

BindCOLTM, biotin-conjugated <Denatured Collagen Detection Reagent>

商品コード FDV-0035

※本商品は研究用です。研究用以外には使用できません。

商品背景

コラーゲンは哺乳動物における最も主要な細胞外マトリックス構成タンパク質ファミリーです。コラーゲンファミリーは3本のポリペプチド鎖からなる特徴的な3重螺旋構造を共通で有しており（図1左）、各ポリペプチド鎖はGly-Pro-Hyp (4-hydroxyproline) の頻繁な繰り返し配列で構成されています。ヒトにおいては、27種類のファミリーメンバーが同定されています。その中でも、線維形成型のI型、II型、III型コラーゲンは体内のコラーゲンの90%以上を占めています。コラーゲンは細胞接着、細胞遊走、浸潤など細胞の活性の制御、組織の機械的維持などさまざまな機能を有しています。これらの機能の中で、コラーゲン新生と分解・変性の動的なリモデリングは厳密に制御されていますが、コラーゲン新生と分解・変性の制御異常（例、過剰なコラーゲン新生に伴うミスフォールディング、または異常なコラーゲン分解・変性など）は病理的状況を誘導すると考えられています。肝臓における線維症（fibrosis）、軟骨組織における変性性関節症（osteoarthritis）、血管中のアテローム性動脈硬化症（atherosclerosis）、およびがん細胞による異常な細胞外マトリックスの浸潤は典型的なコラーゲンリモデリングの異常により引き起こされる例として知られています。最近の知見より変性したコラーゲンの量的増加はこれら疾患と大きく関連することが示唆されています。

変性コラーゲン（denatured collagen; dCOL、図1右）は熱や機械的ストレス、プロテアーゼ分解および各種化学修飾などによって引き起こされるコラーゲン3重螺旋構造が崩れた状態の総称です。一度3重螺旋が崩壊すると個々のポリペプチド鎖は正しい3重螺旋構造に自発的に戻ることはできません。そのため、変性コラーゲンは病理的マーカー因子の一つとしてみなされており、この変性コラーゲンを検出する手法は病理学的・生理学的研究における優れたツールになることが期待されています。一部のアイソフォームのコラーゲン変性特異的に認識するもの抗体がいくつか報告されていますが、コラーゲンファミリー全体に利用することは難しく汎用的ではありません。下記の3つの点を満たすような変性コラーゲン検出用プローブが望まれています。①変性コラーゲンに特異的であること、②高い検出感度を有すること、そして③さまざまなコラーゲンファミリーメンバーに交差すること。近年、コラーゲンの特長的なGly-Pro-Hypアミノ酸配列を模倣して化学合成されたコラーゲン模倣型ペプチド（CMP; collagen mimetic peptides）が変性コラーゲン検出に応用できることが注目されています。しかし、一本鎖CMP（以下ssCMP; single-stranded CMP）は変性コラーゲンに結合する能力はあるものの、自発的な自己3量体形成が優先的に誘導されるため、変性コラーゲンへの結合力が弱いことが知られています。そのため、ssCMPを変性コラーゲン検出ツールとして使用するためには、自己3量体形成を抑制する目的で使用直前に加熱処理してリフォールディングすることが不可欠でしたが、実験プロセスにおける事前加熱のステップは労力の増加だけでなく、実験ごとのバイアスが生じやすいことが問題視されています（図2左）。この課題点を克服するため、次世代型のCMPが開発されています。鎖長の異なる2本のCMPを両端で繋ぐことで歪んだ環状構造もつCMP（scCMP; strained cyclic CMP）に適度

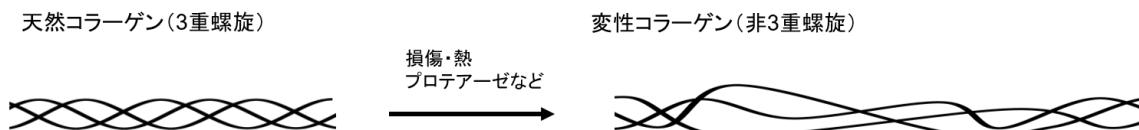


図1 変性コラーゲンの概要

なアニオニン性電荷を付加した電荷最適化 scCMP で、自発的重合が抑制され、事前加熱変性不要で変性コラーゲンに高い結合力を示します（図 2 右）。また、アニオニン最適化型 scCMP（非加熱時）は ssCMP（加熱処理時）に比べて 10 倍程度変性コラーゲンに対する親和性が高いことがわかっています（[参考データ](#) 参照）。本商品 BindCOLTM は電荷最適化型 scCMP のひとつで、ビオチン標識した BindCOLTM, biotin-conjugated は ssCMP に代わる変性コラーゲンの高感度検出試薬としてご使用いただけます。BindCOLTM, biotin-conjugated は一次抗体のように各種実験に利用でき、蛍光標識または酵素標識アビジン／ストレプトアビジンにより容易に検出できます。

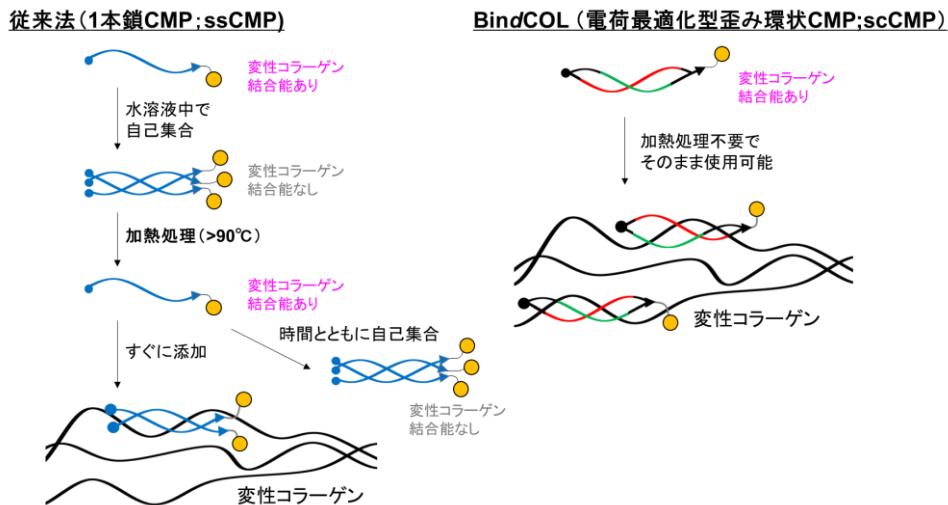


図 2 従来試薬 ssCMP と BindCOLTM の比較

コラーゲンの生合成過程はダイナミックなコラーゲンリモデリングのもう一つの重要な点です。コラーゲンポリペプチドは生合成されたあと小胞体 (ER) においてプロリン水酸化酵素によりプロリンの水酸化翻訳後修飾を受けます。3 本のポリペプチド鎖は自発的には 3 量体は形成できず、コラーゲン特異的なシャペロンタンパク質である HSP47 によって 3 量体形成が促進されます。3 量体となったコラーゲンはゴルジ体に輸送され、分泌経路に入ります。コラーゲン生合成、成熟および分泌の過程における何らかの異常はいくつかの疾患につながると考えられています。BindCOLTM, biotin-conjugated は ER における生合成過程での未成熟のコラーゲンまたはミスフォールディング状態を検出することにも利用可能です（図 3）。

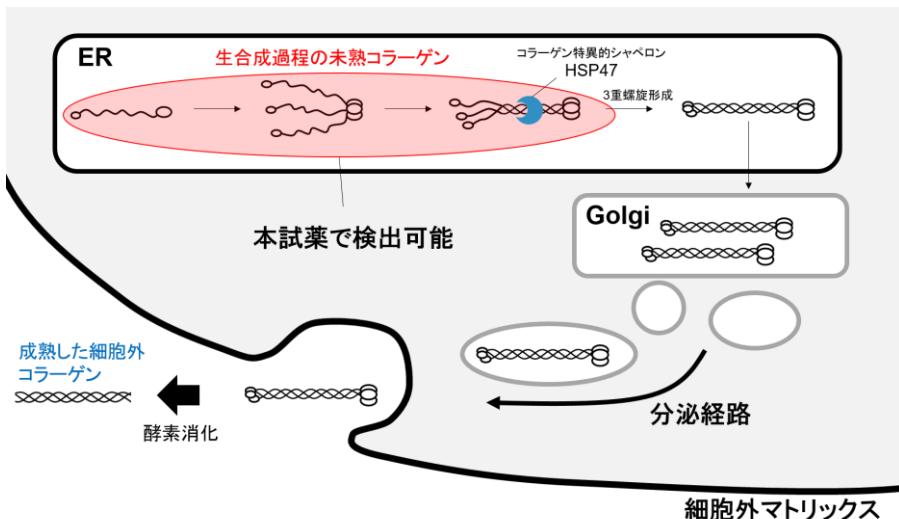


図 3 コラーゲンの生合成過程の概略と本試薬による未熟またはミスフォールディングコラーゲンの検出

商品情報

商品コード: FDV-0035

包装サイズ: 60 μg

分子量: ~4,700 Da

構造: 図 4 参照

溶解性: 水に可溶

標識: ビオチン

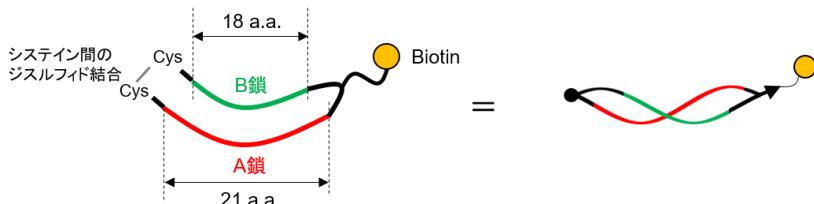


図 4 BindCOL™, biotin-conjugated の構造模式図

アプリケーション

- 変性コラーゲンの検出
- 細胞内の生合成過程の未熟コラーゲンまたはミスフォールディングコラーゲンの検出
- ウエスタンプロットにおける総コラーゲン検出

保存方法

保存温度（溶解前）: -20°C で保管、高温を避けて保存

溶解方法と注意点

使用前に

本商品は凍結乾燥品として提供されます。凍結乾燥粉末は軽い綿状のため、容器側面や蓋の裏側に付着している場合があります。バイアルを開ける前に遠心分離機でスピンドラウンドし粉末を底に落としてから蓋を開けることを推奨します。

溶解方法

BindCOL™, biotin-conjugated は高い水溶性を示します。60 μL or 120 μL の超純水をバイアルに添加し、1 mg/ml or 0.5 mg/ml のストック溶液を調製し、ボルテックスなどで激しく攪拌して完全に可溶化します。水に溶解後は小分注して-20°Cで保存してください。小分注品は凍結融解の繰り返しは避け、使い切りを推奨します。

重要な注意点

BindCOL™, biotin-conjugated は図 4 で示すように N 末端側をシステイン同士のジスルフィド結合により環状構造を形成しています。ジスルフィド結合は本試薬の機能発揮に不可欠であり、各種還元剤 (DTT, 2-ME, TCEP など) とは併用できません。ご使用のアッセイバッファー等に還元剤が含まれていないことを事前にご確認ください。

プロトコール

※下記のプロトコールは一般的な例です。各実験ステップは実験目的等で異なる可能性があります。実験ごとに条件を最適化してください。

蛍光イメージングによる変性コラーゲンの検出プロトコール例

1. BindCOL™, biotin-conjugated を終濃度 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように PBS (またはバッファー) に希釈する
2. 試料を PBS で洗浄する
3. 試料を 4% パラホルムアルデヒド溶液で 10-15 分ほど固定する
4. 試料を PBS で数回洗浄する
5. 試料を任意のブロッキング剤 (3% BSA など) で 1 時間程度ブロッキングする
6. 試料を PBS で複数回洗浄する
7. 試料に 1.で調製した本試薬溶液を添加し、1-2 時間ほど反応させる
8. 試料を PBS で複数回洗浄する

9. 蛍光標識ストレプトアビジンを試料に添加し、1時間ほど反応させる
10. 試料を PBS で複数回洗浄する
11. 試料を蛍光顕微鏡で観察する

固相結合 (ELISA 様) アッセイによる変性コラーゲンの検出プロトコール例

1. 96 ウエルなどマルチウェルプレートに変性コラーゲンを含む試料をコートする
2. ウエルを PBST で複数回洗浄する
3. ウエルを各種ブロッキング剤 (スキムミルク、BSA など) で 1 時間以上処理してブロッキングする
4. BindCOLTM, biotin-conjugated を終濃度 1-10 µg/ml になるように PBS (またはバッファー) に希釈する
5. 4.で調製した本試薬希釈液をウェルに添加し、1 時間以上反応させる
6. ウエルを PBST で複数回洗浄する
7. HRP-または AP-標識アビジン/ストレプトアビジンをウェルに添加し 1 時間以上反応させる
8. ウエルを PBST で複数回洗浄する
9. 適切な HRP または AP 用基質を添加し反応させる
10. マイクロプレートリーダーにより発色強度を測定

ウェスタンプロットによる総コラーゲンの検出プロトコール例

1. SDS-PAGE サンプルバッファーを用いて細胞または組織ライセートを調製し、95°Cで 5 分処理し、試料中のコラーゲンを完全に変性させる
2. SDS-PAGE によりタンパク質を分離する
3. 分離後のタンパク質をニトロセルロースや PVDF メンブレンに転写する
4. メンブレンをブロッキング剤 (スキムミルク、3% BSA など) で 1 時間ほどブロッキングする
5. BindCOLTM, biotin-conjugated をブロッキング溶液に終濃度 1-10 µg/ml で希釈し、メンブレンに添加して少なくとも 1 時間反応させる
6. メンブレンを PBST で複数回洗浄する
7. HRP または AP 標識アビジン/ストレプトアビジン溶液をメンブレンに添加し、1 時間程度反応させる
8. メンブレンを PBST を複数回洗浄する
9. 適切な HRP または AP 用基質を添加し必要時間反応させる
10. HRP または AP シグナルの化学発光または発色を観察する

注意 : SDS-PAGE の試料調製および電気泳動の過程でコラーゲンは SDS により完全に変性します。本手法においては本試薬は試料中の総コラーゲンを検出しており、生理的な変性コラーゲンを検出するものではありません。

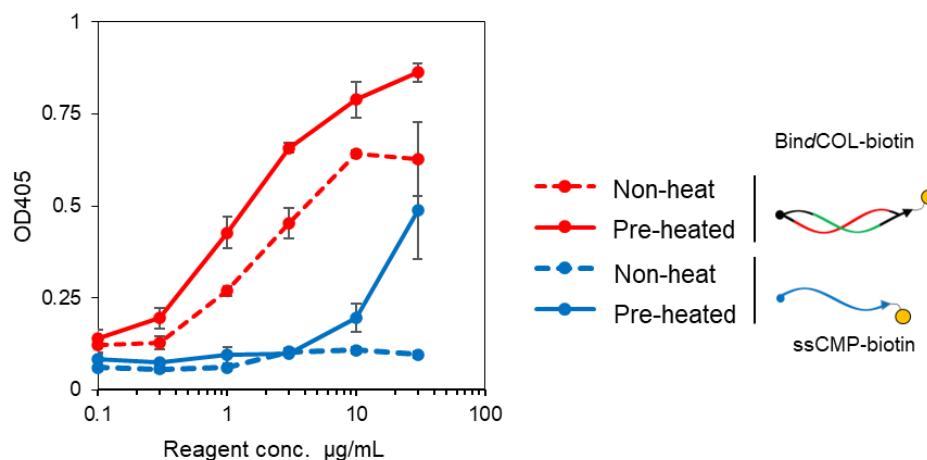
蛍光イメージングによる細胞内の未熟またはミスフォールディングコラーゲンの検出プロトコール例

1. 培養細胞を PBS で複数回洗浄する。
2. BindCOLTM, biotin-conjugated を終濃度 1-10 µg/ml になるように PBS (またはバッファー) に希釈する
3. 細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で 10-15 分ほど固定する
4. 細胞を PBS で数回洗浄する
5. 細胞を 0.5% Triton-X100 含有 PBS で 5 分間処理し、細胞膜透過処理を行う
※BindCOLTM, biotin-conjugated は細胞膜透過性がないため、界面活性剤による細胞膜透過処理が必要
6. 任意のブロッキング剤 (3% BSA など) で 1 時間程度ブロッキングする
7. 細胞を PBS で複数回洗浄する
8. BindCOLTM, biotin-conjugated をブロッキング溶液に終濃度 1-10 µg/ml で希釈し、細胞に添加して少な
くとも 1 時間反応させる
9. 試料を PBS で複数回洗浄する
10. 蛍光標識ストレプトアビジンを試料に添加し、1 時間程度反応させる
11. 試料を PBS で複数回洗浄する
12. 試料を蛍光顕微鏡で観察する

参考データ

ビオチン標識 ssCMP と BindCOLTM の結合親和性の定量的評価

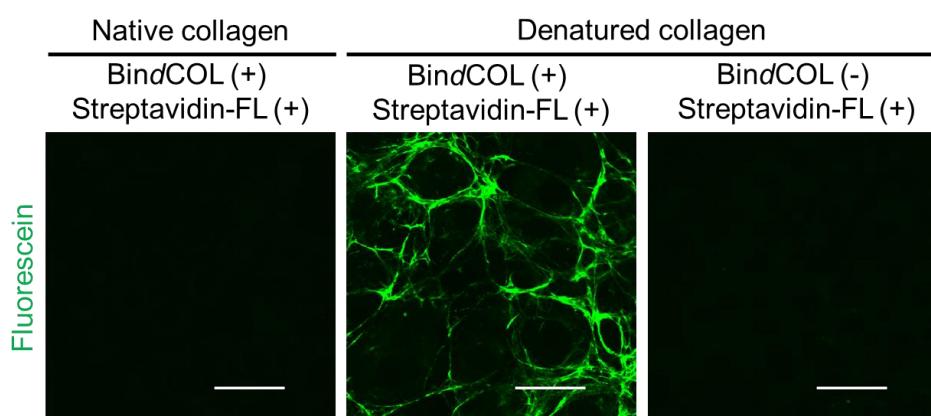
予め熱変性させた精製 I 型コラーゲンを 96 ウエルプレートにコートした。余剰のコラーゲンを ELISA buffer (20 mM HEPES-Na(pH 7.5), 100 mM NaCl, and 0.005% Tween-20) で 3 回洗浄し、0.5% スキムミルクでブロッキングした。ウェルを洗浄したのち、ビオチン標識した ssCMP または BindCOL 希釀液を添加し、1 時間反応させた。ウェルを ELISA バッファーで 3 回洗浄し、HRP 標識ストレプトアビジンを添加して反応させた。結合量は HRP の発色基質を用いて算出した。ssCMP は反応前に事前加熱した際のみ変性コラーゲンに対する結合が観察されたのに対し、本試薬 BindCOLTM は事前加熱の有無によらず高い結合能を示した。



アプリケーションデータ

培養細胞から產生されたコラーゲンの検出

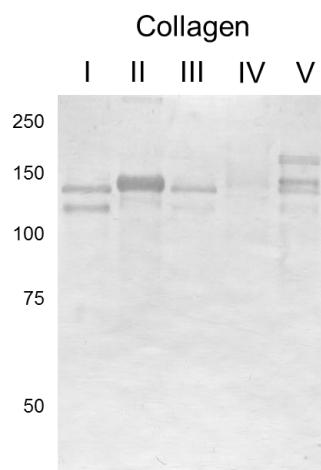
マウス胎児線維芽細胞 (MEF) をコンフルエント条件で 3 日間培養し、コラーゲンを產生させた。変性コラーゲンを調製するため、細胞層に 95°C で加熱した PBS を添加し 1 分間処理した。加熱変性操作後、細胞層を 4% PFA で固定化し、3% BSA/PBS でブロッキングを行った。細胞層に PBS で希釈した終濃度 3 μg/ml の BindCOLTM, biotin-conjugated を処理し 1 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄した後、FITC 標識ストレプトアビジンを 1 時間反応させた。細胞層を再度洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。本試薬は変性処理した試料のみ蛍光シグナルが観察され、非変性試料ではほとんど蛍光シグナルが見られなかった。



ウェスタンプロットによる I-V 型コラーゲンの検出

精製コラーゲン (I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型) を SDS-PAGE で分離し、二トロセルロールメンブレンに転写した。メンブレンをスキムミルク溶液でブロッキングした後、BindCOL™, biotin-conjugated を終濃度 5 μ m/ml に希釈し 1 時間反応させた。メンブレンを TBST で洗浄後、AP 標識ストレプトアビシンを添加し、検出を行った。本試薬は I-V 型コラーゲンをいずれも検出することができた。

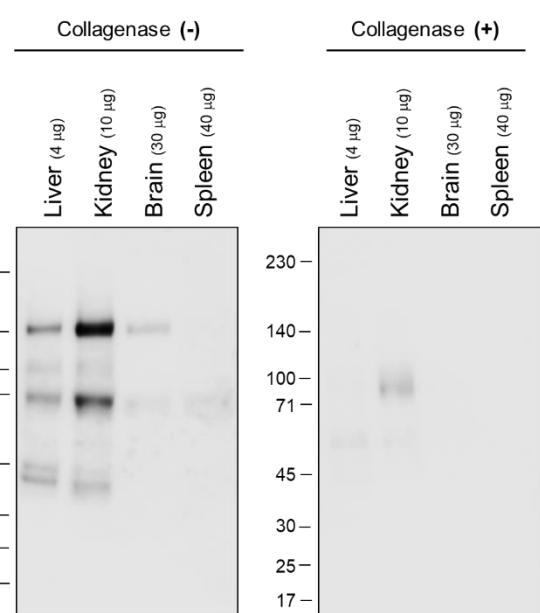
注意：SDS-PAGE においてはコラーゲンは変性するため、試料中の全コラーゲンが検出できます。



ウェスタンプロットによる組織中の総コラーゲンの検出

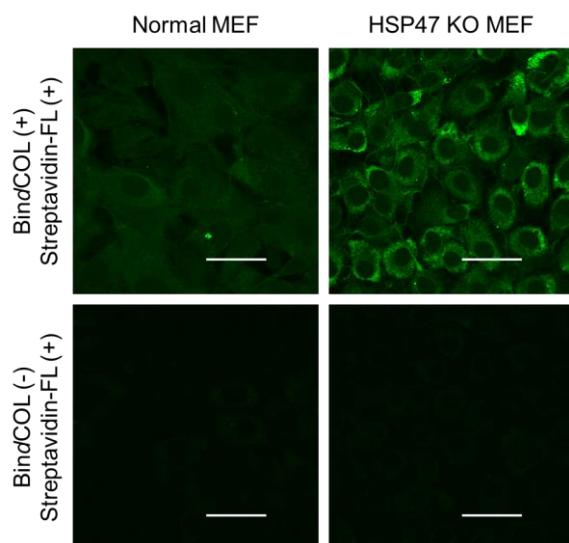
凍結マウス組織（肝臓、腎臓、脳および脾臓）をホモジナイズバッファー (50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.32 M sucrose, 0.1% Triton-X100) 中でダウンスホモジナイザーにより破碎し、組織破碎液を調製した。コラーゲン特異性を評価するため IV 型コラゲナーゼまたは対照実験として水を各組織破碎液に添加し、2 時間室温で反応させたのち、終濃度 2% SDS になるように 10% SDS を添加し試料を変性させた。各変性破碎液を遠心分離し、不溶性の組織片を沈殿させて上清を回収し、SDS-PAGE 用試料を調製した。各試料は SDS-PAGE で分離後 PVDF メンブレンに転写し、3% BSA/TBST でブロッキングした後、BindCOL™, biotin-conjugated (0.4 μ g/ml)を 1 時間反応させた。TBS でメンブレンを洗浄後に HRP 標識ストレプトアビシン (0.05 μ g/ml) で 1 時間反応させた。最後に HRP の発光基質を添加し、化学発光を観察した。本試薬で検出されるシグナルはいずれの組織においてもコラゲナーゼ処理により消失したことから、本試薬が変性コラーゲン特異的であることがわかる。

注意：腎臓組織においてはコラゲナーゼ処理後も若干のシグナルが観察されているが、もともとの分子量と位置が異なるため、コラゲナーゼにより部分的に分解されたコラーゲンと考えられる。



細胞内の未熟またはミスフォールディングコラーゲンの検出

正常なマウス胎児線維芽細胞（MEF）およびコラーゲン特異的シャペロンタンパク質である HSP47 ノックアウト MEF 細胞をそれぞれ 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、0.5% TritonX-100 で膜透過処理を行った後、3% BSA でブロッキングした。細胞を洗浄したのち、BindCOLTM, biotin-conjugated を終濃度 3 μ g/ml で添加し 1 時間反応させた。さらに細胞を洗浄した後、FITC 標識ストレプトアビジンを添加して 1 時間処理した。細胞を洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。コラーゲン特異的シャペロン HSP47 ノックアウト MEF では正常 MEF に比べて ER から有意に強い蛍光シグナルが観察された。本試薬は細胞内に蓄積する未熟コラーゲンやミスフォールディングコラーゲンの検出に優れている。



参考文献

1. Takita, K. K., Fujii, K. K., Ishii, K., Koide, T., *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 7380-7387 (2019) Structural optimization of cyclic peptides that efficiently detect denatured collagen.
2. Takita, K. K., Fujii, K. K., Kadonosono, T., Masuda, R., Koide, T., *ChemBioChem.*, **19**, 1613-1617 (2018) Cyclic Peptides for Efficient Detection of Collagen.

免責事項

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2019年12月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル（以下、商品資料）を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。

BindCOLTM, biotin-conjugated <Denatured Collagen Detection Reagent>

Catalog NO. FDV-0035

Research use only, not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

Product Background

Collagen is the most abundant component of the extracellular matrix (ECM) and constitutes a large protein family in mammals. Collagen family shares unique triple-helical structures (Figure 1, left) consisting of three polypeptides that contain frequent repeats of Gly-Pro-Hyp (4-hydroxyproline) triplets. In human, 27 types are identified as the collagen family. Among them, types I, II and III occupy the majority (~90%) of the family in the body. Collagens have various functions from regulation of cellular activities, such as cell adhesion, migration and invasion, to mechanical support of tissues. In these processes, the dynamic remodeling of collagens including *de novo* production and degradation/denaturation is tightly regulated. Abnormal regulations of collagen-remodeling derived from excess production of unfolded or misfolded collagens or highly degradation of collagens leads to pathological conditions. Fibrosis in liver, osteoarthritis in cartilage, atherosclerosis in blood vessels and abnormal invasion of cancer cells are well-known examples of imbalance of collagen remodeling. Recent evidences indicate the increased amount of denatured collagen is associated with these diseases.

Denatured collagen is the loss of triple helical structure induced by heat, proteases, mechanical stress, and chemical modification (Figure 1, right). Once triple helical structures are destroyed, each polypeptide cannot re-organize the triple-helical structure. As denatured collagen is one of the pathological markers, detecting method for denatured collagens will be a good tool for pathophysiological research. Antibodies are one of the general tools for collagen research but cannot distinguish between native and denatured collagens. Only few antibodies are established to specifically detect denatured collagen, but they recognize only one specific collagen isoform. The detection probes satisfying following three points are highly desired. 1) Denatured collagen specific, 2) highly sensitive, and 3) broad cross-reactivity for various types of collagens. Recently, chemically synthesized collagen mimetic peptides (CMP) containing collagen-like amino acid sequences (Gly-Pro-Hyp)_n are applied in detection of denatured collagens (Figure 2). CMPs selectively hybridize in the unfolded region of collagens. However, single-stranded CMPs (ssCMP) are preferentially self-assembled to homo trimer in water and it dramatically reduces binding affinity to denatured collagens. To avoid self-assembly of ssCMPs a pre-heating step is necessary. Pre-heating promotes dissociation of self-assembled trimers and increases the binding affinity of ssCMPs to denatured collagens. The experimental pre-heating process gives not only researcher's increased labor but also experimental bias in each trial,

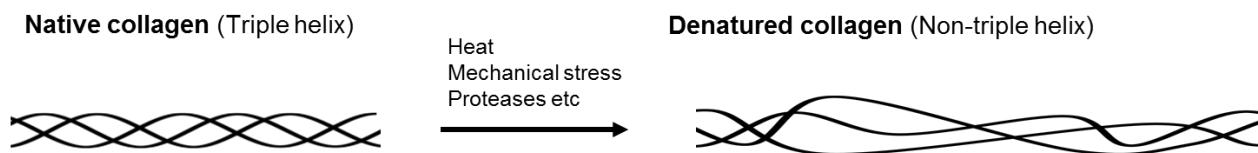


Figure 1. Overview of native and denatured collagens

ssCMPs are not sufficient tools for detecting various denatured collagens. To overcome this problem, the next generation denatured collagen detecting peptide was developed (Ref.1). The novel peptide has highly unique structure which is a strained cyclic CMP (**scCMP**) and has optimized anionic charges (anion-optimized scCMP). Due to strained cyclic structure and anionic charges, the self-assembly of the peptides are suppressed. The anion-optimized scCMP improves not only pre-heating step but also binding affinity for denatured collagen, over 10-fold higher than ssCMP. **BindCOL™**, a charge-optimized scCMP, shows dramatically higher sensitivity than ssCMP without pre-heating step. A biotin-conjugated **BindCOL™** can be flexibly used similar to primary antibody and easily detected by any fluorophore- or enzyme-linked avidin/streptavidin reagents.

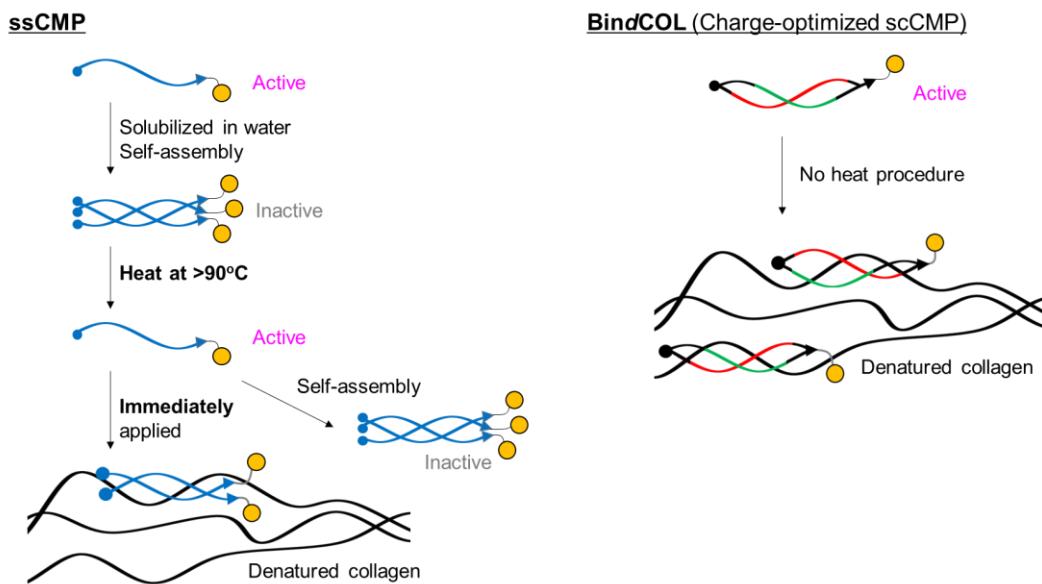


Figure 2. Comparison between ssCMP and BindCOL™

Collagen biosynthesis is another important process of dynamic collagen remodeling. Collagen polypeptides are firstly synthesized and post-translationally modified by prolyl hydroxylase in endoplasmic reticulum (ER). Three polypeptide chains cannot assemble triple helical structure by itself. Collagen-specific molecular chaperon, HSP47 promotes formation of trimers. Folded collagens are transferred to Golgi apparatus and secretory pathway. Abnormal collagen synthesis, maturation or secretory also induces some diseases. **BindCOL™** is an applicable detecting reagent for unfolded or misfolded collagens in ER under the biosynthetic pathway.

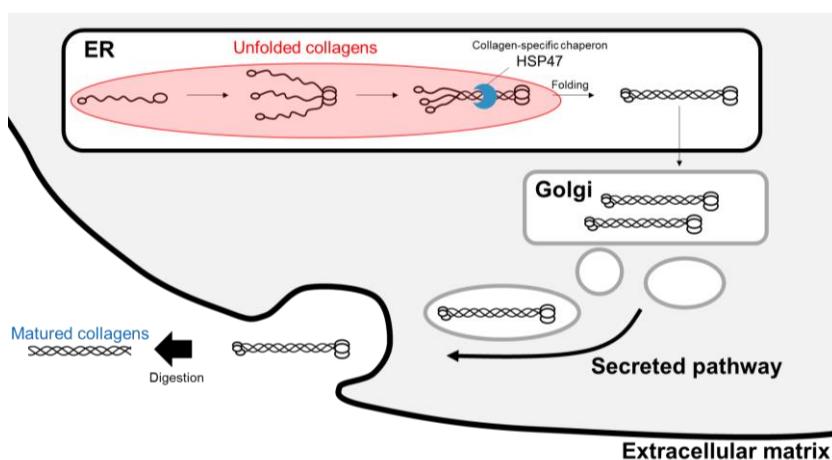


Figure 3. Biosynthesis of collagens and detection of unfolded and misfolded collagen in ER

Description

Catalog Number	: FDV-0035
Size	: 60 µg
Molecular weight	: ~4,700 Da
Probe structure	: Figure 4
Solubility	: Soluble in water
Label	: Biotin

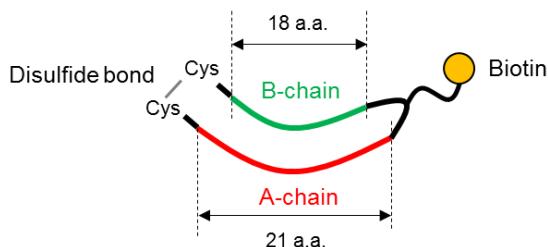


Figure 4. Image of BindCOL™ -biotin structure

Applications

- Detection of denatured collagen
- Detection of intracellular unfolded and misfolded collagen
- Detection of total collagen in Western Blotting system

Storage

Store powder at **-20°C**. Please avoid humid conditions.

Reconstitution and Note

Before use

The lyophilized peptide is a fluffy powder and may be attached to the tube wall or backside of tube lid. Before opening vial, please centrifuge vial and check the powder pellet bottom of vial.

Reconstitution

The reagent is well solubilized in water. Add 60 µL or 120 µL of water to the vial to prepare 1 mg/ml or 0.5 mg/ml stock solution, respectively, and vigorously shake tube to completely dissolve the powder. After reconstitution in water, make aliquots and store at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note

This cyclic peptide has a disulfide bond (S-S bond) in the N-terminus (Figure 4). To protect S-S bond, all reducing reagents such as DTT, 2-ME and TCEP etc., are not compatible with this reagent. If S-S bond is cleaved by any reducing reagents, the binding affinity of the peptide will be dramatically decreased. Please carefully check if your assay buffers contain any reducing reagents.

How to use

- * Following protocols are just general references. Each step depends on customer's experiments. Please optimize assay conditions for each experiment.

General procedure of denatured collagen detection by fluorescent imaging

1. Prepare 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution in PBS (or appropriate buffers)
2. Wash samples with PBS
3. Fix samples by 4% paraformaldehyde for 10-15 min
4. Wash samples with PBS several times
5. Block samples with any blocking buffers (3% BSA etc.) for 1 hour
6. Wash samples with PBS several times
7. Add 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution to samples for 1-2 hours.
8. Wash samples with PBS several times
9. Add fluorophore-conjugated streptavidin to the samples and incubate for 1 hour
10. Wash samples with PBS several times
11. Observe samples with fluorescence microscopies.

General procedure of denatured collagen detection by solid-phase binding (ELISA-like) assay

1. Coat biological samples containing denatured collagens on the multi-well plate such as 96 well plate.
2. Wash the wells with PBST several times
3. Block the wells with any blocking buffers (skim milk or BSA etc.) for >1 hour
4. Prepare 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution in PBS (or appropriate buffers)
5. Probe the wells with 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution for >1 hour
6. Wash the wells with PBST several times
7. Probe the wells with HRP- or AP-conjugated avidin/streptavidin for >1 hour
8. Wash the wells with PBST several times
9. Add HRP-substrate or AP-substrate to the wells
10. Measure colorimetric intensities by a microplate-reader

General procedure of detection of total collagen in Western Blotting system

1. Prepare cell or tissue lysates in SDS-sample buffer and boiled at 95°C for 5 min to denature collagen completely
2. Separate proteins by SDS-PAGE
3. Transfer proteins to nitrocellulose or PVDF membrane
4. Block the membrane with any blocking buffers (skim milk or 3% BSA etc.) for 1 hour.
5. Probe the membrane with 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution in blocking buffer for at least 1 hour.
6. Wash the membrane with PBST several times
7. Probe the membrane with HRP or AP-conjugated avidin/streptavidin for 1 hour.
8. Wash the membrane with PBST several times
9. Add HRP- or AP-substrate to the membrane
10. Detect the HRP or AP signal with chemical luminescence and colorimetric reagents.

NOTE: Under SDS-PAGE, all collagens are denatured by SDS. Please note “Denatured Collagen Detection Reagent” detects total collagen in the sample.

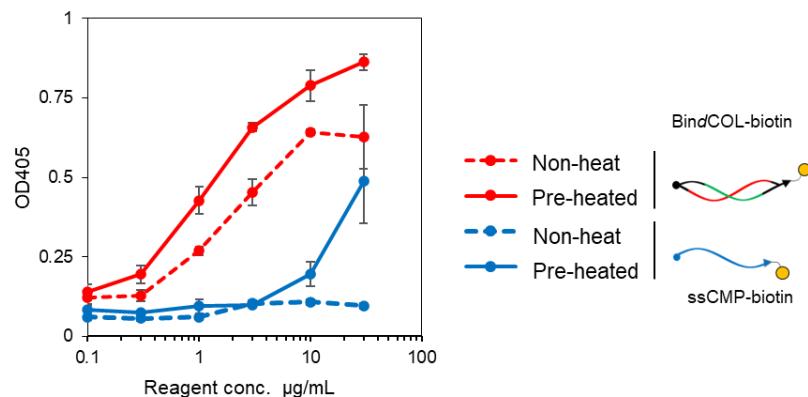
General procedure of intracellular unfolded and misfolded collagen staining

1. Wash cells with PBS several times
2. Fix samples by 4% paraformaldehyde for 10-15 min
3. Wash samples with PBS several times
4. Treat cells with 0.5% TritonX-100/PBS for 5 min *Cell membrane permeabilization is essential step.
5. Block samples with any blocking buffers (3% BSA etc.) for 1 hour
6. Wash samples with PBS several times
7. Add 1-10 µg/ml BindCOL™ reagent solution in the blocking buffer to samples for 1-2 hours.
8. Wash samples with PBS several times
9. Add fluorophore-conjugated streptavidin in the blocking buffer to the samples and incubate for >1 hour
10. Wash samples with PBS several times
11. Observe samples with a fluorescence microscopy.

Reference data

Quantitative analysis of binding affinity of both ssCMP and **BindCOL™**

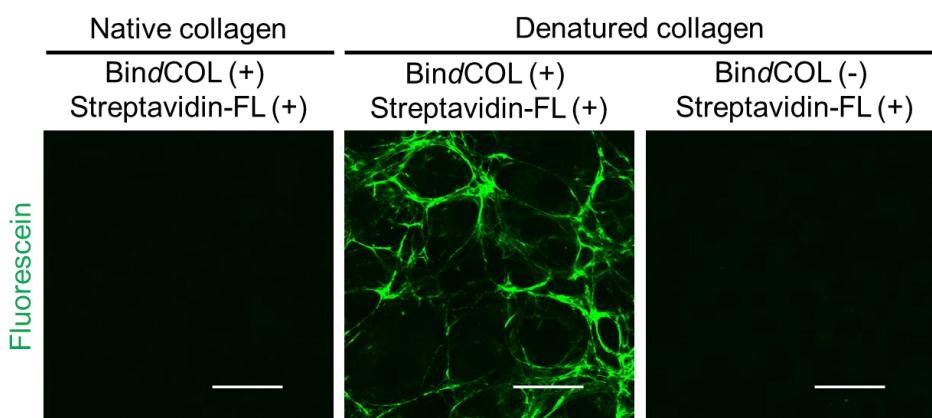
Wells on 96 well plate were pre-coated with heat-denatured collagen I. The wells were washed by ELISA buffer (20 mM HEPES-Na (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 0.005% Tween-20) three times and blocked by 0.5% skim milk. After washing the wells, ssCMP-biotin or **BindCOL™**-biotin-containing solution were added into the wells and incubated for 1 hour. The wells were washed by ELISA buffer three times and probed with streptavidin-HRP conjugated. Binding intensity was estimated with a colorimetric substrate for HRP. **BindCOL™** under the non-heat condition shows 10-fold higher than ssCMP with pre-heating. This data indicated that **BindCOL™** shows great sensitivity compared with ssCMP.



Application data

Detection of denatured collagens derived from cultured cells

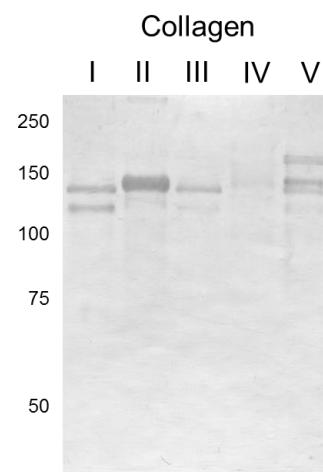
MEF cells were cultured at confluent condition for 3 days to produce collagens. For preparation of denatured collagens, the cell layers were treated with hot PBS (95°C) for 1 min. After the denaturation, they were fixed with 4% PFA and blocked by 3% BSA/PBS. They were incubated with 3 µg/ml of the **BindCOL™** -biotin in PBS for 1 hour, washed by PBS three times and incubated with streptavidin FITC-conjugated for 1 hour. They were washed and observed by confocal laser microscopy. The **BindCOL™** -biotin specifically detect denatured collagen, but no signal from native collagen was observed.



Detection of collagen members by Western Blotting system

Purified collagens (collagen I, II, III, IV and V) were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked by skim milk, probed with 5 µg/ml the reagent for 1 hour. After washing the membrane with TBST, the membrane was treated with streptavidin-AP conjugated to detect biotin-conjugated this probe. The **BindCOL™** -biotin could detect all collagens I-V by the SDS-PAGE/Western Blotting system.

NOTE: Under SDS-PAGE, all collagens were denatured. This result showed the reagent detect total collagen in the sample.

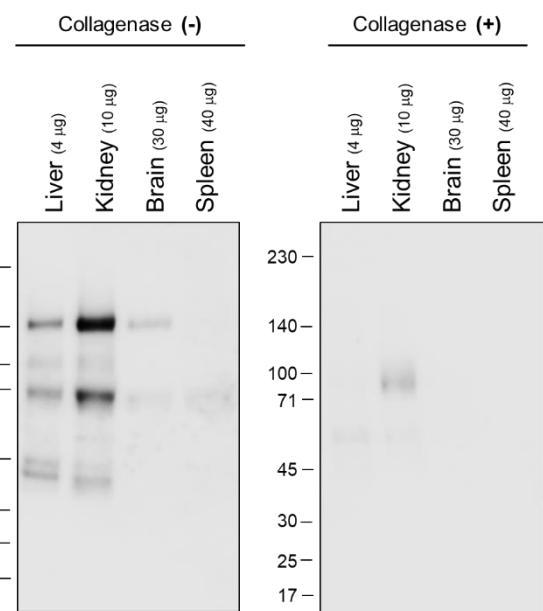


Detection of total collagen members in various tissues by Western Blotting system

Frozen mouse tissues (liver, kidney, brain and spleen) were homogenized by dounce-type homogenizer in homogenize buffer (50 mM HEPES (pH7.4), 100 mM NaCl, 0.32 M sucrose, 0.1% Triton-X100). Collagenase IV or water was added to each homogenate and the lysates were incubated for 2 hours at RT. After incubation, 10% SDS was added to each homogenate to be final 2% SDS concentration. The SDS-containing lysates were centrifuged and collected the supernatants to remove SDS-insoluble tissue debris. All samples were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The membrane was sequentially treated with blocking buffer (3% BSA in TBST) for 30 min, **BindCOL™** -biotin (0.4 µg/ml in TBST) for 1 hour and Streptavidin-HRP (0.05 µg/ml in TBST) for 1 hour. Finally, chemiluminescent signal was observed.

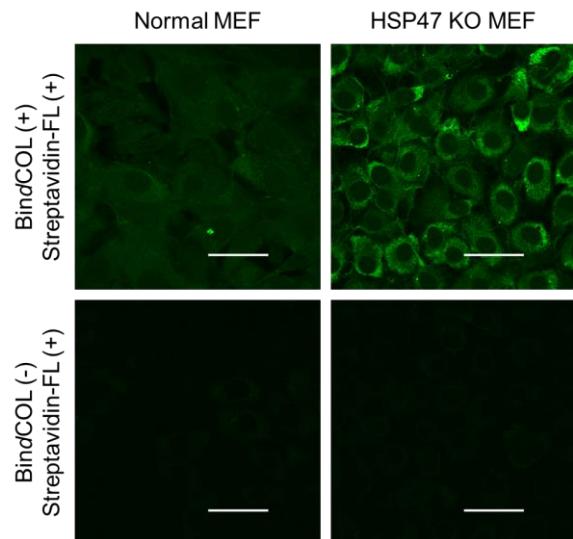
BindCOL™ -biotin could detect collagen signals which can be degraded by collagenase treatment in all tissues tested in this experiment.

NOTE: Kidney in collagenase (+) still shows slight bands. Because molecular weight of these bands were different from original bands in collagenase (-), we concluded these bands were derived from partially cleaved collagens by collagenase.



Detection of intracellular unfolded and misfolded collagen

Normal MEFs and HSP47 KO MEFs were fixed with 4% PFA, permeabilized by 0.5% TritonX-100 and blocked by 3% BSA. After washing cells, the cells were probed with **BindCOL™** -biotin (3 μ g/ml) for 1 hour, washed and further treated with streptavidin FITC-conjugated for 1 hour. After washing cells, the cells were observed in confocal microscopy. Collagen-specific chaperon HSP47- KO MEFs show higher signal from ER than normal MEFs. The **BindCOL™** -biotin is a valuable tool to estimate the amount of intracellular unfolded and misfolded collagen accumulation inside cells.



Reference

1. Takita, K. K., Fujii, K. K., Ishii, K., Koide, T., *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 7380-7387 (2019) Structural optimization of cyclic peptides that efficiently detect denatured collagen.
2. Takita, K. K., Fujii, K. K. Kadonosono, T., Masuda, R., Koide, T., *ChemBioChem.*, **19**, 1613-1617 (2018) Cyclic Peptides for Efficient Detection of Collagen.

Disclaimer/免責事項

This product has been commercialized by Funakoshi Co., Ltd. based on the results of academic research, and the advertisement text, figures and manuals (hereinafter “Product information”) have been prepared based on published research reports on December, 2019. The academic interpretation at the time of creation of the Product Information may change in accordance with future developments in the relevant research field and expansion of various scientific findings, and the latest version and certainty of the Product Information are not guaranteed. The specifications of this product and the Product Information are subject to change without notice. Please contact us for the latest information.

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2019年12月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル(以下、商品資料)を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。

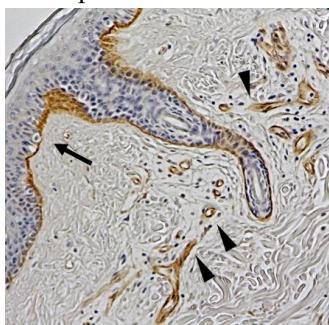


Related products

Catalog No.	Product name	Target	Application
FDV-0023	Anti-Laminin α 3B, Human, Mouse-Mono (F7)	Laminin α 3B	IHC, WB, IP, ELISA
FDV-0024	Anti-Laminin α 3A, Human, Mouse-Mono (BG5)	Laminin α 3A	IHC, WB, IP, ELISA
FDV-0025	Anti-Laminin γ 2 N-terminal fragment, Human, Mouse-Mono (P2H)	Laminin γ 2 N-terminal fragment	IHC, WB, ELISA
FDV-0026	Anti-Laminin 511, Human, Mouse-Mono (12D)	Trimeric Lm511 structure	IHC, WB, IP, ELISA

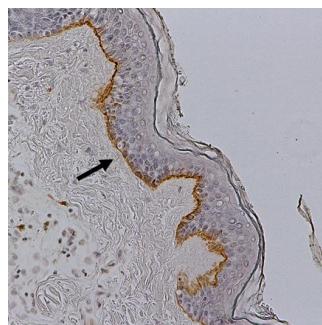
Anti-Laminin α 3B (F7) #FDV-0023

Sample : normal human skin
Arrow head : vascular basement membrane
Arrow : epithelial basement membrane



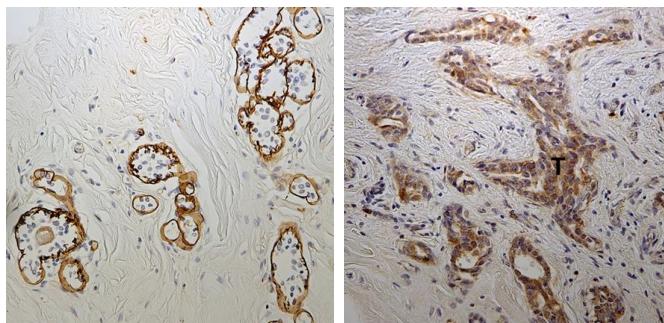
Anti-Laminin α 3A (BG5) #FDV-0024

Sample : normal human skin
Arrow : epithelial basement membrane



Anti- Laminin γ 2 N-terminal fragment (P2H) #FDV-0025

Sample : human normal mammary gland (left), human breast cancer (right, T=tumor)



Anti-Laminin 511 (12D) #FDV-0026

Sample : human normal mammary gland
Arrow head : vascular basement membrane
Arrow : mammary gland basement membrane

