



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

2019年3月26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。

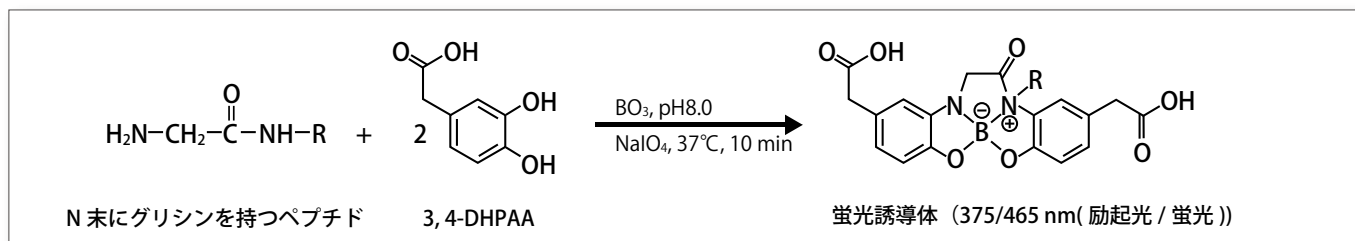


図1 キットの測定原理

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ー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。

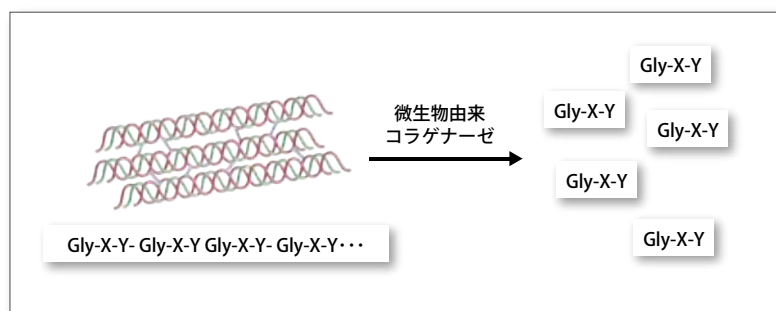


図2 コラーゲン定量の原理


【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	危険表記および取扱上の注意
酵素（コラゲナーゼ）原液 (Enzyme Reagent [Collagenase])	200 μl	1 本	 危険 ◆飲み込むと有害のおそれ ◆皮膚刺激 ◆強い眼刺激 ◆生殖能又は胎児への悪影響のおそれ ◆消化管、神経系の障害 ◆呼吸器への刺激のおそれ ◆長期又は反復ばく露による腎臓の障害
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）

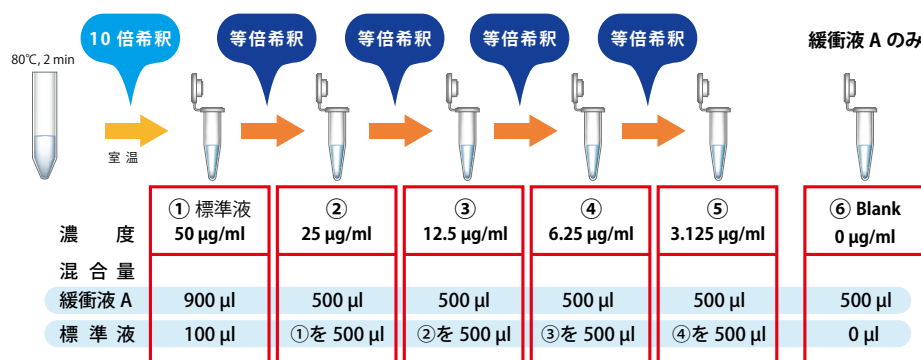
※本製品の測定は蛍光プレートリーダーでの測定を想定して設計しております。

- 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

【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℃、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ください。測定時のコラーゲン濃度が検量線内に入るようにあらかじめ緩衝液 A で濃度調整してください。

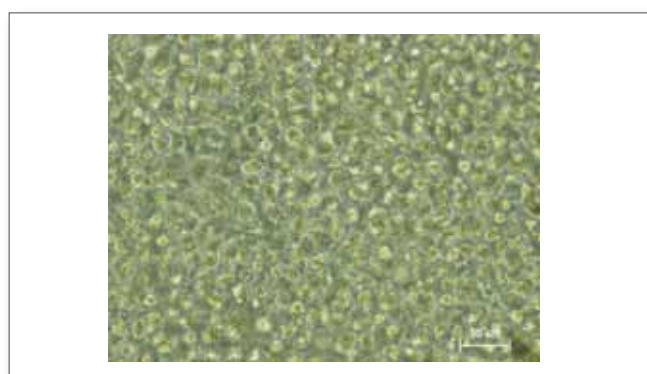
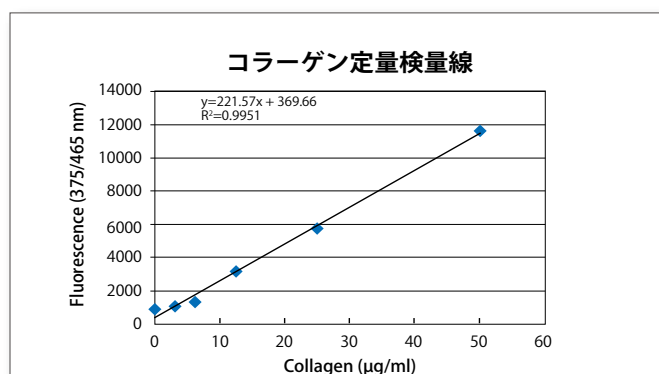
【III - 1】 測定方法

- 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 添加し撹拌します。
- 3 37℃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 添加し撹拌します。
- 5 NaIO₄ 溶液を 50 μ l 添加し撹拌します。
- 6 37℃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ください。
- 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ください。

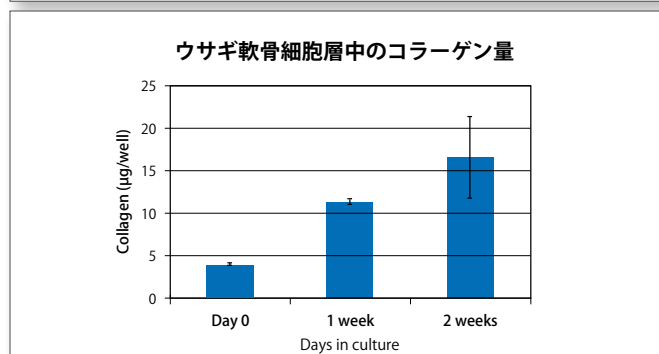
【IV】 コラーゲン定量の例

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

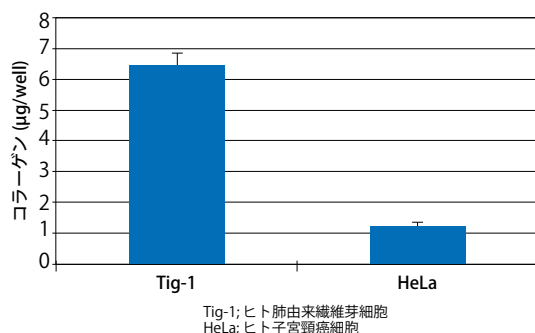


ウサギ軟骨細胞の位相差顕微鏡写真

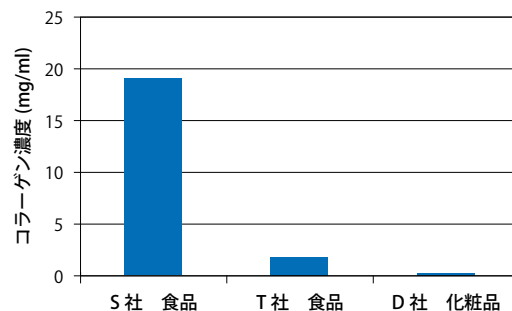




細胞層中のコラーゲン含量



食品および化粧品中のコラーゲン含量



【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いて投稿された論文、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。



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）

TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp
URL : <http://www.primarycell.com/>