COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

For research use only. Not for clinical diagnosis.

Collagenase assay kit

(Code No. AK37)

August 30, 2022

Introduction

Collagenase has an important role on the collagen metabolism and cleaves collagen, yielding 1/4 and 3/4 collagen fragments. Collagenase Assay Kit (PMC-AK37) is designed to quantify collagenase activity using a fluorescent-labeled Type Ⅰ collagen as a substrate.

This kit provides a convenient system for studying, for example, arthritis synovial in which collagenase activity can be detected.

Components

Component	Quantity	Storage
Fluorescent-labeled collagen	12 mL ×2	4-10ºC
Buffer A	130 mL×1	4-10ºC
Buffer B	130 mL×1	4-10ºC

One kit contains regents for 240 samples using a fluorometer or 480 samples using a fluorescent microplate reader.

Additional Materials Required

・distilled water

・Fluorometer or fluorescent microplate reader

Prepare reagents

・Substrate Solution

Mix equal volumes of fluorescent-labeled collagen and Buffer A. Keep dark on ice until needed for experiments.

Note: This working solution should not be stored. Ready to use.

・Sample Diluent

Dilute Buffer A with an equal volume of distilled water. Keep on ice until needed for experiments.

Protocol <Fluorometer>

Prepare tubes for samples, blanks, and Substrate Solution.

1. Add 100 uL of Substrate Solution into each tube.
2. Add 100 uL of sample into each tube and mix thoroughly. For Total Reaction Substrate Solution and Blank, add 100 µLof Sample Diluent into each tube. In the case that collagenase activity will be high, the samples must be diluted with Sample Diluent.
3. Incubate sample and blank tube at 35ºC for 1-3 hours and Total Reaction Substrate Solution tube at 80ºC for 3 minutes.
4. Add 600 uL of cool Buffer B into each tube and mix thoroughly. Keep on ice for 15 minutes, and then centrifuge at 10,000 rpm for 10 minutes at 4ºC.
5. Collect the supernatant and examine the sample by fluorometer with an excitation filter of 495 nm and an emission filter of 520 nm.

Note: For microtiter plate wells, use half the amount of reagents for each well.

ACTIVITY VALUE

One unit of collagenase activity is defined as the cleavage of 1 ug of collagen per minute. Since 0.5mg/ml of collagen is used as a substrate in this assay kit, collagenase activity is calculated by the following equation:

(Substrate Solution; 100 uL, Samples; 100 uL)

Collagenase activity (units/ml) =

$$\frac{\text{(Fluorescence of samples - Fluorescence of blank)}}{\text{(Fluorescence of Substrate Solution – Fluorescence of blank)}} \times \frac{\text{50 ug}}{\text{Reaction time}} \times \frac{1}{\text{0.1 mL}}$$

Notice to Purchaser

This product is to be used for Research Purposes Only. It is not to be used for Drug or Diagnostic Purposes, nor is it intended for Human Use. Primary cell products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without the express written consent of Primary Cell Co., Ltd.

Except as otherwise expressly set forth in this use manual, Primary Cell dose not make any representation or warranties or conditions of any kind, either express or implied, with respect to the products, or information disclosed hereunder, including, but not limited to, the implied warranties of merchantability, fit for a particular purpose, or noninfringement of the intellectual property rights of third parties.

COSMO BIO CO., LTD.

【JAPAN】
TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: 81-3-5632-9619
URL: https://www.cosmobio.co.jp/

COSMO BIO USA

【Outside Japan】
2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: info@cosmobiousa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600
URL: www.cosmobiousa.com

For research use only. Not for clinical diagnosis.

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

一般研究用キット

コラゲナーゼアッセイキット
(Collagenase assay kit, Code No. AK37)

2022 年 8 月 30 日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

コラゲナーゼはコラーゲンを 1/4 および 3/4 のフラグメントに分解する酵素として知られており、コラーゲン代謝の重要な役割を担っております。

本キットは、蛍光標識 I 型コラーゲンを基質としたコラゲナーゼ活性測定キットです。炎症部位の組織液などのコラゲナーゼ活性測定にご利用下さい。

《Ⅰ-1. キット構成》

内　　容	容量	本数	保存温度	取扱上の注意
蛍光標識コラーゲン Fluorescent-labeled collagen	6ml	2 本	4～10℃	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。
緩衝液A Buffer A	100ml	1 本	4～10℃	
緩衝液B Buffer B	150ml	1 本	4～10℃	

※本製品は、蛍光分光光度計(セミマイクロセル利用)で 240 検体分、蛍光プレートリーダー利用で 480 検体分測定することができます。

※本製品の測定は、蛍光（蛍光試薬 FITC）を測定できる機器が必要になります。

※精製水を別途にご用意願います。

《Ⅰ-2. キットの特徴》

・I 型コラゲナーゼ活性を測定することができる。

《Ⅱ. 試薬調製》

（1）基質液

蛍光標識コラーゲンと緩衝液 A を等量混合し、使用するまで遮光した状態で氷冷します。用事調製のため必要量調製してください。

（2）検体希釈液

緩衝液 A と精製水を等量混合し、使用するまで氷冷します。

《Ⅲ．測定方法-セミマイクロセルを使用した蛍光分光光度計の測定の場合》

はじめに測定する検体の本数および 2 本(反応基質総量用、ブランク用)のチューブを用意します。

（1）各チューブに基質液を 100μl ずつ分注する。

（2）基質液が入っているチューブに検体 100μl を加えてよく混合させる。反応基質総量用およびブランク用のチューブには検体希釈液 100μl を加えてよく混合させる。検体に含まれる酵素量が多い場合は検体希釈液で希釈してから添加する。

（3）反応基質総量用チューブを除く全てのチューブを 35℃でインキュベートする（1～3 時間程度)。反応基質総量用チューブのみ 80℃で 3 分間インキュベートする。

（4）全ての各チューブに冷却した緩衝液 B 600μl を加え、強く撹拌し氷上で 15 分間静置した後、冷却遠心(4℃、10,000rpm、10 分間)する。

（5）上清を回収し、励起フィルター（Excitation filter）: 495nm, 蛍光フィルター（Emission filter）: 520nm で蛍光を測定してください。

※蛍光プレートリーダーで測定する場合は、上記の試薬容量を全て半量にしてご使用ください。

《Ⅳ．コラゲナーゼ活性の計算方法》

Ⅰ型コラゲナーゼの活性(unit)は、1 分間に 1μg のコラーゲンを消化するものと定義されています。基質液中に含まれるコラーゲン濃度は 0.5mg/ml になりますので以下のように求めることができます。

コラゲナーゼ活性(units/ml) =

$$\frac{(\text{検体の蛍光強度})-(\text{ブランクの蛍光強度})}{(\text{反応基質総量の蛍光強度})-(\text{ブランクの蛍光強度})} \times \frac{50(\mu g:\text{コラーゲン})}{\text{反応時間（分）}} \times \frac{1}{0.1(\text{ml:検体量})}$$

※基質液 100μl、検体 100μl で測定した場合の計算式になります。

《本製品をご利用になられた文献、発表データ 》

本製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。

送付先：〒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　札幌事業部　あて郵送
または　primarycell@cosmobio.co.jp　あて PDF ファイル送信

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