

羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒说明书

Hydroxyproline Assay Kit

微量法

货号：AK139

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液	6mol/L 盐酸（自备）	浓盐酸（37%）: H ₂ O (V/V) = 1:1, 室温保存
AK139-A	8ml×1 瓶	4℃避光保存
AK139-B	8ml×1 瓶	4℃避光保存
AK139-标准品 (0.5mg/ml)	0.5ml×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：羟脯氨酸 (Hydroxyproline, 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。

原理：样品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。通过测定样品水解液 560nm 吸光值，可计算 HYP 含量。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、研钵、6mol/L 盐酸、10mol/L NaOH 和蒸馏水。

羟脯氨酸提取：

- 组织：称取约 0.2g 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 2mL 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，冷却后用 10mol/L NaOH (约 1mL) 调节 pH 值至 6-8 范围内，再用蒸馏水定容至 4mL，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 (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，不影响实验)。
- 细胞：取 500 万个细胞，加入 1mL 的提取液，煮沸或 110℃烘箱 2 至 6 小时消化至透明状，冷却后用 10mol/L NaOH (约 0.5mL) 调节 pH 值至 6-8 范围内，蒸馏水定容至 2mL, 16000rpm, 25℃, 离心 20min，取上清待测。

测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。
- 将标准品用蒸馏水稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234 μg/mL 的标准溶液。
- 在 EP 管中加入下列试剂：

试剂名称	空白管(ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
样本		60	
标准品			60
AK139-A	60	60	60
混匀，室温静置 20min			
AK139-B	60	60	60
蒸馏水	180	120	120

混匀，60°C，20min 水浴，取出后室温静置 15 min，取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中
检测 560nm 处吸光值。ΔA=A 测定-A 空白

羟脯氨酸含量计算：

1. 标准曲线的绘制：以标准溶液的浓度为 x 轴， ΔA 标准 (ΔA 标准 = 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 ΔA 测定 (ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管) 带入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。
2. 羟脯氨酸含量的计算：

(1) 按样品重量计算

$$\text{组织羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/g}) = x \times V \text{ 样本} \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 组提}) = 4x \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

注：V 样本：加入的样本体积，0.06mL；V 组提：组织提取液体积，4mL；V 胞提：细胞提取液体积，2mL；W：样本质量，g；细胞数量：以 10^4 为单位，万个；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

注意事项：

1. 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。
2. 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。
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。