

(90 × 210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 038-22361 (100 mg)  
034-22363 ( 1 g)  
032-22364 ( 5 g)

## Collagenase コラーゲナーゼ

Collagenase is generally used to digest the connective components in tissue samples to individual cells.

This product is for laboratory research use only; use in any such application is the responsibility of the user.

**Source :** *Clostridium histolyticum*

**Activity :** Indicated on the label

**CAS No. :** 9001-12-1

**EC No. :** 3. 4. 24. 3

### Assay Methods

#### 1. Principle

Liberates amino acid (as L-Leucine) from collagen as the substrate. The amino acid released is quantified by ninhydrin color.

#### 2. Reagents

- A. 0.05 mol/L TES Buffer, pH 7.5  
Dissolve 5.74g of *N*-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane Sulfonate and 0.026 g of Calcium Chloride Dihydrate in 400 mL of water. Adjust to pH 7.5 with 5 mol/L Sodium Hydroxide aq., add water to bring the final volume up to 500 mL.
- B. 0.2 mol/L Citrate Buffer, pH 5.0  
Dissolve 2.1 g of Citric Acid Monohydrate in 30 mL of water. Adjust to pH 5.0 with 5 mol/L Sodium Hydroxide aq., add water to bring the final volume up to 50 mL.
- C. Ninhydrin Reagent  
Dissolve 0.08 g of Tin (II) Chloride Dihydrate in Ninhydrin · 2-Methoxyethanol Solution (40 g/L) and bring the final volume up to 50 mL. Mix with 50 mL of Reagent B and stir until the solution becomes yellow (After enclosing with nitrogen gas, store in the dark).
- D. 50 vol% 1-Propanol  
Mix equivalent amount of 1-Propanol and water.
- E. Collagen Solution  
Add 0.5 g of Collagen to 100 mL of Reagent A, and dissolve in water bath with heat for 10 minutes. After cooling, filtrate the solution.
- F. Enzyme Solution  
Dissolve 10 mg of this product in 10 mL of Reagent A. Add Reagent A to 2 mL of the solution and bring the final volume up to 30 mL.
- G. 500 μg/mL L-Leucine Standard Solution  
Dissolve 0.5 g of L-Leucine in 50 mL of water. Add Reagent A to 2.5 mL of the solution and bring the final volume up to 50 mL.

- 1/4 -

Trans \*

#### 2. 試薬

- A. 0.05 mol/L TES緩衝液、pH 7.5  
*N*-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタン  
スルホン酸 5.74 g、塩化カルシウム二水和物 0.026 g  
を水 400 mL に溶解する。5 mol/L 水酸化ナトリウム  
溶液を用いてpH 7.5に調整後、水で 500 mL にする。
- B. 0.2 mol/L くえん酸緩衝液、pH 5.0  
くえん酸一水和物 2.1 g を水 30 mL に溶解する。5  
mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 5.0に調整  
後、水で 50 mL にする。
- C. ニンヒドリン試液  
塩化すず (II) 二水和物 0.08 g をニンヒドリン・2-  
トキシエタノール溶液 (40 g/L) に溶解し、50 mL  
にする。試液 B 50 mL と混合し、うすい黄色になる  
まで攪拌する (窒素封入後遮光保存)。
- D. 50 vol% 1-プロパノール  
1-プロパノールと水を等量混合する。
- E. コラーゲン溶液  
コラーゲン 0.5 g を試液 A 100 mL に攪拌し、水浴中  
で 10分間加熱溶解する。冷却後、ろ過する。
- F. 酵素溶液  
本品 10 mg を試液 A 10 mL に溶解する。その 2 mL  
を試液 A で 30 mL にする。
- G. 500 μg/mL L-ロイシン標準溶液  
L-ロイシン 0.5 g を水 50 mL に溶解する。その 2.5  
mL を試液 A で 50 mL にする。

#### 3. Procedures

##### 1) Test

Reagent	Test	Blank
E	5 mL	5 mL
Pre-incubate at 37 °C for 15 minutes		
F	0.1 mL	—
A	—	0.1 mL
Shake at 37 °C for 4.5hours, and stand at 37 °C for 30 minutes (Reaction Solution)		
0.2 mL of Reaction Solution		
C	1.0 mL	1.0 mL
In boiled water bath, incubate with covering connection tube with a glass ball for 20 minutes, and cool in water bath of 25 °C for 5 minutes		
D	5.0 mL	5.0 mL
Stand at room temperature for 15 minutes		
Measure the absorbance at 600 nm of wavelength with Reagent D as control with 10 mm of absorption cell.		

- 2/4 -

2) Standard curve

Reagent	Blank	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4
G	0 mL	0.2 mL	0.5 mL	1.0 mL	2.0 mL
A	5.0 mL	4.8 mL	4.5 mL	4.0 mL	3.0 mL
0.2 mL of mixed solution					
C	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
In boiled water bath, incubate with covering connection tube with a glass ball for 20 minutes, and cool in water bath of 25 °C for 5 minutes					
D	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Stand at room temperature for 15 minutes					
Measure the absorbance at 600 nm of wavelength with Reagent D as control with 10 mm of absorption cell					

(Calculation)

$$A = \frac{\alpha}{131.17} \times \frac{1}{S \times \frac{2}{10} \times \frac{0.1}{30} \times \frac{0.2}{5.1}}$$

A : Activity (units/mg)

$\alpha$  : amount of L-Leucine in 0.2 mL of filtrated solution calculated from standard curve ( $\mu\text{g}$ )

S : amount of weighed this product (mg)

131.17 : molecular weight of L-Leucine

Trans\*

2. 実験操作

1) 本試験

試液	本試験	空試験
E	5 mL	5 mL
37 °C、15分間予備加温		
F	0.1 mL	—
A	—	0.1 mL
37 °Cの水浴中で、4.5時間振とう後、30分間静置		
その0.2 mL		
C	1.0 mL	1.0 mL
沸騰水浴中、ガラス球で管口を覆い20分間反応後、25 °Cの水浴中で5分間冷却		
D	5.0 mL	5.0 mL
15分間放置		
吸収セル 10 mm を用い、波長 600 nm における吸光度を試液Dを対照液として測定。		

2) 標準液の試験

試液	空試験	標準 1	標準 2	標準 3	標準 4
G	0 mL	0.2 mL	0.5 mL	1.0 mL	2.0 mL
A	5.0 mL	4.8 mL	4.5 mL	4.0 mL	3.0 mL
各々その0.2 mL					
C	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
沸騰水浴中、ガラス球で管口を覆い20分間反応後、25 °Cの水浴中で5分間冷却					
D	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
15分間放置					
吸収セル 10 mm を用い、波長 600 nm における吸光度を試液Dを対照液として測定。					

(計算)

$$A = \frac{\alpha}{131.17} \times \frac{1}{S \times \frac{2}{10} \times \frac{0.1}{30} \times \frac{0.2}{5.1}}$$

A : 活性 (units/mg)

$\alpha$  : 検量線から求めたろ液 0.2 mL 中のL-ロイシンの量 ( $\mu\text{g}$ )

S : 量りとした本品の質量 (mg)

131.17 : L-ロイシンの分子量

4. Unit Definition

One collagenase unit is the amount of enzyme which liberates 1  $\mu\text{mol}$  of L-Leucine from collagen in 5 hours at pH 7.5 and 37 °C.

Trans\*

4. 単位の定義

上記の条件で、pH 7.5、37 °Cで、5時間にコラーゲンよりL-ロイシン 1  $\mu\text{mol}$ を生じる酵素量を 1 unitとする。

Storage : Store at -20 °C

Package :

Code No.	Packaging
038-22361	100 mg
034-22363	1 g
032-22364	5 g

\* : Trans is the Japanese translation.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : +81-6-6203-3741  
Facsimile : +81-6-6201-5964  
http://www.wako-chem.co.jp

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.  
Telephone : +1-804-271-7677  
Facsimile : +1-804-271-7791  
http://www.wakousa.com

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : +49-2131-3111-0  
Facsimile : +49-2131-3111-100  
http://www.wako-chemicals.de