北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：D17182

规格：50T/48S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×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_2O 的体积比是 1：1 进行配制。
3. 标准品：0.5 mg/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。

Hydroxyproline $\xrightarrow{\text{Chloramine-T}}$ Pyrrole $\xrightarrow{\text{p-Dracorhodin Perochlorate}}$ Red Compound（560nm）

技术指标：

最低检出限：0.051 μg/mL

线性范围：0.117-15 μg/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 5×10^6 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），蒸馏水定容至 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 0.5 mg/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
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 200μL 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（μL）	-	200	-
标准品（μL）	-	-	200
试剂一（μL）	200	200	200
混匀，常温静置 20min			
试剂二（μL）	200	200	200
蒸馏水（μL）	**600**	400	400
混匀，60℃，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ΔA 测定=A 测定管-A 空白管，ΔA 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，ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程 y=kx+b。将ΔA 测定带入方程得到 x（μg/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（μg/g 质量）= x×V 样本÷（W×V 样本÷V 组提）×F=4x÷W×F

（2）按样本蛋白浓度计算：

组织羟脯氨酸含量（μg/mg prot）= x×V 样本÷（Cpr×V 样本）×F =x÷Cpr×F

（3）按细菌或细胞数量计算：

细胞羟脯氨酸含量（μg/10^6 cell）= x×V 样本÷（N×V 样本÷V 胞提）×F =2x÷N×F

（4）按液体体积计算：

液体羟脯氨酸含量（μg/mL）= x×V 液提÷V 液体×F =6.67×x×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；F：样本稀释倍数。

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。

3、 按样本蛋白浓度计算时，需单独提取样本中的蛋白质并测定。

实验实例：

1、 取 0.2g 小鼠皮肤进行样本处理，取上清后蒸馏水稀释 32 倍后按测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.548-0.124=0.424，带入标准曲线 y=0.0634x+0.0044，R^2=0.9996，计算 x=6.62，按样本质量计算含量得：

组织羟脯氨酸含量（μg/g 质量）=4x÷W×32（稀释倍数）=4×6.62÷0.2×32=4236.8 μg/g 质量。

2、 取 8×10^6 个 HMC-1 细胞进行样本处理，取上清后按测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.245-0.124=0.121，带入标准曲线 y=0.0634x+0.0044，R^2=0.9996，计算 x=1.84，按细胞数量计算含量得：

细胞羟脯氨酸含量（μg/10^6 cell）=2x÷N=2×1.84÷8=0.46 μg/10^6 cell。

3、 取 300μL 牛血清进行样本处理，取上清后按测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.243-0.124=0.119，带入标准曲线 y=0.0634x+0.0044，R^2=0.9996，计算 x=1.81，按液体体积计算含量得：

液体羟脯氨酸含量（μg/mL）=6.67×x=6.67×1.81=12.07 μg/mL。

地址： 北京市海淀区丰慧中路 7 号新材料创业大厦B座 327室. 邮编:100080