

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-S0656

Size: 50T/48S

## 羟脯氨酸 (HYP) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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、1 mL 玻璃比色皿、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 <sub>2</sub> O (V/V) = 1:1
试剂一	液体 15mL × 1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂二	液体 15mL × 1 瓶	4°C 避光保存	-
标准品	液体 1mL × 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 0.5g 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 5mL 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 3mL) 调节 pH 值至 6~8 范围内。蒸馏水定容至 8mL，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：

1. 将标准品稀释为 15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234、0.117 $\mu$ g/mL 的标准溶液。

2. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。

3. 按下表进行操作：

	空白管	测定管	标准管
样本 ( $\mu$ L)		200	
标准溶液 ( $\mu$ L)			200
试剂一 ( $\mu$ L)	200	200	200
混匀，室温静置 20min			
试剂二 ( $\mu$ L)	200	200	200
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	600	400	400
混匀，60°C，20min，取出后室温静置 15 min，用 1mL 比色皿，在 560nm 下分别测定空白管、测定管、标准管的 OD 值，并记为 A 空白管、A 测定管、A 标准管。			

## 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,  $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定 ( $\Delta A = A$  测定管 -  $A$  空白管) 带入方程得到  $x$ 。

### 2. 羟脯氨酸含量的测定:

#### (1) 按样本鲜重计算:

组织羟脯氨酸含量 ( $\mu\text{g/g}$  鲜重) =  $x \times V_{\text{样品}} \div (W \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{组提}}) = 8x \div W$

#### (2) 按样本蛋白浓度计算:

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:

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

$V_{\text{样品}}$ : 加入的样品体积, 0.2mL;  $V_{\text{组提}}$ : 组织提取液体积, 8mL;  $V_{\text{胞提}}$ : 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;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL。

## 七、注意事项:

1. OD 值大于 1, 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。