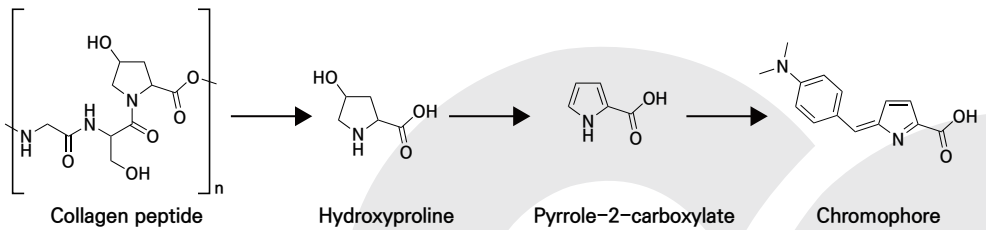
FOR RESEARCH USE ONLY!

PicoSens™ Hydroxyproline Assay Kit (Colorimetric)

(BM-HYP-100, 100 assays, Store at 4℃)

실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Hydroxyproline Assay Kit (Colorimetric)는 Hydroxyproline이 산화되어 Pyrrole-2-carboxylate를 형성하고 Ehrlich's regent와 결합하여 Chromophore를 형성합니다. Chromophore는 흡광도 560 nm에서 측정하여 Sample 내의 Hydroxyproline 양을 측정할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
Oxidation Buffer	10 ㎖	4℃
Chloramine T Concentrate	600 ㎕	
Perchloric Acid / Isopropanol Solution (PCA / IPA)	5 ㎖	
2X DMAB (in DMSO)	5 ㎖	
Hydroxyproline Standard (1㎎/㎖)	100 ㎕	

*** 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 4 ℃ 보관 시 1 년간 안정적입니다.**

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Concentrated HCl (~12N)
- ▶ Autoclave
- ▶ Evaporator, Dry oven or Heating block(60, 70, 120℃)
- ▶ Microplate reader (560 nm Filter)
- ▶ Pressure-tight polypropylene teflon or Screw vial

실험 전 준비사항 및 보관방법

- ▶ 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- ▶ Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.
- ▶ **Chloramine T Concentrate**와 **DMAB Concentrate**는 사용 후 4℃ 에 보관합니다.
- ▶ 실험에 사용하고 남은 Hydrolyzed sample은 4℃ 보관하여 사용합니다.
- ▶ **Chloramine T Reagent** : Chloramine T Concentrate 6 ㎕와 Oxidation Buffer 94 ㎕을 혼합하여 만듭니다.
- ▶ **DMAB Reagent** : 2X DMAB Concentrate 50 ㎕와 Perchloric Acid / Isopropanol Solution 50 ㎕을 혼합하여 만듭니다.

  * **Chloramine T Reagent**와 **DMAB Reagent**는 실험 전 필요한 만큼만 만들어 사용하여야하며, 혼합된 용액은 2~3 h 내에 사용합니다.

Sample type

- Tissues
- Protein/Peptide hydrolysates
- Serum, Urine

실험 과정

* 본 실험은 가수분해 및 건조과정의 시간이 많이 걸리므로 Sample 과 Standard preparation을 동시 진행할 수 있게 준비 후 진행해야 합니다.
* 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample 의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 진행한 후 사용을 권장합니다.

Sample preparation

Tissue or Protein / Peptide hydrolysates

① Tissues 및 Protein sample 10 ㎎에 D.W. 100 ㎕를 넣고 Homogenization을 진행합니다.

② Homogenized sample에 Concentrated HCl (12N) 100 ㎕ 를 넣어 혼합합니다.

③ Pressure tight polypropylene vial (Teflon cap)에 ② 혼합물을 넣고, 120℃에서 3 h 동안 가수분해를 진행합니다.

④ 가수분해가 완료된 sample에 Activated charcoal 4 ㎎을 첨가하여 혼합한 뒤, 10,000 x g에서 3 min 동안 Centrifuge를 진행합니다.

⑤ 침전물과 Activated charcoal을 제거한 뒤 투명해진 sample만 분리합니다.

⑥ Sample 10 ㎕를 96-well Microplate에 분주하여 70℃ Heat block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

Copyright©2022 BIOMAX Co, Ltd. All right reserved
info@scgbiomax.com

Urine

① Urine sample 100 ㎕와 Concentrated HCl (12N) 100 ㎕을 혼합합니다.
② Pressure tight polypropylene vial (Teflon cap) 에 ① 혼합물을 넣고 120℃에서 3 h 동안 가수분해를 진행합니다.
③ 가수분해가 완료된 Urine sample에 Activated charcoal 4 ㎎을 첨가하여 혼합한 뒤, 10,000 x g에서 3 min 동안 Centrifuge를 진행합니다.
④ 침전물과 Activated charcoal을 제거한 뒤 투명해진 Urine sample만 분리합니다.
⑤ Sample 10 ㎕를 96-well Microplate에 넣고 70℃ Heat Block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

Standard preparation

① 1 ㎎/㎖ Hydroxyproline Standard 10 ㎕와 D.W. 90 ㎕를 혼합하여 0.1 ㎎/㎖ Hydroxyproline Standard를 준비합니다.
② 96-well Micoroplate 각 Well에 0.1 ㎎/㎖ Hydroxyproline Standard를 0, 2, 4, 6, 8, 10 ㎕ 분주하여 각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ㎍/well씩 넣어줍니다.

**** 0 ㎍/well : Background***

③ Heat Block / Oven에서 완전히 증발시킵니다.

Reaction mix

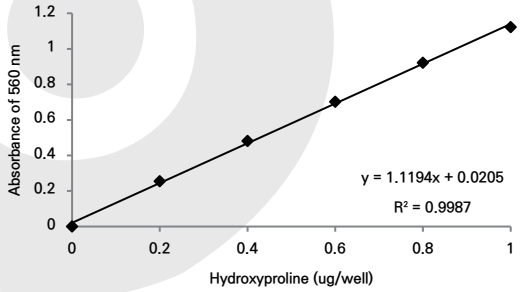
① 각 Sample과 Standard well에 Chloramine T Reagent 100 ㎕씩 첨가한 뒤 상온에서 5 min 간 반응 시킵니다.
② DMAB Reagent 100 ㎕를 각 Well에 넣어준 뒤 60℃ Heat block / Oven에서 90 min 동안 반응 시킵니다.
③ Microplate Reader를 이용하여 흡광도 560 nm에서 측정합니다.

결과 분석

- 모든 측정값에서 Standard 0 (Backgraound)값을 빼줍니다.
- Standard Curve에 시료의 값을 대입하여 구한 Hydroxyproline의 양으로 다음 식을 이용하여 시료 내 Hydroxyproline의 농도를 구합니다.

$$C\ (\mu g/\mu \ell) = B/V \times D$$

C : Sample의 Hydroxyproline 농도 (㎍/㎕)
B : 측정 Well의 Hydroxyproline 양 (㎍)
V : Well에 분주한 시료의 부피 (㎕)
D : Sample 희석 배율



Hydroxyproline Standard curve

※ Spike sample: Sample 내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들어 Hydroxyproline이 실제로는 0.5 ㎍이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 0.4 ㎍ (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 에러를 보정하기 위해 Sample과 별도로 Sample에 일정량의 Standard를 첨가한 Well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 Sample의 농도를 보정하는 방법입니다. 이 실험에서 Spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

Sample 내 Hydroxyproline의 양(B) = OD1/(OD2 – OD1) * Hydroxyproline Spike (㎍)

OD1: Sample의 OD값 (Blank Corrected)
OD2: Spiked Sample의 OD값(Blank Corrected)
Hydroxyproline Spike: Sample에 넣은 Hydroxyproline Spike의 양

Related products

BM-COL-100 PicoSens™ Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)

**** 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.***

Copyright©2023 BIOMAX Co, Ltd. All right reserved
info@scgbiomax.com