

Hydroxyproline Content Assay Kit

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

货号: G1205W | 方法: 微板法 | 规格: 96 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 55mL×1 瓶	4°C保存	临用前向瓶中 务必缓慢 加入 55mL 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 70mL×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:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、水浴锅/恒温培养箱、**浓盐酸**、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:

- 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。
- 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。
- 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°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，4 $^{\circ}$ 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 比例进行提取。

2、上机检测:

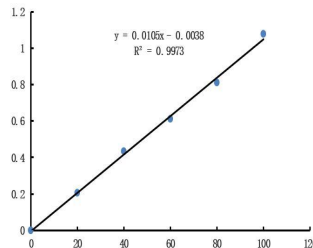
- ① 酶标仪预热 30min，设定波长到 560nm。
- ② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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，室温静止 10min。		
试剂四	100	100
混匀，60 $^{\circ}$ C 孵育 20min，冷却至室温后，取出 200 μ L 至 96 孔板中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

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： $y = 0.0105x - 0.0038$ ，x 为标准品浓度 (μ g/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，具体数据及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:

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 666.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算:

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105] \times 14.8 \times D = 1410 \times (\Delta A + 0.0038) \times D$$

4、按细菌/细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.0105 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times 7 \times D \\ &= 666.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---取样质量, g;

V1---加入样本体积, 0.2mL;

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;

