

研究用試薬



Mushroom Tyrosinase Inhibitor Screening Kit

(Diphenolase activity)

Cat. No. SL-7011
(96 tests)

取扱説明書

Ver 1.0 (05/2020)

SAKULABSCIENCE

Made in Japan

1 使用目的・本キットの特徴

- 使用目的**
- ・美白作用物質の効果検証・スクリーニング
 - ・食用植物の褐変防止物質の効果検証・スクリーニング
 - ・白髪抑制物質の効果検証・スクリーニング
- 本キットの特徴**
- ・マッシュルーム由来チロシナーゼのジフェノラーゼ活性を検証
- 所要時間** 約1時間半

本製品は試験・研究用試薬です。ヒト、動物への治療・臨床診断には使用しないで下さい。

2 背景

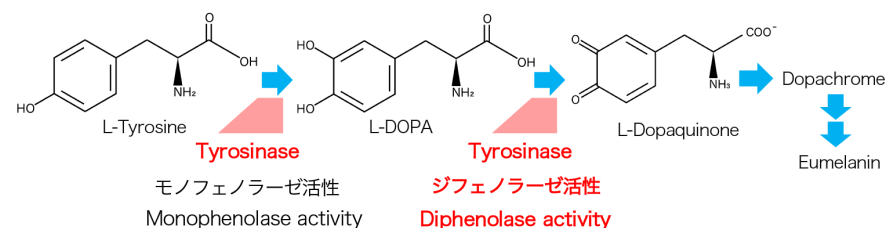


図1 メラニン合成経路

チロシナーゼ (EC1.14.18.1) は細菌から植物、昆虫、動物まで幅広い生物種に存在し、メラニン色素合成における主要代謝酵素である。メラニン色素は脊椎動物では主に皮膚や毛組織の色素細胞(メラノサイト)で合成され紫外線から細胞を保護する。しかし過度な紫外線や物理的ストレスによりメラニン産生が過剰となると皮膚に沈着しシミの原因となる。一方、食用植物において傷や長期保存などによりチロシナーゼがメラニン合成を促進し変色(褐変)の原因となる。従ってチロシナーゼ活性を阻害する物質は美白効果や褐変抑制効果をもたらす、促進する物質は白髪を抑制する効果をもたらす。

メラニン合成過程においてチロシナーゼは主に2つの反応を触媒する(図1)。L-チロシンなどのモノフェノールをL-ドーパキノンのようなキノンへ酸化触媒する(モノフェノラーゼ活性)。もう一方はL-DOPAなどのジフェノールをキノンへ酸化触媒する(ジフェノラーゼ活性)。薬剤に対する感受性は両活性で異なる(9-2参照)。一般的なチロシナーゼ酵素活性は試薬調製の容易なL-DOPAを基質として測定されることが多い。本キットはマッシュルーム由来チロシナーゼを用いてL-DOPAを基質として反応したときのドーパクロム産生を吸光度として検出する。

3 製品内容 (96 tests)

Assay buffer	25 mL
Enzyme (Mushroom由来)	150 μ L X 4
Substrate (L-DOPA)	600 μ L
Inhibitor control (10mM Kojic acid)	300 μ L
96 well microplate	1 plate

4 キット以外に必要なもの

- ・マイクロプレートリーダー (480-510nmフィルター: 推奨495nm)
- ・インキュベーター (25-30°C)
- ・マルチチャンネルピペット (2-200 μ L)

5 保管

使用前 (開封前) -20°Cで保管

使用后 (融解後)

Assay buffer	4°C保管
Enzyme	-20°C保管
Substrate (L-DOPA)	-20°C保管
Inhibitor control (Kojic acid)	-20°C保管
96 well microplate	室温保管

6 試薬の調製

6-1. Assay buffer

キット付属のAssay bufferを室温にて融解する。融解後は希釈せずにそのまま使用する。使用后 (融解後) は4°Cにて保管。

6-2. Enzyme solution (直前調製)

使用する分量に応じてキット付属のEnzymeを氷上もしくは4°Cにて融解する。使用前に使用ウェル数に応じてEnzyme solutionを調製する。

Enzyme solution	1ウェルあたりの使用量
Enzyme	5 μ L
Assay buffer	15 μ L

損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

Enzymeは使用后 (融解後) は-20°Cにて保管。再凍結後のEnzymeは1回まで再融解し使用することができる。

6-3. Substrate solution (直前調製)

目的とする活性に応じてキット付属のSubstrate とEnhancerを室温にて融解する。融解後はよく攪拌後、使用前に使用ウェル数に応じてSubstrate solutionを調製する。

Substrate solution	1ウェルあたりの使用量
Substrate	5 μ L
Assay buffer	55 μ L

SubstrateとAssay bufferを混ぜた後はよく攪拌する。損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

Substrateは使用后 (融解後) は-20°Cにて保管

6-4. Sample & Inhibitor control

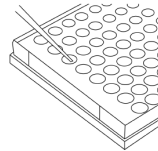
Sampleを希釈する場合は各Assay bufferにて希釈する。事前に希釈濃度検討を行うことを推奨する。

Inhibitor control は希釈せずにそのまま使用する。測定時の終濃度は2mMとなる。

7 プロトコール

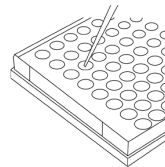
Step1. Sampleの添加

付属のマイクロプレートの各ウェルに 20 μ LのAssay buffer (Control)、Inhibitor control、Sampleを添加する。



Step2. Enzyme solutionの添加

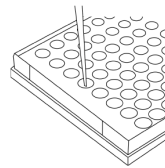
各ウェルに 20 μ LのEnzyme solution (調製は6-2に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。



↓
インキュベーター (25-30 $^{\circ}$ C) に10分間反応

Step3. Substrate solutionの添加

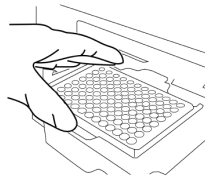
各ウェルに 60 μ LのSubstrate solution (調製は6-3に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。



↓
インキュベーター (25-30 $^{\circ}$ C) にて酵素反応開始

Step4. 吸光度の測定

酵素反応開始後、30分後および60分後の各ウェルの吸光度(480-510nm：推奨波長495nm)をプレートリーダーにて測定



4

8 阻害率・促進率の算出

$$\Delta(\text{Control}) = 60\text{分の吸光度値}(\text{Control}) - 30\text{分の吸光度値}(\text{Control})$$

$$\Delta(\text{Sample}) = 60\text{分の吸光度値}(\text{Sample}) - 30\text{分の吸光度値}(\text{Sample})$$

$\Delta(\text{Control}) > \Delta(\text{Sample})$ の場合

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{\Delta(\text{Control}) - \Delta(\text{Sample})}{\Delta(\text{Control})} \times 100$$

$\Delta(\text{Control}) < \Delta(\text{Sample})$ の場合

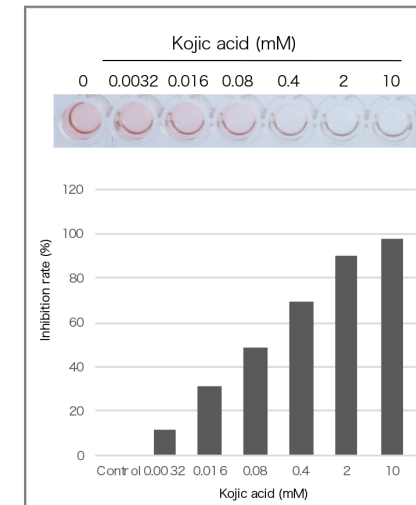
$$\text{促進率}(\%) = \frac{\Delta(\text{Sample})}{\Delta(\text{Control})} \times 100$$

9 基本データ

9-1. 本キットを用いたコウジ酸の阻害効果

本キットを用いてコウジ酸によるチロシナーゼ阻害率を以下に示す。
各ウェルの写真は60分間の酵素反応における発色を示す。

ジフェノラーゼ活性



5

9-2. 陽性対照物質による阻害活性

本キットを用いて代表的美白作用物質および褐変抑制物質の阻害活性を検証した。
各物質のIC50（50%阻害濃度）を以下に示す。

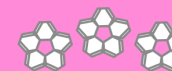
代表的陽性対照物質のIC50値

活性	モノフェノラーゼ	ジフェノラーゼ
基質	L-Tyrosine	L-DOPA
Kojic acid	80 μ M	80 μ M
α -Arbutin	1,700 μ M	No inhibition ^{*1}
β -Arbutin	2,000 μ M	No inhibition
Hydroquinone	160 μ M	No inhibition ^{*2}
Ascorbic acid	20 μ M	390 μ M

*1 α -ArbutinはL-DOPAを基質としたジフェノラーゼ活性を促進する。
参考文献 Liang Qui et al. PLOS ONE, Vol.9, 10, e109398, 2014

*2 HydroquinoneはL-DOPAを基質としたジフェノラーゼ活性を促進する。
参考文献 Elizabeth Neeley et al. International Journal of Molecular Science, Vol.10, 3811-3823, 2009

製造元



株式会社サクラボサイエンス
〒233-0013 神奈川県横浜市港南区丸山台2-38-34 港南ビル202
TEL/FAX: 045-353-7244
E-mail: info@sakulab-sci.co.jp
HP: <https://sakulab-sci.co.jp/>

