

アルギナーゼ活性測定キット

(Arginase Activity Assay Kit, Code No. AK89)

2020年11月9日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

アルギナーゼ (Arginase) は、L-Arginine を L-Ornithine と尿素に加水分解する酵素です。マクロファージの機能的分類の1つとして知られる M1 (炎症性) / M2 (非炎症性) の M2 にマクロファージが活性化された際、強く発現することが知られており、M2 マクロファージ活性化のマーカーとして頻用されています。本製品は、細胞内のアルギナーゼを抽出し、アルギナーゼが L-Arginine から生成する尿素を呈色反応で検出することで、アルギナーゼ活性を評価します。従来の測定法に比べ、試薬の安定性・感度を改善し、簡便にアルギナーゼ活性を測定することができます。

※本製品は、京都大学・田畑泰彦教授及び東京応化工業株式会社が保持する特許（出願中）に基づき、コスモ・バイオ株式会社が特許実施許諾を受けて、製品化しています。

《I-1. キット構成》

| 内 容 | 容量 | 本数 | 保存温度 | 取扱上の注意 |
|---------------------|-------|----|------|---|
| 酵素活性化溶液 | 2.5mL | 1 | 4°C | 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。 危険表記はラベルの表記をご確認ください。 取扱う際には眼鏡・マスク・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。 尿素検出溶液 B は紫外線で反応するため、自然光・蛍光灯に長時間当てないよう、ご注意ください。 |
| 基質溶液 | 5mL | 1 | | |
| 尿素標準液 (160µg/mL) | 1mL | 1 | | |
| 尿素検出溶液 A (遮光容器) | 20mL | 1 | | |
| 尿素検出溶液 B (遮光容器) | 4mL | 1 | | |
| 検出溶液混合用容器 | — | 2 | 常温 | 混合尿素検出溶液は紫外線で反応するため、混合加熱の際は付属の遮光容器で処理してください |
| プレートシール | — | 2 | | 呈色反応の際は、高濃度の硫酸を含む検出溶液を加熱しますので、付属のプレートシールをご使用ください |

※本製品は、96well プレートで 96 検体分測定することができます。

《I-2. ご準備いただくもの》※製品には含まれません

- 手袋・マスク・保護メガネ
- アルミホイル
- マイクロプレートリーダー（測定波長：540nm）
- マイクロピペット・チップ・蓋つきマイクロチューブ
- 96well プレート（透明、平底）
- リザーバー
- 95°Cまで加温可能な恒温槽及び 95°Cまで加温可能なホットプレート（96well プレートの大きさのヒートブロックやサーマルサイクラーでも代用可）
- 37°C恒温器もしくは CO₂ インキュベーター
- 細胞抽出液：0.1% Triton® X-100 水溶液に cOmplete™ プロテアーゼ阻害剤カクテル（品番：11697498001、ロシュ・ダイアグノスティックス、1 錠/50mL）を加えたもの
- 呈色用 UV ランプ（クリーンベンチや UV ゲル撮影装置付属の UV ランプがあれば代用可、UV ランプがない場合は自然光もしくは蛍光灯でも呈色は進行するが、時間を要する）

《II. 測定前準備》

1. 尿素検出溶液（用事調製）

添付の検出溶液混合用容器に、尿素検出溶液 A と尿素検出溶液 B を A : B = 5 : 1 で混合する。

（96well プレートの 1well あたり 180µL の検出溶液が必要になりますので、使用する well 数に応じて量を調節してください）

注：混合した溶液は高濃度の硫酸、エタノールを含んでおり、溶液を加熱することから、揮発や漏れがないように蓋が硬くしまっているかを必ず確認してください。加熱中は攪拌しないでください。取り扱いの際は、手袋、マスク、保護メガネ等を使用してください。

95°Cの恒温槽で 30 分間、加熱後、十分に冷ましてから軽く攪拌し、尿素検出溶液として使用する。

（複数回に分けて測定したい際に、混合用容器が不足した場合は、尿素検出溶液 A もしくは B の遮光容器を用いて調製してください）

2. 尿素標準液

尿素標準液を超純水で 2 倍の段階希釈にて希釈系列を作製する。

濃度：0（超純水のみ）、2.5、5、10、20、40、80、160µg/mL

調製量：各 100µL

希釈した尿素標準液保管期限：4°C、1 カ月

《III. サンプルの準備》

細胞は、上清を除き、上記の細胞抽出液を 96well プレート（底面積：0.32cm²/well）の場合、40µL 添加して細胞を溶解して、サンプルとする。

※抽出液量は、プレートの底面積に応じて調整ください。

《IV. 測定方法》

1. 20 μ L のサンプル及び尿素標準液に 20 μ L の酵素活性化溶液と 40 μ L の基質溶液を加えて混和する。
※duplicate でのアッセイを推奨します
2. 添付のプレートシールもしくは蓋をして、37°Cの恒温器中で1時間静置し、酵素基質反応を行う。
3. 酵素基質反応後、用事調製した尿素検出溶液を 180 μ L/well で加える。
※尿素検出溶液は自然光や蛍光灯下で少しずつ呈色してしまうため、尿素検出溶液の添加はリザーバー等を用いて迅速に行う等、できるだけ光に当たらないように留意して作業してください。
4. 添付のプレートシールでしっかりと密閉し、アルミホイル等で 96well プレート を遮光する。
注：尿素検出溶液は高濃度の硫酸、エタノールを含んでおり、加熱することから、揮発や漏れがないように、プレートシールをしっかりと密着させてください。取り扱いの際は、手袋、マスク、保護メガネ等を使用してください。
5. ホットプレート等を用いて、遮光下で 95°C、2時間加熱する。
6. 加熱後、アルミホイルを外し、UV ランプ下で十分な呈色が認められるまで反応を促進させてください。UV ランプ下では 15 分～1 時間で十分な呈色が認められます。自然光や蛍光灯下では 1～2 時間程度必要になります。呈色の度合については図 1 の例を参照してください。
7. 吸光度を測定する（波長：540nm）

尿素濃度

160 μ g/mL

80 μ g/mL

40 μ g/mL

20 μ g/mL

10 μ g/mL

5 μ g/mL

2.5 μ g/mL

0 μ g/mL

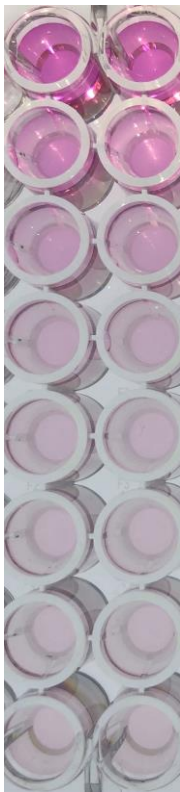


図 1：尿素標準液の呈色度合の例

《V. 標準曲線及びアルギナーゼ活性の計算方法》

各濃度の尿素標準液の吸光度を平均し、平均値から four-parameter logistic curve fit (4-PL)もしくは2次回帰曲線にあてはめて標準曲線を計算します(どちらの関数でもフィットします)。

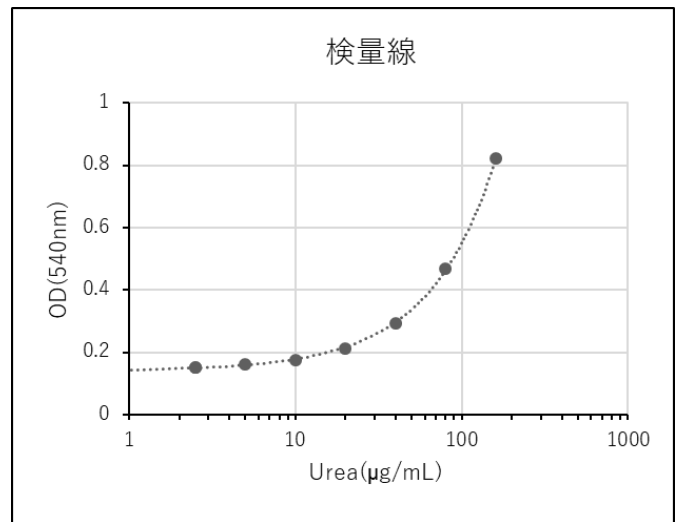
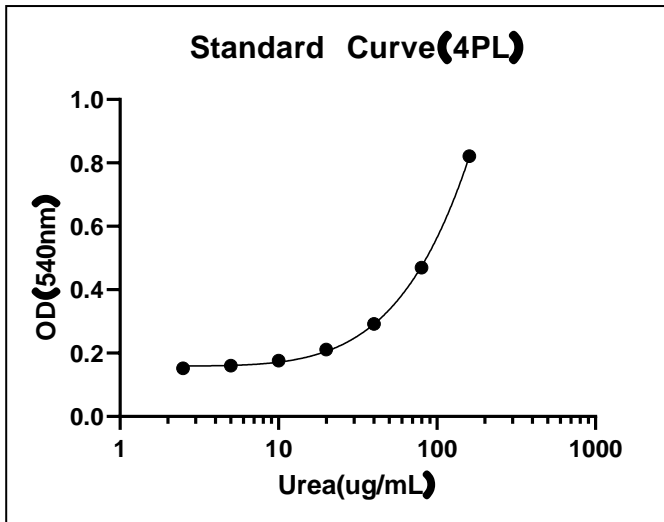


図2：4-PL の回帰曲線例 (使用ソフト：Prism8)

図3：2次回帰曲線例 (使用ソフト：Excel)

アルギナーゼ活性(unit/mL)は、37°Cの条件で1分間に1μmolのL-Arginineを1μmolのL-Ornithineと尿素に変換するものと定義しますので、以下の式で求めることができます。

$$\text{アルギナーゼ活性(unit/mL)} = \frac{\text{標準曲線から求めた各サンプルの尿素量} (\mu\text{g/mL}) \times 1000 (\mu \text{ モル換算}) \times 1000 (\text{mL 換算})}{60.06 (\text{尿素モル質量}) \times 60 (\text{反応時間:分}) \times 20 (\text{サンプル液量:}\mu\text{L})}$$

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2
 コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送
 または primarycell@cosmobio.co.jp あて
 PDF ファイル送信



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
 URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
 TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
 TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)
 TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
 E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp