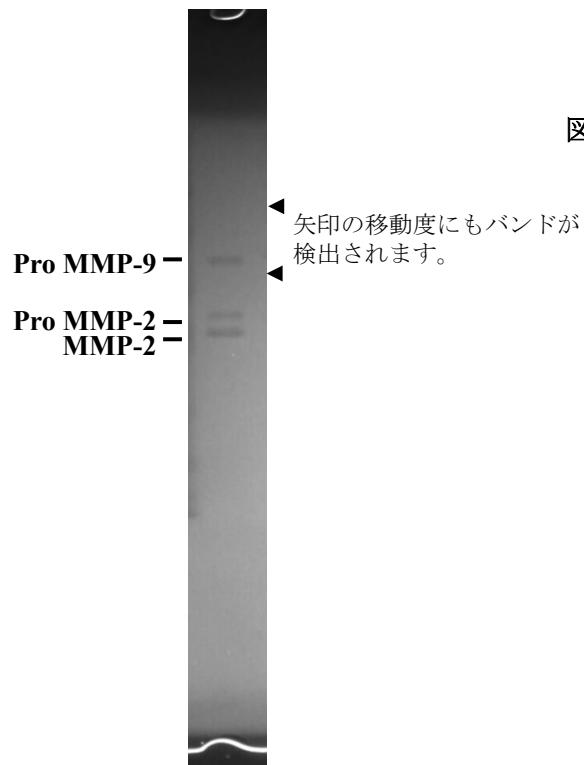


図 1. MMP マーカーの泳動パターン

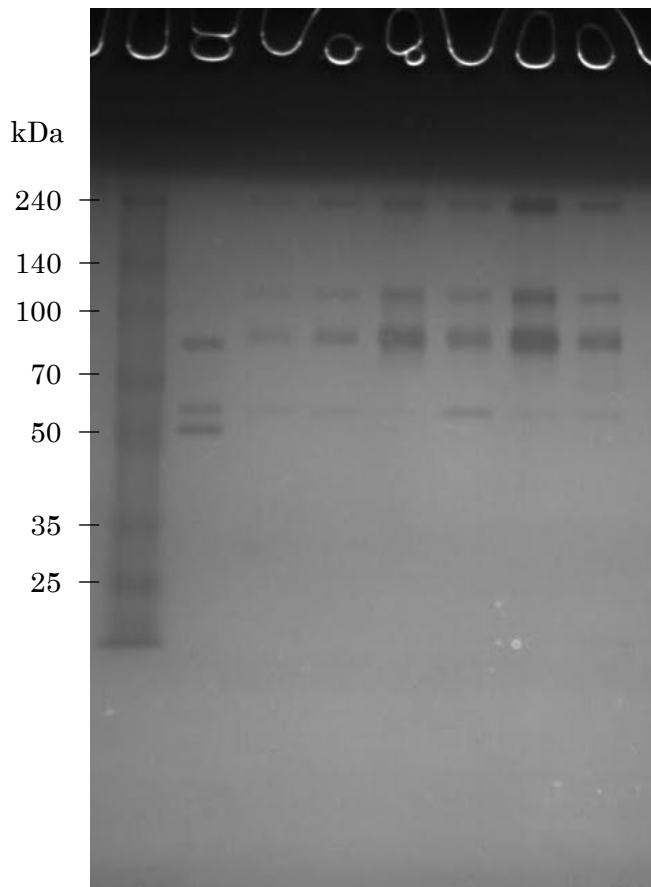


図 2. 蛍光ゼラチンゼイモ電気泳動の 40 時間後の泳動パターン

(左から分子量マーカー、MMP マーカー、ヒト涙液
サンプル 6 種類)