

# コラーゲン抗糖化アッセイキット

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

2015年9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。

## 《I-1. キット構成》

キット内容	容量	本数	保存温度	危険表記および取扱上の注意
中和コラーゲン溶液	10 mL	1本	4℃	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、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)	10 mL	1本		
フルクトース溶液 (200mM)	10 mL	1本		
緩衝液	30 mL	1本		
アミノグアニジン溶液 (20mM) ※抗糖化標準物質	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  $\mu$  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。

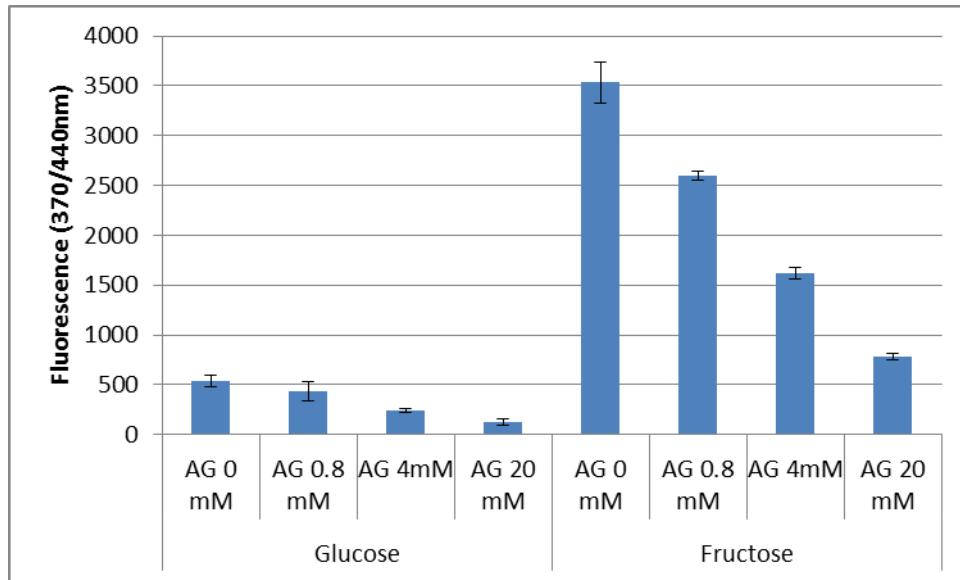
- (1) 中和コラーゲン溶液は、使用前に十分に氷冷してください。
- (2) 中和コラーゲン溶液は高粘性のため、溶液の温度を低温（10℃以下）に保ちながらゆっくりと泡を立てないように注意深く扱ってください。
- (3) 中和コラーゲン溶液を 1well あたり 50  $\mu$ L ずつ 96well プレートに分注してください。  
中和コラーゲン溶液は粘性が高いため 200  $\mu$ L 用マイクロピペットを用いてゆっくり吸い取り、ゆっくり吐き出し、同じ速度で各 well に分注してください。室温が高い場合にはプレートを氷冷しながら分注してください。
- (4) 96well プレートの蓋をし、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<sup>(注意1)</sup>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  $\mu$ L 添加してください。  
※試料は予め 0.22  $\mu$  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  $\mu$ 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<sup>(注意1)</sup>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。

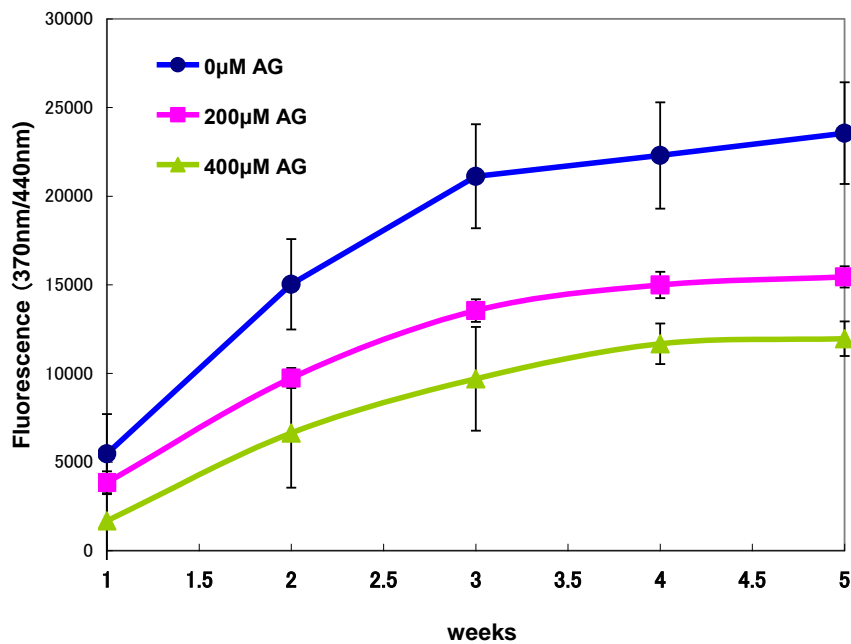
※注意 2：湿潤状態について。

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<sub>2</sub> 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き投稿された論文、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](mailto:primarycell@cosmobio.co.jp)  
URL : <http://www.primarycell.com/>