

<研究用>

K12 コラゲノ Type 2 (顕在型測定用)

説明書

企画；コラーゲン技術研修会

〒204-0013 清瀬市上清戸1-10-1

四訂 103128

はじめに

・本品は、蛍光標識タイプIIコラーゲンを基質として、コラゲナーゼ活性を測定する研究用試薬である。

### 1 構成試薬

容量及び成分

A チューブ液 (分注済)

50  $\mu$ l / チューブ 48本

0.1M トリス-塩酸緩衝液 pH7.5

B 蛍光標識 Type 2

2.5ml / 褐色瓶 又は遮光

0.1% 蛍光標識 Type 2 コラーゲン

C 検体希釈液

2.5ml pH7.5

D 反応停止液

10ml

4mM オルトフェナントロリン

E 抽出液

20ml pH9.5

0.125M トリス塩酸緩衝液 / エタノール

F コントロール

100  $\mu$ l

ヒト線維芽細胞由来コラゲナーゼ (-20C保存)

活性化済

II型コラーゲンを基質にした時、50ul 酵素液は

24時間の反応で、基質5ugを切断する

### 2 キットの保存条件

ラベル表示に従い1年有効

凍結融解の繰り返しは不可

必要量をあらかじめ小分けし保存

### 3 検体及び試薬の調整

- ・潜在型も含めて測定する時、血清含有の時は、「検体の前処理」を行ってから測定する
- ・検体が高活性の時は、測定範囲に入るよう、検体希釈液で、任意に希釈する。



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

#### 4 操作手順

全試薬を、4℃で一夜放置して溶解、又は、使用時、流水にて溶解し、軽く混和。  
特に指定しない限り、操作は、4℃（氷冷容器等で試薬・検体を冷却して）で行う。

チューブ液                      必要数（トータル、ブランク、コントロール及び検体）用意  
↓  
蛍光標識 Type 2              50 µl を加え、軽く攪拌  
↓  
コントロール及び検体        100 µl を加え、軽く攪拌  
↓  
                                     \*トータル用及びブランク用に検体希釈液を各100 µl

ウォーターバス中で、インキュベーション（トータルは除く 35℃×2時間）  
↓                                      乾浴可（キャップを閉め、壁より10cm離す、以下同様）  
                                     \*活性が弱い時は、更に延長しインキュベーションする  
                                     コントロールが精製品の試験例では16～20時間が適した  
                                     \*トータルのみ、1分間、沸騰水浴

反応停止液                      200 µl を加え、軽く攪拌  
↓  
ウォーターバス中で、インキュベーション（35℃×1時間）        乾浴可  
↓  
氷上で3分間冷却  
↓  
氷冷した抽出液                      400 µl を加え、激しく振蕩 更に氷上で20分放置  
↓  
スイング型冷却遠心機（5000rpm×10分）        25℃以下（できたら4-8℃で）  
↓  
ただちに、上清600 µl（使用するセルによる）を採取し、  
Em.520nm/Ex495nmで、蛍光強度を測定する

#### 5 活性値の算出

コラゲナーゼ活性 (U/ml)

$$= \frac{\text{蛍光強度 (検体-ブランク)}}{\text{蛍光強度 (トータル-ブランク)}} \times \frac{\text{コラーゲン量}}{(50 \mu\text{g})} \times \frac{1}{\text{反応時間}} \times \frac{1}{\text{検体量}}$$

(120分)                      (0.1ml)

\* 35℃にて、1分間に、1 µgのコラーゲンを分解する酵素活性を、1単位とする。

#### 6 文献

服部俊治, 他: II型コラーゲン分解活性測定法. *Connective Tissue* 1996; 28: 27-33

実施例；出荷ロットにより、活性は異なる

- 基質I型コラーゲン 2時間測定
- - ● - - 基質II型コラーゲン 2時間測定
- ▲— 基質II型コラーゲン 20時間測定

