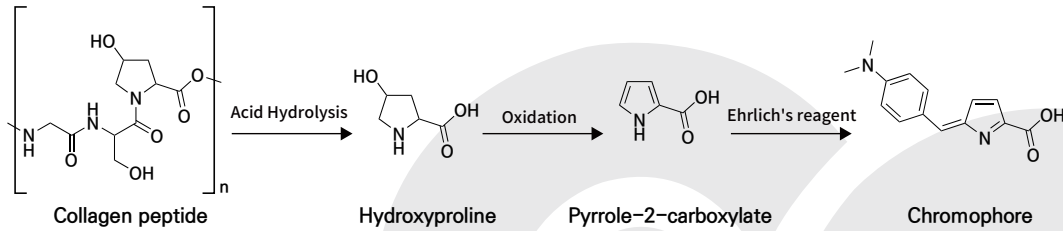


## PicoSens™ Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)

(BM-COL-100, 100 assays, Store at -20°C)

### 실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)는 Collagen으로부터 가수분해되어 만들어진 Hydroxyproline이 산화되어 Pyrrole-2-carboxylate를 형성하고 Ehrlich's reagent와 결합하여 Chromophore를 형성합니다. Chromophore는 흡광도 560 nm에서 측정하여 Sample 내의 Total Collagen 양을 측정할 수 있습니다.

### 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Oxidation Buffer	10 mL	-20°C
Chloramine T Concentrate	600 µL	
Perchloric Acid / Isopropanol Solution (PCA/IPA)	5 mL	
2X DMAB (in DMSO)	5 mL	
Collagen Type 1 Standard (2 mg/mL)	100 µL	

\* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 6개월 간 안정적입니다.

### 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Concentrated HCl (~12N)
- ▶ Autoclave
- ▶ Evaporator, Dry oven or Heating block (60, 70, 120°C)
- ▶ Colorimetric microplate reader (560 nm filter)
- ▶ Pressure-tight polypropylene teflon or Screw vial

### 실험 전 준비사항 및 보관방법

- ▶ 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- ▶ Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.
- ▶ **Chloramine T Concentrate**와 **DMAB Concentrate**는 사용 후 -20°C에 보관합니다.
- ▶ 실험에 사용하고 남은 Hydrolyzed sample은 4°C 보관하여 사용합니다.
- ▶ **Chloramine T Reagent** : Chloramine T Concentrate 6 µL와 Oxidation Buffer 94 µL을 혼합하여 만듭니다.
- ▶ **DMAB Reagent** : 2X DMAB Concentrate 50 µL와 Perchloric Acid / Isopropanol Solution 50 µL을 혼합하여 만듭니다.
- \* **Chloramine T Reagent**와 **DMAB Reagent**는 실험 전 필요한 만큼만 만들어 사용하여야 하며, 혼합된 용액은 2~3 h 내에 사용합니다.

### Sample type

- Tissues
- Protein/Peptide hydrolysates
- Serum, Urine

### 실험 과정

- \* 본 실험은 가수분해 및 건조과정의 시간이 많이 걸리므로 Sample 과 Standard preparation을 동시에 진행할 수 있게 준비 후 진행해야 합니다.
- \* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 진행한 후 사용을 권장합니다.

### Sample preparation

#### Tissue or Protein / Peptide hydrolysates

- ① Tissues 및 Protein sample 10 mg에 D.W. 100 µL를 넣고 Homogenization합니다.
- ② Homogenized sample에 Concentrated HCl (12N) 100 µL 를 넣어 혼합합니다.
- ③ Pressure tight polypropylene vial (Teflon cap)에 ② 혼합물을 넣고, 120°C에서 3 h 동안 가수분해를 진행합니다.
- ④ 가수분해가 완료된 Sample 10 µL를 96-well Microplate에 분주하여 70°C Heat block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

## Urine

- ① Urine sample 100  $\mu\text{l}$ 와 Concentrated HCl (12N) 100  $\mu\text{l}$ 을 혼합합니다.
- ② Pressure tight polypropylene vial (Teflon cap) 에 ① 혼합물을 넣고 120°C에서 3 h 동안 가수분해를 진행합니다.
- ③ 가수분해가 완료된 Urine sample에 Activated charcoal 4 mg을 첨가하여 혼합한 뒤, 10,000 x g에서 3 min 동안 Centrifuge를 진행합니다.
- ④ 침전물과 Activated charcoal을 제거한 뒤 투명한 Urine sample만 분리합니다.
- ⑤ Sample 10  $\mu\text{l}$ 를 96-well Microplate에 넣고 70°C Heat Block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

## Standard preparation

- ① 2 mg/ml Collagen Type 1 Standard 50  $\mu\text{l}$ 와 Concentrated HCl (12N) 50  $\mu\text{l}$ 를 혼합합니다.
- ② Pressure tight polypropylene vial (Teflon cap) 에 ① 혼합물을 넣고, 120°C에서 3 h 동안 가수분해를 진행합니다. (최종 1 mg/ml)
- ③ Spin down 후 100  $\mu\text{l}$  의 가수분해된 1 mg/ml Collagen Type 1 Standard를 96-well Microplate 각 Well에 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{l}$ 를 분주하여 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g/well}$ 씩 넣어줍니다.  
- 0  $\mu\text{g/well}$  : Blank
- ④ 70°C Heat Block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

## Reaction mix

- ① 각 Sample과 Standard well에 Chloramine T Reagent 100  $\mu\text{l}$  씩 첨가한 뒤 상온에서 5 min간 반응 시킵니다.
- ② DMAB Reagent 100  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 넣어준 뒤 60°C Heat block / Oven에서 90 min동안 반응 시킵니다.
- ③ Microplate Reader를 이용하여 흡광도 560 nm에서 측정합니다.

## 결과 분석

- 모든 측정값에서 Blank을 뺍니다.
- Standard curve에 시료의 OD값을 대입하여 구한 Collagen의 양으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Collagen의 농도를 구합니다.

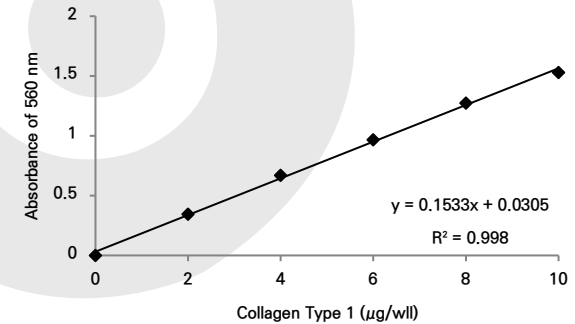
$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = B/V \times D$$

C : Sample의 Collagen 농도 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

B : 측정 Well의 Collagen 양 ( $\mu\text{g}$ )

V : Well에 분주한 Sample의 Volume ( $\mu\text{l}$ )

D : Sample 희석 배율



Collagen Type 1 Standard curve

※ Spike sample: Sample 내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 Collagen이 실제로는 0.5  $\mu\text{g}$ 이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 0.4  $\mu\text{g}$  (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 현상을 보정하기 위해 Sample과 별도로 Sample에 일정량의 Standard를 첨가한 Well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 Sample의 농도를 보정하는 방법입니다. 이 실험에서 Spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

$$\text{Sample 내 Collagen의 양(B)} = \text{OD1}/(\text{OD2} - \text{OD1}) * \text{Collagen Spike} (\mu\text{g})$$

OD1: Sample의 OD값 (Blank Corrected)

OD2: Spiked Sample의 OD값(Blank Corrected)

Collagen Spike: Sample에 넣은 Collagen Spike의 양

## Related products

BM-HYP-100

PicoSens™ Hydroxyproline Assay Kit (Colorimetric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.