

羟脯氨酸（HYP）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1092

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

检测范围：1.25-80 μg/mL 灵敏度：0.313 μg/mL

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细胞上清、细菌

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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，可检测各种生物样本中 HYP 含量，其原理是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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	自备	自备	室温保存
试剂一	4mL	8mL	4℃避光保存
试剂二	4mL	8mL	4℃避光保存
HYP 标准品	0.5mL	0.5mL	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 560nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

天平、低温离心机、烘箱

去离子水、无水乙醇、异丙醇、6mol/L 盐酸、10mol/L NaOH 溶液

玻璃管

试剂准备

注意：小管试剂开盖前，请先低速离心。

提取液：6mol/L 盐酸，自备。浓盐酸： H_2O (V/V) = 1:1，室温保存。

10mol/L NaOH：按称 40g NaOH，溶于少量水，加水定容至 100mL 的比例配制。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

HYP 标准品：含 0.5mg/mL HYP 标准品，使用前，平衡到室温；4℃保存。

标准曲线设置：把 0.5mg/mL（即 500 μg/mL）HYP 标准品按下表所示，进行下一步稀释。

	标准品体积	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (μg/mL)
Std. 1	64μL of 500 μg/mL	336	80
Std. 2	200 μL of Std. 1 (80 μg/mL)	200	40
Std. 3	200 μL of Std. 2 (40 μg/mL)	200	20

产品说明书

Std. 4	200 μL of Std. 3 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	10
Std. 5	200 μL of Std. 4 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	5
Std. 6	200 μL of Std. 5 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	2.5
Std. 7	200 μL of Std. 6 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	1.25

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

组织：称取约 0.1g 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 1mL 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（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 10mol/L NaOH 溶液（大约需要 0.5mL）调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），再去离子水定容至 2mL。最后 12,000g, 25℃，离心 20min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除），取上清待测。

细菌/细胞：取 5×10^6 个细菌/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（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 10mol/L NaOH 溶液（大约需要 0.5mL）调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），去离子水定容至 2mL, 12,000g, 25℃，离心 20min，取上清待测。

液体样本：取 0.1mL 液体样本于玻璃管，加入 0.9mL 的提取液（若测定数值过小可调整二者比例并使二者相加等于 1.0mL，比如：0.3mL 液体样本，加入 0.7mL 提取液；并调整结果计算中 $V_{液}$ ），煮沸或 110℃ 烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 10mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），再去离子水定容至 2mL。最后 12,000g, 25℃，离心 20min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除），取上清待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 6 个月。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 560nm，可见分光光度计去离子水调零。

2. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
样本	0	0	60
不同浓度标准品	0	60	0
试剂一	60	60	60
混匀，室温静置 20min			
试剂二	60	60	60
去离子水	180	120	120

混匀，60℃ 水浴 20min（盖紧，以防止水分散失），取出后常温静置 15min。取 200 μL 至 96 孔板或微量石英比色皿中，于 560nm 测定吸光值，计算 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{空白}$ 、 $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ （空白和标准曲线只需做 1 次）。显色后务必在 30min 内测完。

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 $\Delta A_{测}$ 小于 0.001 可适当加大样本量，如果 $\Delta A_{测}$ 大于 2.0，样本可用去离子水进一步稀释，他乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{测}$ 带入标准曲线公式计算出 y ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2. 样本 HYP 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\text{HYP 含量} (\mu\text{g}/\text{g 质量}) = y \times V_{样本} \div (W \times V_{样本} \div V_{样总}) \times n = 2y \div W \times n$$

(2) 按细菌或细胞数量计算

$$\text{HYP 含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = y \times V_{样本} \div (\text{细胞数量} \times V_{样本} \div V_{样总}) \times n = 2y \div 500 \times n = 0.004y \times n$$

(3) 按液体体积计算

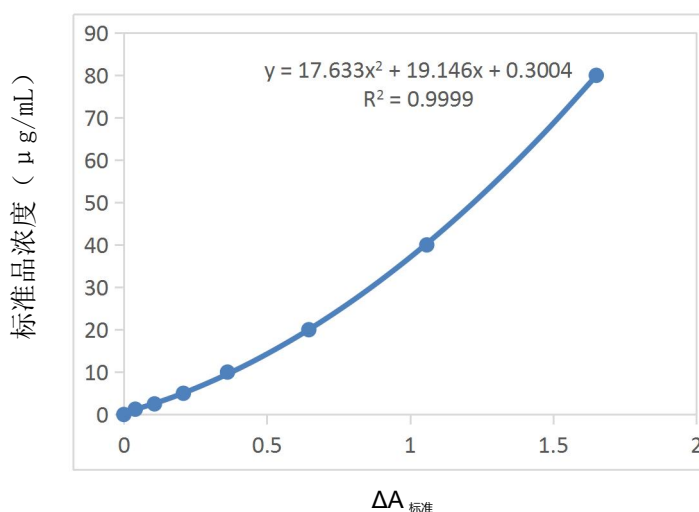
$$\text{HYP 含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = y \times V_{样本} \div (V_{液} \times V_{样本} \div V_{样总}) = 2y \div V_{液} \times n$$

产品说明书

$V_{\text{样本}}$: 加入样本体积: 0.06mL; $V_{\text{样总}}$: 提取体系体积, 2mL; W : 样本质量, g; n : 样本进一步稀释的稀释倍数; 500: 细菌或细胞总数, 500 万个; $V_{\text{液}}$: 液体样本体积, mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

- PMK1046 脯氨酸 (PRO) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1084 谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1085 谷草转氨酶 (AST/GOT) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1090 半胱氨酸 (Cys) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1091 谷氨酸 (Glu) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

