

**羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒 (分光光度计法)**  
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0110	羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒	50 管/48 样

**产品内容**

名称	规格	储存条件
提取液	6mol/L 盐酸, 浓盐酸: H <sub>2</sub> O (V/V) = 1:1 (自备)	常温
试剂一	液体 15mL ×1 瓶	4°C, 避光
试剂二	液体 15mL ×1 瓶	4°C, 避光
标准品	1mL×1 支, 0.5mg/mL 羟脯氨酸标准品。	4°C

**一、产品说明**

羟脯氨酸 (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。

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, 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。

**二、自备材料**

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。

**三、样品制备**

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、细胞或细菌: 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。

**四、操作步骤**

**正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

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

2、将标准品稀释成 15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234、0.117μg/mL 的标准溶液。

3、加样表

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	标准管
样本		200	
标准液			200

试剂一	200	200	200
混匀, 室温静置 20min。			
试剂二	200	200	200
H2O	600	400	400
混匀, 60°C, 20min 水浴, 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。			

## 五、HYP 含量的计算

1、建立标准曲线: 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、按照组织蛋白浓度计算:

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

3、按照样本鲜重计算:

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

4、按照细胞/细菌数量计算:

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

V 样品: 加入的样品体积, 0.2mL; V 组提: 组织提取液体积, 8mL; V 胞提: 细胞提取液体积, 2mL; W: 样本鲜重, g; 细胞数量: 以 10<sup>4</sup> 为单位, 万个; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/mL。

## 六、注意事项

- 1、OD 值大于 1.0, 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。