

羟脯氨酸（HYP）含量测定试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB8-M48	羟脯氨酸（HYP）含量测定试剂盒	48T	微量法
AYHB8-M96		96T	微量法

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。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	自备
提取液：6mol/L 盐酸溶液，由浓盐酸（37%）和水体积比为 1：1 混合而成			
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	液体 3.5 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2~8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：称取约 0.1g 样本于玻璃管，将组织尽量剪碎以便消化，盖子稍松不密闭。加入 1mL 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。

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 NaOH 溶液调节 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、血清（浆）等液体样本：称取 300μL 液体样本于玻璃管，加入 0.7mL 的提取液（若测定数值过小时可调整二者比例），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°C，离心 20min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除），取上清待测。

测定步骤

- 1、酶标仪预热30min 以上，调节波长至560nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将标准品粉剂中加入1mL蒸馏水得到10mg/mL的标准液，随后将10mg/mL的标准液用蒸馏水稀释成12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0.390625、0.1953125 µg/mL的标准液备用。
- 3、操作表

试剂名称	测定管	标准管	空白管
样本上清液（µL）	120	-	-
不同浓度标准液（µL）	-	120	-
蒸馏水（µL）	-	-	120
试剂一（µL）	30	30	30
试剂二（µL）	60	60	60
混匀，37°C水浴 25min			
试剂三（µL）	60	60	60
混匀，室温下放置 5min			
试剂四（µL）	60	60	60
混匀，沸水浴 3min（缠封口膜，防止爆盖），冷却后于波长 560nm 处测各管吸光度，分别记为 A 空白管、A 测定管、A 标准管，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。			

五、羟脯氨酸含量计算：

1、标准曲线的绘制

以标准品的浓度为 x 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程得到 y（µg/mL）。

2、乳酸含量计算

（1）按照蛋白含量计算

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

（2）按照样本质量计算

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

（3）按照细胞数量计算

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

(4) 按照液体体积计算

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

V 样本: 加入的样本体积, 0.12mL;

V 组提: 组织提取液体积, 1mL;

V 胞提: 细胞提取液体积, 1mL;

V 液提: 液体提取液体积, 1mL;

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。

六、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稀释样本后再进行测定。

2、为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书(以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。

3、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。

4、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。