

羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒说明书

Hydroxyproline Assay Kit

微量法

货号: AK139

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液	6mol/L 盐酸 (自备)	浓盐酸 (37%): H ₂ O (V/V) = 1:1, 室温保存
AK139-A	8ml×1 瓶	4℃避光保存
AK139-B	8ml×1 瓶	4℃避光保存
AK139-标准品 (0.5mg/ml)	0.5ml×1 支	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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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, 再用蒸馏水定容至 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, 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/酶标仪预热 30min, 调节波长至 560nm, 蒸馏水调零。
2. 将标准品用蒸馏水稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234 μg/mL 的标准溶液。
3. 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	空白管(ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
样本		60	
标准品			60
AK139-A	60	60	60
混匀, 室温静置 20min			
AK139-B	60	60	60
蒸馏水	180	120	120

混匀，60°C，20min 水浴，取出后室温静置 15 min，取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板中检测 560nm 处吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

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 ($\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y = kx + b$ 。将 ΔA 测定 ($\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$) 带入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。

2. 羟脯氨酸含量的计算：

(1) 按样品重量计算

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

注： $V_{\text{样本}}$ ：加入的样本体积，0.06mL； $V_{\text{组提}}$ ：组织提取液体积，4mL； $V_{\text{胞提}}$ ：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； C_{pr} ：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。