

<IC50 を測定する>

ステップ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
- ・ マイクロピペット (2-20 μ l、20-200 μ l、100-1000 μ l)
- ・ 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 (1ml)

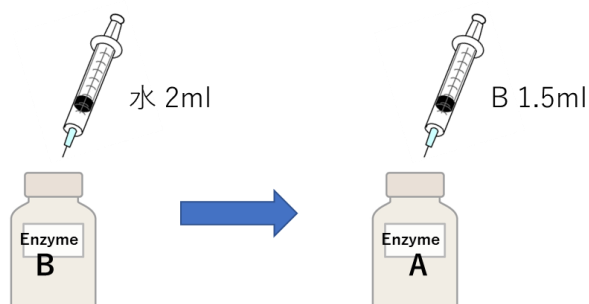
ステップ2 アッセイ溶液、サンプルの調整

<キット内容>

- ・ Substrate buffer 1 本
- ・ Enzyme C 1 本
- ・ Enzyme A 1 本
- ・ Coenzyme 1 本
- ・ Enzyme B 1 本
- ・ Indicator solution 1 本

<アッセイ溶液の調整>

- ・ Enzyme working solution



- 1) Enzyme B 1 本に純水 2 ml を加えて Enzyme B 溶液を調製する。
- 2) 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。

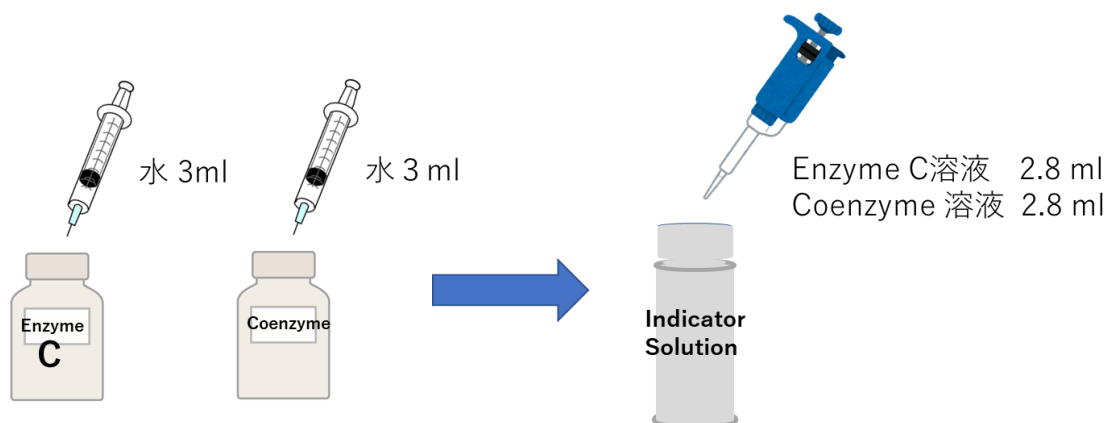
※ 減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがありますので、

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 1.5ml 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



- 1) 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。
- 2) 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。

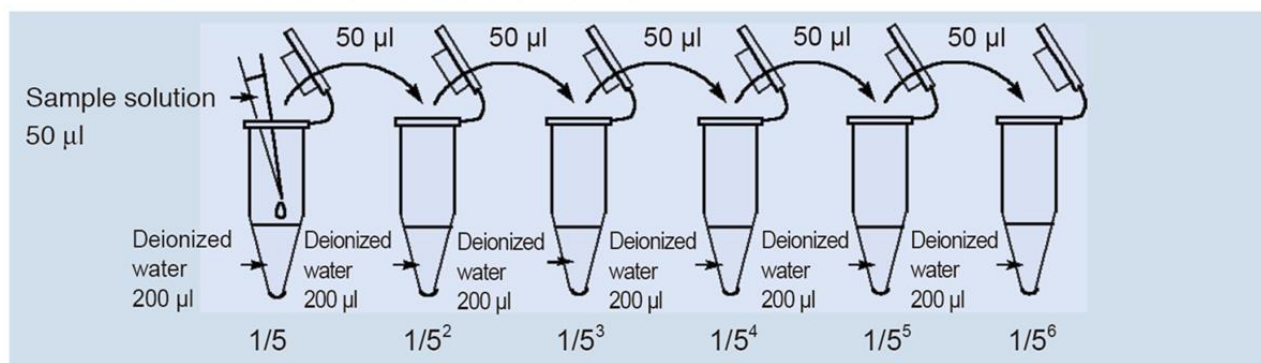
※ Enzyme C および Coenzyme は凍結乾燥品のため瓶内部が減圧になっています。減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがありますので、必ず純水をシリンジで注入し、溶解後開封してください。

※ 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。

< サンプルの準備 >

IC50 を測定したい場合は、以下の例のようにサンプルを純水で希釈してください。

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



※ 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、その後バッファー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。

ステップ3 測定

※希釈系列7、n=3の場合、2サンプル測定できます。

	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								

プレートレイアウト例 (n=3の場合)

表. サンプル及び blank 1, 2 の各ウェルに加える溶液

	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

添加順 ↓

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 µl + 純水 240 µl) 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。

※プレート配置図と添加順の表をご確認ください。

- 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 µl ずつ入れる。
- 2) 各ウェルに Substrate buffer を 20 µl ずつ加える。
- 3) blank 2 のウェルに純水を 20 µl 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 µl 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 µl 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。

$$\text{ACE 阻害活性値(阻害率\%)} = \frac{(\text{Ablank 1} - \text{Asample})}{(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 2})} \times 100$$

ステップ4 データ解析

- 1) 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。
- 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。

