



## 羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒（分光光度法）

货号：R29162

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

| 试剂名称 | 规格        | 保存条件   |
|------|-----------|--------|
| 提取液  | 自备试剂      | -      |
| 试剂一  | 液体15mL×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 液体15mL×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品  | 液体1mL×1支  | 2-8℃保存 |

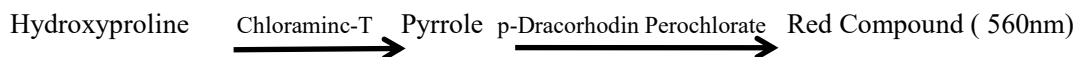
**溶液的配制：**

1. 提取液：自备6 mol/L 盐酸溶液，大约需要100mL，常温保存；试剂盒内提供一个30mL 棕色空瓶，仅做 分装使用，请自行标注试剂名称
2. 6 mol/L盐酸提取液的配制：按浓盐酸(37%)和H<sub>2</sub>O 的体积比是1:1进行配制。
3. 标准品：0.5mg/mL 羟脯氨酸标准品。

**产品说明：**

HYP 是机体胶原蛋白主要成分之一，胶原蛋白大多分布于皮肤、腱、软骨和血管等，因此HYP 含量是反映 胶原组织代谢及纤维化程度的一项重要指标。

样本经酸水解产生游离的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，产生红色化合物， 在560nm 处有特征吸收峰。通过测定样本水解液560nm 吸光值，可计算HYP 含量。



**技术指标：**

最低检出限：0.051 μg/mL

线性范围：0.117-15μg/mL

注意： 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**



天平 EP 管、离心机、水浴锅、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、6mol/L 盐酸、氢氧化钠溶液和蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、样本处理(可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、组织: 称取约0.2g 样本于EP管, 将组织尽量剪碎以便消化, 盖子稍松不密闭。加入2mL 的提取液, 煮沸或 110℃烘箱2至6小时消化至没有可见大的团块(缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后用NaOH 溶液 (10mol/L 的大约需要 1mL) 调节pH 值至6-8范围内(不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至4mL。最后16000rpm, 25℃, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 取上清待测。

2. 细菌/细胞: 取 $5 \times 10^6$ 个细菌/细胞, 加入1mL 的提取液, 煮沸或110℃烘箱2至6小时消化至透明状(缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后用NaOH 溶液(10mol/L 的大约需要0.5mL) 调节pH 值至6-8范围内(不可过酸或过碱), 蒸馏水定容 2mL, 16000rpm, 25℃, 离心20min, 取上清待测。

3. 液体样本: 称取300μL液体样本于EP管, 加入0.7mL 的提取液(若测定数值过小可调整二者比例), 煮沸或 110℃烘箱2至6小时消化至没有可见大的团块(缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后用NaOH 溶液调节pH 值至6-8 范围内(不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至2mL, 最后16000rpm, 25℃, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 取上清待测。

注: 提取过程中可能有黑色物质生成, 若长时间不能消化, 可能为碳化的物质, 不影响实验。

#### 二、测定步骤

1、分光光度计预热30min 以上, 调节波长至560nm, 蒸馏水调零。

2、将0.5mg/mL 羟脯氨酸标准品用蒸馏水稀释为15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234、0.117 μg/mL 标准品。

#### 3、标准品稀释表:

| 序号 | 稀释前浓度(μg/mL)    | 标准液体积(μL) | 蒸馏水体积(μL) | 稀释后浓度(μg/mL) |
|----|-----------------|-----------|-----------|--------------|
| 1  | 500(即0.5 mg/mL) | 30        | 970       | 15           |
| 2  | 15              | 500       | 500       | 7.5          |



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248  
网址: www.shyuanye.com  
邮箱: 3008007435@qq.com

|   |       |     |     |       |
|---|-------|-----|-----|-------|
| 3 | 7.5   | 500 | 500 | 3.75  |
| 4 | 3.75  | 500 | 500 | 1.875 |
| 5 | 1.875 | 500 | 500 | 0.938 |
| 6 | 0.938 | 500 | 500 | 0.469 |
| 7 | 0.469 | 500 | 500 | 0.234 |
| 8 | 0.234 | 500 | 500 | 0.117 |

备注: 下述实验中每个标准管需200  $\mu$ L 标准品(注意不要在此步骤直接检测吸光度)。

#### 4、按下表进行操作:

| 试剂名称                                                                                                                                                                           | 空白管 | 测定管 | 标准管 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 样本( $\mu$ L)                                                                                                                                                                   | -   | 200 | -   |
| 标准品( $\mu$ L)                                                                                                                                                                  | -   | -   | 200 |
| 试剂一( $\mu$ L)                                                                                                                                                                  | 200 | 200 | 200 |
| 混匀, 常温静置20min                                                                                                                                                                  |     |     |     |
| 试剂二( $\mu$ L)                                                                                                                                                                  | 200 | 200 | 200 |
| 蒸馏水( $\mu$ L)                                                                                                                                                                  | 600 | 400 | 400 |
| 混匀, 60°C,水浴20min,取出后常温静置15 min,用1mL玻璃比色皿, 在560nm下分别测定空白管、测定管、标准管的吸光值, 记为A空白管、A测定管、A标准管, 计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定管}-A_{空白管}$ , $\Delta A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}$ 。标准曲线和空白管只需做1-2次。 |     |     |     |

### 三、羟脯氨酸含量计算公式

#### 1. 标准曲线的绘制:

以标准品的浓度为x 轴,  $\Delta A$  标准为y 轴, 绘制标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。将  $\Delta A$  测定带入方程得到x( $\mu$ g/mL)。

#### 2. 羟脯氨酸含量的测定:

##### (1)按样本质量计算:

组织羟脯氨酸含量( $\mu$ g/g 质量) =  $x \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{组提}}) \times F = 4x \div W \times F$

##### (2)按样本蛋白浓度计算:

组织羟脯氨酸含量( $\mu$ g/mg prot) =  $x \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = x \div C_{\text{pr}} \times F$

##### (3)按细菌或细胞数量计算:

细胞羟脯氨酸含量( $\mu$ g/ $10^6$ cell) =  $x \times V_{\text{样本}} \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{胞提}}) \times F = 2x \div N \times F$

##### (4)按液体体积计算:



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248  
网址: www.shyuanye.com  
邮箱: 3008007435@qq.com

---

液体羟脯氨酸含量( $\mu\text{g/mL}$ )= $x \times V_{\text{液提}} \div V_{\text{液体}} \times F = 6.67 \times x \times F$

---

V 样本: 加入的样本体积, 0.2mL; V 组提: 组织提取液体积, 4mL; V 胞提: 细胞提取液体积, 2mL; V 液提: 液体提取液体积, 2mL; V 液体: 前处理中液体加入体积, 0.3mL; W: 样本质量, g; N: 细胞数量, 以 $10^6$ 为单位, 百万个; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL。

**注意事项:**

- 1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用蒸馏水稀释样本后再进行测定。
- 2、试剂有一定的毒性, 请操作时做好防护措施, 防止吸入或与皮肤接触。



源叶