

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-AJS008 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
活性炭	粉体 1 瓶	室温	
提取液	液体 55mL×1 瓶	4°C保存	1. 临用前向瓶中缓慢加入 55mL 盐酸 (6mol/L 盐酸), 混匀备用。 2. 保存周期与试剂盒有效期相同
试剂一	液体 70mL×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避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 11mL 的试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	试剂 A: 粉体 1 瓶 试剂 B: 8mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前向试剂 A 中依次加入 3.5mL 高氯酸和 6.5mL 试剂 B 溶解(可超声), 最终溶解液颜色为黄绿色。 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准管	液体 2mL×1 支	4°C保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96孔板、离心管、酶标仪、盐酸、高氯酸、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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 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 $^{\circ}$ 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 的提取液，置于 100 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 560nm。
 ② 所有试剂解冻至室温，按下表在 EP 管中依次加入：

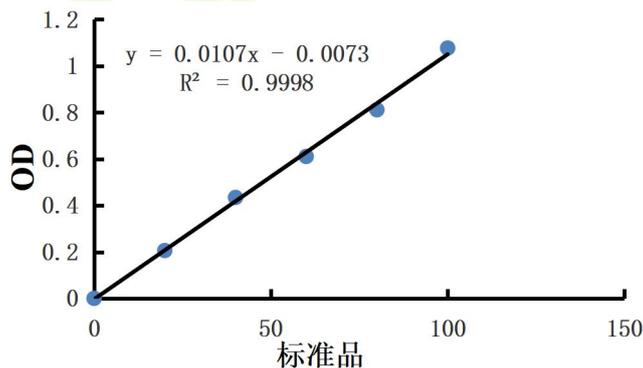
试剂名称 (μ L)	测定管	空白管（仅做一次）
样本	200	
蒸馏水		200
试剂二	100	100
试剂三	100	100
混匀，室温静止 10min。		
试剂四	100	100
混匀，60 $^{\circ}$ C 孵育 20min，冷却至室温后，取出 200 μ L 至 96 孔板中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

【注】：

- 若 A 测定管值超过 1，可把样本进行稀释后测定，稀释倍数 D 代入计算公式。
- 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： $y = 0.0107x - 0.0073$ ，x 为标准品浓度（ μ g/mL），y 是 ΔA 。



2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/g}) &= [(\Delta A + 0.0073) \div 0.0107 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 654.21 \times (\Delta A + 0.0073) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0073) \div 0.0107 \times V_1] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times 7 \times D \\ &= 654.21 \times (\Delta A + 0.0073) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0073) \div 0.0107] \times 14.8 \times D = 1383.1776 \times (\Delta A + 0.0073) \times D$$

5、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸(Hyp)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0073) \div 0.0107 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times 7 \times D \\ &= 654.21 \times (\Delta A + 0.0073) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---取样质量，g；
V1---加入样本体积，0.2mL；
500---细菌或细胞总数，万；
14.8---液体样本稀释倍数。
Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

V---提取液体积，1mL；
V2---液体取样体积，0.1mL；
7---组织样本稀释倍数；
D---稀释倍数，未稀释即为 1；

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，20，40，60，80，100. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200 μL ，加入 800 μL 蒸馏水，混匀得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	200	
蒸馏水		200
试剂二	100	100
试剂三	100	100
混匀，室温静置 10min。		
试剂四	100	100
混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20min，冷却至室温后，取出 200 μL 至 96 孔板中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		