



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Arginase Activity Assay Kit

(Arginase Activity Assay Kit, Catalog No. AK89N)

August 9, 2024

Arginase is an enzyme that hydrolyzes L-Arginine to L-Ornithine and urea. It is known to be strongly expressed when macrophages are activated in M2 of the M1 (inflammatory)/M2 (non-inflammatory) known as one of the functional classifications of macrophages and is frequently used as a marker of M2 macrophage activation. This product extracts intracellular arginase and evaluates arginase activity by detecting urea produced by arginase from L-arginine. Compared to conventional assay methods, the stability and sensitivity of the reagent have been improved, and arginase activity can be easily measured.

This product is based on a patent owned by Professor Yasuhiko Tabata of Kyoto University and TOKYO OHKA KOGYO CO., LTD.

I-1. Kit Components

Contents	Volume	Number of bottles	Storage Temperature	Precautions for handling
Enzyme activation solution	2.5mL	1	4°C	When handling, wear protective equipment such as glasses and gloves, and take sufficient care to avoid contact with the human body.
Substrate solution	5mL	1		
Urea standard solution (160μg/mL)	1mL	1		
Urea Detection Solution A (light-shielded container)	2.2mL	1		Please check the label for hazardous indications. When handling, wear protective equipment such as glasses, mask, and gloves, and take sufficient care to avoid contact with the human body. Urea Detection Solution B reacts with ultraviolet rays, so be careful not to expose it to natural or fluorescent light for a long time.
Urea Detection Solution B (light-shielded container)	4mL	1		
Detection solution mixing vessel	-	2	Room temperature	Since the mixed urea detection solution reacts with ultraviolet light, it should be treated in the light-shielded container provided when mixed and heated.
Plate seal	-	2		Use the plate seal provided since the detection solution containing high concentrations of sulfuric acid is heated during the coloring reaction.

This product can measure 96 samples on a 96-well plate.

I-2. Preparations required] *Not included in the product.

- Gloves, mask, safety glasses
- Aluminum foil
- Microplate reader (measurement wavelength: 540 nm)
- Micropipettes, tips, microtubes with lids
- 96-well plate (transparent, flat bottom)
- Reservoir
- Thermostatic bath capable of heating up to 95°C and hot plate capable of heating up to 95°C (a heat block or thermal cycler the size of a 96-well plate can be substituted)
- 37°C thermostatic incubator or CO₂ incubator
- **Concentrated sulfuric acid (purity: 98%)**
- Cell extract: 0.1% Triton[®] X-100 aqueous solution plus cOmplete[™] protease inhibitor cocktail (part number: 11697498001, Roche Diagnostics, 1 tablet/50 mL)
- UV lamp for coloration (UV lamp attached to clean bench or UV gel imaging equipment can be substituted if available; if no UV lamp is available, natural or fluorescent light will also progress coloration, but it will take time)

II. Preparation for measurement Preparation before measurement

1. Urea Detection Solution A

Prepare 22mL of urea detection solution A by adding 9.9mL of concentrated sulfuric acid and 9.9mL of ultrapure water to the urea detection solution A bottle.

Note: Urea Detection Solution A after addition of sulfuric acid can be stored at 4°C for 1 year.

Note: When handling concentrated sulfuric acid, use appropriate protective equipment in a ventilated area. Follow the facility's regulations for handling and disposal.

2. Urea Detection Solution (Preparation for use)

Mix Urea Detection Solution A and Urea Detection Solution B at ratio 5:1 (A:B = 5:1) in the attached container for mixing detection solutions.

(180 µL of detection solution is required per well of a 96-well plate, so adjust the volume according to the number of wells to be used.)

Note: Since the mixed solution contains high concentrations of sulfuric acid and ethanol and the solution will be heated, be sure to check that the lid is tightly closed to prevent volatilization or leakage. Do not stir while heating. Use gloves, masks, protective glasses, etc. when handling.

After heating the solution in a thermostatic bath at 95°C for 30 minutes, allow it to cool sufficiently before stirring gently to use it as a urea detection solution.

(If there are insufficient mixing containers when multiple measurements are desired, prepare Urea Detection Solution A or B using a light-shielded container.)

3. Urea standard solution

Prepare a dilution series of Urea standard solution by 2-fold step dilution with ultrapure water.

Concentration: 0 (ultrapure water only), 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL

Preparation volume: 100 µL each

Storage period of diluted urea standard solution: 4°C, 1 month

III. Sample Preparation

Cells are to be lysed by adding 40 µL of the above cell extract solution to a 96-well plate (bottom area: 0.32 cm²/well), excluding the supernatant, and the cells are to be used as the sample.

The volume of the extraction solution should be adjusted according to the bottom area of the plate.

IV. Procedure

1. Add 20 µL of enzyme activation solution and 40 µL of substrate solution to 20 µL of sample and urea standard solution and mix.

*Duplicate assay is recommended.

2. Cover the plate with the attached plate seal or lid and incubate in a 37°C incubator for 1 hour to allow the enzyme-substrate reaction to take place.

3. After the enzyme-substrate reaction, add urea detection solution prepared in advance at 180 µL/well.

*Please be careful to avoid exposure to light as much as possible when adding the urea detection solution, for example by using a reservoir to add it quickly.

4. Seal the plate tightly with the attached plate sealer and shield the 96-well plate from light with aluminum foil or the like.

Note: Since the urea detection solution contains high concentrations of sulfuric acid and ethanol and will be heated, the plate seal should be tightly adhered to prevent volatilization or leakage. Use gloves, masks, protective glasses, etc. when handling.

5. Heat the product at 95°C for 2 hours under shaded light using a hot plate, etc.

6. After heating, remove the aluminum foil and accelerate the reaction under a UV lamp until sufficient color is observed. 15 minutes to 1 hour under a UV lamp is sufficient. Under natural light or fluorescent light, it takes about 1 to 2 hours. Refer to the example in Figure 1 for the degree of coloration.

7. Measure absorbance (wavelength: 540 nm)

Urea concentration

160 μ g/mL

80 μ g/mL

40 μ g/mL

20 μ g/mL

10 μ g/mL

5 μ g/mL

2.5 μ g/mL

0 μ g/mL

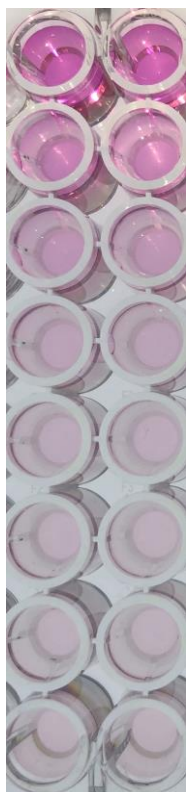


Fig.1: Example of coloration of urea standard solution

V. Calculation of standard curve and arginase activity

The absorbance of the urea standard solution at each concentration is averaged, and a standard curve is calculated from the average value by fitting a four-parameter logistic curve fit (4-PL) or a quadratic regression curve (either function will fit).

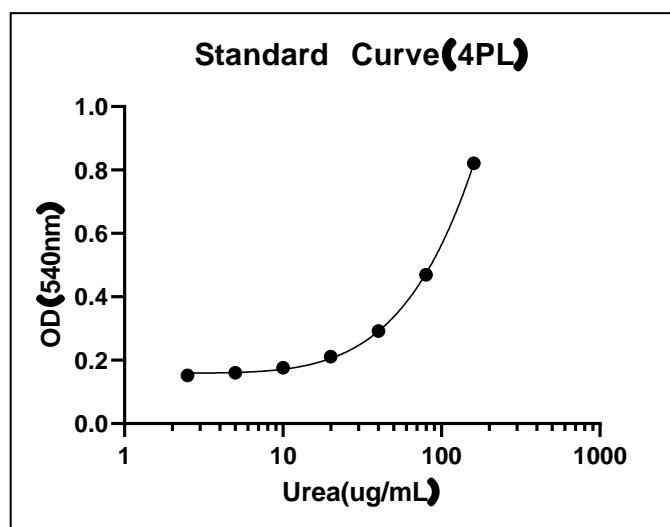


Fig.2: Example of a 4PL curve (software: Prism8)
Excel)

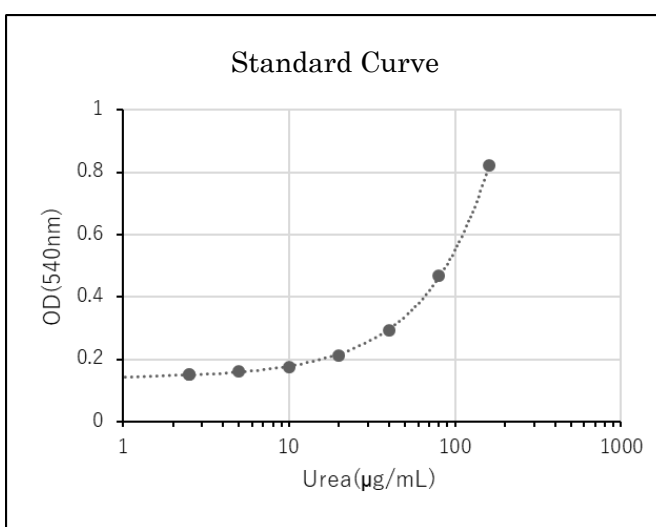


Fig.3: Example of a regression curve (software:

Arginase activity (units/mL) is defined as the conversion of 1 μmol of L-Arginine to 1 μmol of L-Ornithine and urea per minute at 37°C, which can be obtained using the following formula

Arginase activity (units/mL) =

$$\frac{\text{Urea content of each sample determined from standard curve } (\mu\text{g/mL}) \times 1000 (\mu\text{mol conversion}) \times 1000 (\text{mL conversion})}{60.06 (\text{urea molar mass}) \times 60 (\text{reaction time: min}) \times 20 (\text{sample solution volume: } \mu\text{L})}$$

一般研究用キット

アルギナーゼ活性測定キット

(Arginase Activity Assay Kit, 品番 : AK89N)

2024 年 8 月 9 日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

アルギナーゼ (Arginase) は、L-Arginine を L-Ornithine と尿素に加水分解する酵素です。マクロファージの機能的分類の 1 つとして知られる M1 (炎症性) /M2 (非炎症性) の M2 にマクロファージが活性化された際、強く発現することが知られており、M2 マクロファージ活性化のマーカーとして頻用されています。

本製品は、細胞内のアルギナーゼを抽出し、アルギナーゼが L-Arginine から生成する尿素を呈色反応で検出することで、アルギナーゼ活性を評価します。従来の測定法に比べ、試薬の安定性・感度を改善し、簡便にアルギナーゼ活性を測定することができます。

※本製品は、京都大学・田畑泰彦教授及び東京応化工業株式会社が保持する特許に基づき、コスモ・バイオ株式会社が特許実施許諾を受けて、製品化しています。

《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度	取扱上の注意
酵素活性化溶液	2.5mL	1	4℃	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
基質溶液	5mL	1		
尿素標準液 (160μg/mL)	1mL	1		
尿素検出溶液 A (遮光容器)	2.2mL	1		危険表記はラベルの表記をご確認ください。 取扱う際には眼鏡・マスク・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。 尿素検出溶液 B は紫外線で反応するため、自然光・蛍光灯に長時間当てないように、ご注意ください。
尿素検出溶液 B (遮光容器)	4mL	1		
検出溶液混合用容器	—	2	常温	混合尿素検出溶液は紫外線で反応するため、混合加熱の際は付属の遮光容器で処理してください。
プレートシール	—	2		呈色反応の際は、高濃度の硫酸を含む検出溶液を加熱しますので、付属のプレートシールをご使用ください。

※本製品は、96well プレートで 96 検体分測定することができます。

《Ⅰ-2. ご準備いただくもの》※製品には含まれません

- 手袋・マスク・保護メガネ
- アルミホイル
- マイクロプレートリーダー（測定波長：540nm）
- マイクロピペット・チップ・蓋つきマイクロチューブ
- 96well プレート（透明、平底）
- リザーバー
- 95℃まで加温可能な恒温槽及び 95℃まで加温可能なホットプレート（96well プレートの大きさのヒートブロックやサーマルサイクラーでも代用可）
- 37℃恒温器もしくは CO₂ インキュベーター
- 濃硫酸（純度：98%）
- 細胞抽出液：0.1% Triton[®] X-100 水溶液に cOmplete™プロテアーゼ阻害剤カクテル（品番：11697498001、ロシュ・ダイアグノスティックス、1 錠/50mL）を加えたもの
- 呈色用 UV ランプ（クリーンベンチや UV ゲル撮影装置付属の UV ランプがあれば代用可、UV ランプがない場合は自然光もしくは蛍光灯でも呈色は進行するが、時間を要する）

《Ⅱ. 測定前準備》

1. 尿素検出溶液 A

尿素検出溶液 A のボトルに濃硫酸 9.9mL、超純水 9.9mL を添加し、22mL の尿素検出溶液 A を調製する。

注：硫酸添加後の尿素検出溶液 A は 4℃で、1 年保管可能です。

注：濃硫酸の取り扱いに関しては、喚起の良い場所で適切な保護具を用いてください。取扱・廃棄等は施設の規定に従ってください。

2. 尿素検出溶液（用事調製）

添付の検出溶液混合用容器に、尿素検出溶液 A と尿素検出溶液 B を A : B=5 : 1 で混合する。

（96well プレートの 1well あたり 180μL の検出溶液が必要になりますので、使用する well 数に応じて量を調節してください）

注：混合した溶液は高濃度の硫酸、エタノールを含んでおり、溶液を加熱することから、揮発や漏れがないように蓋が硬くしまっているかを必ず確認してください。加熱中は攪拌しないでください。取り扱いの際は、手袋、マスク、保護メガネ等を使用してください。

95℃の恒温槽で 30 分間、加熱後、十分に冷ましてから軽く攪拌し、尿素検出溶液として使用する。

（複数回に分けて測定したい際に、混合用容器が不足した場合は、尿素検出溶液 A もしくは B の遮光容器を用いて調製してください）

3. 尿素標準液

尿素標準液を超純水で 2 倍の段階希釈にて希釈系列を作製する。

濃度：0（超純水のみ）、2.5、5、10、20、40、80、160μg/mL

調製量：各 100μL

希釈した尿素標準液保管期限：4℃、1 カ月

《Ⅲ．サンプルの準備》

細胞は、上清を除き、上記の細胞抽出液を 96well プレート（底面積：0.32cm²/well）の場合、40μL 添加して細胞を溶解して、サンプルとする。※抽出液量は、プレートの底面積に応じて調整ください。

《Ⅳ．測定方法》

1. 20μL のサンプル及び尿素標準液に 20μL の酵素活性化溶液と 40μL の基質溶液を加えて混和する。
※duplicate でのアッセイを推奨します
2. 添付のプレートシールもしくは蓋をして、37℃の恒温器中で 1 時間静置し、酵素基質反応を行う。
3. 酵素基質反応後、用事調製した尿素検出溶液を 180μL/well で加える。
※尿素検出溶液は自然光や蛍光灯下で少しずつ呈色してしまうため、尿素検出溶液の添加はリザーバー等を用いて迅速に行う等、できるだけ光に当たらないように留意して作業してください。
4. 添付のプレートシールでしっかりと密閉し、アルミホイル等で 96well プレートを遮光する。
注：尿素検出溶液は高濃度の硫酸、エタノールを含んでおり、加熱することから、揮発や漏れがないように、プレートシールをしっかりと密着させてください。取り扱いの際は、手袋、マスク、保護メガネ等を使用してください。
5. ホットプレート等を用いて、遮光下で 95℃、2 時間加熱する。
6. 加熱後、アルミホイルを外し、UV ランプ下で十分な呈色が認められるまで反応を促進させてください。UV ランプ下では 15 分～1 時間で十分な呈色が認められます。自然光や蛍光灯下では 1～2 時間程度必要になります。呈色の度合については図 1 の例を参照してください。
7. 吸光度を測定する（波長：540nm）

尿素濃度
160μg/mL

80μg/mL

40μg/mL

20μg/mL

10μg/mL

5μg/mL

2.5μg/mL

0μg/mL

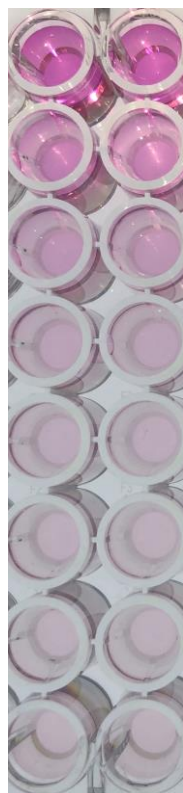


図 1：尿素標準液の呈色度合の例

《V. 標準曲線及びアルギナーゼ活性の計算方法》

各濃度の尿素標準液の吸光度を平均し、平均値から four-parameter logistic curve fit (4-PL)もしくは2次回帰曲線にあてはめて標準曲線を計算します（どちらの関数でもフィットします）。

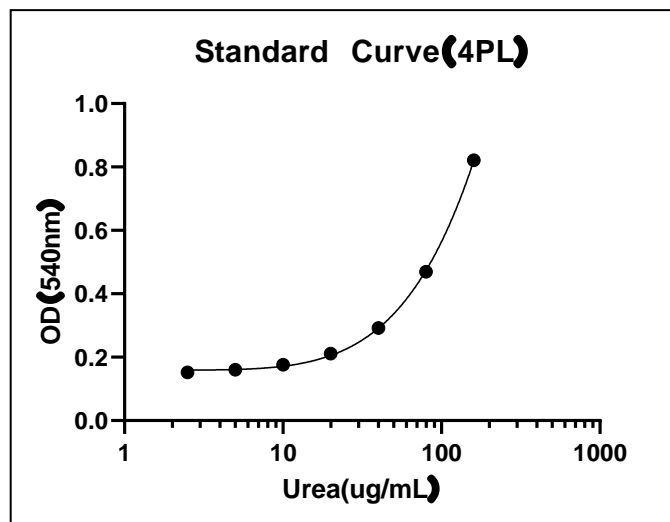


図 2 : 4-PL の回帰曲線例（使用ソフト : Prism8）

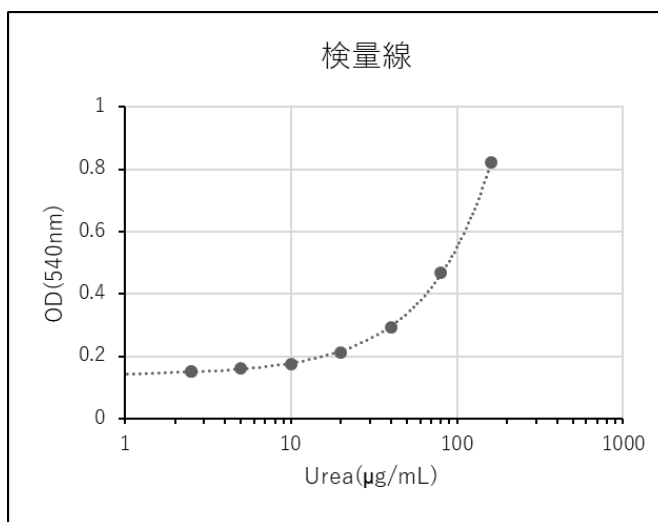


図 3 : 2 次回帰曲線例（使用ソフト : Excel）

アルギナーゼ活性(unit/mL)は、37℃の条件で1分間に1μmolのL-Arginineを1μmolのL-Ornithineと尿素に変換するものと定義しますので、以下の式で求めることができます。

アルギナーゼ活性(unit/mL) =

$$\frac{\text{標準曲線から求めた各サンプルの尿素量 (}\mu\text{g/mL)} \times 1000 (\mu \text{ モル換算}) \times 1000 (\text{mL 換算})}{60.06 (\text{尿素モル質量}) \times 60 (\text{反応時間 : 分}) \times 20 (\text{サンプル液量 : }\mu\text{L})}$$