

羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒 (微量法)

产品简介

本产品测定意义: HYP 是机体胶原蛋白主要成分之一, 胶原蛋白大多分布于皮肤、腱、软骨和血管等, 因此 HYP 含量是反映胶原组织代谢及纤维化程度的一项重要指标。

测定原理: 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, 产生红色化合物, 在 560nm 处有特征吸收峰。通过测定样品水解液 560nm 吸光值, 可计算 HYP 含量。

产品组成

名称 编号	羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒 (微量法) 规格: 25 管/24 样
FSS191-T	T 提取液: 液体 6mol/L 盐酸, 自备。浓盐酸: H ₂ O (V/V) = 1:1, 室温保存。
FSS191-1	试剂 1: 液体 8mL×1 瓶, 4℃避光保存。
FSS191-2	试剂 2: 液体 8mL×1 瓶, 4℃避光保存。
FSS191-3	试剂 3: 标准品: 0.5mL×1 支, 0.5mg/mL 羟脯氨酸标准品, 4℃保存。
使用说明书	1 份

使用方法

需自备的仪器和用品:

天平、烘箱、玻璃管、离心机、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、6mol/L 盐酸和蒸馏水。

操作步骤

一、羟脯氨酸提取:

- 1、组织: 称取约 0.2g 样品于玻璃管, 将组织尽量剪碎以便消化, 盖子稍松不密闭。加入 2mL 的提取液, 煮沸或 110℃烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块, 16000rpm, 25℃, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 用 10mol/L NaOH (约 1mL) 调节 pH 值至 6~8 范围内。蒸馏水定容至 4mL, 取上清待测。(过程中可能有黑色物质生成, 若长时间不能消化, 可能为碳化的物质)
2. 细胞: 取 500 万个细胞, 加入 1mL 的提取液, 煮沸或 110℃烘箱 2 至 6 小时消化至透明状, 16000rpm, 25℃, 离心 20min, 用 10mol/L NaOH (约 0.5mL) 调节 pH 值至 6~8 范围内。蒸馏水定容至 2mL, 取上清待测。

二、测定操作表:

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 560nm, 蒸馏水调零。
- 2、 将标准品稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234μg/mL 的标准溶液。
- 3、 操作表

	空白管	测定管	标准管
样本 (μL)		60	
标准溶液 (μL)			60
试剂一 (μL)	60	60	60
混匀, 室温静置 20min			

试剂二 (μL)	60	60	60
H2O (μL)	180	120	120
混匀, 60°C, 20min 水浴, 取出后室温静置 15 min, 取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中检测 A560 吸光值。ΔA=A 测定管-A 空白管			

三、羟脯氨酸含量计算公式:

1. 标准曲线的绘制:

以标准溶液的浓度为 x 轴, ΔA 标准 (

ΔA=A 标准管-A 空白管) 为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA (ΔA=A 测定管-A 空白管) 带入方程得到 x。

2. 羟脯氨酸含量的计算:

(1) 按样本鲜重计算:

组织羟脯氨酸含量 (μg/g 鲜重) = $x \times V_{\text{样品}} \div (W \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{组提}}) = 4x \div W$ 。

(2) 按样本蛋白浓度计算:

组织羟脯氨酸含量 (μg/mg prot) = $x \times V_{\text{样品}} \div (Cpr \times V_{\text{样品}}) = x \div Cpr$ 。

(3) 按细菌或细胞数量计算:

细胞羟脯氨酸含量 (μg/10⁴ cell) = $x \times V_{\text{样品}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{胞提}}) = 2x \div \text{细胞数量}$ 。

V 样品: 加入的样品体积, 0.06mL; V 组提: 组织提取液体积, 4mL; V 胞提: 细胞提取液体积, 2mL; W: 样本鲜重, g; 细胞数量: 以 10⁴ 为单位, 万个; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL。

注意事项

- 1) OD 值大于 1.0, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数。
- 2) 试剂有一定的毒性, 请操作时做好防护措施, 防止吸入或与皮肤接触。
- 3) 按样本蛋白浓度计算时, 需单独提取样本中的蛋白质并测定。
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 5) 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。