

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AJS008 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 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 100μL 混合液至新 EP 管中,再加 600μL 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 100μL 液体样本,加 100μL 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 100μL 混合液至新 EP 管中,再加 640μL 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 100μL 混合液至新 EP 管中,再加 600μL 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:

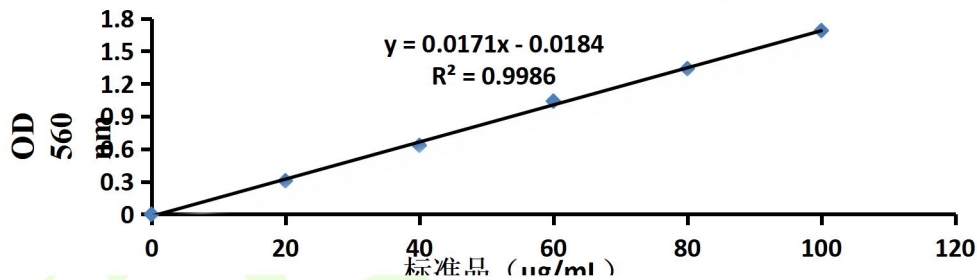
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|--|-----|------------|
| 样本 | 400 | |
| 蒸馏水 | | 400 |
| 试剂二 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀, 室温静止 10min。 | | |
| 试剂四 | 200 | 200 |
| 混匀, 60°C 孵育 20min, 冷却至室温后, 取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿中, 于 560nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 空白。 | | |

【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 (μg/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 500μg/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, μg/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。