

研究用

TAKARA

グリセロール 3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性測定キット

説明書

製品添付の 96 well UV Plate が、スプリットモジュールタイプの入手が困難になったため、ウェル一体型プレートに変更になりました (Lot. AEYJ200 以降)。
光路長が変更になっておりますので、VI-3. 測定操作法の注をご参照ください。

生体内での炭酸固定の一つである脂肪酸の合成は、グルコースを原料として肝臓で行われます。グルコースは解糖系を通りピルビン酸まで分解され、ミトコンドリア内でアセチル CoA となり、これが直接の脂肪酸合成の原料になります。合成された脂肪酸のうち特に、長鎖脂肪酸には界面活性作用があり、遊離の状態では細胞毒となり、細胞内には留まれません。そのため、生体内に長鎖脂肪酸が大量に合成されるとグリセロール 3-リン酸とすばやくエステルを作ってトリアシルグリセロール（脂肪）を生成します。つまり、脂肪の合成は長鎖脂肪酸とグリセロール 3-リン酸との縮合反応で始まります。肝臓ではこのグリセロール 3-リン酸はグリセロールを直接リン酸化して生成されますが、筋肉や脂肪細胞では解糖系の中間代謝物であるジヒドロキシアセトン 3-リン酸が NADH によって還元されて生成します。（図 1）そのため、筋肉や脂肪細胞での脂肪合成は、脂肪酸濃度がいくら高くてもグルコースが利用できないと起こりません。NAD を補酵素としてジヒドロキシアセトンリン酸 \rightleftharpoons グリセロール 3-リン酸との変換反応を担う酵素をグリセロール 3-リン酸脱水素酵素：GPDH：NAD + 2-oxidoreductase (EC.1.1.1.8) と呼び、特に脂肪前駆細胞が脂肪細胞に分化する際の代表的マーカーとされています。脂肪細胞や筋肉では、このグリセロール 3-リン酸脱水素酵素：NAD + 2-oxidoreductase (EC.1.1.1.8) は細胞質内に存在しますが、それとともにミトコンドリア内では、FAD を補酵素として働くもう 1 種類のグリセロール 3-リン酸脱水素酵素：(acceptor) oxidoreductase (EC.1.1.99.5) が、グリセロール 3-リン酸 \rightarrow ジヒドロキシアセトンリン酸への逆反応を担っています。これら 2 つの酵素で基質のやりとりを行い、グリセロールリン酸回路が形成されています。

本製品は NAD を補酵素としてジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール 3-リン酸を生成するグリセロール 3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) (EC.1.1.1.8) 活性を測定するためのキットです。脂肪合成への動きをモニターするもので、GPDH 活性は脂肪前駆細胞が脂肪細胞に分化する際に急増することが知られており、株化されている、もしくは初代培養の脂肪前駆細胞を分化させる実験系において、その分化抑制物質のスクリーニングや分化機構を解明する際に主な分化指標として利用されてきています。そこで本キットは、大量スクリーニングを想定し、一度に多くのサンプル測定が可能ないように 96 ウェルプレート測定用として設計されています。サンプル調製時間および測定時間が短時間で済むことから目的酵素の失活の心配がなく、再現性のあるデータが得られます。

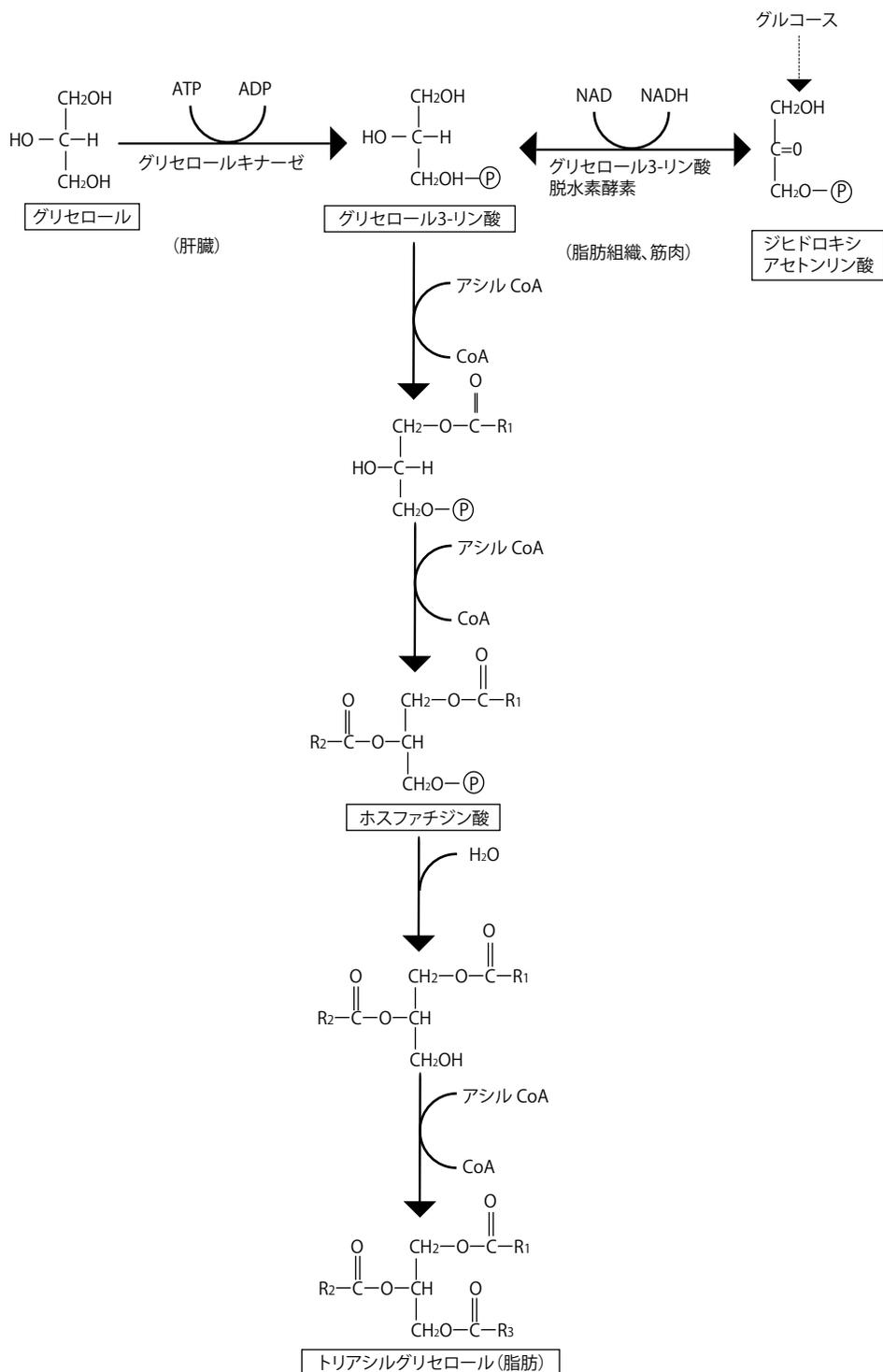


図 1. 脂肪の合成経路¹⁾

脂肪の合成は、アシル CoA として活性化された脂肪酸がグリセロール 3-リン酸に順次結合していく形で行われる。グリセロール 3-リン酸は、肝臓ではグリセロールキナーゼの作用でグリセロールから生成されるが、脂肪組織や筋肉ではグリセロールキナーゼは存在しないので、グルコースよりジヒドロキシアセトンリン酸を経由して生成される。

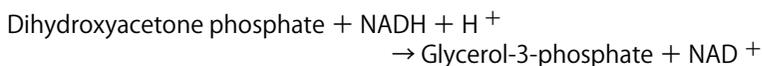
I. 特長

- ・ 試薬調製が簡単で、迅速な測定が可能です。
- ・ キットには、UV透過性96ウェルプレート (96 well UV plate) が含まれているため、マイクロプレートリーダーを用いることにより、一度に数多くのサンプルを測定できます。別途、96ウェルプレートを準備する必要もありません。
- ・ UV透過性96ウェルプレートは、洗浄乾燥することで繰り返し使用できます。ただし、底面に傷を付けないでください。

洗浄方法：0.5～1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含む器具用洗剤に15～24時間程度浸漬した後、よくすすいで乾かしてください。

II. 測定原理

次に示す反応におけるNADHの減少を、340 nmの吸光度の減少から求めることにより、GPDH活性を測定します。



検体中のGPDH活性 (unit/ml) は、次式で計算されます。

$$\text{GPDH 活性 (unit/ml)} = \frac{\Delta \text{OD}_{340} \times A \text{ (ml)} \times \text{検体希釈倍率}}{6.22 \times B \text{ (ml)} \times C \text{ (cm)}}$$

ΔOD_{340} : 1分間あたりの340 nmの吸光度の減少量

A (ml) : 全反応液量

B (ml) : 添加検体量

C (cm) : 使用した測定セルの光路長*

6.22 : NADHのミリモル分子吸光係数

* : キット添付の96ウェルプレートの光路長については6ページのVI-3. 測定操作法をご覧ください。なお、30℃で1分間あたり1 μmol のNADHを消費する酵素量を1 unitと定義しています。

III. キットの内容 (96穴プレート1枚測定分)

(1) 96 well UV Plate 96ウェル反応測定用プレート	1枚
(2) GPDH Substrate (凍結乾燥品) GPDH基質	11 ml用
(3) Enzyme Extraction Buffer 酵素抽出用緩衝液	11 ml
(4) Dilution Buffer 酵素希釈用緩衝液	11 ml×2本

IV. 保存

−20℃以下

V. 本製品以外に必要な器具および試薬 (主なもの)

- ・ 2-メルカプトエタノール (2-ME)
- ・ マイクロピペット
- ・ サンプル希釈用 96 ウェルマイクロプレート
- ・ 精製水
- ・ 生理的リン酸緩衝液 (PBS (-))
(PBS Tablets; 製品コード T900 をご利用になると便利です。)
- ・ 96 ウェルマイクロプレートリーダー
(340 nm のフィルターを有するもの)

検体からの粗酵素液抽出にあたり、以下の装置があれば必要に応じてご準備ください。

- ・ 恒温インキュベーター
- ・ 高速遠心機
- ・ 低速遠心機

VI. 使用方法

以下の使用法は、本キットに含まれる (1) 96 well UV Plate を使用した測定を想定して記載しています。(一般の分光光度計および分光光度計用石英マイクロセルを用いての活性測定も可能です。お手持ちの吸光度測定装置に合わせてご使用ください。VIII. Q&A 参照)

1. 試薬の調製

- ・ 反応基質液
(2) GPDH Substrate 全量を 11 ml の精製水により溶解し、これを反応基質液として使用します。本品はジヒドロキシアセトンリン酸、NADH、最適緩衝液を含みます。溶解後、4°C で 2 週間、-80°C で 1 ヶ月間保存できます。
- ・ (3) Enzyme Extraction Buffer
室温で融解してご使用ください。融解後は 4°C で 1 年間保存できます。
- ・ Dilution Buffer (+ 2-ME)
(4) Dilution Buffer を室温で融解してご使用ください。融解後は 4°C で 1 年間保存できます。ご使用になる量に対して終濃度が 1 mM になるように 2-メルカプトエタノールを添加してください。具体的には、市販の 2-メルカプトエタノールを 14.4 M とした場合、5 μ l を精製水 715 μ l に加え 0.1 M を作り、さらに 100 倍希釈してお使いください。2-メルカプトエタノールは不安定ですからご使用ごとに添加調製してください。

[注意]

2-メルカプトエタノールは毒物です。2-メルカプトエタノール添加後の試薬の取扱いおよび廃棄方法にはご注意ください。

2. サンプルの調製

2-1. 96 ウェルプレートでの培養細胞から調製する場合

- 1) 培養液を取り除き、PBS (-) で 2 回洗浄し (ただし、細胞が剥がれやすい場合は、洗浄工程を省略することができる)、1 ウェルあたり 100 μ l ~ 200 μ l の (3) Enzyme Extraction Buffer を加える。この段階で必要な場合は、タンパク質定量用にサンプリングする。抽出後直ちに、Dilution Buffer (+ 2-ME) を等量加えて 2 倍希釈物とする。
- 2) Dilution Buffer (+ 2-ME) でさらに $2^1 \sim 2^7$ 程度希釈して測定操作に従い GPDH 活性を測定する。

注) 細胞破碎液が濁っていて扱いにくい場合は、遠心分離 (10,000 rpm、4℃、5 分) し、脂肪画分を避け、液状成分をサンプルとしてください。

2-2. 直径 90 mm 細胞培養ディッシュでの培養細胞から調製する場合

- 1) 培養液を取り除き、PBS (-) で 2 回洗浄し、1 ml の (3) Enzyme Extraction Buffer を加える。スクレーパーで細胞をかき集め、マイクロチューブに回収、軽く振とう攪拌した後、遠心分離 (10,000 rpm、4℃、5 分) し、脂肪画分を避け、液状成分をサンプルとする。この段階で必要な場合は、タンパク質定量用にサンプリングする。抽出後直ちに Dilution Buffer (+ 2-ME) を等量加えて 2 倍希釈物とする。
- 2) Dilution Buffer (+ 2-ME) でさらに $2^1 \sim 2^7$ 程度希釈して測定操作に従い GPDH 活性を測定する。

2-3. 調製したサンプルの安定性について

(3) Enzyme Extraction Buffer で抽出したサンプルは、タンパク質定量用分をサンプリングした後直ちに Dilution Buffer (+ 2-ME) で 2 倍希釈することで氷上で 1 時間までは安定である。

3. 測定操作法

- 1) 反応基質液を、(1) 96 well UV Plate に 100 μ l ずつ分注し、30℃であらかじめプレインキュベートしておく。
- 2) サンプル 25 μ l を加え攪拌後、96 ウェルマイクロプレートリーダーにより、30℃での 340 nm の吸光度の減少を測定し、1 分間当たりの吸光度の変化 (Δ OD₃₄₀) を求める。

※ あらかじめ別の 96 ウェルプレートに氷上でサンプルを 50 μ l ずつ分注し、8 レーンピペットで一度にサンプルを 25 μ l ずつ添加すると測定までのサンプル間の時間差を軽減できます。

※ サンプル数が多数の場合は、希釈倍率の高いほうから順にサンプルを入れてください。(プレートリーダー付属のカイネティックス測定プログラムがあれば、ご使用になると便利です。)

- 注 1) 通常、サンプル添加後 2 ~ 10 分程度で反応が終了します。酵素活性が非常に高い場合、短時間で反応が終了しますので適当な希釈段階をお取りください。反応が直線的に進んでいるところで、 Δ OD₃₄₀ を求めてください。カイネティックス測定プログラムの場合、corr.coeff が 0.98 ~ 1.0 になる時の Δ OD₃₄₀ を求めてください。吸光度の減少をモニタリングするためネガティブカイネティックアッセイとなります。

(測定プログラム例)

測定時間 15 分、測定インターバル 60 秒 (測定 16 ポイント)、
OD リミット -0.5

注 2) 本キットは、96 ウェルプレートを用いて一度に多数のサンプルの GPDH 活性を相対的に比較検討することを目的としている性質上、“光路長 C (cm)” の正確な値を規定しておりません。計算式により、正確な活性値を算出することを希望される場合は、光路長の規定があるセルをご使用ください

※ 添付の (1) 96 well UV Plate (96 ウェル反応測定用プレート) で、3. 測定操作法通りの量を添加される場合は、簡易的に以下の値を用いることにより、おおよその値を算出できます。

$$\text{GPDH 活性 (unit/ml)} = \frac{\Delta \text{OD}_{340} \times 0.125 \text{ ml} \times \text{検体希釈倍率}}{6.22 \times 0.025 \text{ ml} \times 0.39^*}$$

添付の 96 well UV Plate は、Corning 製 (code 3635) (図 2) を使用しています。

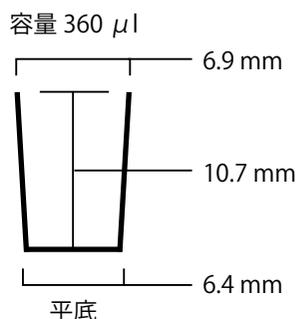


図 2. 96 well UV Plate の well 形状規格

*: ウェルの形状は図 2 の様な円錐台となっておりますが、便宜的に底面積を底面の直径をもとに 0.32 cm^2 と算出し、この底面積をもつ円柱とほぼイコールと想定し概算した値

$$\frac{0.125 \text{ ml}}{0.32 \text{ cm}^2} = 0.39 \text{ cm}$$

光路長とすることでおおよその活性を求めることができます。

注 3) 酵素反応が直線的でも、酵素活性が強い場合は頭打ちになっている場合がありますので、段階希釈されることをおすすめします。 ΔOD_{340} が 0.02 ~ 0.01 で測定されると再現性も良く酵素活性も正確に測定できます。

注 4) 泡が反応液に入った場合、正確な結果を得られませんので注意してください。もし入った場合はドライヤーの冷風で吹き消していただくのと除けます。ただし熱風は失活の原因となりますのでくれぐれもご注意ください。

注 5) 培養した細胞の培養上清を測定される場合は、未使用の培地をブランクとしてお使いください。

注 6) 光路長が変わることで、反応開始時の OD_{340} 値が従来のキット (~ Lot. AD8J200) より若干低くなりますが、 ΔOD_{340} をもとに活性を測定しますので、活性値には影響ありません。VIII. Q & A の Q5 をご参照ください。

VII. 実施例

1) 反応のタイムコース

コラーゲンコート 24 ウェルプレートでラット褐色脂肪前駆細胞を初発 1×10^4 cell/well で培養し、褐色脂肪細胞に分化させた。各ウェルを 250 μ l の (3) Enzyme Extraction Buffer を用いて抽出後、Dilution Buffer (+ 2-ME) で $2^1 \sim 2^4$ まで希釈系列を作製し、GPDH 活性の反応のタイムコースを調べた。

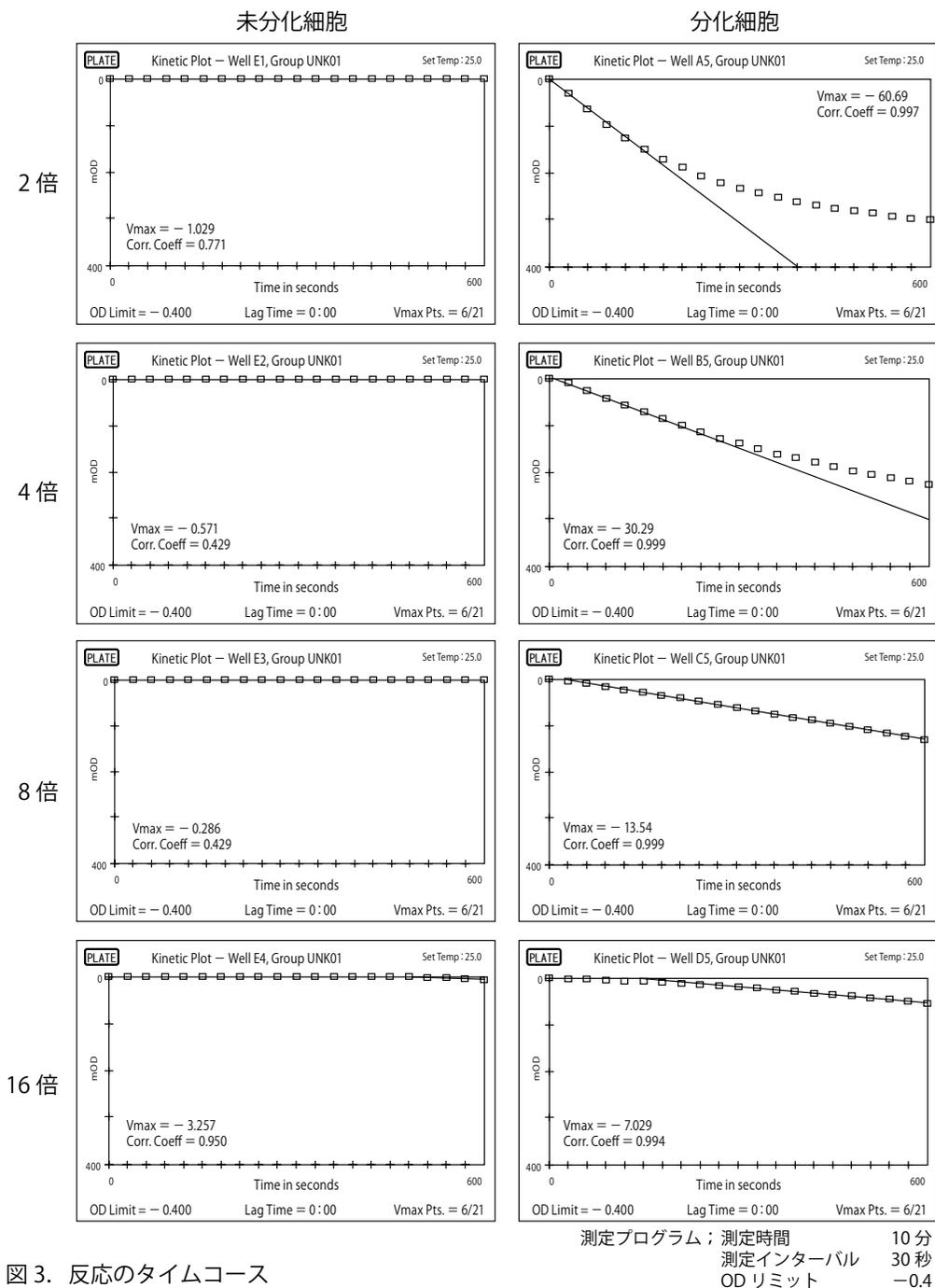


図 3. 反応のタイムコース

2) 希釈直線性

ラット褐色脂肪細胞をサンプルとした希釈直線性を示します。

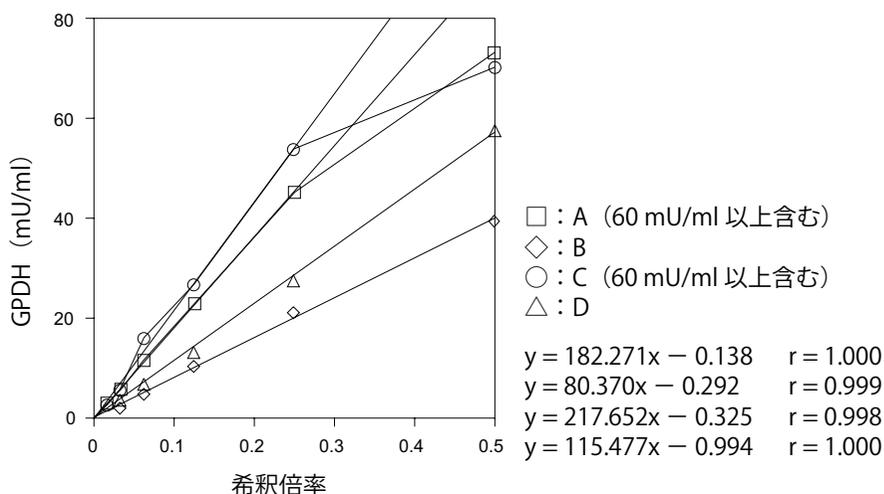


図 4. 希釈直線性

3) 脂肪細胞の分化と EGF との関連を調べた実施例

コラーゲンコート 24 ウェルプレートでラット褐色脂肪前駆細胞を初発 1×10^4 cell/well で培養した (3 プレート作製)。インシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル 1-メチルキサンチンを加えた分化培地を作製し、短期間で確実に分化させる目的で 2 日間分化誘導処理を行った。コントロール群は分化誘導せずにおいた。その後、すべてのウェルを維持培地に交換し、この段階から 10 nM EGF の存在群と非存在群にわけて培養し、経時的に GPDH 活性を測定するために $150 \mu\text{l/well}$ で日毎に酵素を抽出し (各群から、2 ウェルずつ抽出)、希釈用緩衝液で 2 倍希釈系列をつくって測定し、経日変化を調べた。

		分化誘導開始			維持培地 / EGF 添加有無			維持培地 / EGF 除去 / 添加			
EGF		day 0	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 11
未分化群	無添加	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.95
	無添加				35.07	65.41	62.75	110.00	119.15	118.80	128.46
分化群	無添加→添加									129.00	96.65
	添加	0.00	0.00	7.00	30.06	27.83	10.16	0.00	0.00		
分化群	添加→除去									56.86	60.98
	除去										

(単位 : mU/ml)

- ・脂肪細胞の分化過程で EGF は分化抑制効果をもたらす。
- ・EGF を除去すると GPDH 活性は再び増加し、脂肪へ分化する。
- ・EGF の添加、約 1 日後からその効果がみられる。
- ・未分化細胞は、11 日目に GPDH 活性が示すとおり自然分化していた。

図 5. 脂肪細胞の分化と EGF との関連

VIII. Q&A

Q1：96 ウェルマイクロプレートリーダーがないので、分光光度計と石英セルで測定したいが。

A1：反応液とサンプルを4：1の割合で反応させてください。石英セルは、容積ができるだけ少ないもののほうが、数多くのサンプルを測定できます。サンプルは氷上で保存してください。

Q2：96 ウェル反応測定用プレートで測定したとき、計算式を使って酵素活性値を算出したい。

A2：弊社では96 ウェル反応測定用プレートの底面積と反応液の体積から高さを算出し、これを簡易的に光路長として計算式に代入し酵素のユニット数を計算する方法を用いています。

(キットに添付の96 ウェル反応測定用プレートは、Corningの製品 (code. 3635) です。底面積を 0.32 cm^2 としておおよその活性を計算できます。)

また、正確な活性の算出を求めたい場合は、分光光度計とマイクロプレーリーダーとの OD_{340} の値を比較することにより補正係数を求めてください。

Q3：細胞から抽出したサンプルを凍結保存しておいて、あとでまとめて測定したいが、安定性は？

A3：弊社では、褐色脂肪細胞からの粗抽出液の活性が、凍結融解により減少した経験がありますので、サンプル調製後すぐに測定するようにしています。調製したサンプルは氷上で1時間は安定です。実験上、凍結保存する必要がある場合は、できるだけ濃い状態で小分けし、 -80°C で保存してください。凍結融解の繰り返しは避けてください。

Q4：酵素反応が、直線的になっていない。

A4：酵素濃度が高すぎるのが予想されます。酵素希釈用緩衝液を用いて段階希釈して測定してください。

Q5：UV プレートが変わると具体的にどうなるか？

A5：UV プレートの容積の差から光路長が若干変わります。そのため、反応開始時の OD_{340} 値にも変動がありますが、 ΔOD_{340} をもとに求める活性値に影響はありません。

なお、実験デザイン等により OD_{340} の勾配を大きく付けたい場合には、ウェルに投入する基質液量を増やすことで対応できます。基質の増量に合わせてサンプル量も増やす必要がありますのでご注意ください。適切な値を計算式にあてはめて、活性を測定してください。

製品ロット 使用プレート	反応開始時の OD_{340}	
	現製品 (Lot. AEYJ200 ~) Corning code. 3635	従来品 (~ Lot. AD8J200) Greiner Module
Substrate volume (μl)		
100	0.527	0.672
100	0.522	0.674
100	0.528	0.674
150	0.782	0.933
150	0.803	0.935
150	0.808	0.930
200	1.048	1.196
200	1.005	1.193

IX. 参考文献

- 1) 田川邦夫 (1993) からだの生化学 第5章, 79-125.
- 2) Kozak L.P., *et al* (1974) *J B C.* **25**:7775-7781.
- 3) Kuri-Harcuch W., *et al* (1978) *Cell.* **14**:53-59.

X. 関連製品

PBS (Phosphate Bufferd Salts) Tablets (製品コード T900)
AdipoInducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK429)
TaKaRa BCA Protein Assay Kit (製品コード T9300A)

XI. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社