

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

(货号: BN72749 微板法 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
活性炭	粉体×1 瓶	室温	
试剂一	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 30mL×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 11mL 的试剂一溶解备用。
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准管	液体 2mL×1 支	4℃保存	临用前用蒸馏水稀释100倍,即5μg/mL羟脯氨酸溶液。

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、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℃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,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 的浓盐酸,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,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、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，标准品按要求稀释成浓度为 5μg/mL，在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	200		
蒸馏水		200	
标准品			200
试剂二	100	100	100
试剂三	100	100	100
混匀，室温静置 10min。			
试剂四	100	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，ΔA=A 测定-A 空白。			

【注】：测定管的 A 值若超过 1，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸 (Hyp) 含量}(\mu\text{g/g}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (V1 \div V \times W) \times 7 \times D \\ &= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \div W \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸 (Hyp) 含量}(\mu\text{g/mL}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V2 \times 7.4 \times D \\ &= 74 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，5μg/mL；

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；

V1---加入样本体积，0.2mL；

7.4---液体样本稀释倍数。