



Collagen Glycation Assay Kit, Glucose / Fructose

Catalog No. AK70

July 1, 2024

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.

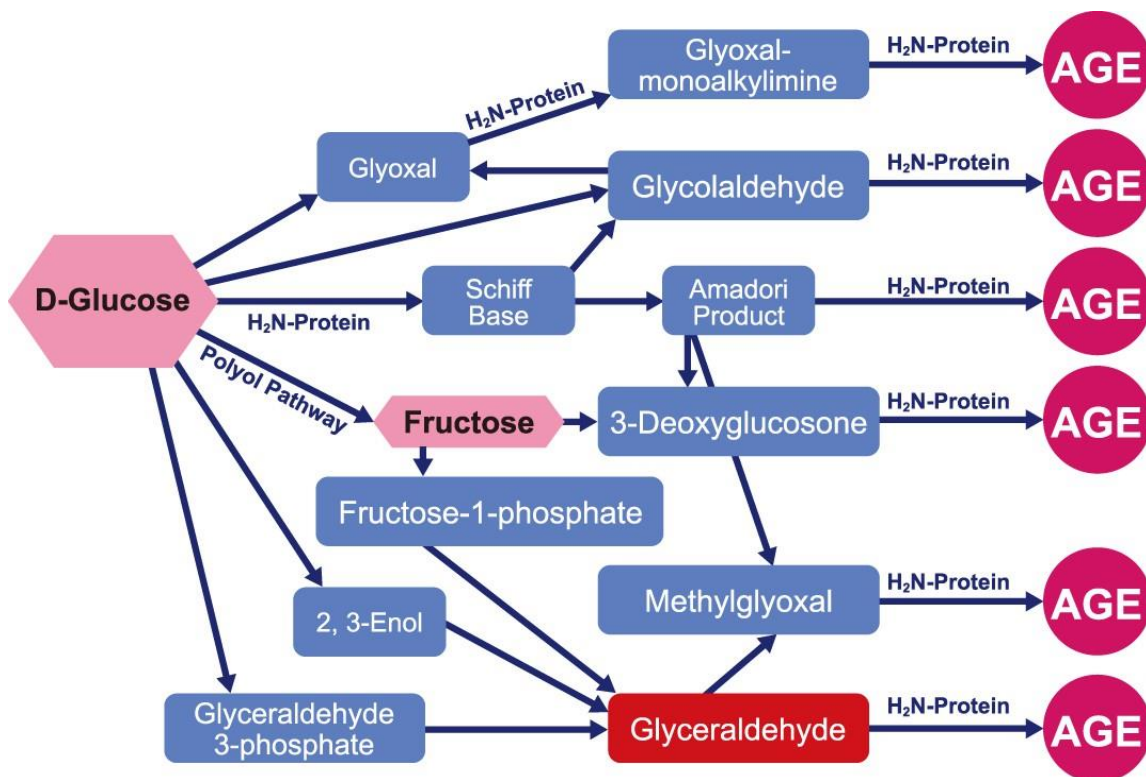


Figure 1. Possible routes for the formation of advanced glycation end-products (AGEs)

《 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 CO₂ 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 CO₂ 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.

$$\frac{\text{Fluorescent intensity B}}{\text{(1,2,3 and 4 weeks)}} - \frac{\text{Fluorescent intensity A}}{\text{(0 week)}} = \text{Inhibitory effect of glycation}$$

《III. Assay Example 》

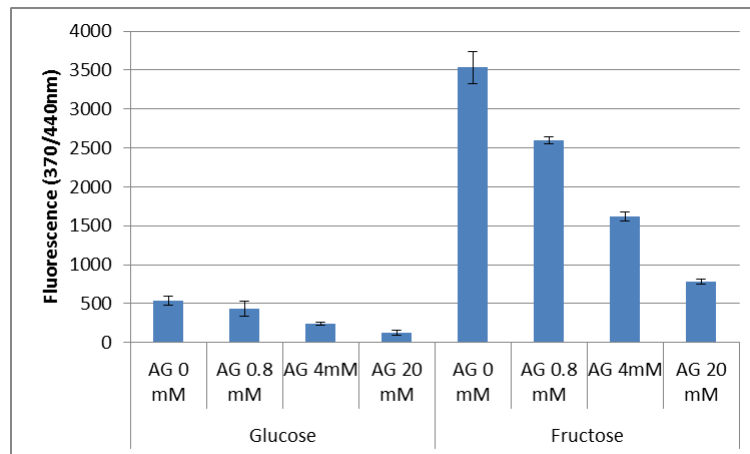


Figure 2. The glycation of the collagen gel after the addition of glucose or fructose and the inhibitory effects of aminoguanidine.

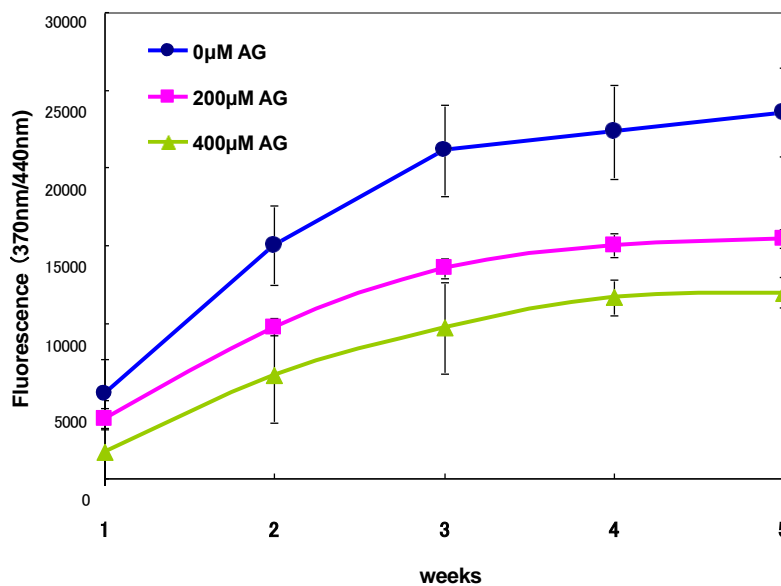


Figure 3. Time course of the glycation of the collagen gel after the addition of fructose and the inhibitory effects of aminoguanidine. The formation of AGEs with fructose was measured on the basis of the fluorescence after incubation at 37°C for 1, 2, 3, 4, and 5 weeks.

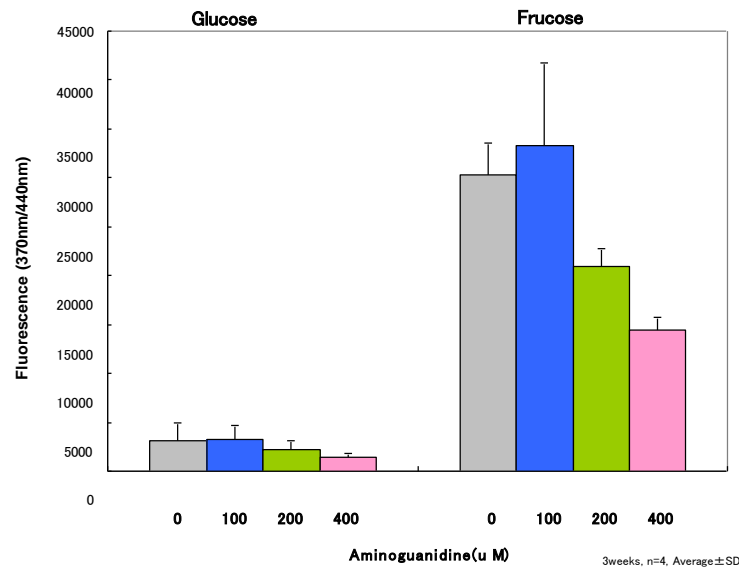


Figure 4. Effects of glucose or fructose on the glycation of collagen with glyceraldehyde and the inhibitory effects of aminoguanidine. The formation of AGEs was measured on the basis of the fluorescence after incubation at 37°C for 3 weeks.

《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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20084527/).

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, 品番 : AK70)

2024年7月1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。

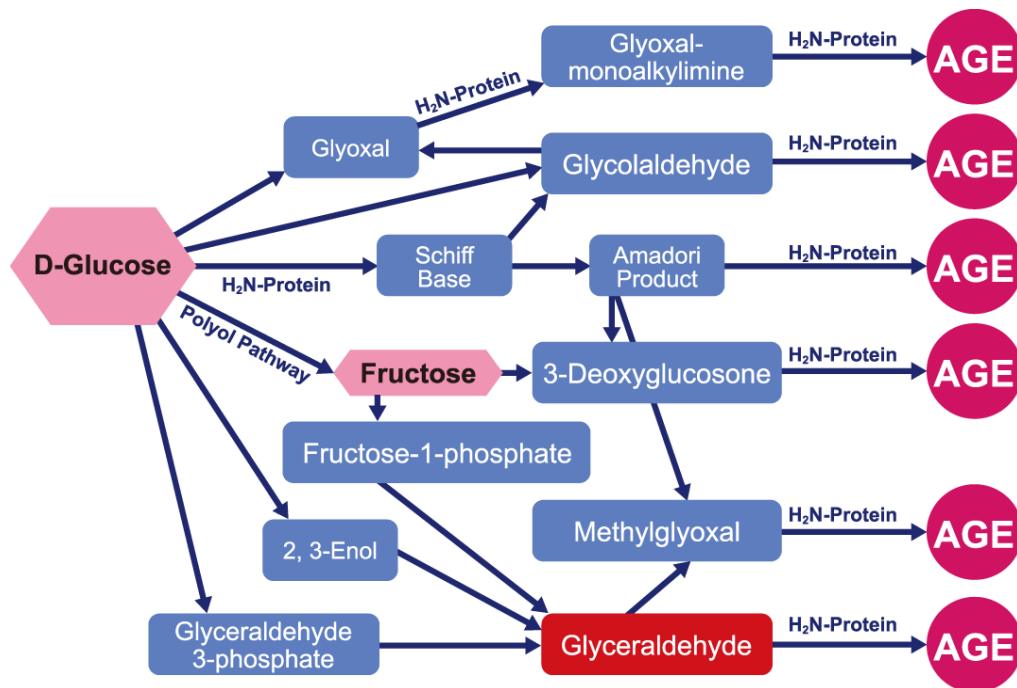


図1.生体内AGEsの精製経路

《 I-1. キット構成》

キット内容	容量	本数	保存温度
中和コラーゲン溶液 Collagen Solution 10mL	10 mL	1 本	4℃
グルコース溶液 (200mM) Glucose Solution	10 mL	1 本	
フルクトース溶液 (200mM) Fructose Solution	10 mL	1 本	
緩衝液 Dilution Buffer	30 mL	1 本	
アミノグアニジン溶液 (20mM) ※抗糖化標準物質 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 μ CLEAR-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)

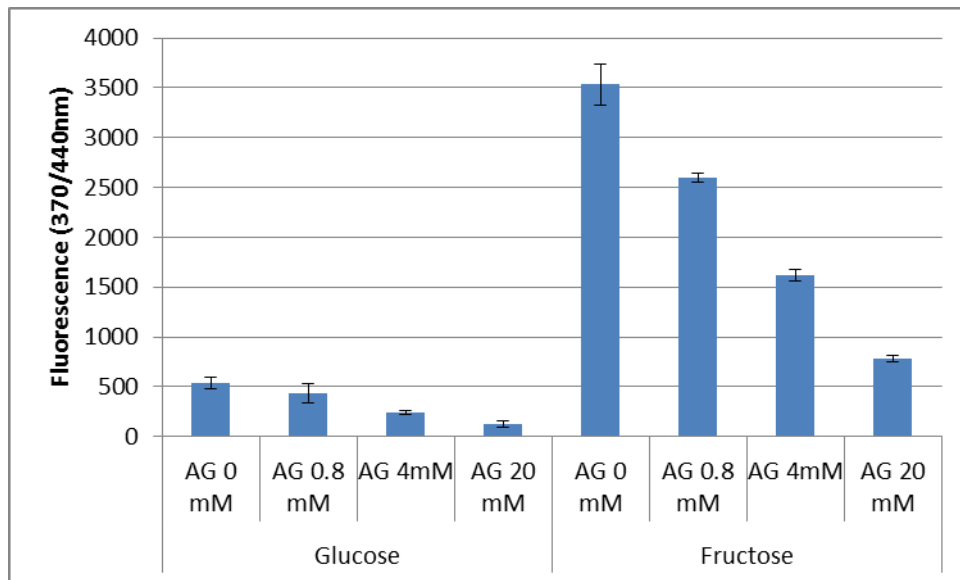
以下の操作は、クリーンベンチ等で無菌的に行ってください。

- (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 μ L 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ため 200 μ L 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 (コラーゲングル) に変化します。

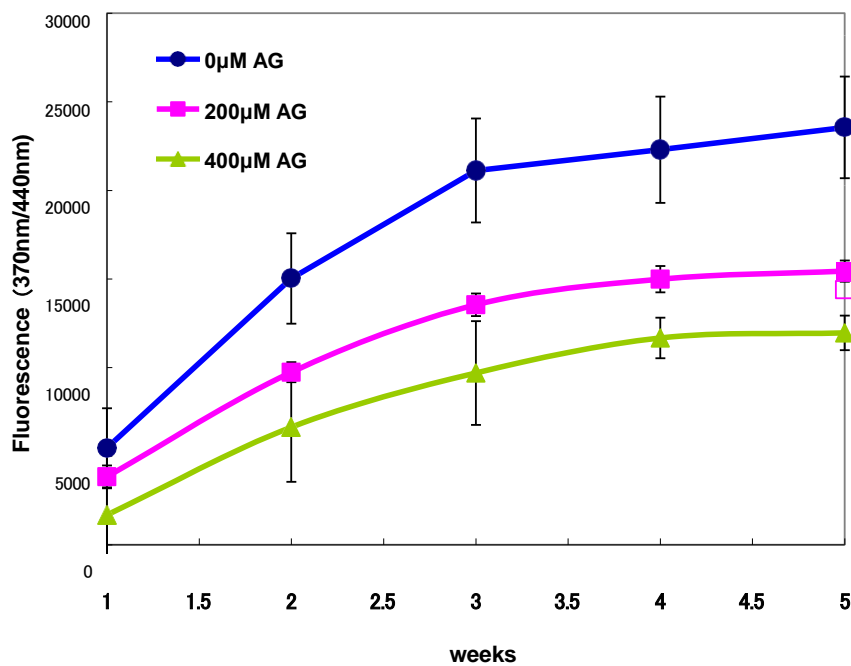
- (5) 緩衝液列および糖溶液列にアミノグアニジン溶液または試料を 10 μ L 添加してください。
※試料は予め 0.22 μ フィルター滅菌したものをご使用ください。
- (6) コラーゲンゲル上に**緩衝液**もしくは **200mM 糖溶液** (グルコース溶液もしくはフルクトース溶液) を 50 μ L 重層してください。
※緩衝液を重層させたコラーゲンゲルは糖化しませんが、糖溶液を重層させたコラーゲンゲルは糖化コラーゲンとなります。
※フルクトース溶液で糖化させたコラーゲンは、グルコース溶液で糖化させたコラーゲンと比べて約 10 倍の蛍光を発します。
- (7) 糖溶液を添加後 5 分以内に、プレートをプレートミキサー等で攪拌後、下方測定用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°C 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2)。

※注意 1 : 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。CO₂ 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。

※注意 2 : 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。



《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.
- (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.