



羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒（微板法）

货号: R29163-100T

有效期: 6个月

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。

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℃保存	临用前向瓶中务必缓慢加入55mL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	试剂A:粉体g×1瓶 试剂B:8mL×1瓶	4℃保存	临用前加向试剂A中依次加入3.5mL浓盐酸(12mol/L)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℃保存	

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。



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℃,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℃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℃,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100 μ L 混合液至新 EP 管中, 再加600 μ L 试剂一混匀, 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(10^4 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



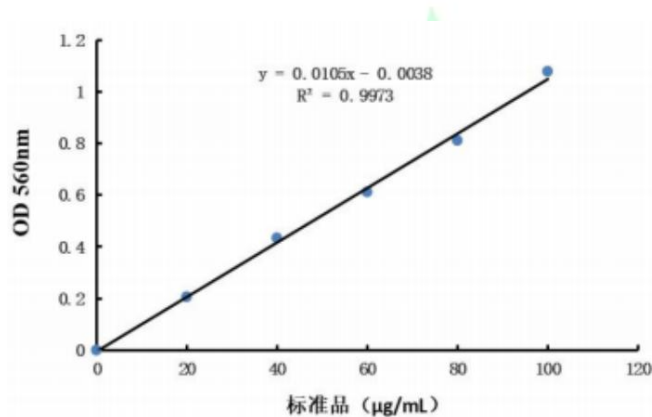
混匀, 60°C 孵育 20min, 冷却至室温后, 取出 200μL 至 96 孔板中, 于 560nm 处
读取吸光值 A, $\Delta A = A - A_{\text{空白}}$ 。

【注】: 1. 若 A 测定管值超过 1, 可把样本进行稀释后测定, 稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若 ΔA 小于 0.01, 则可增加样本质量 W 或液体样本取样体积 V2, 则改变后的 W 和 V2 需带入公式重新计算。

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 。



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:

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

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；

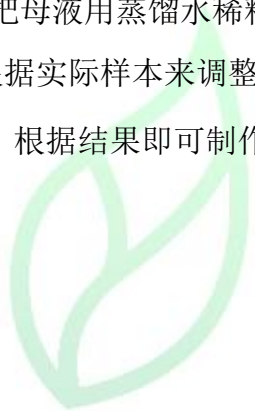
V2---液体取样体积，0.1mL；

7--组织样本稀释倍数；

D-- 稀释倍数，未稀释即为1；

附：标准曲线制作过程：

- 1.标准品母液是500 μ g/mL 。把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0,20, 40,60,80,100. μ g/mL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 2.依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。



源叶