

Hydroxyproline Content Assay Kit

羟脯氨酸(HYP)含量测定试剂盒(酸水解法) 微板法

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 |
|---------|----------------------------|-----|
| BL1485B | 羟脯氨酸(HYP)含量测定试剂盒(酸水解法) 微板法 | 96T |

产品简介:

羟脯氨酸(4-hydroxyproline, Hyp)是一种非必需氨基酸,是胶原组织的主要成分之一,在哺乳动物中仅存在于胶原蛋白和弹性蛋白中,但在植物中却存在于许多蛋白质中。动物中的很多疾病可伴有胶原代谢变化而引起血、尿及组织羟脯氨酸的含量改变,因此检测 HYP 含量对了解相关疾病是一项重要参考指标。

本试剂盒采用样品经水解产生游离的 HYP,进一步被氯胺 T 氧化,氧化产物与对二甲氨基苯甲醛反应呈现紫红色,通过检测该有色物质在 560nm 吸光值,即可得出 HYP 含量。

产品组成:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|-------|-------------|-------|---|
| 提取液 | 液体 55mL×1 瓶 | 4°C保存 | 临用前向瓶中务必缓慢加入 55mL 盐酸(6mol/L 盐酸),混匀备用。 |
| 活性炭 | 粉末×1 瓶 | 室温 | |
| 试剂一 | 液体 70mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂三 | 粉末×1 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加 11mL 的试剂一溶解备用。 |
| 试剂四 A | 粉末×1 瓶 | 4°C保存 | 临用前加向试剂 A 中依次加入 3.5mL 高氯酸和 6.5mL 试剂 B,混匀(可超声)溶解,最终液体颜色是黄绿色。 |
| 试剂四 B | 液体 8mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准管 | 液体 2mL×1 支 | 4°C保存 | |

使用方法:

建议正式实验前,选取 2 个样本做预测定,了解实验样品情况,熟悉流程,避免样本和试剂浪费。

一、样本准备

1. 组织样本准备:

- 称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,置于 100°C烘箱,水解 5 小时;
- 水解后,冷却至室温,混匀并取出 100 μ L 混合液至新离心管中,再加 600 μ L 试剂一混匀,再适量加入活性炭颠倒混匀;
- 12000rpm 4°C离心 5min 后取上清(观察:基本无色,若颜色较深,取出上清液后重新加入适量活性炭脱色离心),置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):生理盐水体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

2. 细胞/细菌样本准备:

- 先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



- (b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，置于 100°C 烘箱，水解 5 小时；
- (c) 水解后，冷却至室温，混匀并取出 100 μ L 混合液至新离心管中，再加 600 μ L 试剂一混匀，再适量加入活性炭颠倒混匀；
- (d) 12000rpm 4°C 离心 5min 后取上清（观察：基本无色，若颜色较深，取出上清液后重新加入适量活性炭脱色离心），置冰上待测。

【注】：若增加样本量，按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

3. 液体样本准备：

- (a) 取 100 μ L 液体样本，加 100 μ L 浓盐酸，置于 100°C 烘箱，水解 1.5 小时；
- (b) 水解后，冷却至室温，混匀并取出 100 μ L 混合液至新离心管中，再加 640 μ L 试剂一混匀，再适量加入活性炭颠倒混匀；
- (c) 4°C，12000rpm 离心 5min，取出上清液（观察：基本无色，若颜色较深，取出上清液后重新加入适量活性炭脱色离心），上清液待测。

二、样品测定

- 酶标仪预热 30min，调节波长至 560nm。
- 所有试剂解冻至室温，在离心管中依次加入：

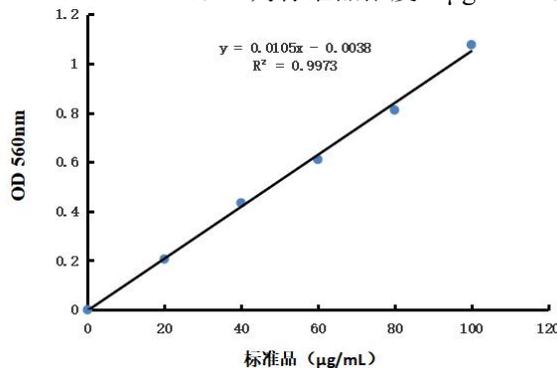
| 试剂名称 (μ L) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|--|-----|------------|
| 样本 | 200 | - |
| 蒸馏水 | - | 200 |
| 试剂二 | 100 | 100 |
| 试剂三 | 100 | 100 |
| 混匀，室温静止 10min。 | | |
| 试剂四 | 100 | 100 |
| 混匀，60°C 孵育 20min，冷却至室温后，取出 200 μ L 至 96 孔板中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 | | |

【注】1 若 A 测定管值超过 1，可把样本进行稀释后测定，稀释倍数 D 代入计算公式。

- 若 ΔA 小于 0.01，则可增加样本质量 W 或液体样本取样体积 V2，则改变后的 W 和 V2 需带入公式重新计算。

三、结果计算

- 标准曲线方程： $y = 0.0105x - 0.0038$ ，x 为标准品浓度 (μ g/mL)，y 是 ΔA 。



- 按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 666.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div W \times D \end{aligned}$$

- 按照液体体积计算：

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



羟脯氨酸(Hyp)含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $[(\Delta A+0.0038)\div 0.0105]\times 14.8\times D=1410\times(\Delta A+0.0038)\times D$

4. 按细菌/细胞密度计算:

羟脯氨酸(Hyp)含量($\mu\text{g}/10^4\text{ cell}$)= $[(\Delta A+0.0038)\div 0.0105\times V1]\div(V1\div V\times 500)\times 7\times D$
 $=666.7\times(\Delta A+0.0038)\div 500\times D$

V---提取液体积, 1mL

V1---加入样本体积, 0.2mL

V2---液体取样体积, 0.1mL

2---一分子尿素含有 2 个氮元素

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

W---取样质量, g

500---细菌或细胞总数, 万

7---组织样本稀释倍数

14.8---液体样本稀释倍数

附: 标准曲线制作过程:

1. 标准品母液是 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 20, 40, 60, 80, 100. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
2. 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

4 $^{\circ}\text{C}$ 保存六个月。

