COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

**For research use only. Not for clinical diagnosis.**

**Catalog No. AK70**

# Collagen Glycation Assay Kit, Glucose / Fructose

April 16, 2019

## INTRODUCTION

The non-enzymatic reaction of reducing carbohydrates with lysine side chains and N-terminal amino groups of macromolecules (proteins, phospholipids, and nucleic acids) is called the Maillard reaction or glycation. This reaction is initiated by the nonenzymatic reaction of reducing sugars with free amino groups on proteins to form Amadori products. The Amadori products undergo a variety of irreversible dehydration and rearrangement reactions, leading to the formation of advanced glycation end products (AGEs). AGEs have adverse effects on the functional properties of proteins. Many AGEs have fluorescent and covalent cross-linking properties. The accumulation of AGEs is thought to play an important role in the pathogenesis of diabetic patients and the aging process. The collagen that forms bone, skin, and blood vessel is also glycated.

The Collagen Glycation Assay Kit, Glucose / Fructose can detect the fluorescent AGEs produced by the glycation reaction between collagen and sugar on an ongoing basis. The inhibitory effect of samples on the glycation of collagen can be assayed in a 96-well plate. This kit provides sufficient reagents to perform up to 192 assays.

This kit tests the ability to inhibit AGE formation and would be useful for checking usefulness of functional foods or cosmetic materials.

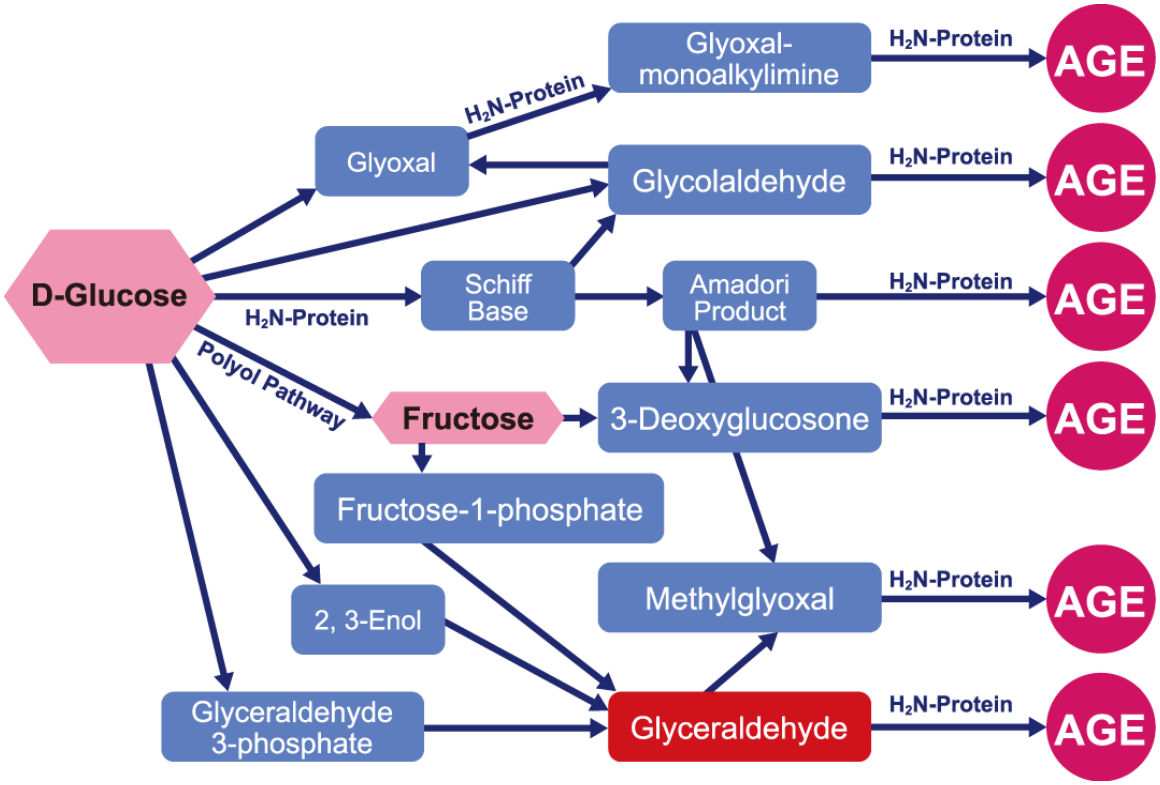



Figure 1. Possible routes for the formation of advanced glycation end-products (AGEs)

## 《 Assay principle 》

The collagen gel formed in 96-well plates generates fluorescence after long-term incubation with glucose or fructose at 37°C. Some reagents or natural products inhibit this reaction. The Collagen Glycation Assay Kit, Glucose / Fructose is a complete assay system, which is designed to measure fluorescent AGEs using a fluorescence micro plate reader equipped with a 370 nm excitation filter and a 440 nm emission filter.

## 《I. Kit components 》

| Components | Quantity | Storage |
|---|---|---|
| Collagen Solution | 10 mL | 4°C |
| Glucose Solution (200 mM) | 10 mL | |
| Fructose Solution (200 mM) | 10 mL | |
| Sample Dilution Buffer | 30 mL | |
| Aminoguanidine Solution (20 mM): Positive Control | 0.5 mL | |

* One kit contains sufficient reagents for 192 assays (tubes or 96-well plates)
* Additional materials required:

- 96-well black plate (sterile, clear bottom)
  Greiner [µCLEAR-PLATE BLACK Cat. No. 655090] is recommended.
- Fluorescent microplate reader
  (Mode: fluorescence bottom reading, excitation wavelength: 370 nm, emission wavelength: 440 nm)

## 《II. Assay protocol: 96-well plate》

(1) Collagen solution is stored on ice (<10°C) before testing.

(2) Add 50 µL of the collagen solution to the 96-well black plate.
Incubate the plate for 18–24 h at 37°C with high humidity to avoid the wells drying up (do not use a $CO_2$ incubator). The collagen solution changes into a white gel.

(3) Prepare the positive control by diluting the 20 mM aminoguanidine solution to concentrations of 0, 0.8, and 4 mM with sample dilution buffer.

(4) Dissolve the samples with the sample dilution buffer and filter through a 0.22-µm filter. Add **10 µL** of the 0, 0.8, 4, and 20 mM aminoguanidine solutions (positive control) or samples to each well.

(5) Add **50 µL** of (i) sample dilution buffer, (ii) 200 mM glucose, or 200 mM fructose solution to each well. Mix thoroughly.

(6) Immediately, start reading the standard and sample wells using a fluorescent microplate reader at an excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 440 nm by fluorescence bottom reading. Record this fluorescence intensity before incubation **(0 week:A).**

(7) Incubate the plate for **1, 2, 3, and 4 weeks (10–30 days)** at 37°C in high humidity conditions to avoid the wells drying up (do not use a $CO_2$ incubator).

(8) Read the fluorescent intensity after **1, 2, 3, and 4 weeks (10–30 days:B)** with a fluorescent microplate reader at 37°C.

(9) The inhibitory effects of the samples on glycation are calculated as follows.

| Fluorescent intensity B (1,2,3 and 4 weeks) | − | Fluorescent intensity A (0 week) | = | Inhibitory effect of glycation |
|---|---|---|---|---|

## 《III. Assay Example 》

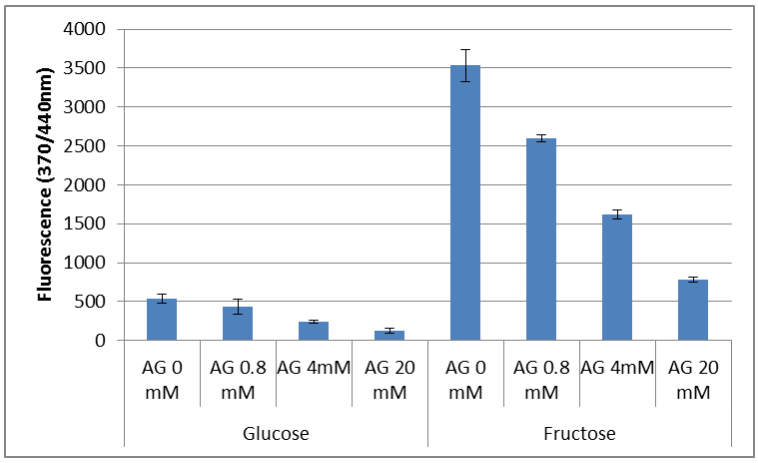



Figure 2. The glycation of the collagen gel after the addition of glucose or fructose and the inhibitory effects of aminoguanidine.

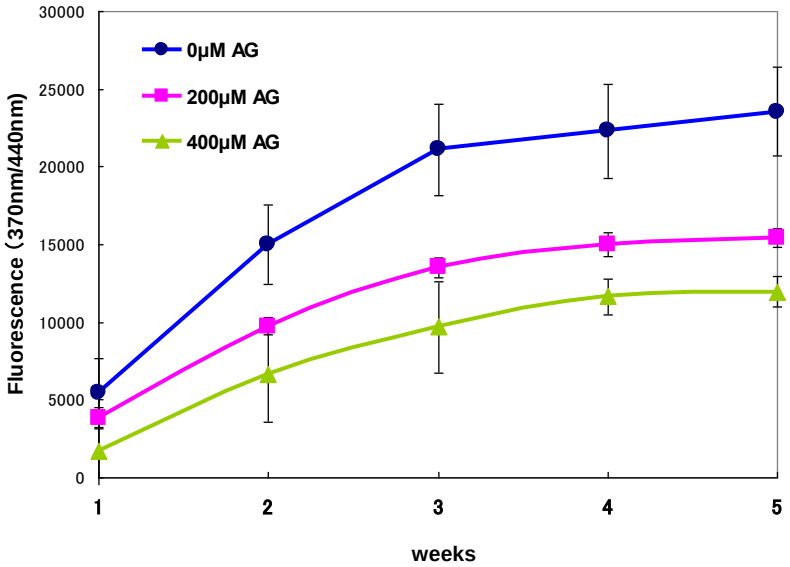



Figure 3. Time course of the glycation of the collagen gel after the addition of fructose and the inhibitory effects of aminoguanidine. The formation of AGEs with fructose was measured on the basis of the fluorescence after incubation at 37°C for 1, 2, 3, 4, and 5 weeks.

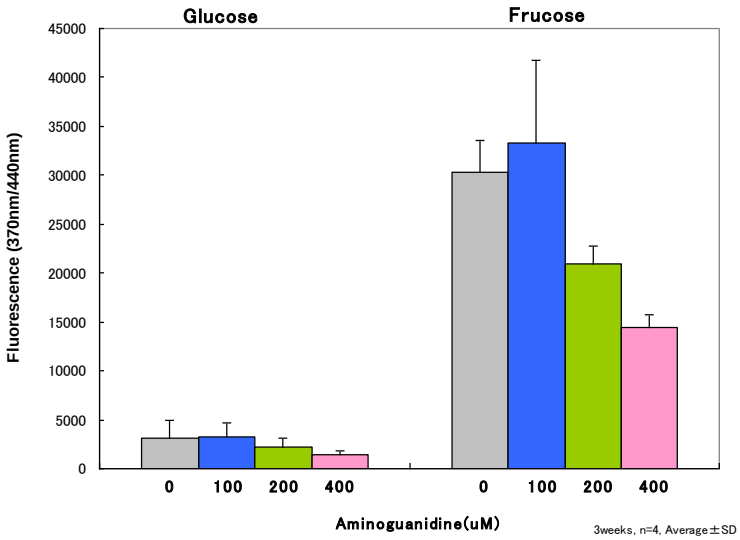



Figure 4. Effects of glucose or fructose on the glycation of collagen with glyceraldehyde and the inhibitory effects of aminoguanidine. The formation of AGEs was measured on the basis of the fluorescence after incubation at 37°C for 3 weeks.

## 《IV. References》

(1) A. Nishikawa, T. Taira, K. Yoshizato. *In Vitro* Maturation of Collagen Fibrils Modulates Spreading, DNA Synthesis, and Collagenolysis of Epidermal Cells and Fibroblasts. Exp. Cell Res. (1987) 171, 164–177.

(2) H. Shoda et al. Inhibitory Effects of Tenilsetam on the Maillard Reaction. Endocrinology (1997) 138, 1886–1892.

(3) J. Takino et al. The Formation of Intracellular Glyceraldehyde-Derived Advanced glycation End-Products and Cytotoxicity. J Gastroenterol. (2010) 45, 646–655 PMID: 20084527.

***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.*

一般研究用キット

# コラーゲン抗糖化アッセイキット

## (Collagen Glycation Assay kit, Glucose/Fructose, Code No.AK70)

2022 年 7 月 13 日改訂

※本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

糖類は生命活動において不可欠な栄養素であるが、生体内のタンパク質と共存すると、タンパク質内のリジンやアルギニン残基を修飾し架橋形成し、タンパク質の立体構造を変え、活性や物性に大きく影響を及ぼす。この反応は糖化反応（Glycation）もしくはメイラード反応と呼ばれ、アマドリ転移物が生成する前期反応と、酸化、脱水、縮合などの反応を経て糖化反応後期生成物(advanced glycation endproducts:AGEs)に至る後期反応に分けられる。皮膚、血管壁、骨などあらゆる臓器を形作る構造タンパク質であるコラーゲンも例外ではなく糖化反応を受ける。

本キットは 96well プレートを用いることにより、無細胞および非酵素的にコラーゲンの糖化反応を追うことができるキットです。コラーゲンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングを容易に行うことができます。機能性食品および化粧品開発における抗糖化素材開発にご利用ください。

### 《Ⅰ-1. キット構成》

| キット内容 | 容量 | 本数 | 保存温度 | 取扱上の注意 |
|---|---|---|---|---|
| 中和コラーゲン溶液<br>Collagen Solution 10mL | 10 ｍL | 1 本 | 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。 |
| グルコース溶液（200mM）<br>Glucose Solution | 10 ｍL | 1 本 | | |
| フルクトース溶液（200mM）<br>Fructose Solution | 10 ｍL | 1 本 | | |
| 緩衝液<br>Dilution Buffer | 30 ｍL | 1 本 | | |
| アミノグアニジン溶液（20mM）<br>※抗糖化標準物質<br>Aminoguanidine Solution | 0.5 ｍL | 1 本 | | |

**※本キットは、96well プレート２枚分のアッセイが可能です。**

※ コラーゲン酸性溶液(5mL)と中和液(5mL)は、中和コラーゲン溶液（10mL）1 本に変更になりました。また糖化度の計算方法が変更になっています。

### 《Ⅰ-2. キットの特徴》

・本キットは糖化したコラーゲンから出てくる蛍光（励起波長 370nm、蛍光波長 440nm）を指標として、抗糖化作用成分を探索することに適している。

《Ⅱ．試験方法－96wellプレートを用いた測定－》

ご用意して頂くもの

・96wellブラックプレート（透明底タイプ、滅菌済み）

（グライナー製μCLEAR－PLATE BLACK　Cat.No.655090 または同等品）

・下方励起・下方蛍光測定が可能な蛍光プレートリーダー（励起波長370nm、蛍光波長440nm）

以下の操作は、クリーンベンチ等で無菌的に行ってください。

（1）**中和コラーゲン溶液**は、使用前に十分に氷冷してください。

（2）**中和コラーゲン溶液**は高粘性のため、溶液の温度を低温（１０℃以下）に保ちながらゆっくりと泡を立てないように注意深く扱ってください。

（3）中和コラーゲン溶液を1wellあたり50 μLずつ96wellプレートに分注してください。

中和コラーゲン溶液は粘性が高いので200 μL用マイクロピペットを用いてゆっくり吸い取り、ゆっくり吐き出し、同じ速度で各wellに分注してください。室温が高い場合にはプレートを氷冷しながら分注してください。

（4）96wellプレートの蓋をし、中和コラーゲン溶液がwell底面全面に均一に広がっていることを確認後、湿潤状態下（注意１）の37℃インキュベーターで一晩静置してください。

中和コラーゲン溶液は低温では無色液状ですが、加温することで白濁したゲル状（コラーゲンゲル）に変化します。

（5）緩衝液列および糖溶液列にアミノグアニジン溶液または試料を10 μL添加してください。

※試料は予め0.22μフィルター滅菌したものをご使用ください。

（6）コラーゲンゲル上に**緩衝液**もしくは**200mM糖溶液**（**グルコース溶液**もしくは**フルクトース溶液**）を50 μL重層してください。

※緩衝液を重層させたコラーゲンゲルは糖化しませんが、糖溶液を重層させたコラーゲンゲルは糖化コラーゲンとなります。

※フルクトース溶液で糖化させたコラーゲンは、グルコース溶液で糖化させたコラーゲンと比べて約10倍の蛍光を発します。

（7）糖溶液を添加後5分以内に、プレートをプレートミキサー等で撹拌後、下方測定の蛍光プレートリーダーで励起波長370nm、蛍光波長440nmでの蛍光強度を測定して下さい。この測定値を反応0時間の蛍光強度Aとします。

（8）ゲルの乾燥を防ぐため湿潤状態を保ち（注意１）の37℃インキュベーターで21 ～30日間静置してください。

反応期間は長いほど糖化は進みます。1週間毎に測定をすることをお勧めいたします。

この測定値を蛍光強度Bとします。

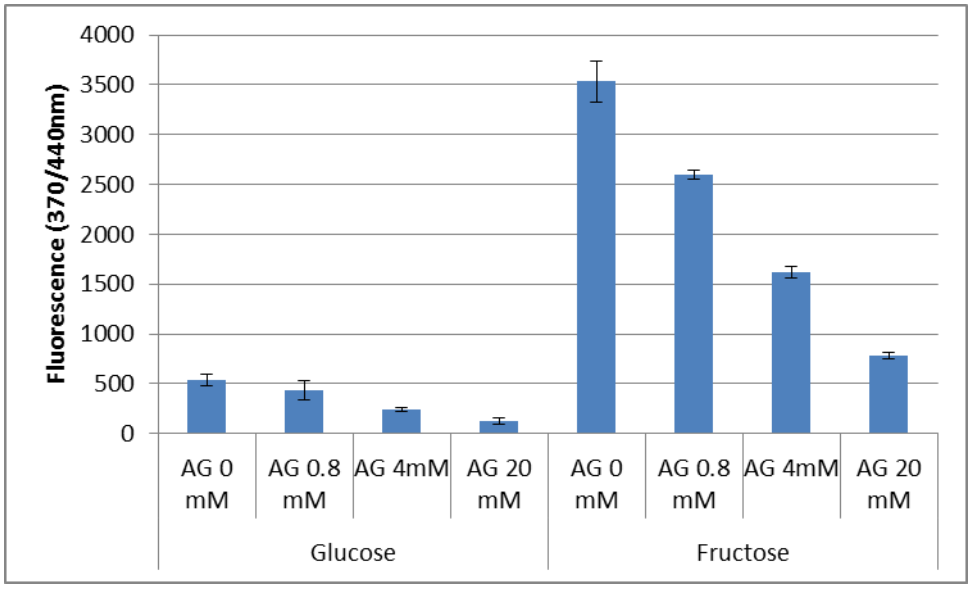
各Wellの糖化度を、蛍光強度B－蛍光強度A　とします。

※注意1：反応時間内で試験試料のみの蛍光値が変動する可能性がある場合には（6）で試験試料添加群に緩衝液を添加し同様に加温し、励起波長370nm、蛍光波長440nmでの蛍光強度を測定して下さい。この値を蛍光強度Cとし、各Wellの糖化度は蛍光強度B－蛍光強度Cとして計算してください。

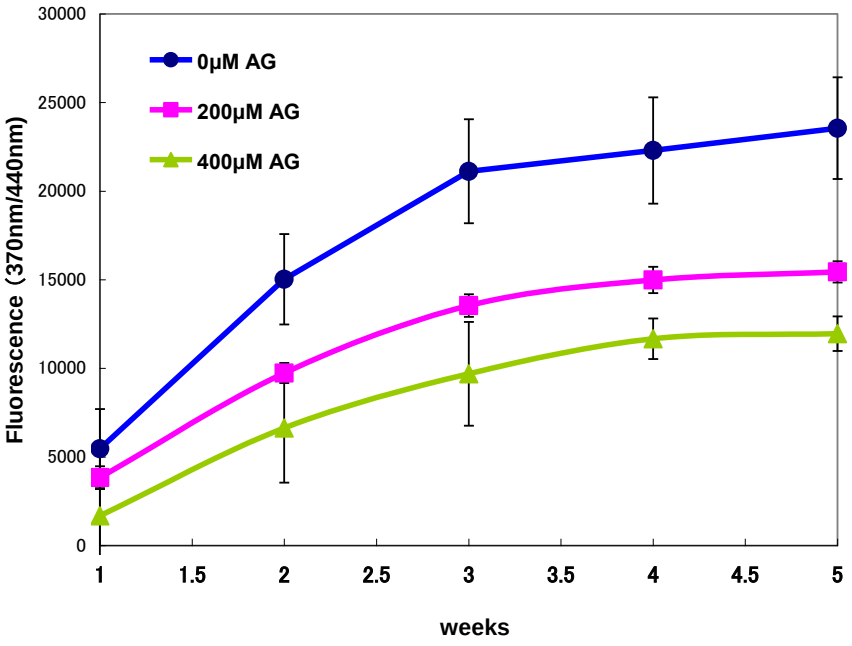
※注意2：湿潤状態について。

ゲルが乾燥してしまうと正確な測定結果を得ることができません。アッセイ中は湿潤状態を保つようにご注意ください。湿度調整付きインキュベーターが無い場合は、ろ紙などを蒸留水で湿らせたものをタッパーの底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。$CO_2$インキュベーターの使用は避けてください。溶液のpHが変化するため糖化スピードが低下します。

《Ⅲ．実施例 》




《参考１ －フルクトース溶液によるコラーゲン糖化反応に対するアミノグアニジンの経時的抑制効果》




《Ⅳ．参考論文》


(1) A. Nishikawa, T. Taira, K. Yoshizato. (1987) In Vitro Maturation of Collagen Fibrils Modulates Spreading, DNA Synthesis, and Collagenolysis of Epidermal Cells and Fibroblasts. Exp. Cell Res. 171, p164-177.

(2) H. Shoda et al.(1997) Inhibitory Effects of Tenilsetam on the Maillard Reaction. Endocrinology 138, p1886-1892.

《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