

はじめに

アンジオテンシン変換酵素 (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 を生成します。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す。近年、高血圧予防を目的とした数多くの機能食品（特定保健用食品）が販売されるなど、ACE 阻害作用を有する食品成分が注目を集めています。

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ます。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ました。

ACE Kit - WST 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します。96 穴マイクロプレート対応ですので、一度に多検体の測定が可能です。また、有害な有機溶媒は使用しませんので、安全で迅速・簡便であり再現性の高い測定方法です。

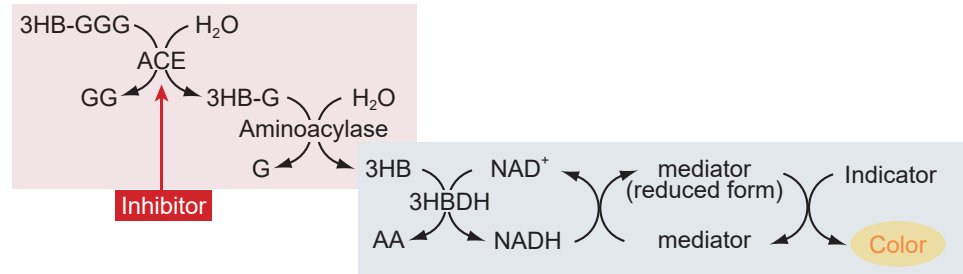


図 1 ACE Kit - WST の測定原理

キット内容

	50 tests	100 tests
Substrate buffer	1 ml × 1	1 ml × 2
Enzyme A	× 1	× 2
Enzyme B	× 1	× 2
Enzyme C	× 1	× 2
Coenzyme	× 1	× 2
Indicator solution	5 ml × 1	5 ml × 2

保存条件

0 ~ 5 °C で保存してください。本キットは未開封で 6 ヶ月間は安定です。

必要なもの
(キット以外)

- プレートリーダー (450 nm フィルター)
- 2-20 µl、20-200 µl、100-1000 µl のマイクロピペット
- マルチチャンネルピペット
- 96 穴マイクロプレート
- インキュベーター (37 °C)
- ディスポーザブルシリンジ (1 ml)

使用上の注意

- 本キットにはガラス製容器を使用しております。保護手袋をご着用頂くなど取扱いにはご注意ください。
- 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。
- 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、その後バッファなどで希釈してください。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。
- 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。中和して pH 5 以上で測定してください。
- 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ります。アスコルビン酸は 0.01% 以下で測定してください。
- 不溶性の固体物質を含むサンプルは遠沈または濾過して測定してください。固体物質は吸光度測定に影響します。

溶液調製

Enzyme working solution

Enzyme B 1 本に純水 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。

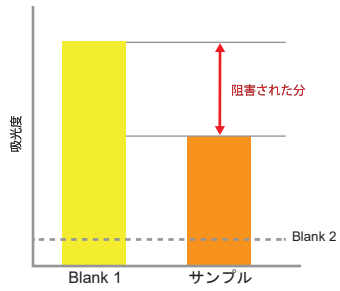
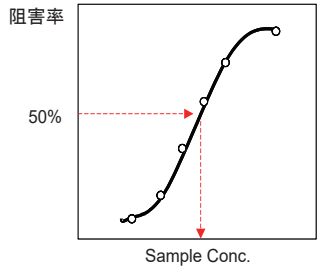
- * Enzyme A, B は凍結乾燥品のため瓶内部が減圧になっています。減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがありますので、必ず純水または Enzyme B 溶液をシリンジで注入し、溶解後開封してください。
- * 必ず Enzyme B を先に純水 2 ml で溶解し、その 1.5 ml を用いて Enzyme A を溶解してください。順番を間違えると発色が低くなります。
- * Enzyme working solution は、-20 °C の冷凍保存で 2 週間、冷蔵保存で 3 日間使用できます。

Indicator working solution

Enzyme C および Coenzyme 各 1 本に純水 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 は凍結乾燥品のため瓶内部が減圧になっています。減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがありますので、必ず純水をシリンジで注入し、溶解後開封してください。
- * 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。

プロトコルの選択 2種類のプロトコルを準備しています。実験系に応じてお選びください。

protocol 1 ACE 阻害活性の有無を確認する	protocol 2 IC ₅₀ を測定する
 <p>n=3 にて 14 samples(50 tests), 28 samples(100 tests) 測定できます。操作の詳細は 2 ページを参照。</p>	 <p>n=3 にて 2 samples(50 tests), 4 sample(100 tests) 測定できます。操作の詳細は 4 ページを参照。</p>

Protocol 1 ACE 阻害活性の有無を確認する

サンプル溶液調製

- 1 サンプルあたり 100 μl 準備する。
- * 100 μl に満たない場合は、純水で希釈してください。
- * サンプルが着色している場合は 1 サンプルあたり 150 μl 準備する。

操作

サンプルに着色がない場合

表 1 および図 2 参照

- 1) サンプル溶液を sample のウェルへ 20 μl 加える。
- 2) 純水を blank 1 のウェルへ 20 μl, blank 2 のウェルへ 40 μl を加える。
- 3) 各ウェルに Substrate buffer を 20 μl 加える。
- 4) sample 及び blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20 μl 加える。
*Enzyme working solution はウェル壁面に残りやすです。マイクロプレート を軽く叩き、すべての溶液が混合されたことを確認してください。
*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 μl 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。

表 1 各ウェルに必要なサンプル及び試薬の添加量

	Sample	blank 1	blank 2
サンプル溶液	20 μl	-	-
純水	-	20 μl	40 μl
Substrate buffer	20 μl	20 μl	20 μl
Enzyme working solution	20 μl	20 μl	-
Indicator working solution	200 μl	200 μl	200 μl

blank 1 : 阻害なしの全発色
blank 2 : 試薬 blank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1	Sample 8										
B	Sample 2	Sample 9										
C	Sample 3	Sample 10										
D	Sample 4	Sample 11										
E	Sample 5	Sample 12										
F	Sample 6	Sample 13										
G	Sample 7	Sample 14										
H	blank 1	blank 2										

図 2 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

< ACE 阻害活性の評価 >

ACE 阻害活性値 (阻害率 %) を下記の計算式により求める。

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

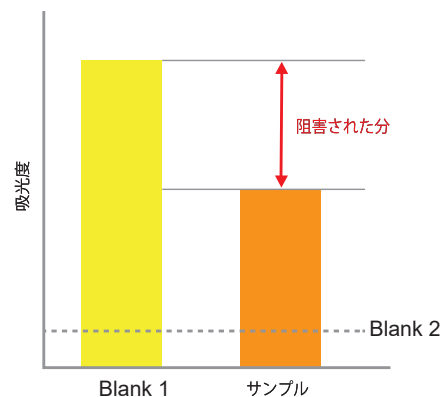


図 3 ACE 阻害活性の評価

サンプルに着色がある場合

表 2 および図 4 参照

- 1) サンプル溶液を sample 及び sample blank のウェルへ 20 µl 加える。
- 2) 純水を blank 1 のウェルへ 20 µl, blank 2 のウェルへ 40 µl, sample blank のウェルへ 240 µl 加える。
- 3) Substrate buffer を sample、blank 1 及び 2 のウェルへ 20 µl 加える。
- 4) sample 及び blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20 µl 加える。
 *Enzyme working solution はウェル壁面に残りやすいです。マイクロプレート を軽く叩き、すべての溶液が混合されたことを確認してください。
 *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) Indicator working solution を sample、blank 1 及び 2 のウェルへ 200 µl 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。

表 2 各ウェルに必要なサンプル及び試薬の添加量

	Sample	blank 1	blank 2	Sample blank
サンプル溶液	20 µl	-	-	20 µl
純水	-	20 µl	40 µl	240 µl
Substrate buffer	20 µl	20 µl	20 µl	-
Enzyme working solution	20 µl	20 µl	-	-
Indicator working solution	200 µl	200 µl	200 µl	-

blank 1 : 阻害なしの全発色
 blank 2 : 試薬 blank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1			Sample 8			Sample blank 1			Sample blank 8		
B	Sample 2			Sample 9			Sample blank 2			Sample blank 9		
C	Sample 3			Sample 10			Sample blank 3			Sample blank 10		
D	Sample 4			Sample 11			Sample blank 4			Sample blank 11		
E	Sample 5			Sample 12			Sample blank 5			Sample blank 12		
F	Sample 6			Sample 13			Sample blank 6			Sample blank 13		
G	Sample 7			Sample 14			Sample blank 7			Sample blank 14		
H	blank 1			blank 2								

図 4 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

< ACE 阻害活性の評価 >

ACE 阻害活性値 (阻害率 %) を下記の計算式により求める。

ACE 阻害活性値 (阻害率 %) =

$$[(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / (A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 2}})] \times 100$$

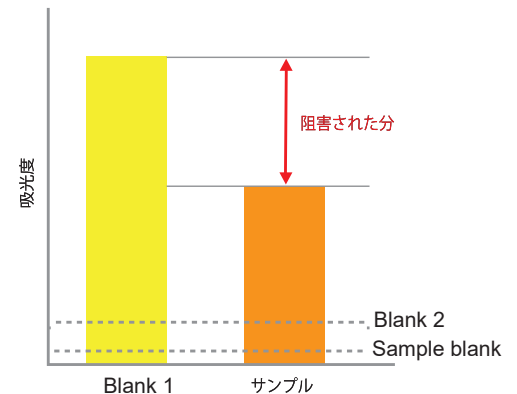


図 5 ACE 阻害活性の評価

サンプル溶液調製

サンプル溶液を純水で希釈する。

例) 希釈率 : 1 (希釈なし), $1/5$, $1/5^2$, $1/5^3$, $1/5^4$, $1/5^5$, $1/5^6$

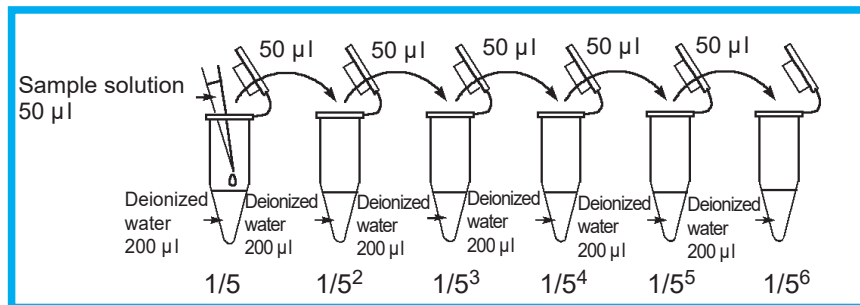


図 6 Sample solution 調製例

操作

サンプルに着色がない場合

表 3 および図 7 参照

- 1) 調製したサンプル溶液を sample のウェルへ 20 µl 加える。
- 2) 純水を blank 1 のウェルへ 20 µl, blank 2 のウェルへ 40 µl を加える。
- 3) 各ウェルに Substrate buffer を 20 µl 加える。
- 4) sample 及び blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20 µl 加える。
*Enzyme working solution はウェル壁面に残りやすいです。マイクロプレート を軽く叩き、すべての溶液が混合されたことを確認してください。
 *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 µl 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。

表 3 各ウェルに必要なサンプル及び試薬の添加量

	Sample	blank 1	blank 2
サンプル溶液	20 µl	-	-
純水	-	20 µl	40 µl
Substrate buffer	20 µl	20 µl	20 µl
Enzyme working solution	20 µl	20 µl	-
Indicator working solution	200 µl	200 µl	200 µl

blank 1 : 阻害なしの全発色
 blank 2 : 試薬 blank

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

図 7 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

< IC_{50} の算出方法 >

- サンプルの濃度に対して、阻害活性値をプロットし阻害曲線を描かせる。
- 阻害率 50% に相当するサンプル濃度を読む。
- 反応時のサンプルの終濃度は、調整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、 IC_{50} となる。

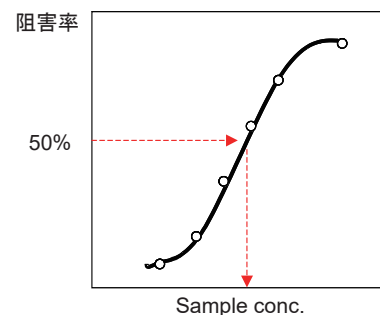


図 8 阻害曲線

サンプルに着色がある場合

表 4 および図 9 参照

- 1) 調製したサンプル溶液を sample 及び sample blank のウェルへ 20 µl 加える。
- 2) 純水を blank 1 のウェルへ 20 µl, blank 2 のウェルへ 40 µl、sample blank のウェルへ 240 µl 加える。
- 3) Substrate buffer を sample、blank 1 及び 2 のウェルへ 20 µl 加える。
- 4) sample 及び blank 1 のウェルに Enzyme working solution を 20 µl 加える。
 *Enzyme working solution はウェル壁面に残りやすいです。マイクロプレートを軽く叩き、すべての溶液が混合されたことを確認してください。
 *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) Indicator working solution を sample、blank 1 及び 2 のウェルへ 200 µl 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。

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

表 4 各ウェルに必要なサンプル及び試薬の添加量

	Sample	blank 1	blank 2	Sample blank
サンプル溶液	20 µl	-	-	20 µl
純水	-	20 µl	40 µl	240 µl
Substrate buffer	20 µl	20 µl	20 µl	-
Enzyme working solution	20 µl	20 µl	-	-
Indicator working solution	200 µl	200 µl	200 µl	-

blank 1 : 阻害なしの全発色
 blank 2 : 試薬 blank

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

図 9 プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

<IC₅₀ の算出方法>

- サンプルの濃度に対して、阻害活性値をプロットし阻害曲線を描かせる。
- 阻害率 50% に相当するサンプル濃度を読む。
- 反応時のサンプルの終濃度は、調整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。

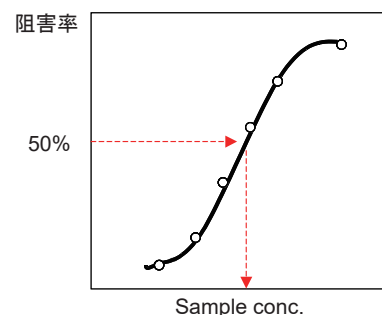


図 10 阻害曲線

参考文献

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

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<製造元>

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
 URL: www.dojindo.co.jp/

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーファックス: 0120-021557