

一般研究用キット

Aging/Glycation Assay Kit Series — 老化 / 糖化研究関連シリーズ —

# Collagen AGEs Assay Kit, CML-Specific, Glyoxal

コラーゲン AGEs 抗糖化アッセイキット, CML 特異的, グリオキサール

Cat. No. AAS-AGE-K02

2018年1月19日作成

www.cosmobio.co.jp

## 【1-1】背景と測定原理

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タンパク質の荷電を変化させて立体構造が変化し、酵素の活性や構造タンパク質の立体構造に大きく影響を及ぼすことが知られています。この反応はメイラード反応 (Glycation) もしくは糖化と呼ばれ、アマドリ転位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後期生成物 (Advanced Glycation End-products: AGEs) に至る後期反応に分けられます。皮膚、血管壁、骨などあらゆる臓器を形成す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ます。

カルボキシメチルリジン: N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine: CML は非蛍光性・非架橋性 AGEs の一種で、

糖化修飾されたタンパク質のリジン残基 (フルクトースリジン) が遷移金属から生成するヒドロキシラジカル<sup>(1)</sup>、一酸化窒素由来のペルオキシナイトライト<sup>(2)</sup>、炎症反応によって生成する次亜塩素酸<sup>(3)</sup>により酸化されて生成する糖酸化生成物で、生体内における主要な抗原性の AGEs 構造として報告されています<sup>(4)</sup>。また、CML はグルコースの酸化分解より生成するグリオキサールを介して生成する経路も知られています。CML は加齢に伴う皮膚コラーゲンへの蓄積など、長期的な酸化ストレス蓄積の指標となるほか、アテローム性動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー等との関連性も指摘されています。

本キットは、プレート上に固相化されたコラーゲンをグリオキサールで糖化をさせたときに生成される CML を迅速に ELISA 法によって検出するキットです。

コラーゲンを固相化したプレート上にグリオキサールを添加することによって糖化が起こり、24 時間、37°C でインキュベーションすることによって AGEs が生成されます。抗 CML 抗体を用いることで、グリオキサールを介して生成された CML を検出できます。アミノグアニジン (抗糖化標準物質) やサンプルの CML 生成阻害活性を評価することができます。

## 【1-2】キットの特長

- コラーゲンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングを簡便に行うことが可能
- 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有用

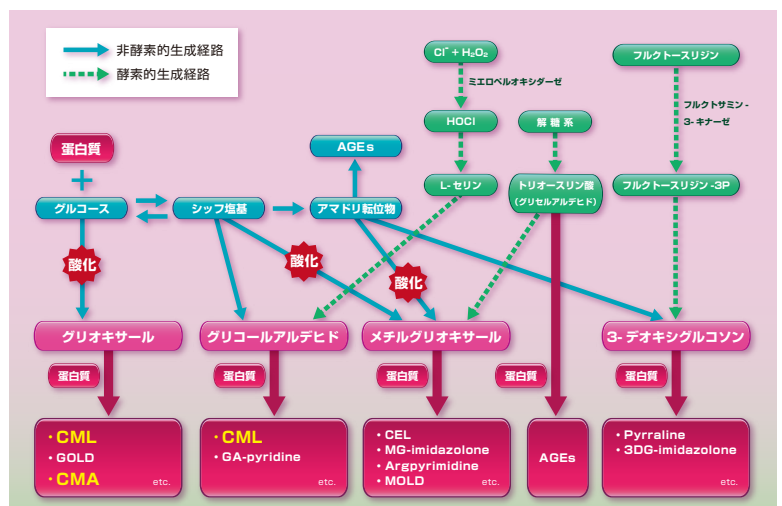


図1 生体内 AGEs の生成経路

## 【I-3】キット構成

本キットは、96 ウェルプレート 1 枚分のアッセイが可能です。

保存温度：4℃

No.	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	コラーゲン固相化 96 ウェルプレート (アルミパウチ入り)	8-well × 12 strips	1 枚	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。
2	プレートシール	-	2 枚	
3	アミノグアニジン溶液 (10 mM) ※抗糖化標準物質	250 μL	1 本	
4	検体希釈液	30 mL	1 本	
5	グリオキサール溶液 (20 mM)	5 mL	1 本	
6	洗浄バッファー (× 10)	50 mL	1 本	
7	ブロッキングバッファー	50 mL	1 本	
8	抗 CML 抗体 (× 100)	100 μL	1 本	
9	HRP 標識二次抗体 (× 100)	100 μL	1 本	
10	発色液	10 mL	1 本	
11	停止液	10 mL	1 本	(成分として硫酸を 2.9%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および 第 57 条の 2 に該当 <b>警告</b> ・吸入すると有害 (気体、蒸気、ミスト) ・皮膚刺激 ・強い眼刺激 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ

96 ウェルコラーゲン固相化プレートを長期間保存する場合は、冷凍 (-20℃) にて保存ください。

### ご準備いただくもの (その他必要なもの)

- 精製水
- 10 μL ~ 1000 μL マクロピペット
- リサーバー
- 50 μL ~ 200 μL マルチチャネルマイクロピペット
- プレートリーダー (波長 450 nm)
- 37℃ 恒温器 (湿潤状態)

## 【II】サンプルの調製方法

### ● 洗浄バッファーの調製

洗浄バッファー (× 10) を精製水で 10 倍希釈してください。

### ● 抗糖化標準物質アミノグアニジンの調製

アミノグアニジン溶液 (10 mM) は検体希釈液にて調製してください。

### ● サンプルの調製

検体希釈液にて溶解し、0.2 μm フィルターにてろ過滅菌をしてください。

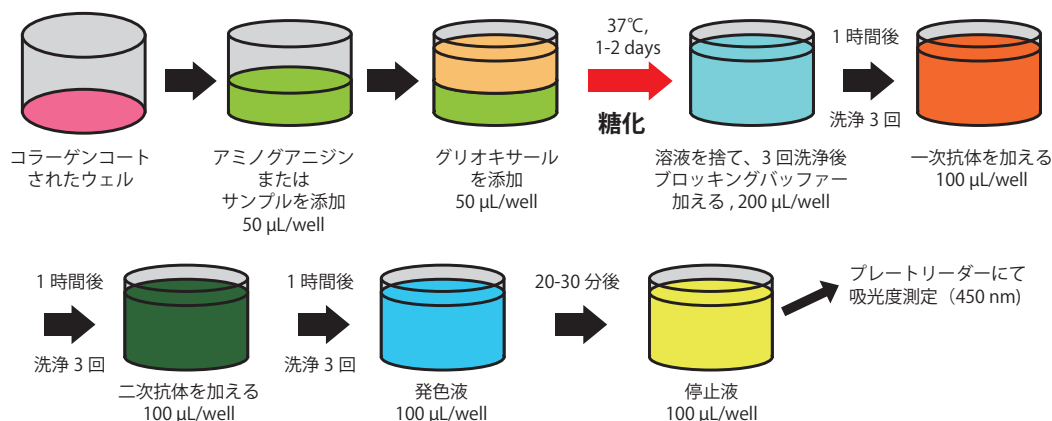
### ● 抗体の調製 (用事調製)

一次抗体は、抗 CML 抗体 (× 100) をブロッキングバッファーで 100 倍希釈してください。

二次抗体は、HRP 標識二次抗体 (× 100) をブロッキングバッファーにて 100 倍希釈してください。

※ 調製した抗体は冷蔵で 1 週間保存可能です。

### 【III】測定方法



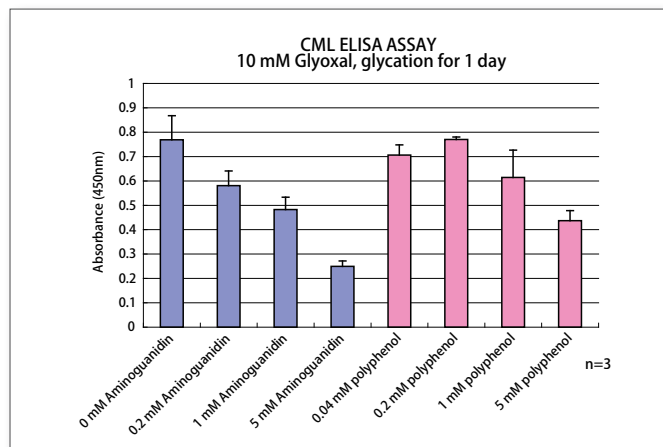
- 1 コラーゲン固相化プレートとシールは使用前に室温に戻し、アルミパウチから必要数を取り出してください。(シールは必要ウェル数によってカットしてお使いください。)
- 2 抗糖化標準物質としてのアミノグアニジン溶液 (0, 0.4, 2, 10 mM) もしくはサンプル溶液を1ウェルあたり 50 µL ずつ加えてください。
- 3 さらに全てのウェルにグリオキサール溶液を1ウェルあたり 50 µL 加えてください。
- 4 プレートにシールをし、湿潤状態下 (注意 1) の 37 °C インキュベーターで 24-48 時間静置し糖化反応を行います。
- 5 ウェル内の溶液を完全に除去してください。各ウェルに 200 µL の洗浄バッファーを加え、ウェルを洗浄してください。この操作を3回繰り返します。
- 6 ウェル内の洗浄バッファーを完全に除去し、ブロッキングバッファーを各ウェルに 200 µL 加えて、室温で1時間静置してください。
- 7 ウェル内のブロッキングバッファーを完全に除去してください。各ウェルに 200 µL の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。一次抗体を各ウェルに 100 µL 加えて、室温で1時間静置してください。
- 8 一次抗体を完全に除去してください。各ウェルに 200 µL の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。HRP 標識二次抗体を各ウェルに 100 µL 加えて、室温で1時間静置してください。
- 9 二次抗体を完全に除去してください。各ウェルに 200 µL の洗浄バッファーを加え、ウェル内を洗浄してください。この操作を3回繰り返します。発色液を各ウェルに 100 µL 加えて、室温で20分間静置してください。
- 10 発色の濃度差を確認後、各ウェルに 100 µL の停止液を加え、発色を停止してください。
- 11 すぐにプレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定してください (測定波長は 450 nm)。

**※注意 1: 湿潤状態について**

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。湿潤状態を保つようにしてください。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。

## 【IV】 実施例 —グリオキサールで糖化させた糖化コラーゲンから生成する CML を用いた抗糖化素材の探索—

本キットを使用して、植物由来ポリフェノールの抗糖化活性を評価した。



## 【V】 参考文献

- [1] Nagai R., Ikeda K., Higashi T., Sano H., Jinnouchi Y., Araki T., Horiuchi S: Hydroxyl radical mediates N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 167-172 (1997)
- [2] Nagai R., Unno Y., Hayashi MC., Masuda S., Hayase F., Kinae N., Horiuchi S: Peroxynitrite Induces Formation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine by the Cleavage of Amadori Product and Generation of Glucosone and Glyoxal from Glucose: Novel Pathways for Protein Modification by Peroxynitrite, *Diabetes*. **51**, 2833-2839 (2002)
- [3] Mera K., Nagai R., Haraguchi N., Fujiwara Y., Araki T., Sakata N., Otagiri M. Hypochlorous acid generates N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine from Amadori products. *Free Radic. Res.* **41**, 713-718 (2007)
- [4] Mera K., Nagai M., Brock JW., Fujiwara Y., Imai H., Murata T., Maruyama T., Baynes JW., Otagiri M., Nagai R. Glutaraldehyde is an Effective Cross-linker for Production of Antibodies Against Advanced Glycation End Products. *J. Immunol. Methods* **334** (1-2), 82-90 (2008)

## 本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商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。

### 送付方法

#### 郵 送

〒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 札幌事業所宛

#### E-mail

primarycell@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

