

羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒说明书

Hydroxyproline Content Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK138

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 (自备)	100ml×1 瓶	6mol/L 盐酸, 即按浓盐酸(37%): H ₂ O (V/V) = 1:1 配制, 室温保存;
AK138-A	15ml×1 瓶	4℃避光保存;
AK138-B	15ml×1 瓶	4℃避光保存;
AK138-标准品 (0.5 mg/mL)	1ml×1 瓶	4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 羟脯氨酸 (Hydroxyproline, 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。

原理: 样品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, 通过测定样品水解液 560nm 吸光值, 可计算 HYP 含量。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、研钵、6mol/L 盐酸和蒸馏水。

羟脯氨酸提取:

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℃ 烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块, 冷却后用 10mol/L NaOH (约 1mL) 调节 pH 值至 6-8 范围内 (不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至 4mL; 最后 16000rpm, 25℃, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 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, 不影响实验)。
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, 冷却后用 10mol/L NaOH (约 0.5mL) 调节 pH 值至 6-8 范围内 (不可过酸或过碱), 蒸馏水定容至 2mL, 16000rpm, 25℃, 离心 20min, 取上清待测。

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、0.117μg/mL 的标准溶液。
3. 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
样本		200	
AK138-标准品			200
AK138-A	200	200	200
混匀, 室温静置 20min			
AK138-B	200	200	200
蒸馏水	600	400	400

混匀, 60°C, 水浴 20min, 取出后室温静置 15 min, 对照管调零, 1mL 玻璃比色皿, 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。

羟脯氨酸含量计算:

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 $y=kx+b$, 再将 ΔA 测定 (ΔA 测定=A 测定管-A 空白管) 带入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。
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 ($\mu\text{g/g}$ 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 ($\mu\text{g/mg prot}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) = x \div C_{\text{pr}}$
 - (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. 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。
2. 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。
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。