

羟脯氨酸(HYP)试剂盒(酸水解法)

- 【产品简介】**
- ◆羟脯氨酸(4-hydroxyproline, Hyp)是一种非必需氨基酸，是胶原组织的主要成分之一，在哺乳动物中仅存在于胶原蛋白和弹性蛋白中，但在植物中却存在于许多蛋白质中。动物中的很多疾病可伴有胶原代谢变化而引起血、尿及组织羟脯氨酸的含量改变，因此检测HYP含量对了解相关疾病是一项重要参考指标。
 - ◆本试剂盒采用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呈现紫红色，通过检测该有色物质在560nm吸光值，即可得出HYP含量。

【货号】 TMC026

【规格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体55mL×1瓶	4℃	临用前向瓶中务必缓慢加入55mL浓盐酸(12mol/L)，混匀备用，该提取液为6mol/L盐酸。
活性炭	粉体×1瓶	室温	
试剂一	液体70mL×1瓶	4℃	
试剂二	液体30mL×1支	4℃	
试剂三	粉体mg×1瓶	4℃	临用前甩几下使粉体落入底部，再加11mL的试剂一溶解备用。
试剂四	试剂A：粉体g×1瓶 试剂B：8mL×1瓶	4℃	临用前加向试剂A中依次加入3.5mL浓盐酸(12mol/L)和6.5mL试剂B，混匀(可超声)溶解，最终液体颜色是黄绿色。
标准管	粉剂mg×1支	4℃	

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织样本：取约0.1g组织样本，加1mL的提取液，置于100℃烘箱，水解5小时后，冷却至室温，混匀并取出100uL混合液至新EP管中，再加600uL试剂一混匀(由于加试剂一后会产生气泡，可分多次加入：如每次需缓慢加入200uL，中间可间隔5min使气泡释放后再加入200uL试剂一，共分3次加入试剂一)。

再适量加入活性炭颠倒混匀，4℃，12000rpm离心5min，取出上清液(观察:基本无色，若颜色较深，取出上清液后重新加入适量活性炭脱色离心)，上清液待测。

②液体样本:取100uL液体样本，加100 μL浓盐酸，置于100℃烘箱，水解1.5小时后，冷却至室温，混匀并取出100uL混合液至新EP管中，再加640uL试剂一混匀(由于加试剂一后会产生气泡，可分多次加入:如每次需缓慢加入200uL，中间可间隔5min使气泡释放后再加入200uL 试剂一，共分3次加入试剂一)，再适量加入活性炭颠倒混匀，4℃，12000rpm离心5min，取出上清液(观察:基本无色，若颜色较深，取出上清液后重新加入适量活性炭脱色离心)，上清液待测。

③细菌/培养细胞:先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清;取约500万细菌或细胞至EP管中，加1mL的提取液，置于100℃烘箱，水解5小时后，冷却至室温，混匀并取出100uL 混合液至新EP管中，再加600uL试剂一混匀(由于加试剂一后会产生气泡，可分多次加入:如每次需缓慢加入200uL，中间可间隔5min 使气泡释放后再加入200uL试剂一，共分3次加入试剂一)，4℃，12000rpm 离心5min，取出上清液待测。

注:若增加样本量，可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500:1比例进行提取。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min，设定波长到560nm。

②所有试剂解冻至室温，在EP管中依次加入:

试剂名称(uL)	测定管	空白管(仅做一次)
样本	200	
蒸馏水		200
试剂二	100	100
试剂三	100	100
混匀，室温静置10min		
试剂四	100	100
混匀，60℃孵育20min，冷却至室温后，取出200uL至 96孔板中，于560nm处读取吸光值A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

③标准曲线结果计算①由标准品测定获得，如需重制见随货说明书或咨询。

3、结果计算:

①标准曲线方程为 $y = 0.0105x - 0.0038$; x 为标准品浓度(ug/mL)，y为 ΔA 。

②按照质量计算:

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量(ug/g)} = [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times 7 \times D \\ = 666.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div W \times D$$

③按照液体体积计算:

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量(ug/mL)} = [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105] \times 14.8 \times D$$

$$=1410 \times (\Delta A + 0.0038) \times D$$

④按细菌/细胞密度计算：

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量 (ug/10}^4\text{cellI)} = [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times 7 \times D = 666.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div 500 \times D$$

W---取样质量，g；

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.2mL；

V2---液体取样体积，0.1mL；

500---细菌或细胞总数，万；

7---组织样本稀释倍数；

14.8---液体样本稀释倍数

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

- 【注意事项】**
- 1、试剂有一定的毒性，避免吸入与皮肤接触。
 - 2、提取过程中含有蛋白沉淀组分，不能用于蛋白含量测定。
 - 3、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
 - 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。