

Hydroxyproline Content Assay Kit

羟脯氨酸(HYP)含量测定试剂盒(酸水解法) 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL1485A	羟脯氨酸(HYP)含量测定试剂盒(酸水解法) 分光法	48T

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 30mL×1 瓶	4°C保存	临用前向瓶中务必缓慢加入 30mL 盐酸(6mol/L 盐酸),混匀备用。
活性炭	粉末×1 瓶	室温	
试剂一	液体 40mL×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

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。
2. 所有试剂解冻至室温，在离心管中依次加入：

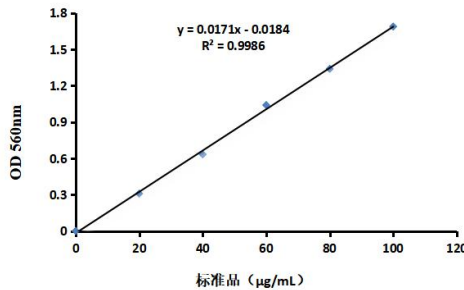
试剂名称 (μ L)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	400	-
蒸馏水	-	400
试剂二	200	200
试剂三	200	200
混匀，室温静止 10min。		
试剂四	200	200
混匀，60°C 孵育 20min，冷却至室温后，取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 空白。		

【注】1 若 A 测定管值超过 1.8，可把样本进行稀释后测定，稀释倍数 D 代入计算公式。

2 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

1. 标准曲线方程： $y = 0.0171x - 0.0184$ ，x 为标准品浓度 (μ g/mL)，y 是 ΔA 。



2. 按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 409.4 \times (\Delta A + 0.0184) \div W \times D \end{aligned}$$

3. 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($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $[(\Delta A+0.0184)\div 0.0171]\times 14.8\times D=865.5\times(\Delta A+0.0184)\times D$

4. 按细菌/细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A+0.0184)\div 0.0171\times V1]\div (V1\div V\times 500)\times 7\times D \\ &= 409.4\times(\Delta A+0.0184)\div 500\times D \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL

V1---加入样本体积, 0.4mL

V2---液体取样体积, 0.1mL

14.8---液体样本稀释倍数

W---取样质量, g

500---细菌或细胞总数, 万

7---组织样本稀释倍数

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

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°C 保存六个月。

