

食品分析用

 α -グルコシダーゼ活性阻害測定キット

【はじめに】

本品は酵素（ α -グルコシダーゼ）、緩衝剤（マレイン酸 / マレイン酸二ナトリウム）、基質（D(+)-マルトース、スクロース）、ポジティブコントロール（アカルボース）がセットになった α -グルコシダーゼ活性阻害（IC₅₀）の測定に用いられるキットです。食品等に含まれる α -グルコシダーゼ阻害物質の活性阻害の測定などにご使用いただけます。

【キット内容】

試薬名	容量	数量	主成分
酵素剤 (294-78611)	1mL	2	α -グルコシダーゼ
緩衝剤 (291-78621)	50mL 用	2	マレイン酸 / マレイン酸二ナトリウム
基質 1 (298-78631)	20mL 用	2	D(+)-マルトース
基質 2 (295-78641)	20mL 用	2	スクロース
ポジティブコントロール (292-78651)	100mg	1	アカルボース

【キット以外に必要な器具・器材】

- ・ラボアッセイTM グルコース（商品コード：291-94001）
- ・96 ウェルの透明マイクロプレート
- ・プレートリーダー（505nm 吸光フィルター）
- ・マイクロピペット
- ・恒温槽（37℃）

【測定原理】

α -グルコシダーゼはマルトースやスクロースを分解しグルコースを生成しますが、 α -グルコシダーゼ阻害物質共存下では、生成グルコース量は減少します。別売りのラボアッセイTM グルコースを用いて生成グルコース量を定量することで、試料中に含まれる α -グルコシダーゼ阻害物質による活性阻害（IC₅₀）を測定します。

活性阻害物質（アカルボース等）
↓
マルトース + α -グルコシダーゼ → 2 グルコース + マルトース
(未分解)

活性阻害物質（アカルボース等）
↓
スクロース + α -グルコシダーゼ → グルコース + フルクトース +
スクロース（未分解）
生じたグルコースをラボアッセイTM グルコースを用いて測定します。

【測定手順】

Ⅰ．試薬の調製

- I-1 緩衝液（100mmol/L マレイン酸緩衝液 pH 6.0）
緩衝剤に精製水を 50mL 入れ、完全に溶解させます。（試薬 A）
- I-2 基質 1 液（18.5mmol/L D(+)-マルトース溶液）
基質 1 に I-1 で作製した試薬 A を 20mL 入れ、完全に溶解させます。（試薬 B）
- I-3 基質 2 液（74mmol/L スクロース溶液）
基質 2 に I-1 で作製した試薬 A を 20mL 入れ、完全に溶解させます。（試薬 C）
- I-4 ポジティブコントロール溶液（アカルボース溶液）
適量秤量したポジティブコントロールに精製水を入れ 1mg/mL の濃度になるように溶解させます。（試薬 D）
- I-5 酵素希釈液（ α -グルコシダーゼ酵素液）
下記予備試験の結果から設定される希釈倍率に、酵素剤を試薬 A で希釈し、各基質用の酵素希釈液を作製します。（マルトース用希釈液：試薬 E / スクロース用希釈液：試薬 F）
酵素剤の凍結・融解の繰り返しは避け、試験中は氷冷保管して下さい。また、酵素剤は懸濁液のため融解後はよく攪拌して使用して下さい。

〈本試験の前に必ず予備試験を行って下さい〉

- （希釈倍率決定のための予備試験）
本品に別添されている現品説明書に記載されている値を参考に希釈倍率を設定します。
- ①グルコース標準液（ラボアッセイTM グルコース付属）の作製
200mg/dL のグルコース標準液（標準液 I）を精製水で 15, 10, 5, 2.5mg/dL の濃度になるよう希釈します。
- ②酵素希釈液の作製
解凍した酵素剤を試薬 A で希釈します。（酵素希釈液）
〔例〕マルトース用希釈系列：5 倍, 10 倍, 20 倍
〔スクロース用希釈系列：1 倍（原液）, 2.5 倍, 5 倍〕
- ③試薬 B 50 μ L に精製水 25 μ L を加え 37℃ で 3 分間予備加温します。②で設定したマルトース用希釈液 25 μ L を添加し攪拌後、精確に 37℃ で 30 分間酵素反応を行います。30 分後、精製水 400 μ L を加え、沸騰水浴中で 3 分間加熱した後、氷冷します。（【本試験】Ⅱ. 酵素反応④～⑥を参照）
- ④生成したグルコース量を測定します。（【本試験】Ⅲ. グルコース定量を参照）
- ⑤希釈倍率と生成グルコース量をプロットし、生成グルコース量が 10mg/dL になるように希釈倍率を求めます。（試薬 E 作製時の設定希釈倍率）
- ⑥試薬 C を用いて③以降と同様の作業を行い、生成グルコース量が 5mg/dL になるように希釈倍率を求めます。（試薬 F 作製時の設定希釈倍率）

【本試験】

Ⅱ．酵素反応（基質 1 液（D(+)-マルトース溶液）を用いる場合*）

- ①試料を精製水に溶解し、これを希釈して希釈系列を作製し、試料希釈溶液とします。
- ②試薬 D を精製水で希釈し、希釈系列を作製します。（8, 4, 2, 1, 0.5 μ g/mL）（ポジティブコントロール希釈溶液）

- ③予備試験で得られた希釈倍率に基づき、試薬 E を作製します。
- ④試薬 B 50 μ L に試料希釈溶液又はポジティブコントロール希釈溶液 25 μ L をそれぞれ加え（対照溶液には精製水 25 μ L を添加）、37℃で 3 分間予備加温します。
- ⑤④に試薬 E 25 μ L を添加し攪拌後^{注1}、精確に 37℃で 30 分間酵素反応を行います。30 分後、精製水 400 μ L を加え、沸騰水浴中で 3 分間加熱した後、水冷します。（酵素反応液）
（注 1：ボルテックスミキサー等で 2～3 秒程度攪拌して下さい。攪拌が不十分である場合測定値がばらつく原因になることがあります。）
- ⑥サンブルブランクとして、試薬 B 50 μ L、試料溶液又は精製水 25 μ L を混合し、精製水 400 μ L を加え、試薬 E 25 μ L を添加してただちに沸騰水浴中で 3 分間加熱した後、水冷します。（ブランク液）

試験は n=2 で行い、各濃度につきブランク液を 1 本作製します。

※基質 2 液（スクロース溶液）を基質として用いる場合は、基質液に試薬 C、酵素希釈液に試薬 F を用いて上記と同様の作業を行って下さい。

〈酵素反応液調製〉

	マルトース	スクロース
基質液	試薬 B 50 μ L	試薬 C 50 μ L
試料希釈溶液又は ポジティブコントロール 希釈溶液 (対照溶液には精製水)	25 μ L	
37℃で 3 分間加温		
酵素希釈液	試薬 E 25 μ L	試薬 F 25 μ L
攪拌後精確に 37℃で 30 分間反応		
精製水	400 μ L	
ただちに沸騰水浴中で 3 分間加熱後、水冷		

〈ブランク液調製〉

	マルトース	スクロース
基質液	試薬 B 50 μ L	試薬 C 50 μ L
試料希釈溶液又は精製水	25 μ L	
精製水	400 μ L	
酵素希釈液	試薬 E 25 μ L	試薬 F 25 μ L
ただちに沸騰水浴中で 3 分間加熱後、水冷		

Ⅲ. グルコース定量

- ① 96 ウエルマイクロプレートに酵素反応液（又はブランク液）及び希釈したグルコース標準液 100 μ L を分注し、ラボアッセイTM グルコースの発色剤 150 μ L を添加してよく混合します。
- ② 37℃で 10 分間加温後、波長 505nm における吸光度を測定します。

Ⅳ. IC₅₀ 算出

- ①対照溶液のグルコース生成量を α -グルコシダーゼ活性 100% とし、各濃度の試料希釈溶液のグルコース生成量から比活性を求めます。

- ②片対数グラフの横軸に試料又はポジティブコントロール希釈溶液濃度（酵素反応液中での終濃度）、縦軸に α -グルコシダーゼ比活性をプロットし、近似曲線から比活性 50% の時の試料濃度（IC₅₀）を算出します。

【使用上又は取扱い上の注意】

〈使用上の注意〉

- (1) 試薬は指定された条件で保管し、使用期限の過ぎたものは使用しないで下さい。
- (2) 試薬の開封後はなるべく早く使用して下さい。
- (3) 本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
- (4) グルコース定量には別売りのラボアッセイTM グルコースを使用して下さい。

〈廃棄上の注意〉

- (1) 廃棄に際しては排水基準に基づいて適切に処理して下さい。

【保管上の注意】

製品貼付のラベルにてご確認ください。

【包装単位】

(コード番号) (品 名) (容 量)
297-78601 α -グルコシダーゼ活性阻害測定キット 96 回用

【別 売】

(コード番号) (品 名) (容 量)
291-94001 ラボアッセイTM グルコース 500 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741