

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0383

Size: 100T/96S

羟脯氨酸 (HYP) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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, 产生红色化合物, 在 560nm 处有特征吸收峰。通过测定样品水解液 560nm 吸光值, 可计算 HYP 含量。

三、需自备的仪器和用品:

天平、烘箱、玻璃管、离心机、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、6mol/L 盐酸和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	6mol/L 盐酸, 自备	室温保存	浓盐酸: H ₂ O (V/V) = 1:1
试剂一	液体 8mL × 1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂二	液体 8mL × 1 瓶	4°C 避光保存	-
标准品	0.5mL × 1 支	4°C 保存	0.5mg/mL 羟脯氨酸标准品

五、操作步骤：

1. 羟脯氨酸提取：

(1) 组织：称取约 0.2g 样品于玻璃管，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°C 烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块，16000rpm，25°C，离心 20min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除）用 10mol/L NaOH（约 1mL）调节 pH 值至 6~8 范围内。蒸馏水定容至 4mL，取上清待测。（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）

(2) 细胞：取 500 万个细胞，加入 1mL 的提取液，煮沸或 110°C 烘箱 2 至 6 小时消化至透明状，16000rpm，25°C，离心 20min，用 10mol/L NaOH（约 0.5mL）调节 pH 值至 6~8 范围内。蒸馏水定容至 2mL，取上清待测。

2. 测定操作表：

(1) 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。

(2) 将标准品稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

(3) 操作表

	空白管	测定管	标准管
样本 (μL)		60	
标准溶液 (μL)			60
试剂一 (μL)	60	60	60
混匀，室温静置 20min			
试剂二 (μL)	60	60	60
H ₂ O (μL)	180	120	120
混匀，60°C，20min 水浴，取出后室温静置 15 min，取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中检测 A_{560} 吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$			

六、羟脯氨酸含量计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

以标准溶液的浓度为 x 轴， ΔA 标准 ($\Delta A = A$ 标准管 - A 空白管) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA ($\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管) 带入方程得到 x。

2. 羟脯氨酸含量的计算：

(1) 按样本鲜重计算：

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

(2) 按样本蛋白浓度计算：

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

(3) 按细菌或细胞数量计算：

$$\text{细胞羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样品}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{胞提}}) = 2x \div \text{细胞数量}。$$

V 样品：加入的样品体积，0.06mL；V 组提：组织提取液体积，4mL；V 胞提：细胞提取液体积，2mL；W：样本鲜重，g；细胞数量：以 10^4 为单位，万个；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

七、注意事项：

1. OD 值大于 1.0，样品适当稀释再测定，注意计算公式里乘以稀释倍数。
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。