

Collagen Quantitation Kit

Cat. No. COL-001

Edition Date : 2020 / 11 / 25

www.cosmobiousa.com

【1-1.】 Background

Collagen is the one of the main components of extracellular matrix, and accounts for about 30% of the whole human protein. Recent studies, the production of collagen are reduced in aged skin, the degradation and the accumulation of collagen found in a particular disease, such as has been shown. Therefore, it has become important in accurately quantifying technology health maintenance and disease diagnosis collagen.

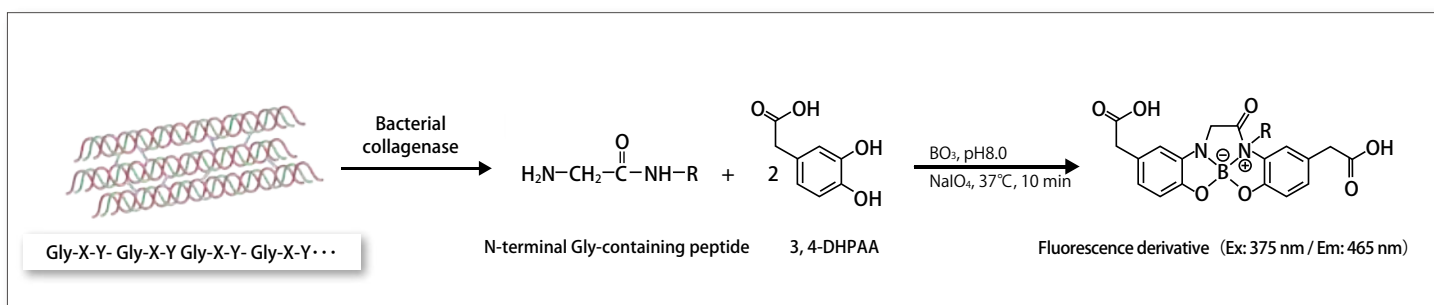


Figure 1 Principle of collagen determination

Collagen contains approximately 30 % Glycine (Gly) of whole amino acid residues in each molecule, and constitutes a repeated amino acid sequence, -Gly-X-Y- in which Pro or Hyp frequently appears at the X or Y position. The proposed assay method takes an advantage of this unique sequence of collagen as well as the remarkable specificity of bacterial collagenase that cleaves all collagen types at the position of N-terminal side of the Gly residue. Therefore, abundant N-terminal Gly-containing peptides such as Gly-Pro-Hyp, Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Pro, and Gly-Pro-Z (Z is other amino acid or oligopeptide) are produced from one molecule of each collagen, and greatly amplified fluorescence signals from these products are obtained by the reaction with 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA).

This kit is a highly specific and sensitive method for the assay of whole collagen in biological samples using a fluorogenic reagent, 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA). The 3,4-DHPAA reagent can selectively detect N-terminal Gly-containing peptides.

【1-2.】 Features

This kit can quickly measure the collagen in the food and cosmetics. Compared to the existing hydroxyproline method, there is no need of hydrochloric acid hydrolysis, it can be determined in a safe and simple procedure with a small amount of sample. This kit is suitable for quality control and product development during the manufacturing process.

- Simple procedure: takes only 2 - 3 hours
- Fast and convenient
- The kit can measure 96 tests

【 I - 3. 】 Kit Components

No.	Component	Content	Quantity	Storage
1	Enzyme Reagent (Collagenase)	200 μ L	1	4°C -10°C
2	Standard solution (500 μ g/mL Collagen)	300 μ L	1	
3	Buffer A	30 mL	1	
4	Fluorescence Reagent (3,4-DHPAA)	500 μ L	1	
5	Buffer B	15 mL	1	
6	NaIO ₄ solution	5 mL	1	

Required but not provided

PBS(-) (without Mg and Ca)

1.5 mL and 500 μ L micro-test tube

96 well Black Microplate

96 well Fluorescent Microplate Reader (Ex: 375 nm/Em: 465 nm)

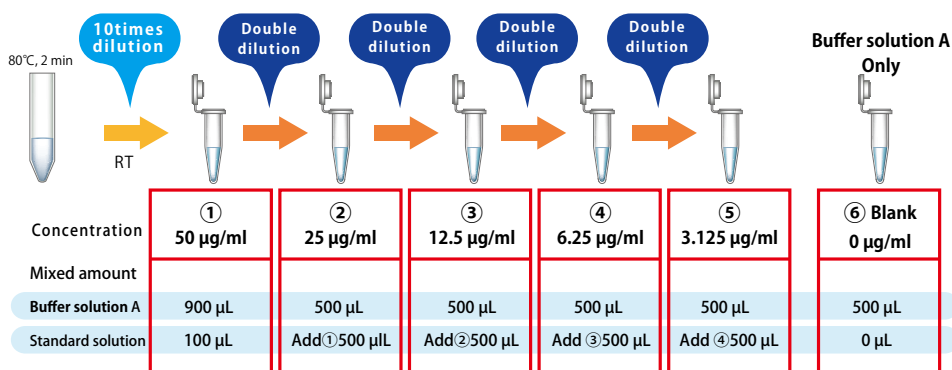
Sonicator

※ Please prepare a microcell cuvette if you are using a fluorescence spectrophotometer.

【 II-1. 】 Standards Preparation

Heat Standard solution (500 μ g / mL collagen) for 2 minutes at 80 °C and then cool it down to room temperature (as the Calibrator stock). Dilute 100 μ L of Calibrator stock with 900 μ L of Buffer A, constitute ① highest concentration (50 μ g / mL). The total quantity of Stp 1 will be 1 mL, and it can be prepared 50 μ g/mL in a tube x 20. The total quantity of collagen standard solution is 300 μ L, Hence it can be prepared 60 times (20 x 3).

Following, prepare ② 25 μ g / mL, ③ 12.5 μ g / mL, ④ 6.25 μ g / mL, ⑤ 3.125 μ g / mL, and ⑥ blank (BufferA only).



【 II-2. 】 Sample Preparation

1) Cell layer

Remove culture medium. Wash out each well with PBS(-) and homogenize the cell layer. (ex: 24 well plate: 500 μ L - 1 mL of PBS(-).) Transfer the cell lysate into micro-test tube and heat at 80 °C for 2 minutes.

2) Foods/Cosmetics

Sample of solid and jelly-like is weighed and measure it after being dissolved or extracted to collagen by adding a certain amount of Buffer A. As collagen concentration at the time of measurement is within the calibration curve, adjust the sample concentration with Buffer A in advance.

【 II-3. 】 Reagent Preparation

● Enzyme Solution Preparation

Dilute Enzyme Reagent with Buffer A (1:19)

● Fluorescent Solution Preparation

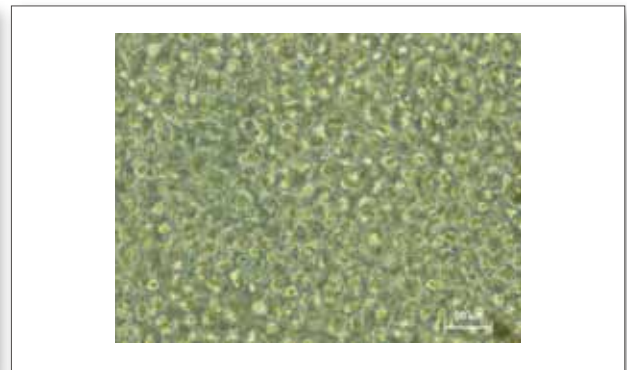
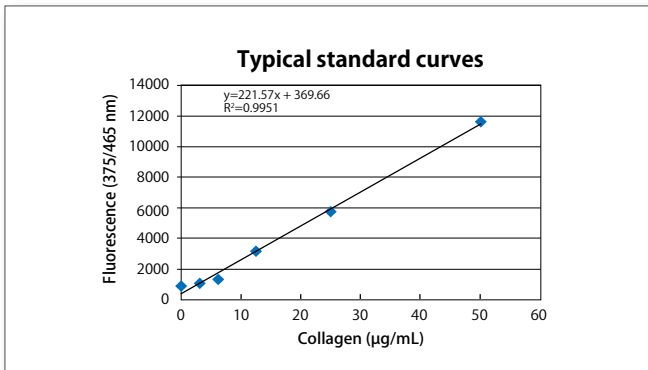
Dilute Fluorescent Reagent (3,4-DHPAA) with Buffer B (1:19)

【 III. 】 Measurement Protocol

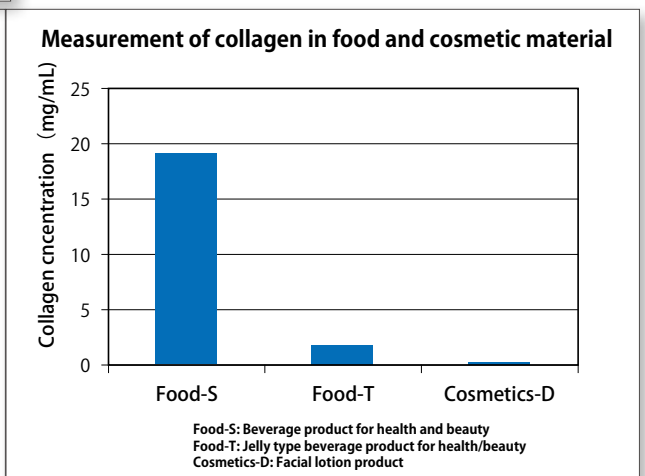
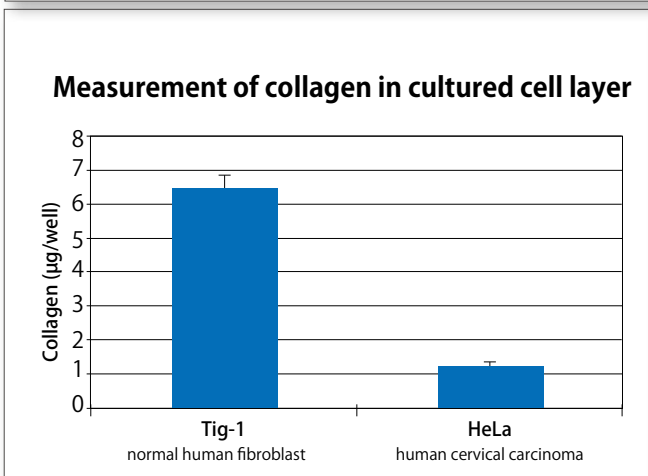
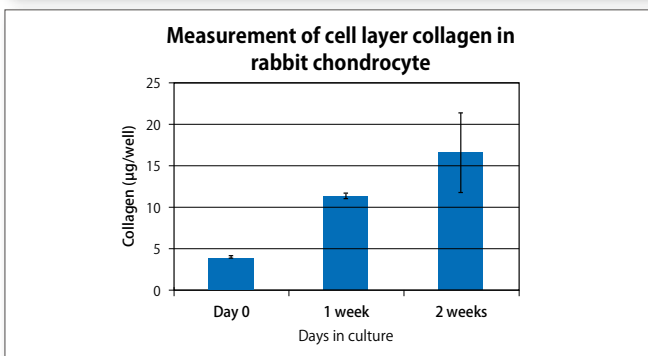
- 1 Transfer 25 μ L of prepared diluted standard solutions or samples into 500 μ L micro-test tube.
- 2 Add 25 μ L of the Enzyme Solution (diluted Enzyme Reagent with Buffer A (1:19)) into the micro-test tube.
In totally, it can be prepared the quantity 4 mL of Enzyme Reagent (200 μ L x the dilution range 20 times). It can be tested 160 times (25 μ L in a test x 160 tests = 4mL)
- 3 Heat the tubes at 37 °C for 1 hour.
- 4 Add 100 μ L of the Fluorescent Solution (Diluted Fluorescent Reagent (3,4-DHPAA) with Buffer B (1:19)) into each tube. In totally, it can be prepared the quantity 10 mL of Enzyme Reagent (500 μ L x the dilution range 20 times). It can be tested 100 times (100 μ L in a test x 100 tests = 10 mL)
- 5 Add 50 μ L of NaIO₄ solution into each tube. (It contains 5 mL in a kit, hence it can be used for 100 tests.)
- 6 Heat the tubes at 37 °C for 10 minutes.
- 7 Transfer the 100 μ L of the content of each tube into the wells of 96 well black microplate and then measure the fluorescence using fluorescence plate reader set at a wavelength (Ex:375 nm /Em:465 nm)
- 8 Create a standard curve by serial dilution of standard solutions as indicated in the below. Draw a smooth curve through these points to construct the calibration curve. Read the concentration in the samples from the calibration curve.

【IV.】 Assay examples

Measurement of cell layer collagen in a rabbit chondrocyte



Rabbit chondrocyte (phase contrast microscope)



【V.】 References

- [1] Selective and sensitive determination of peptides using 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent. Hasina Yasmin, Takayuki Shibata, Mohammed Shafikur Rahman, Tsutomu Kabashima, Masaaki Kai, *Analytica Chimica Acta*, 721 (2012) 162-166
- [2] Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions. Hasina Yasmin, Tsutomu Kabashima, Mohammed Shafikur Rahman, Takayuki Shibata, Masaaki Kai, *Scientific Reports* (May 2014) | 4 : 4950 | DOI: 10.1038/srep04950

10141



一般研究用キット

Collagen Quantitation Kit

コラーゲン定量キット

Cat. No. COL-001

2020年11月9日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景と測定原理

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、ヒト全タンパク質の約30%を占めます。最近の研究で、老化した皮膚においてコラーゲンの産生が低下していること、特定の疾病においてコラーゲンの分解や蓄積が見られること、などが明らかになっています。本キットは、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA) がN末端にグリシンを有するペプチドに選択的に結合し蛍光を発することを利用したコラーゲン定量キットです。

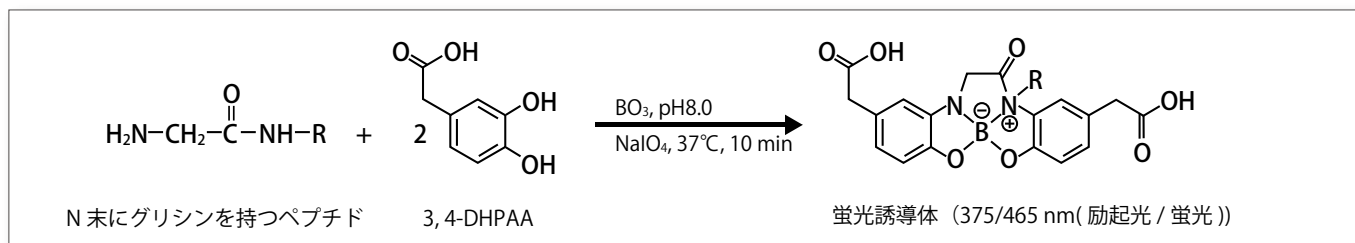


図1 キットの測定原理

コラーゲンは、Gly-X-Y (X, Yは主にプロリン、ヒドロキシプロリン) という3アミノ酸残基の繰り返し配列を持ちます。コラーゲンを微生物由来コラゲナーゼで分解すると、N末端にグリシンを有するペプチドフラグメントを大量に生成します。これを、3,4-DHPAAによって選択的に蛍光体に変換し、蛍光強度を測定するだけでコラーゲンの定量が可能となります。

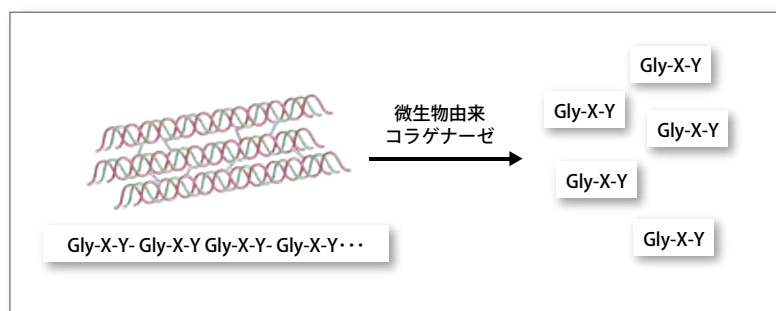


図2 コラーゲン定量の原理

【1-2】キットの特長

- 細胞層 (cell layer) および食品中、化粧品中のコラーゲンを迅速に測定することが可能
- 既存のヒドロキシプロリンを測定する方法に比べ、塩酸加水分解の必要がなく、少量のサンプルで、安全で簡単な手順で測定することが可能
- 細胞研究および食品・化粧品製造工程中の品質管理や商品開発に最適

【I-3】キット構成

本製品は 96 検体を測定できます。

保存温度：4～10℃

内容	容量	数量	取扱上の注意
酵素（コラーゲナーゼ）原液 (Enzyme Reagent [Collagenase])	200 µl	1 本	取り扱う際には眼鏡・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。
コラーゲン標準液 (500 µg/ml) (Standard Solution [500 µg/ml])	300 µl	1 本	
緩衝液 A (Buffer A)	30 ml	1 本	
緩衝液 B (Buffer B)	15 ml	1 本	
発蛍光試液 (3, 4-DHPAA 液) (Fluorescence Reagent)	500 µl	1 本	
NaIO ₄ 溶液 (NaIO ₄ solution)	5 ml	1 本	

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

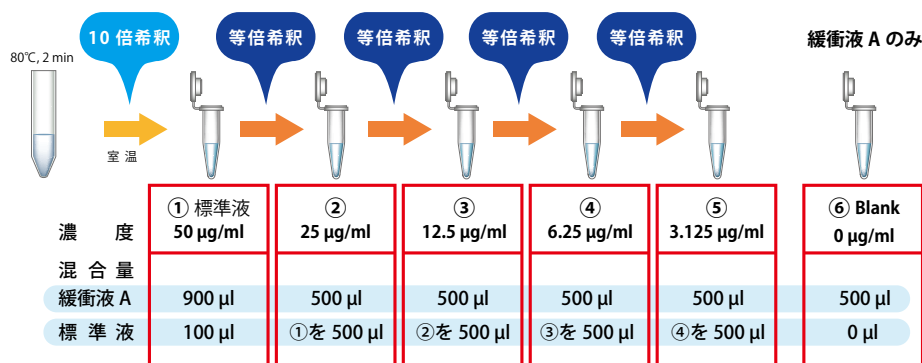
※本製品の測定は蛍光プレートリーダーでの測定を想定して設計しております。

- PBS(-)
- 蛍光プレートリーダーおよびブラックプレート
- 蛍光分光光度計で測定の場合は、マイクロセルをご用意ください。
- 1.5 ml および 500 µl マイクロテストチューブ
- 超音波破碎機

【II-1】コラーゲン標準液の調製方法

標準液（コラーゲン 500 µg/ml）を 80℃で 2 分間加熱します*。室温まで冷ました標準液（コラーゲン 500 µg/ml）を原液として緩衝液 A を用いて 10 倍希釈し、標準液の①最高濃度（50 µg/ml）を調製します。さらに本液を等倍希釈し、② 25 µg/ml ③ 12.5 µg/ml ④ 6.25 µg/ml ⑤ 3.125 µg/ml ⑥ ブランク（緩衝液 A のみ）を調製します。

※ 調製後の標準液は冷蔵で 1~2 週間安定ですが、冷蔵することでゲル状になりますので、80℃で 2 分間の加熱処理後使用ください。



新しい 1.5 mL マイクロチューブに②～⑥まで、ナンバリングし緩衝液 A を 500 µl ずつ分注します。①から 500 µl 取り②へ加え、よく混和します。②から 500 µl 取り③へ加えます。以後⑤まで同操作を繰り返し、スタンダードとします。⑥のブランクは緩衝液 A のみとします。

【II - 2】 サンプルの調製方法

① 細胞層 (cell layer) 中のコラーゲン量を測定する場合

培養上清を抜き取った後、PBS 洗浄 1 回行い、PBS で細胞をソニケーションする。(24 well プレートの場合、500 μ l ~ 1 ml)。この細胞懸濁液をチューブに入れて、80 $^{\circ}$ C、2 min 加温し、熱変性させて下さい。

② 食品・化粧品中のコラーゲン量を測定する場合

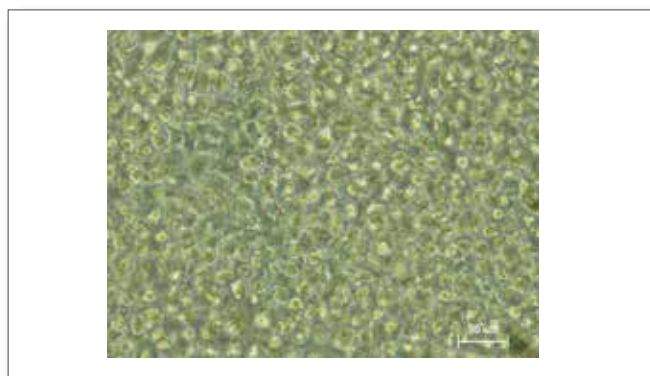
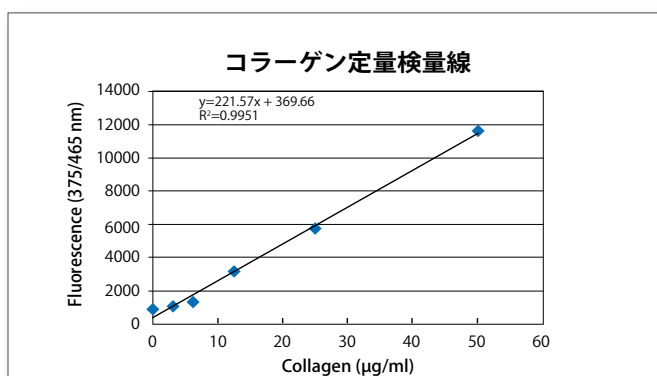
検体が固形およびゼリー状の場合は重量を測定し、これに一定量の緩衝液 A を加えてコラーゲンを溶解、もしくは抽出し測定に供して下さい。測定時のコラーゲン濃度が検量線内に入るようあらかじめ緩衝液 A で濃度調整して下さい。

【III - 1】 測定方法

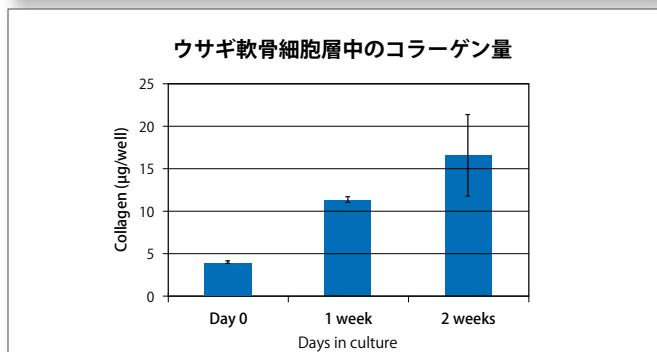
- 1 検量線作成のため標準液を 25 μ l 取り、全量 500 μ l 用のマイクロテストチューブに移します。また同様に、測定試料も 25 μ l 取り、別の全量 500 μ l 用のマイクロテストチューブに移します。
- 2 酵素原液を緩衝液 A で 20 倍希釈し、この溶液を 25 μ l 添加し攪拌します。
- 3 37 $^{\circ}$ C で 1 時間加温します。
- 4 発蛍光試液 (3, 4-DHPAA 液) を緩衝液 B で 20 倍希釈し、この溶液を 100 μ l 添加し攪拌します。
- 5 NaIO₄ 溶液を 50 μ l 添加し攪拌します。
- 6 37 $^{\circ}$ C で 10 分間加温します。
- 7 マイクロテストチューブ内の溶液 100 μ l を 96 Well ブラックプレートに移し、375/465 nm (励起光 / 蛍光) で蛍光強度を測定して下さい。
- 8 標準液の蛍光値より検量線を作製し、測定試料液中のコラーゲン濃度を算出して下さい。

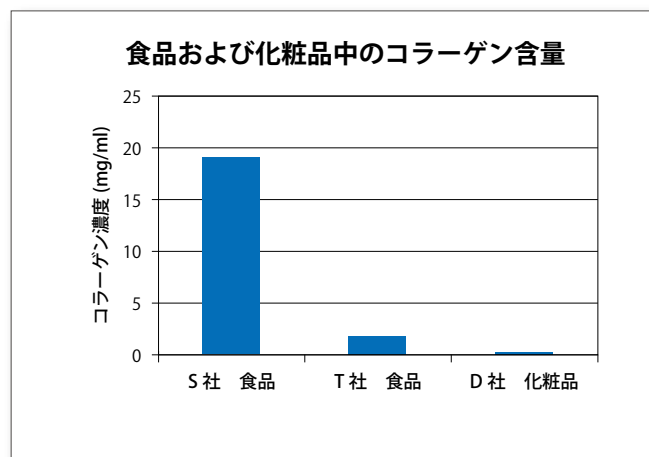
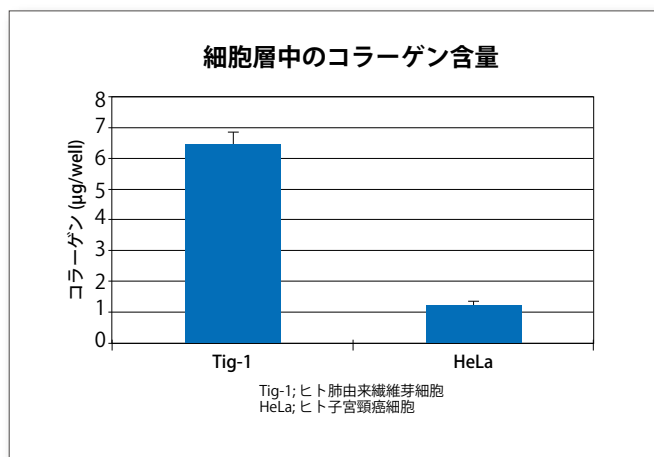
【IV】 コラーゲン定量の例

本キットを用いたウサギ軟骨細胞層中のコラーゲン量の定量
播種前 (細胞浮遊液) および培養後の軟骨細胞層中のコラーゲン量を定量した



ウサギ軟骨細胞の位相差顕微鏡写真





【V】 参考文献

- [1] Selective and sensitive determination of peptides using 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent. Hasina Yasmin, Takayuki Shibata, Mohammed Shafikur Rahman, Tsutomu Kabashima, Masaaki Kai, *Analytica Chimica Acta*, 721 (2012) 162-166
- [2] Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions. Hasina Yasmin, Tsutomu Kabashima, Mohammed Shafikur Rahman, Takayuki Shibata, Masaaki Kai, *Scientific Reports* (May 2014) | 4 : 4950 | DOI: 10.1038/srep04950

【VI】 関連特許

本キットに関連し、国立大学法人長崎大学より下記特許出願がされております。

【特許番号】 特開 2012-194170

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送

〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2
 コスモ・バイオ株式会社 札幌事業所宛

E-mail

primarycell@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

