

羟脯氨酸（Hyp）含量检测试剂盒说明书

（货号：BP10166W 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℃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℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 1 瓶	4℃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℃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℃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℃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℃，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℃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℃，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℃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℃，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 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：

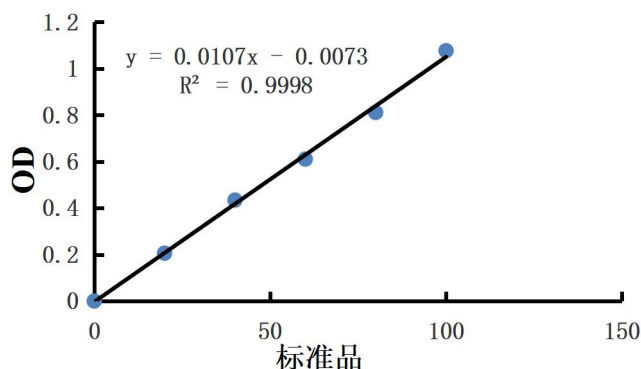
试剂名称（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	200	
蒸馏水		200
试剂二	100	100
试剂三	100	100
混匀，室温静止 10min。		
试剂四	100	100
混匀，60℃孵育 20min，冷却至室温后，取出 200μL 至 96 孔板中，于 560nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：

1. 若 A 测定管值超过 1，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 = 0.0107x - 0.0073，x 为标准品浓度（μg/mL），y 是 ΔA 。



- 2、按照质量计算：

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

- 3、按蛋白浓度计算：

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

- 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; V---提取液体积, 1mL;
V1---加入样本体积, 0.2mL; 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;
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。

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。		