

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,
Code No. AK72】

2016 年 10 月 19 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(Code No.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。

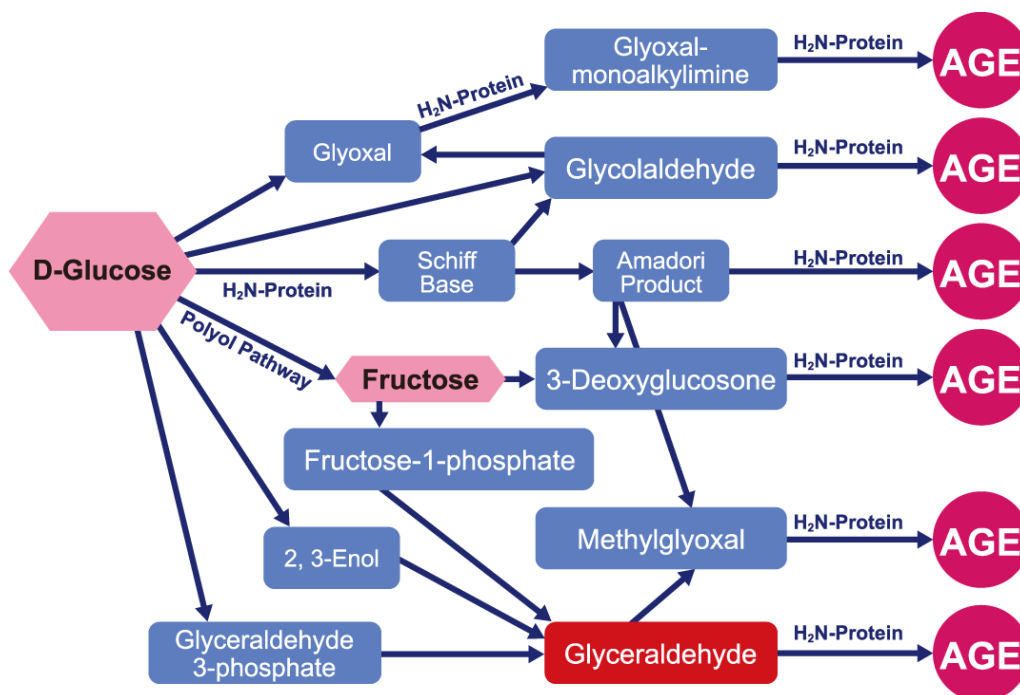


図. 生体内 AGEs の生成経路

《I-1. キット構成》

キット内容	容量	本数	保存温度	危険表記および取扱上の注意
軟骨 II 型コラーゲン酸性溶液	5 mL	1 本	4℃	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。
中和液	5 mL	1 本		
グリセルアルデヒド溶液 (500mM)	2mL	1 本		
緩衝液	30 mL	1 本		
アミノグアニジン溶液 (20mM) ※抗糖化標準物質	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る。

《II. 試験方法—96well プレートをを用いた測定—》

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 μ 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℃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 μ 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 μ 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) 96well プレートの蓋をし、コラーゲン溶液が well 底面全面に均一に広がっていることを確認後、湿潤状態（注意1）の 37℃インキュベーターで一晩静置してください。
中和されたコラーゲン溶液は低温では無色液状ですが、加温することで白濁したゲル状（コラーゲンゲル）に変化します。

- (5) 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 μ m）でろ過滅菌しコラーゲンゲル上に 40 μ 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ゲル上に 40 μ L 重層してください。
- (6) 全ての well に **500mM グリセルアルデヒド溶液**を 10 μ L 添加し、プレートを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重層することで糖化が開始します。
- (7) グリセルアルデヒド溶液添加後 5 分以内に下方測定 of 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、ゲルの乾燥を防ぐため湿潤状態下^(注意 2)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 of 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。

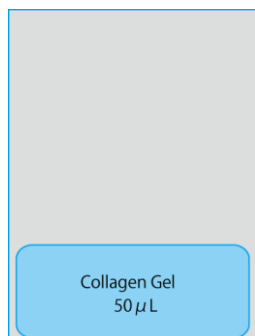
各 Well の糖化度を、 $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 A}$ とします。

※注意 1：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。

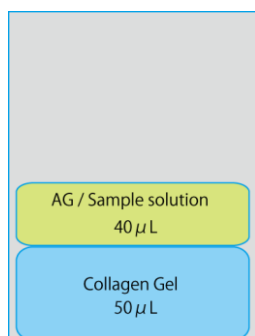
※注意 2：湿潤状態について。

ゲルが乾燥してしまうと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、ろ紙などを蒸留水で湿らせたものをタッパーの底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。

《Ⅱ．試験方法の（3）以降》の手順



コラーゲン溶液を 1well あたり 50 μ L ずつ 96well プレートに分注する。
湿潤状態下^(注意 2)の 37°C インキュベーターで一晩静置する。



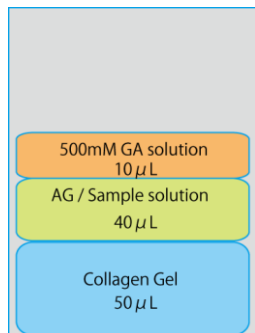
コラーゲンゲル上に①緩衝液 ②緩衝液で調製した試料 ③アミノグアニジン溶液 (AG) を 40 μ L 重層する。

<陽性コントロール（アミノグアニジン溶液）の調製>

アミノグアニジン溶液（20mM）を緩衝液で希釈系列を作製し 40 μ L/well 分注する。

<試料の調製例>

試験試料は緩衝液で溶解または抽出し 0.22 μ フィルター滅菌し、緩衝液で希釈系列を作成し、各群 40 μ L/well 分注する。

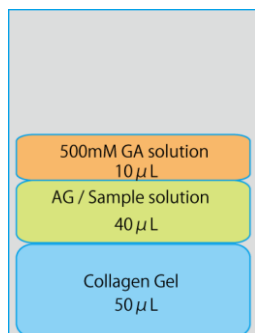


各 well に緩衝液列、アミノグアニジン溶液列および試料列に **500mM グリセルアルデヒド溶液(GA)**を 10 μ L 添加する (ウェル全量における終濃度: 50mM GA)。

その後、蛍光プレートリーダーで蛍光強度の測定する (反応 0 時間の蛍光強度を A とする)。



湿潤状態^(注意1)の 37°C インキュベーターで 24 時間静置する。



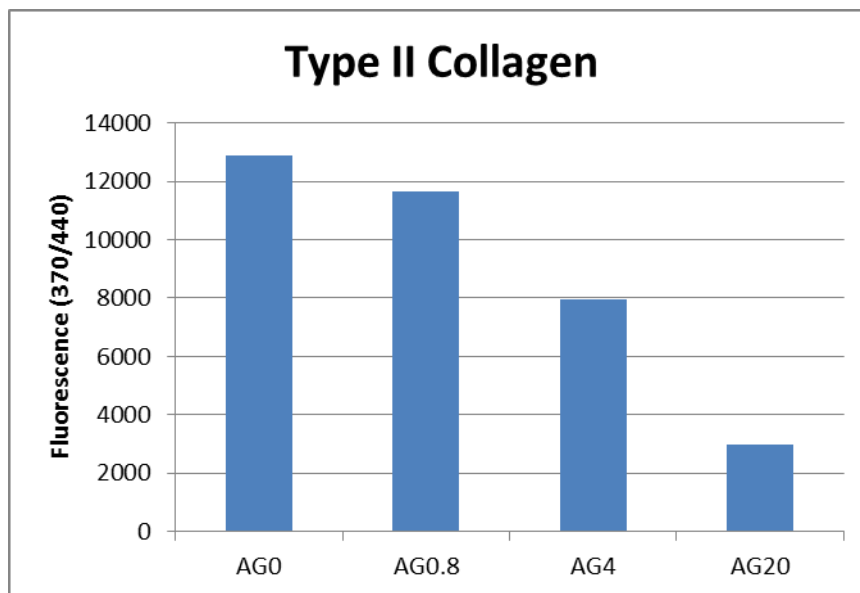
24 時間後に蛍光プレートリーダーにて蛍光強度の測定を行なう (24 時間の蛍光強度を B とする)。

各 Well の糖化度 = (B 値) - (A 値)

※ 経時的に測定することも可能です。

《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 μ L 添加した。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た。



《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

《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



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒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
URL : <http://www.primarycell.com/>