

Hydroxyproline Content Assay Kit

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

货号: G1205F | 方法: 可见分光法 | 规格: 48 样

一、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。

二、试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|---------------------------------|--------|---|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | 临用前向瓶中 务必缓慢 加入 30mL 浓盐酸 (6mol/L 盐酸),混匀备用。 |
| 活性炭 | 粉体×1 瓶 | 室温 | |
| 试剂一 | 液体 40mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 粉体 mg×1 瓶 | 4°C 保存 | 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°C 保存 | 临用前加向试剂 A 中依次加入 3.5mL 浓盐酸 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 | 液体 2mL×1 支 | 4°C 保存 | |

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、**浓盐酸**、水浴锅/恒温培养箱、离心机、蒸馏水。

四、羟脯氨酸(Hyp)含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

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°C 烘箱,水解 5 小时后,冷却至室温,混匀并取出 100 μ L 混合液至新 EP 管中,再加 600 μ L 试剂一混匀,再适量加入活性炭颠倒混匀,4°C,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 100 μ L 液体样本,加 100 μ L 浓盐酸,置于 100°C 烘箱,水解 1.5 小时后,冷却至室温,混匀并取出 100 μ L 混合液至新 EP 管中,再加 640 μ L 试剂一混匀,再适量加入活性炭颠倒混匀,4°C,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 提取液，置于 100°C 烘箱，水解 5 小时后，冷却至室温，混匀并取出 100μL 混合液至新 EP 管中，再加 600μL 试剂一混匀，4°C，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（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

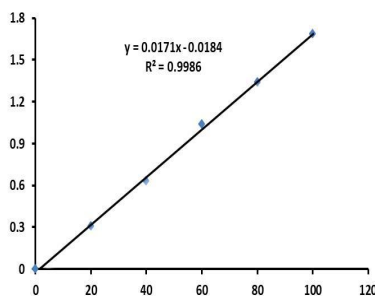
- ① 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 560nm，蒸馏水调零。
② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|---|-----|-----------|
| 样本 | 400 | |
| 蒸馏水 | | 400 |
| 试剂二 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀，室温静止 10min。 | | |
| 试剂四 | 200 | 200 |
| 混匀，60°C 孵育 20min，冷却至室温后，取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 | | |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0171x - 0.0184$ ，x 为标准品浓度（μg/mL），y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 409.4 \times (\Delta A + 0.0184) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按照液体体积计算：

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171] \times 14.8 \times D = 865.5 \times (\Delta A + 0.0184) \times D$$

- 4、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times 7 \times D \\ &= 409.4 \times (\Delta A + 0.0184) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---取样质量, g;

V1---加入样本体积, 0.4mL;

500---细菌或细胞总数, 万;

14.8---液体样本稀释倍数。

V---提取液体积, 1mL;

V2---液体取样体积, 0.1mL;

7---组织样本稀释倍数;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

