

羟脯氨酸 (Hyp) 含量检测试剂盒说明书

(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 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂一 | 液体 40mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂三 | 粉体 mg×1 瓶 | 4℃ 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 | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 标准管 | 液体 2mL×1 支 | 4℃ 保存 | 临用前用蒸馏水稀释 100 倍, 即 5μg/mL 羟脯氨酸溶液 |

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、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℃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 的浓盐酸,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。

2、上机检测:

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,标准品按要求稀释成浓度为 5μg/mL,在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) | 标准管 (仅做一次) |
|-----------|-----|------------|------------|
| 样本 | 400 | | |
| 蒸馏水 | | 400 | |
| 标准品 | | | 400 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 试剂二 | 200 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 200 | 200 | 200 |
| 混匀，室温静止 10min | | | |
| 试剂四 | 200 | 200 | 200 |
| 混匀，60℃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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 | | | |

【注】：测定管的 A 值若超过 1，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸 (Hyp) 含量}(\mu\text{g/g}) &= (\text{C 标准} \times V_1) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (V_1 \div V \times W) \times 7 \times D \\ &= 35 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D \div W \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{羟脯氨酸 (Hyp) 含量}(\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times V_1) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div V_2 \times 3.7 \times D \\ &= 74 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，5 $\mu\text{g/mL}$ ；

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；

V₁---加入样本体积，0.4mL；

3.7---液体样本稀释倍数。