

羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1252

产品规格：50管/48样

产品简介：

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。

样本经酸水解产生游离的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。通过测定样本水解液560nm吸光值，可计算HYP含量。

技术指标：

最低检出限：0.051 μ g/mL

线性范围：0.117-7.5 μ g/mL

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL \times 1瓶（自备）	室温
试剂一	液体15mL \times 1瓶	4 $^{\circ}$ C
试剂二	液体15mL \times 1瓶	4 $^{\circ}$ C
标准液	液体1mL \times 1支	4 $^{\circ}$ C

溶液的配制：

1. 提取液：自备6mol/L盐酸。6mol/L盐酸的配制：浓盐酸（37%）和H₂O的体积比是1：1。
2. 标准液：0.5 mg/mL羟脯氨酸标准液。

需自备的仪器和用品：

天平、玻璃管、离心机、水浴锅、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、6mol/L盐酸和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可参考文献）

1. 组织：称取约0.2g样本于玻璃管，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 $^{\circ}$ C烘箱2至6小时消化至没有可见大的团块，16000rpm，25 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C烘箱2至6小时消化至透明状，16000rpm，25 $^{\circ}$ C，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、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至560nm，蒸馏水调零。
2. 将标准液用蒸馏水稀释为7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234、0.117 μ g/mL的标准溶液。
3. 按下表进行操作：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

	空白管	测定管	标准管
样本 (μL)		200	
标准溶液 (μL)			200
试剂一 (μL)	200	200	200
混匀, 室温静置 20min			
试剂二 (μL)	200	200	200
H ₂ O (μL)	600	400	400
混匀, 60℃, 水浴 20min, 取出后室温静置 15min, 用 1mL 比色皿, 在 560nm 下分别测定空白管、测定管、标准管的 OD 值, 并记为 A 空白管、A 测定管、A 标准管。			

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 标准 = 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 测定 (ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管) 带入方程得到 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2. 羟脯氨酸含量的测定:

(1) 按样本质量计算:

组织羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 质量) = $x \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{组提}}) = 4x \div W$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

组织羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (Cpr \times V_{\text{样本}}) = x \div Cpr$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

细胞羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{胞提}}) = 2x \div \text{细胞数量}$

V 样本: 加入的样本体积, 0.2mL; V 组提: 组织提取液体积, 4mL; V 胞提: 细胞提取液体积, 2mL; W: 样本质量, g; 细胞数量: 以 10^4 为单位, 万个; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
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。

实验实例:

1. 取 0.2g 小鼠腿进行样本处理, 取上清后按测定步骤操作, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.243 - 0.022 = 0.221$, 带入标准曲线 $y = 0.0629x + 0.0051$, 计算 $x = 3.432$, 按样本质量计算含量得:
组织羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 质量) = $4x \div W = 4 \times 3.432 \div 0.2 = 68.64 \mu\text{g}/\text{g}$ 质量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com