天净沙系列

CAT#:7-SC2610-10-8

低温运输，2-8℃保存

天净沙

天狼星红沉淀法可溶性胶原含量测定试剂盒

Sirius-Red-Precipitation Method Soluble Collagen Assay Kit

使用手册 V0.56

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定可溶性胶原（Soluble Collagen）含量。其原理是可溶性胶原和特异反应物反应生成在 540 nm 处有特征光吸收的物质。以其为测定物，通过检测其吸光度在此波长下的改变即可计算出待测样本中可溶性胶原含量。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 提供可溶性胶原阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 适用于检测从各种样本中提取的，或合成的可溶性胶原。
4. 灵敏度高，最低检测限为 1 μM。
5. 可以定量，线性范围在 400 μM -10 mM 之间。
6. 提供标准曲线法和消光系数法两种操作流程。
7. 足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
可溶性胶原测定液	7-SC2610-10-8rx	100 mL	120 mL 本色瓶
可溶性胶原测定反应物干粉	7-SC2610-10-8sp	100 T	10 mL 本色瓶
4×可溶性胶原测定显色液	7-SC2610-10-8c	30 mL	30 mL 棕塑瓶
10 mM 可溶性胶原标曲液	7-SC2610-10-8sd	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	7-SC2610-10-8sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，样本溶解液，超纯水，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时需配制下列溶液。

1. 反应物溶液：从装有 100 mL 可溶性胶原测定液的瓶中取出 10 mL 到新的离心管或试剂瓶中待在第 4 步使用，再将可溶性胶原测定反应物干粉全部加入到剩余的 90 mL 可溶性胶原测定液中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 3×反应物溶液，放冰上待用。
2. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、制备待测样本

3. 用自备试剂制备待测样品，记下初始样本用量（如 g 数或 mL 数）。

三、标曲制备（以 6 个浓度梯度的标曲液为例）

4. 标记 0-6 号共 7 个 1.5 mL 离心管，并在 0-5 号管中加入 0.7 mL 第 1 步留存的可溶性胶原测定液，第 6 号管不加可溶性胶原测定液。

5. 在 6 号管中加入 0.7 mL 试剂盒提供的 10 mM 可溶性胶原标曲液。
6. 在 5 号管中也加入 0.7 mL 试剂盒提供的 10 mM 标曲液，充分震荡 1 分钟，由于管中已经有 0.7 mL 测定液，故得 5 mM 标曲液。
7. 在 4 号管中加入 0.7 mL 5 号管标曲液，充分震荡 1 分钟，得 2.5 mM 标曲液。
8. 在 3 号管中加入 0.7 mL 4 号管标曲液，充分震荡 1 分钟，得 1.25 mM 标曲液。
9. 重复上面的操作直到得到 1 号管标曲液。0 号管不需要加入 1 号管标曲液，故它只含有在第 4 步加入的 0.7 mL 可溶性胶原测定液。最后，0-6 号共 7 个管中可溶性胶原浓度分别为 0、313 μM、625 μM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 和 10 mM。放冰上待用。
10. 将分光光度计开机，预热 30 分钟后用超纯水调零。在预热期间设置按下表标记 6 个 1.5 mL 反应管并按下表加入各成份：

成份	7 个可溶性胶原标曲管
3×反应物溶液（来于第 1 步）	各 250 μL
7 个可溶性胶原标曲样本（来于第 9 步）	各 500 μL，1 号样到 1 号管，以此类推
37℃保温 30 分钟后加入下列成份并快速混匀	
4×可溶性胶原测定显色液	各 250 μL

11. 测定每个样本在 540 nm 的光吸收（以下全部简称为 A 值）。
12. 数据处理：将 1-6 号的 A 值分别减去 0 号的 A 值即得各标曲样本的真实 A 值。
13. 绘制标曲：以 1-6 号标曲液可溶性胶原浓度（单位为μM）为横轴，以每个标曲样本的 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到线性回归方程式 C = a*A + b。C 为标曲液可溶性胶原浓度（单位为μM），A 为 A 值。
14. 此公式可在后续计算中使用，不需要每次再做标曲，但必须在后续实验中设置 1 个质控点样本随待测样本一起测试。质控点样本的可溶性胶原浓度必须在上述标的线性范围内，并且最好跟上述 7 个标曲液可溶性胶原浓度不同。测试后将质控点样本的 A 值代入到上步的方程式得其计算浓度，如果此浓度跟质控点的配制浓度差异在 10%以内，则可以用此公式计算其余待测样本。如果差异大于 10%，则需在测试待测样本时同步制备新的标曲。

四、样本测定

15. 设置反应：在 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成份：

成分	质控点 样本管	N 个待测 样本管
3×反应物溶液（来于第 1 步）	250 μL	各 250 μL
质控点样本	各 500 μL	不加

自备 N 个待测样本	不加	各 500 μL
37℃保温 30 分钟后加入下列成份		
4×可溶性胶原测定显色液	250 μL	各 250 μL

16. 测定每个样本在 540 nm 的 A 值。

五、数据处理

17. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。

18. 将真实 A 值导入到 C = a*A + b 公式中，即可计算出待测样本中可溶性胶原浓度（单位为μM）。如果计算所得的可溶性胶原浓度在标曲的线性范围外，则对应的样本需要稀释，直到其测得的浓度在标曲的线性范围内。需要记下稀释倍数 N，在计算浓度时需要乘以稀释倍数。此浓度乘以样本体积即得样本中可溶性胶原的含量。再根据第 3 步记录的初始样本量即可计算出每 g 或每 mL 样本中可溶性胶原的含量。

六、96 孔板检测

19. 操作同上，只是在设置反应时，反应总体积为 0.25 mL，各成份的用量需要×25%。

附：消光系数法

在大规模筛选或基质比较简单时，还可以选择更加快捷、不需要制备标曲的消光系数法，前提是知道测定物的消光系数。用户如果选择使用消光系数法，建议先用此法和标曲法同时测定同一个样本，如果结果差异大，则只能使用标曲法。如果差异可以接受，则可使用消光系数法。在操作上，消光系数法不需要制作标曲，在按第二步制备好样本后，直接进行下面的操作。

七、消光系数法的样本测定

20. 按下表设置反应。

成分	N 个待测样本无酶对照管	N 个待测样本管
3×反应物溶液（来于第 1 步）	各 250 μL	各 250 μL
自备 N 个待测样本	各 500 μL	各 500 μL
37℃保温 30 分钟后加入下列成份		
4×可溶性胶原测定显色液	250 μL	各 250 μL

21. 测定每个样本在 540 nm 的 A 值。

八、数据处理

22. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。如果计算所得的可溶性胶原浓度在标曲的线性范围外，则对应的样本需要

	稀释，直到其测得的浓度在标曲的线性范围内。需要记下稀释倍数 N，以便在下步计算浓度时使用。 23. 将真实 A 值换算成测定物浓度：根据朗伯-比尔定律 A = εlC，测定物在 540 nm 的消光系数ε = N/cm*M，比色皿光径 l = 1 cm，则测定体系中测定物的浓度 C = A/εl = A/ (N/cm*M) * 1 cm = A/N (单位为 M，非μM)。将测定物的消光系数（去除单位后）37600 代入此公式即得测定体系中测定物的浓度。由于测定物的浓度改变跟可溶性胶原的浓度改变是 1:1 的关系，故测定体系中测定物浓度除 1 即是测定体系中可溶性胶原的浓度。测定体系中待测样本的体积占总体积的一半（1 mL 测定体系中加入的待测样本体积为 500 μL），故待测样本中可溶性胶原浓度 = 测定体系中可溶性胶原浓度 × 2。如果在上步还有稀释处理，则再乘以稀释倍数 N，得到待测样本中可溶性胶原的浓度。此浓度乘以体积即得样本中可溶性胶原的含量。再根据第 3 步记录的初始样本量即可计算出每 g 或每 mL 样本中可溶性胶原的含量。 **九、96 孔板检测** 24. 操作同上，只是各成份的用量需要×25%；在上步计算时，所用光径也非 1 cm，具体多少需要询问 96 孔板厂家。
关联产品	可溶性胶原抽提试剂盒