

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、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。

二、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 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | 临用前向瓶中 务必缓慢 加入 30mL 盐酸 (6mol/L 盐酸),混匀备用。 |
| 活性炭 | 粉体×1 瓶 | 室温 | |
| 试剂一 | 液体 40mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 粉体 mg×1 瓶 | 4°C 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°C 保存 | 临用前加向试剂 A 中依次加入 3.5mL 高氯酸 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°C 保存 | |

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、**盐酸**、**高氯酸**、水浴锅/恒温培养箱、离心机、蒸馏水。

四、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°C 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°C, 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°C 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°C, 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 提取液,置于 100°C 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°C, 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（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

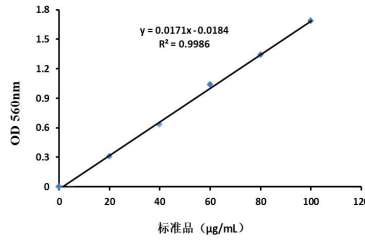
- ① 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 560nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（ μL ） | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|
| 样本 | 400 | |
| 蒸馏水 | | 400 |
| 试剂二 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀，室温静止 10min。 | | |
| 试剂四 | 200 | 200 |
| 混匀，60℃孵育 20min，冷却至室温后，取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - A - \text{空白}$ 。 | | |

- 【注】：1. 若 A 测定管值超过 1.8，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。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0171x - 0.0184$ ，x 为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ），y 是 ΔA 。



2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 409.4 \times (\Delta A + 0.0184) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171] \times 14.8 \times D = 865.5 \times (\Delta A + 0.0184) \times D$$

4、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0184) \div 0.0171 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times 7 \times D \\ &= 409.4 \times (\Delta A + 0.0184) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---取样质量，g；

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.4mL；

V2---液体取样体积，0.1mL；

500---细菌或细胞总数，万；

7---组织样本稀释倍数；

14.8---液体样本稀释倍数。

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 $\mu\text{g/mL}$ 。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. $\mu\text{g/mL}$ 。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。