

ACE 阻害活性を測定したい

使用製品

ACE Kit - WST

[A502]

解析装置



I はじめに

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme (ACE)) は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン-アンジオテンシン系においてアンジオテンシンIから昇圧作用を有するアンジオテンシンIIを生成する。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関与している酵素である。近年、高血圧予防を目的とした機能性食品 (特定保健用食品) が多く販売されるなど、ACE 阻害作用を有する食品成分が注目を集めている。

従来、ACE 阻害活性は合成基質 Hippuryl-His-Leu から切り出されてくる馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、濃縮乾固し、再溶解して 228 nm の吸光度を測定することで算出される。しかし、酢酸エチルのような有害な有機溶媒を用いることと、操作が煩雑であり測定誤差が生じやすい方法であるため改良が望まれていた。

ACE Kit - WST (Code: A502) は 3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG) から切り出されてくる 3-Hydroxybutyric acid(3HB) を酵素法により検出する。96 穴マイクロプレート対応であることから、一度に多検体の測定が可能である。また、有害な有機溶媒は使用しないため、安全で迅速・簡便であり再現性の高い測定方法である。

II キット内容

Substrate buffer	× 2
Enzyme A	× 2
Enzyme B	× 2
Enzyme C	× 2
Coenzyme	× 2
Indicator solution	× 2

III 試薬調製並びに実験に必要なもの

1. キット以外に必要なもの

- ・ プレートリーダー (450 nm フィルター)
- ・ 96 穴マイクロプレート
- ・ 2 ~ 20 μ l、20 ~ 200 μ l、100 ~ 1,000 μ l のマイクロピペット (各 1 本)
- ・ マルチチャンネルピペット
- ・ インキュベーター (37°C)
- ・ ディスポーザブルシリンジ (1 ml)

2. 試薬調製

・ Enzyme working solution

Enzyme B 1 本にシリンジで純水 2 ml を加えて Enzyme B 溶液を調製する。次に Enzyme A 1 本に、Enzyme B 溶液 1.5 ml を加えて Enzyme working solution を調製する。

Enzyme A, B は凍結乾燥品で瓶内部が減圧になっているため、減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがある。必ず純水または Enzyme B 溶液をシリンジで注入し、溶解後開封すること。-20°C の冷凍保存で 2 週間、冷蔵保存で 3 日間使用できる。

・ Indicator working solution

Enzyme C および Coenzyme 各 1 本にシリンジで純水 3 ml を加えて Enzyme C 溶液および Coenzyme 溶液を調製する。Indicator solution に、Enzyme C 溶液と Coenzyme 溶液を 2.8 ml ずつ加えて Indicator working solution を調製する。

Enzyme C および Coenzyme は凍結乾燥品で瓶内部が減圧になっているため、減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがある。必ず純水と Enzyme B 溶液をシリンジで注入し、溶解後開封すること。-20°C の冷凍保存で 2 週間、冷蔵保存で 3 日間使用できる。

・ サンプル溶液

サンプル溶液を純水で希釈する。

例) 希釈率 : 1 (希釈なし), 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶

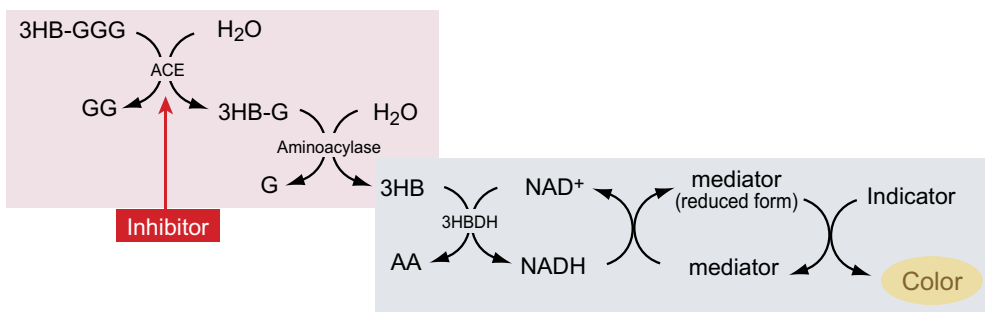
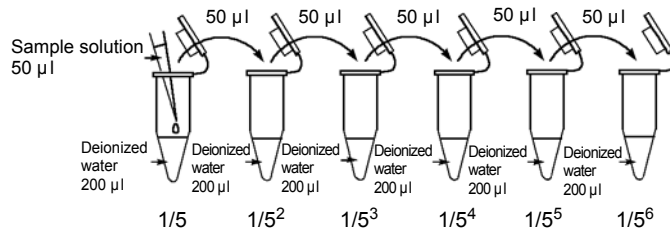


図 1 ACE Kit - WST の測定原理

細胞増殖 / 毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

IV 測定操作

- 1) 各ウェルにサンプル溶液 (sample) もしくは純水 (blank 1, blank 2) を 20 μ l ずつ入れる。
- 2) 各ウェルに Substrate buffer を 20 μ l ずつ加える。
- 3) blank 2 のウェルに純水を 20 μ l ずつ加える。
- 4) サンプル溶液を入れたウェルと blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20 μ l ずつ加える。
※ Enzyme working solution を加えるとすぐに 3-Hydroxybutyric acid (3HB) の生成が始まりますので、ウェル間のタイムラグをできるだけ少なくするためにマルチチャンネルのピペットをお使いください。
- 5) 37°Cで 60 分間インキュベートする。
- 6) 各ウェルに Indicator working solution を 200 μ l ずつ加える。
- 7) 室温で 10 分間インキュベートする。
- 8) プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。
- 9) ACE 阻害活性値 (阻害率 %) を下記の計算式により求める。

$$\text{ACE 阻害活性値 (阻害率 \%)} = \frac{[A_{\text{blank 1}} - A_{\text{sample}}]}{[A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 2}}]} \times 100$$

表 1 サンプルおよび blank1, 2 の各ウェルに加える溶液の量

	Sample	blank 1	blank 2
サンプル溶液	20 μ l	—	—
純水	—	20 μ l	40 μ l
Substrate buffer	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Enzyme working solution	20 μ l	20 μ l	—
Indicator working solution	200 μ l	200 μ l	200 μ l

blank 1 : 阻害なしの全発色
blank 2 : 試薬 blank

※ 着色の強いサンプルの場合、サンプルの希釈ごとに sample blank (sample 20 μ l + 純水 240 μ l) を測定し、 A_{sample} から引いてください。特に黄色～赤色の着色は 450 nm の吸光度測定に影響します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample1 1											
B	Sample1 1/5											
C	Sample1 1/5 ²											
D	Sample1 1/5 ³			Sample 2								
E	Sample1 1/5 ⁴											
F	Sample1 1/5 ⁵											
G	Sample1 1/5 ⁶											
H	blank 1			blank 2								

図 2 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

・ IC₅₀ の算出方法

- 1) サンプルの濃度 (log) に対して、阻害活性値をプロットし阻害曲線を描かせる。
- 2) 阻害率 50% に相当するサンプル濃度を読む。
- 3) 反応時のサンプル終濃度は、調製時のサンプル濃度の 1/3 であるので、阻害曲線から求めた濃度の 1/3 が IC₅₀ となる。

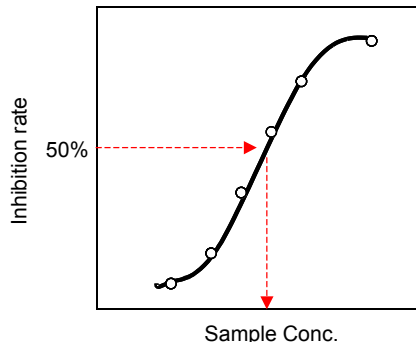


図 3 阻害曲線

V 保存条件及び使用上の注意

- (1) 本キットは購入後 0 ~ 5°C で保存して下さい。未開封で保存した場合、6 ヶ月間は安定です。Enzyme working solution と Indicator working solution は、-20°C の冷凍保存で 2 週間、冷蔵保存で 3 日間使用できます。
- (2) 本キットにはガラス製容器を使用しているため、保護手袋を着用し、特に凍結乾燥品のアルミシールを開ける場合、取扱いにご注意ください。
- (3) 本キットには各種コンポーネントが 2 本ずつ入っており、各コンポーネント 1 本で 50 tests 測定することができます。
- (4) 正確な測定値を得るために、1 つのサンプルにつき複数 (n=3 以上) のウェルをお使いください。
- (5) サンプル物質が水溶性でない場合、DMSO またはエタノールに溶解してストック溶液を調製してください。その場合、DMSO またはエタノールは 1% 以下になるようにしてください。
- (6) クエン酸や酢酸を含むサンプルなど酸性が強い場合、Substrate buffer 中の基質が沈殿し、発色しなくなることがあります。その場合は、サンプルを中和して pH5 以上で測定を行なってください。
- (7) アスコルビン酸を含むサンプルは、Indicator solution を還元し、正誤差を与える場合があるため、アスコルビン酸濃度は 0.01% 以下で測定してください。
- (8) 濁りや着色の強いサンプルの場合、サンプルの希釈ごとにサンプル 20 μ l を純水 240 μ l で希釈した sample blank の吸光度を測定し、 A_{sample} から引く。特に黄色～赤色の着色は 450 nm の吸光度測定に影響を与えません。
- (9) 不溶性の固体物質を含むサンプルは遠沈するか、濾過して測定を行う。固体物質は吸光度測定に影響を与えません。

参考文献

1) L. H. Lam, T. Shimamura, K. Sakaguchi, K. Noguchi, M. Ishiyama, Y. Fujimura and H. Ukeda, *Anal. Biochem.*, **2007**, 364, 104.
2) L. H. Lam, T. Shimamura, S. Manabe, M. Ishiyama and H. Ukeda, *Anal. Sci.*, **2008**, 24, 1057.