

「コラーゲン・ステイン」キット
コラーゲンの簡便染色・定量法

はじめに

近年、コラーゲン研究の進展には、めざましいものがあります。
それと共に、専門外の方でも、手軽にできるコラーゲン染色や定量方法の開発が待たれて
おりました。

「コラーゲン・ステイン」キットは、この要望に応えたものです。小組織切片中のコラ
ーゲンと、非コラーゲン蛋白の分別定量、さらには、その localization の観察を可能に
しました。

腎、肝、血管壁等、各種組織の線維化の研究に、又、新薬の探索研究にと、幅広くご利用
いただけたらと存じます。



--- 目 次 ---

1. 測定原理
2. キット内容と保存性
3. 取扱い上の注意
4. 準備する装置と試薬
5. 試料の作成
6. 染色法
7. 定量法(1)
8. 定量法(2)
9. 計算法

1. 測定原理

本キットは、「A染色液」と「B抽出液」から成り、「A染色液」は、赤色剤と緑色剤の二剤を含む。

赤色剤は、組織切片中のコラーゲンとのみ、緑色剤は、非コラーゲン蛋白とのみ特異的に結合し、赤色と緑色に染めわける。

又、結合量は、コラーゲンと非コラーゲン蛋白量に比例する。

「B抽出液」は、赤色剤とコラーゲン、緑色剤と非コラーゲン蛋白との結合を解離させ、二剤を抽出する。

この抽出液のO. D. (赤色剤530nm、緑色剤605nm)を測定し、その値から、コラーゲン量及び非コラーゲン蛋白量を知る。

なお、本キットは、非特異的結合を最小にし、抽出量を最大にするよう、工夫されている。

2. キット内容と保存性

A 液 : 染色液 16ml
(含赤色剤、緑色剤)

B 液 : 抽出液 80ml
(含メタノール)

保存性 : 遮光下、室温にて、10カ月間有効

3. 取扱い上の注意

- 皮膚、衣服に試薬を付着させない。
- 机、床等にこぼした時は速やかにふきとる。
- 実験は、研究目的により条件が異なり、それに応じた試薬の利用が考えられる。
これに関しては、各研究者の責任において、もっとも適した使用法、実験条件等を検討した上、ご利用願いたい。

4. 準備する装置と試薬

褐色試験管 : $\phi 10\text{mm} \times 75\text{mm}$

ピペット : $200\mu\text{l}$ 、 1ml 、 2ml 他

マイクローム又はクリオスタット

プレパラート用ガラス	Xylol
広口瓶	Xylol/EtOH 混液 (1:1)
フタ付き箱	EtOH
顕微鏡	EtOH/H ₂ O 混液 (1:1)
分光々度計	精製水
	アイスボックスと氷

5. 試料の作成 : 常法により、パラフィン包埋標本を作成する。

- ①組織片を採取する。
- ②ただちに、固定液(10%ホルマリン液)にひたし、24時間以上放置する。
- ③組織片を、固定液より取り出し、脱水後、パラフィン中に包埋する。
- ④カミソリ(マイクローム)で厚さ $4\sim 15\mu\text{m}$ に薄切する。
(広さ $3\sim 5\text{mm} \times 3\sim 5\text{mm}$)

6. 染色法

- ①作成した試料を、プレパラート用ガラスに塗布する。
(のりは、グリセリン : 卵白 = 1 : 1 の混液を用いる。)
- ②常法により脱パラフィンする。 参照:定量法(2)の項
- ③フタ付き箱(Ex. タップウェア等)に入れる。
- ④プレパラート上の切片に、「A染色液」 $200\mu\text{l}$ を滴下する。
- ⑤フタをする。
- ⑥室温にて、30分間放置する。

- ⑦プレパラートを精製水につける。
- ⑧色が出なくなるまで、精製水を交換する。
- ⑨顕微鏡下で観察する。

7. 定量法(1) : 染色したプレパラート試料を用いる。

- ①プレパラート試料に、「B抽出液」200 μ lを滴下する。
- ②同液をピペットで採取し、褐色試験管に移す。(①、②の操作を5回くり返す)
- ③採取液のO. D. (530, 605nm)を測定する。

8. 定量法(2)

- ①褐色試験管(10mm \times 75mm)に番号をつける。
- ②作成した試料を試験管に入れる。
- ③脱パラフィン操作を行う。
 - a) Xylol 1mlを加え、5分間放置する。
 - b) Xylolを除去する。
 - c) Xylol/EtOH 混液(1:1) 1mlを加え、5分間放置する。
 - d) Xylol/EtOH 混液を除去する。
 - e) EtOH 1mlを加え、5分間放置する。
 - f) EtOHを除去する。
 - g) EtOH/H₂O 混液(1:1) 1mlを加え、5分間放置する。
 - h) EtOH/H₂O 混液を除去する。
 - i) 精製水 1mlを加え、5分間放置する
 - j) 精製水を除去する。
 - k) 氷冷水 1mlを加える。(次の操作に入るまで、試料の乾燥を防ぐため)
- ④冷水を除去し、「A染色液」200 μ lを加える。
- ⑤室温下、30分間ゆっくり振盪する。
- ⑥「A染色液」を除去する。
- ⑦精製水 2mlを加え、5分間放置する。
- ⑧精製水を除去する。
 - ⑨洗浄操作(⑦、⑧)は、精製水の着色がなくなるまで行う(通常4~5回)。
- ⑨「B抽出液」1mlを加え、軽く振盪後1分間放置する。
- ⑩上清を採取し、O. D. (530, 605nm)を測定する。

9. 計算法

次式により、コラーゲン量、非コラーゲン蛋白量を算出する。

$$\text{Collagen (mg)} = \frac{\text{O. D. 530} - 0.254^* \times \text{O. D. 605}}{40.8^*}$$

$$\text{Non Collagen Protein} = \frac{\text{O. D. 605}}{2.04^*}$$

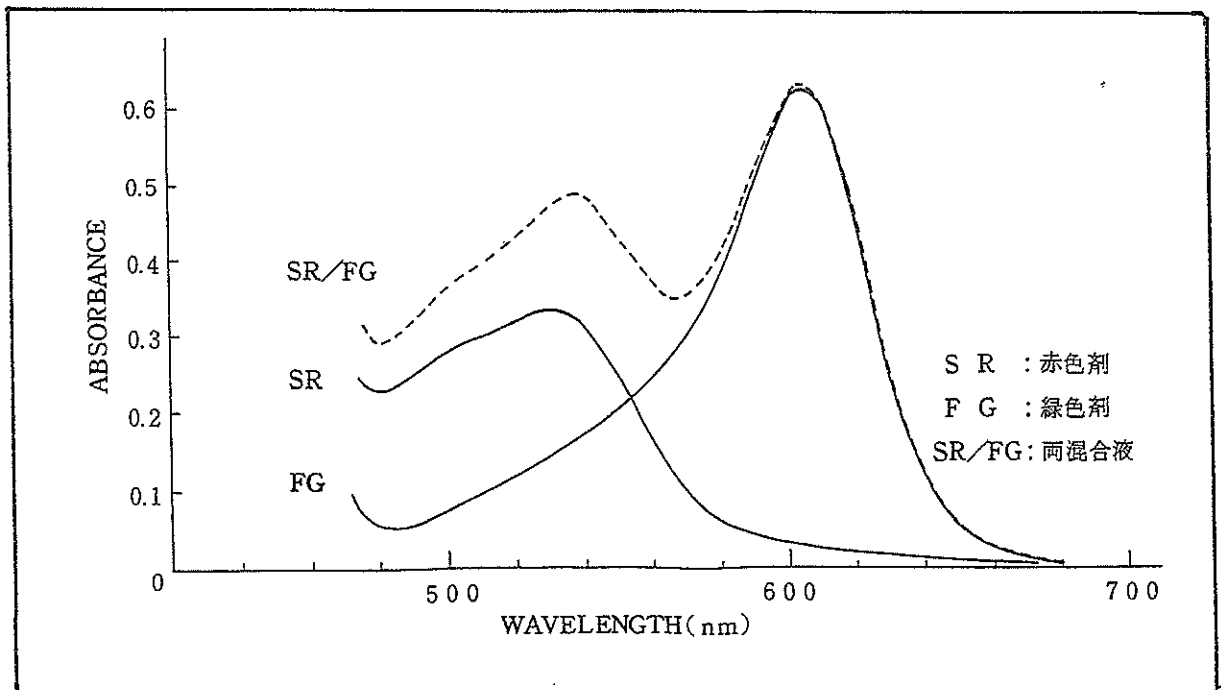
- ① O. D. 530 : コラーゲンと結合した赤色剤の吸光度。
- ② O. D. 605 : 非コラーゲン蛋白と結合した緑色剤の吸光度。
- ③ 係数0.254 : 緑色剤の O. D. 605 値の 25.4% が赤色剤の O. D. 530 値に加わっているの
で、その値を差引き、真の O. D. 530 値を求める。
- ④ 係数40.8 : コラーゲン1mgに結合する赤色剤の O. D. 530 値。
- ⑤ 係数2.04 : 非コラーゲン蛋白1mgに結合する緑色剤の O. D. 605 値。
- ⑥ *印の係数 : ラットの肺及び肝臓中のコラーゲン量をヒドロキシプロリン量で、
非コラーゲン蛋白をキールダール法で各々求め、本色剤の結合量と比較して算出した
ものである。従って研究目的、さらにはその試料の種類に応じて、係数の変更が必要
な場合、各研究者自身でご検討願いたい。

参考文献

Lopez de Leon A., Rojkind M. :

A simple micromethod for collagen and total protein determination
in formalin-fixed paraffin-embedded sections.

J. Histochem. Cytochem. 33 : 737-743, 1985



10 キットの貯法と有効期限

- ・未開封時、遮光下2-8℃で10ヵ月。

11 問合せ先

- ・コラーゲン技術研修会 (Fax. 0424-95-1990) 又は、お近くの試薬販売店へ。
- ・万全を期して出荷しておりますが、万一、構成試薬の不足や変質が有りましたら、直接ご連絡下さい (Tel. 0424-95-1995)。
- ・特種項目の開発、製造にも応じています。ご相談下さい。

12 製品のご紹介

- ・「K11」コラゲノキット

東京医科歯科大学永井裕教授、テネシー大学K. Terato助教授のご指導、ご助言により、世界で最初に開発されたコラゲナーゼ活性測定試薬。
発売以来25年、国内外での使用例、記載文献多数。

- ・蛍光標識タイプI (ウシ)、タイプII (ウシ関節)。

高感度ザイモグラフィーの基質に、MMPsの活性測定に、代謝研究に。

- ・「K41」「K42」タイプIIコラーゲン (ウシ由来)

リウマチ関節炎を研究目的に、1982年、世界で最初に製品化され、この分野での標準品として、使用されています。

- ・独自の精製法による各種動物由来のタイプIIコラーゲン

免疫用に、K43 (ニワトリ)、K44 (ブタ)。

ELISAに、K45 (ラット)、K46 (ウシ)、K47 (ニワトリ)、
K48 (ブタ)、K49 (ヒト)。他にK49S (サル)。

- ・「K71」「K72」「K73」抗タイプIIコラーゲン抗体検索システム
ヒト用、ラット用及びマウス用の3種。

- ・「K34」タイプIVコラーゲン (ヒト由来)

分子サイズが均一で、国内で最もお使い易い価格 (1mg/ ¥34,000)。

- ・「K61」コラーゲンステインキット 姉妹品「K62」コラーゲンレッド
コラーゲンの簡便染色定量キットとして世界で最初に製品化されたもの。

- ・「K77」タイプIIコラーゲン測定キット (ELISA、コート済)

- ・「K79」タイプIVコラーゲン測定キット (ELISA、コート済)

ヒト及び動物用。

- ・「K81 デオキシピリジノリン」「K82 ピリジノリン」

骨粗鬆症の研究に。

- ・「K35 NC1」タイプIVコラーゲンのNC1領域を精製

腎炎モデルの作製に。簡単な投与で確実に発症。

- ・「K35 MONO 抗NC1モノクローナル抗体 (マウス由来)」

障害腎と健常腎を染め分ける世界唯一の製品。間接的免疫組織染色に。

- ・「K36 抗NC1抗体測定キット」ヒト用及びラット用。

腎炎検体から検出します。世界で最初に開発。

初版1983

研究試薬のご案内

1. コラーゲン関節炎の作製に

「K41 タイプIIコラーゲン液」 「K42 末」
コラゲナーゼ (MMPs) 活性測定試薬
「K11 コラゲノキット CLN100」

- ・世界で最初に製品化され30年
- ・国内外の文献に多数紹介されています
- ・抗タイプIIコラーゲン抗体測定キットもあります

2. 腎炎モデルの作製に

「K35 NC1」

- ・腎糸球体よりタイプIVコラーゲンNC1領域を精製
- ・簡単な投与で、確実に発症し、長期に観察できます
- ・腎疾患治療薬の開発、スクリーニングに
- ・薬剤の腎機能低下者への影響予測に
- ・自己免疫の研究に

3. ヒト及び動物腎炎での抗体測定に

「K36 抗NC1抗体測定キット ELISA」

4. 障害腎の免疫組織染色に

「K35M0N0 抗NC1モノクローナル抗体」

- ・健常腎を染色せず、障害腎のみを染色します

●お問い合わせ先

販売 コスモ・バイオ (株) Tel. 03-5632-9610
Fax. 03-5632-9619

開発 コラーゲン技術研修会

CRC



COLLAGEN RESEARCH CENTER
1-10-1 Kamikiyoto, Kiyose, Tokyo 204-0013, Japan
Tel+81-424-95-1995 Fax+81-424-95-1990