

EZ- Total Collagen Assay Kit

Metabolism assay kit
(Colorimetric)

Cat. No. DG-COL100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

콜라겐은 세포 외 기질과 결합 조직에서 발견되는 가장 풍부한 불용성 단백질입니다. 또한, 다른 조직인 피부, 힘줄, 뼈, 연골 및 인대에서도 찾을 수 있습니다. 콜라겐의 과도한 생산은 간경화 폐 섬유증 및 종양성장을 포함한 병리학적 상태와 관련이 있습니다.

콜라겐은 16개 이상의 유형이 있지만 유형 I, II 및 III 콜라겐은 포유동물에서 80%이상의 함량을 차지합니다. 콜라겐의 삼중 나선구조는 기본 삼량체인 Glycine-Proline-Hydroxyproline의 반복 패턴으로 구성되어 있습니다. 세포에서 콜라겐은 프로콜라겐으로 분비되고 이 사슬은 소포체로 운반되며, 여기서 수많은 변형으로 이황화 결합이 있는 삼중 나선 구조를 갖게 됩니다.

DG-Total Collagen Assay Kit는 샘플에서 hydroxyproline을 정량할 수 있는 방법입니다. 다양한 샘플에서의 hydroxyproline은 chloramine-T, Ehrlich's reagent와 반응하여 560 nm에서 발색을 띄는 물질을 생성하여 측정할 수 있습니다. Hydroxyproline은 주로 콜라겐에만 존재하므로 콜라겐 함량의 지표로 사용할 수 있습니다.

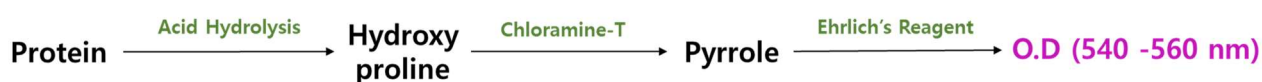


Fig 1. Total Collagen quantification.

▪ Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage
2X DMAB Concentrate	5 mL	Yellow	-20 °C 개봉 후 한달
Oxidation Buffer	10 mL		
Chloramine T Reagent	600 µL	Blue	
Perchloric acid/Isopropanol Solution	5 mL		
Collagen Standard (2 mg/mL)	50 µL X 2	Green	

* Kit 개봉 후 한달 안으로 사용을 권장드리며, 한달 이후부터 감도가 떨어질 수 있습니다.

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* Hydrochloric acid (~12N HCl)와 pressure tight polypropylene screw-capped vial은 kit에 제공되지 않습니다.

▪ General Protocol

Sample preparation

Note

- 미지의 sample의 경우 standard curve 범위 내에 있는지 미리 예비실험을 권장드립니다.
- Sample의 부피를 조정하여 2 ~ 30 μl 의 가수분해물을 사용하거나, 필요한 경우 가수분해물을 D.W 및 PBS로 희석합니다.

● **Tissue, protein**

- ① 조직 및 단백질 10 mg에 D.W 100 μl 를 넣어 homogenization (균질화) 시켜줍니다.
- ② Sample 100 μl 와 12N HCl 1000 μl 를 pressure tight polypropylene screw-capped vial에 넣어 잘 섞은 후 120 °C에서 2 시간동안 가수분해합니다.
- ③ Spin down 후 가수분해된 sample을 96-well plate에 2 ~ 30 μl 를 duplicate이상 준비합니다.
- ④ 60 ~ 70 °C heat block 또는 Oven에서 완전히 건조합니다.

● **Urine**

- ① Urine sample 100 μl 와 12N HCl 100 μl 를 pressure tight polypropylene screw-capped vial에 넣어 잘 섞은 후 120 °C에서 2 시간동안 가수분해합니다.
- ② Spin down 후 activated charcoal 4 mg을 넣고, 잘 섞은 후 10,000 x g로 3분 centrifuge합니다.
- ③ 투명한 urine sample만을 사용하며, 침전물과 activated charcoal은 사용하지 않습니다. 필요한 경우 이 과정을 반복합니다.
- ④ 가수분해된 urine sample을 96-well plate에 2 ~ 30 μl 를 duplicate이상 준비합니다.
- ⑤ 60 ~ 70 °C heat block 또는 Oven에서 완전히 건조합니다.

Reagent preparation

Component	Preparation	Storage
Chloramine T Reagent	6 μl chloramine T와 94 μl oxidation buffer를 섞습니다.	필요한 well +1 만큼 준비합니다. 제조 후 2 ~ 3 hr 안에 사용합니다.
DMAB Reagent	DMAB 와 perchloric acid/isopropanol solution을 1:1로 섞어 사용합니다.	필요한 well +1 만큼 준비합니다. 제조 후 2 ~ 3 hr 안에 사용합니다.

* 개봉 후 한달 안으로 사용할 것을 권장드립니다.

Hydroxyproline standard preparation

- ① 2 mg/ml hydroxyproline standard에 12N HCl 50 μl 를 넣은 후 잘 섞어줍니다.
- ② 120°C heat block에서 2 h 동안 가수분해를 진행합니다.
- ③ 위에서 제조한 1 mg/ml hydroxyproline standard를 96-well plate에 다음과 같이 각 농도의 standard를 duplicate 이상 분주합니다.

Standard No.	1 mg/ml Hydroxyproline(μl)	Final Hydroxyproline Conc. ($\mu\text{g}/\text{well}$)
1	0	0
2	2	2
3	4	4
4	6	6
5	8	8
6	10	10

- ④ 60 ~ 70°C heat block 또는 Oven에서 완전히 건조시켜줍니다.
- ⑤ Hydroxyproline standard well에 chloramine T reagent 100 μl 를 넣어 상온에서 20 분 반응시켜줍니다.
- ⑥ DMAB reagent 100 μl 를 모든 well에 첨가하여 60°C heat block 또는 Oven에서 약 30 분부터 발색을 확인한 후 흡광도 560 nm에서 측정합니다.
 - Heat block 또는 oven에 따라 반응 시간이 달라질 수 있으며, Hydroxyproline 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서 O.D값이 0.9 ~ 1.1 정도가 나오도록 시간 조절을 해주시면 됩니다.
 - Kit 개봉 후에는 감도가 낮아질 수 있으므로 반응 시간을 늘려 실험을 진행합니다.

▪ Calculation

Hydroxyproline concentration of sample (μg)

1. 모든 측정값에서 blank의 O.D. 값을 보정해줍니다.
* Blank = O.D._{560nm} from Hydroxyproline standard No. 1 (0 μg Hydroxyproline)
2. Hydroxyproline standard의 농도(X 축)에 대한 O.D. 값(Y축)을 이용하여 표준곡선을 그려 선형 방정식을 구합니다.
3. Standard curve에 sample 측정값 수치를 대입하여 Hydroxyproline 양을 계산하여 줍니다.
* Sample을 2배 희석했을 시에 계산된 Hydroxyproline (μg)에 x2를 하여 정확한 Hydroxyproline 의 양을 계산합니다.

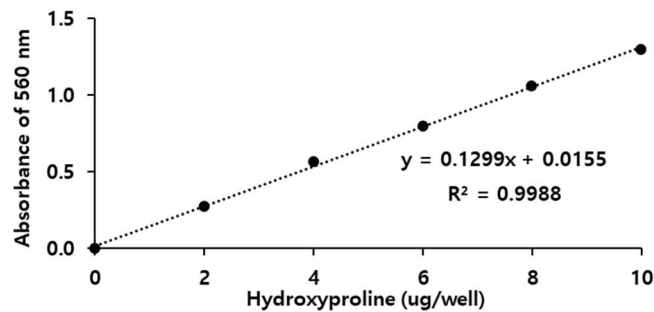


Fig 2. Hydroxyproline standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay