

Hydroxyproline Content Assay Kit

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

货号: G1205W48 | 方法: 微板法 | 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℃保存	临用前向瓶中 务必缓慢 加入 30mL 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 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 6mL 的试剂一溶解备用。
试剂四	试剂 A: 粉体 g×1 瓶 试剂 B: 4mL×1 瓶	4℃保存	临用前加向试剂 A 中依次加入 1.75mL 浓盐酸 (12mol/L) 和 3.25mL 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℃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 (12mol/L)**、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,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

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℃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(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 200μL,中间可间隔 5min 使气泡释放后再加入 200μL 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 100μL 液体样本,加 100μL 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 100μL 混合液至新 EP 管中,再加 640μL 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 200μL,中间可间隔 5min 使气泡释放后再加入 200μL 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 100μL 混合液至新 EP 管中，再加 600μL 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 200μL，中间可间隔 5min 使气泡释放后再加入 200μL 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（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。

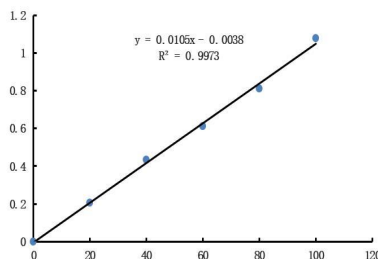
- ② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	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 200μL 至 96 孔板中，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： $y = 0.0105x - 0.0038$ ，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：

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

- 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：

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

$$=666.7\times (\Delta A+0.0038)\div 500\times D$$

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；