

Collagen Glycation Assay Kit, Glyceraldehyde

Catalog No. AK71

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.

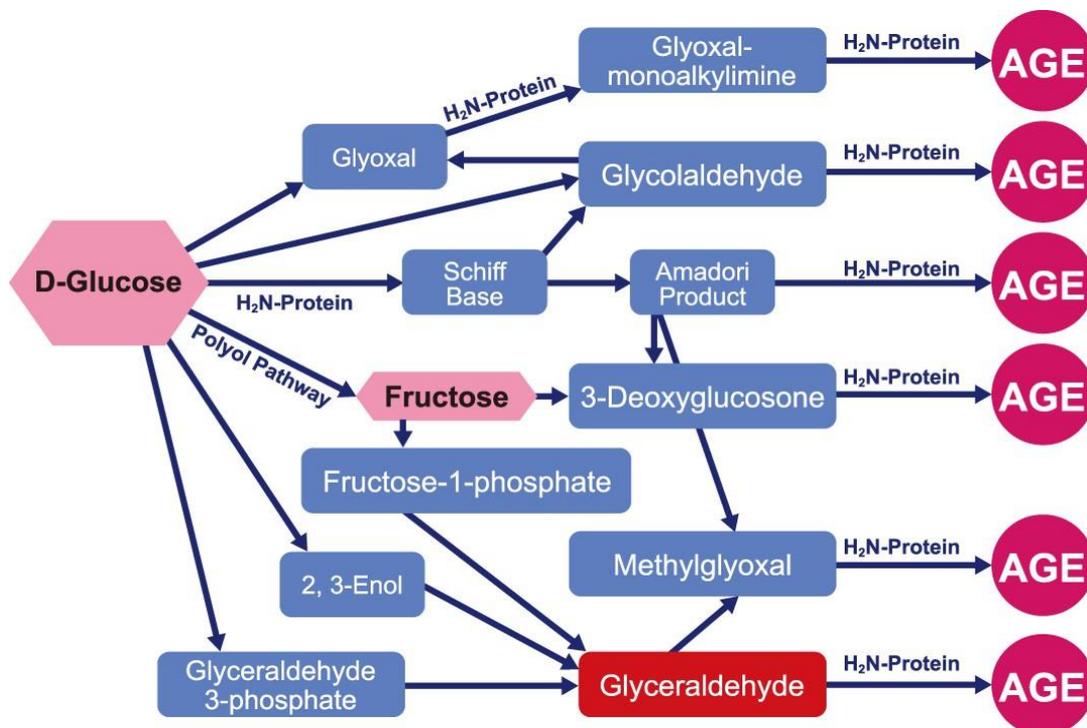


Figure 1. Possible routes for the formation of advanced glycation end-products (AGEs)

《 Assay principle 》

Collagen Glycation Assay Kit, Glyceraldehyde is a complete assay system designed to measure the fluorescent AGEs using the fluorescence microplate reader equipped with a 370nm excitation filter and 440nm emission filter.

《 I . Kit components 》

| Components | Quantity | Storage |
|---|----------|---------|
| Collagen Solution | 10 mL | 4°C |
| Glyceraldehyde Solution (500mM) | 2 mL | |
| Sample Dilution Buffer | 30 mL | |
| Aminoguanidine Solution (20mM) : Positive control | 0.5 mL | |

* One kit contains reagents for 192 assays (96 well Plate)

* Additional materials required

- 96well black plate (clear bottom, sterile)

Greiner [μ CLEAR – PLATE BLACK Cat.No.655090] is recommended.

- Fluorescent microplate reader

(Mode: Fluorescence Bottom Reading, Excitation Wavelength: 370nm, Emission Wavelength: 440nm)

《 II . Assay protocol—96-well plate—》

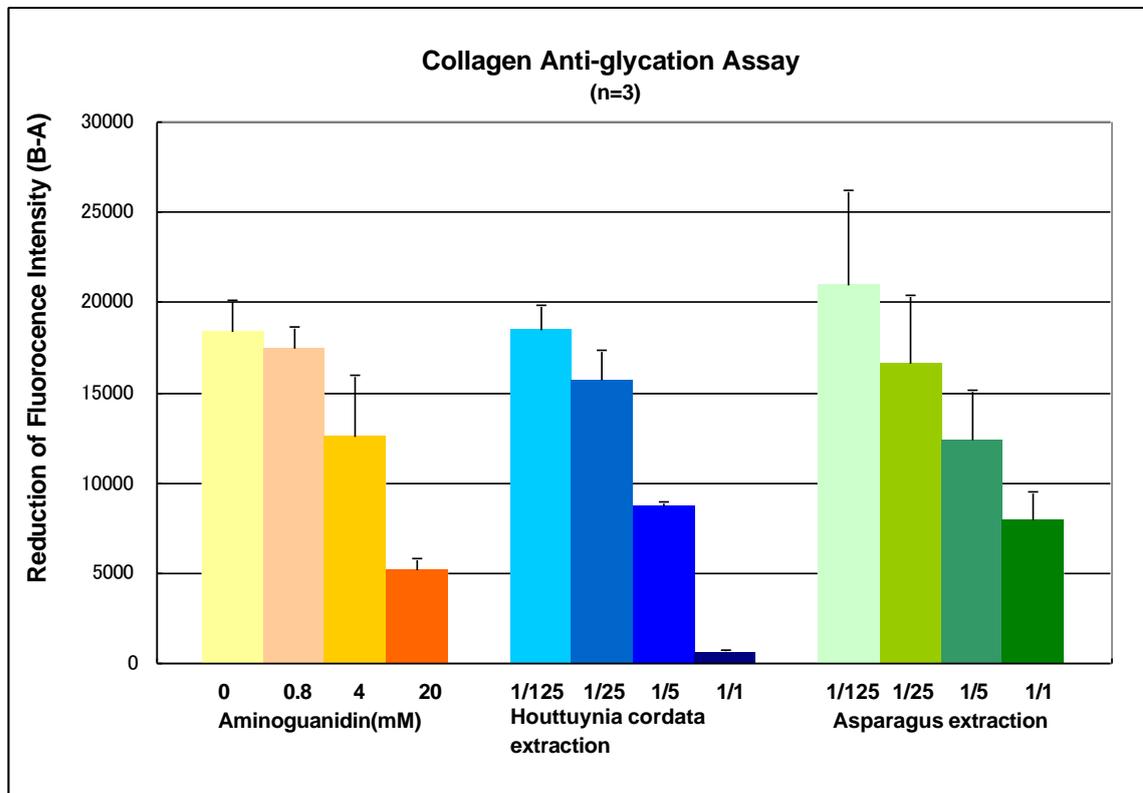
- (1) Collagen solution is stored into the ice (<10 °C) before testing.
- (2) Add 50 μ L of the collagen solution into the 96-well black plate.
Incubate the plate for 18-24hrs at 37°C under the high humidity condition to avoid drying the well up (but do not use CO₂ incubator). Collagen solution changes into the white gel.
- (3) Prepared positive control by diluting the 20 mM Aminoguanidine solution at the concentration of 0, 0.8, 4mM with sample dilution buffer.
- (4) Dissolve the samples with the sample dilution buffer and filtrate with 0.22 μ m.
Add 40 μ L of the positive control or samples to each well.
- (5) Add 10 μ L of 500 mM Glyceraldehyde Solution to each well. Mix thoroughly.
- (6) Immediately begin reading standard and sample wells with a fluorescent microplate reader with the Excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 440 nm by fluorescence bottom reading.
Peg this fluorescence intensity at before incubation (0 hr) and describe "Fluorescent intensity A".**
- (7) Incubate the plate for 24hrs at 37 °C under the high humidity condition to avoid drying the well up (but do not use CO₂ incubator).

- (8) After 24 hrs, read the fluorescent intensity with a fluorescent microplate reader at 37 °C. Peg the fluorescence intensity at after incubation for 24 hrs fluorescent intensity and describe "Fluorescent intensity B".
- (9) The reduction of fluorescence intensity (Fluorescent intensity B – Fluorescent intensity A) from control fluorescence intensity is the inhibitory effect of glycation.

** In case samples contain florescent material, subtract the florescence intensity of the sample group without addition of glyceraldehyde (as "sample blank") from the group with glyceraldehyde.

《III. Example of Results 》

The following figure demonstrates Collagen Glycation Assay Kit, Glyceraldehyde results that inhibitory effects of aminoguanidin, Houttuynia cordata extraction, and Asparagus extraction on collagen glycation.



《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 ver.2 (グリセルアルデヒド)

【Collagen Glycation Assay kit: Glyceraldehyde, 品番 : AK71】

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、一方で生体内のタンパク質のリジンやアルギニン残基を修飾し架橋形成することでタンパク質の立体構造が変化し、活性や物性に大きく影響を及ぼすことが知られている。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 end-products: 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。

近年、AGEs は生体内においてグルコースだけではなく、グルコースの代謝中間体や分解物、メイラード反応中間体などからも生成することが報告され、生体内で生成される AGEs の中でも、特に糖代謝中間体由来するグリセルアルデヒド由来の AGEs が疾患の発症や進展に強く関わっていることが報告されている。

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。関連製品のコラーゲン抗糖化アッセイキット(品番 : AK70) はグルコース・フルクトースから糖化反応するのに対し、本キットは糖代謝中間体であるグリセルアルデヒドを用いることで、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より短期間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。

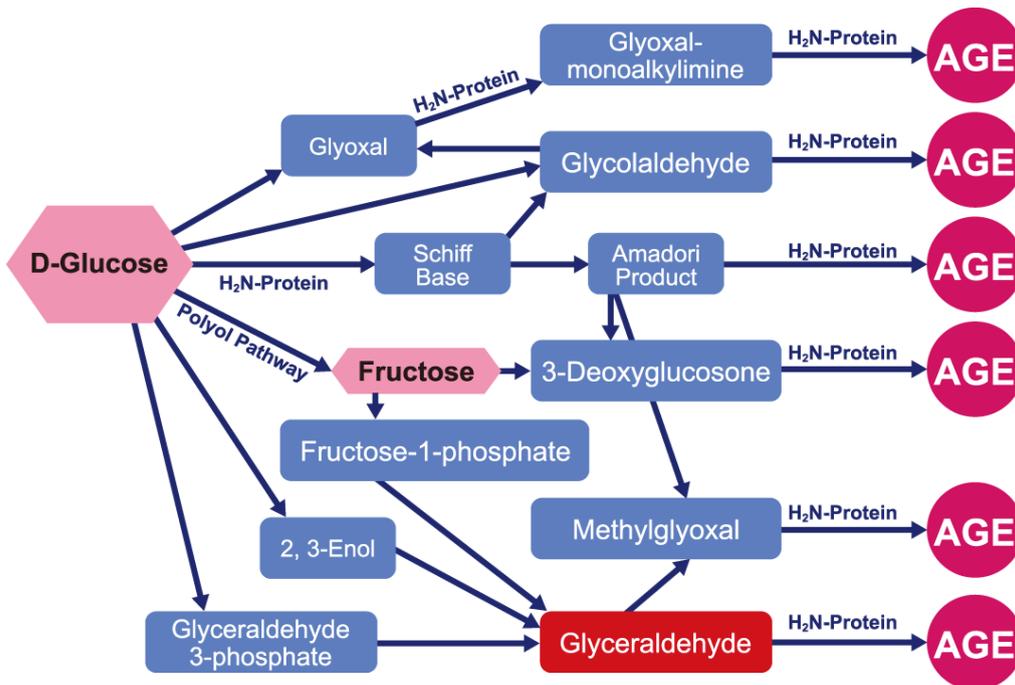


図1. 生体内 AGEs の生成経路

《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 | 1本 | 4°C |
| グリセルアルデヒド溶液 (500mM) Glyceraldehyde Solution | 2mL | 1本 | |
| 緩衝液 Dilution Buffer 30mL | 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。アッセイ方法については変わりません。

《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なってください。

緩衝液に 3mM アジ化ナトリウムを添加することによって、無菌でない環境にても操作可能です。

- (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°C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°C インキュベーターで一晩静置してください。CO₂ インキュベーターの使用は避けてください。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) 試験試料は緩衝液で溶解または抽出したものをフィルター（孔径 0.22 μ m）でろ過滅菌しコラーゲンゲル上に 40 μ L 重層してください。
- 陽性コントロールはアミノグアニジン溶液（20mM）を緩衝液で 5 倍希釈系列を作製しコラーゲンゲル上に 40 μ L 重層してください。
- (6) 全ての well に **500mM グリセルアルデヒド溶液** を 10 μ L 添加し、プレートをプレートミキサー等で攪拌してください。グリセルアルデヒド溶液を重層することで糖化が開始します。
- (7) グリセルアルデヒド溶液添加後 5 分以内に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ください。この測定値を反応 0 時間の蛍光強度 A とします。
- (8) プレートは、ゲルの乾燥を防ぐため湿潤状態下^(注意1)の 37°C インキュベーターで 24 時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。
- (9) 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。この測定値を蛍光強度 B とします。
- 各 Well の糖化度を、 $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 A}$ とします^(注意2)。

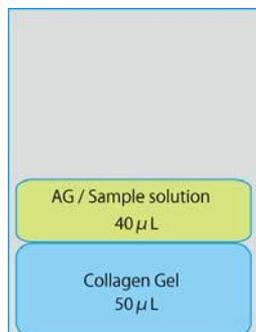
※注意 1：ゲルが乾燥してしまうと正確な測定結果を得ることができません。アッセイ中は湿潤状態を保つようご注意ください。湿度調整付きインキュベーターが無い場合は、ろ紙などを蒸留水で湿らせたものをタッパーの底に敷き、その上にプレートを置くようにしてください。CO₂ インキュベーターの使用は避けてください。溶液の pH が変化するため糖化スピードが低下します。

※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 $\text{蛍光強度 B} - \text{蛍光強度 C}$ として計算してください。

《Ⅱ. 試験方法の（3）以降》の手順



中和コラーゲン溶液を 1well あたり 50 μL ずつ 96well プレートに分注する。
湿潤状態下^(注意2)の 37°Cインキュベーターで一晩静置する。加温されることで白濁したコラーゲンゲルが形成される。（泡がなく均一に白濁したゲルか確認する）



コラーゲンゲル上に①緩衝液 ②緩衝液で調製した試料 ③アミノグアニジン溶液

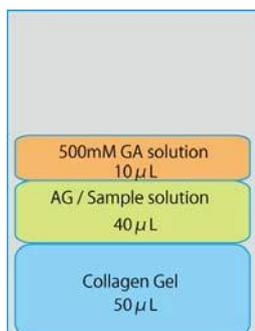
(AG) を 40 μL 重層する。

<陽性コントロール（アミノグアニジン溶液）の調製>

アミノグアニジン溶液（20mM）を緩衝液で希釈系列を作製し 40μL/well 分注する。

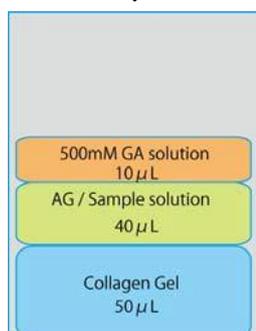
<試料の調製例>

試験試料は緩衝液で溶解または抽出し 0.22μm フィルター滅菌し、緩衝液で希釈系列を作成し、各群 40μL/well 分注する。



各 well に緩衝液列、アミノグアニジン溶液列および試料列に 500mM グリセルアルデヒド溶液(GA)を 10 μL 添加する（ウェル全量における終濃度：50mM GA）。

その後、蛍光プレートリーダーで蛍光強度の測定する（反応 0 時間の蛍光強度をAとする）。



湿潤状態下^(注意1)の 37°Cインキュベーターで 24 時間静置する。

24 時間後に蛍光プレートリーダーにて蛍光強度の測定を行なう（24 時間の蛍光強度を

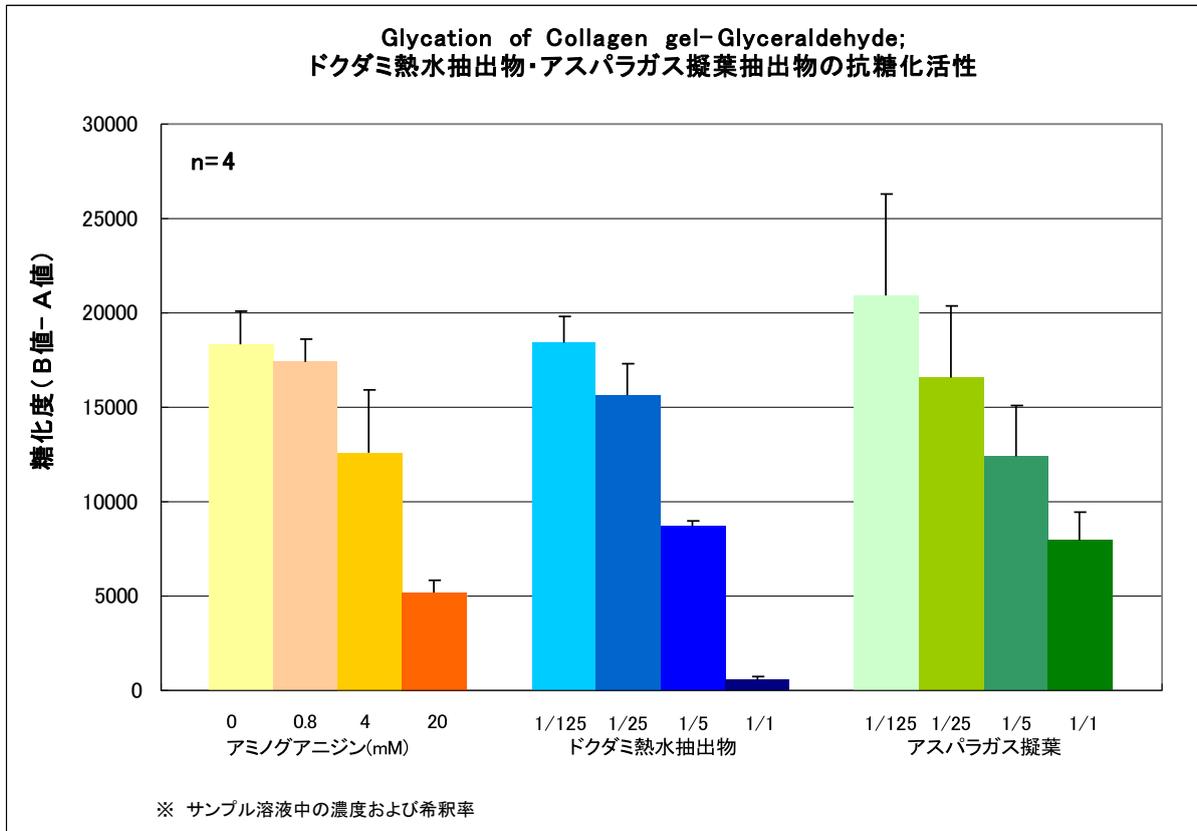
Bとする）。

各 Well の糖化度 = (B 値) - (A 値)

※ 経時的に測定することも可能です。

《Ⅲ. 実施例 ―グリセルアルデヒド溶液で糖化させた糖化コラーゲン生成の検討―》

陽性コントロールとしてアミノグアニジン溶液、試料としてドクダミ葉熱水抽出物およびアスパラガス擬葉抽出物を添加し、各成分の糖化コラーゲンの抗糖化活性を検討した。その結果、いずれも濃度依存的に抗糖化活性を有することが認められた。



《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) Jun-ichi Takino et al. (2010) The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J. Gastroenterol* 45: 646-655