

羟脯氨酸（Hydroxyproline, HYP）试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备实验用品及仪器：

天平、烘箱、玻璃管、离心机、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、无水乙醇、异丙醇、6mol/L盐酸和蒸馏水。

试剂组成和配制：

组织提取液：6mol/L盐酸，自备。浓盐酸：H₂O（V/V）= 1:1，室温保存。

细胞提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

羟脯氨酸提取：

1. 组织：称取约0.2g样品于玻璃管，加入2mL的组织提取液，置于110℃烘箱，水解6至12小时，用提取液定容至2mL，12000g，25℃，离心20min，取上清待测。
2. 细胞：取约500万个细胞，加入1mL的细胞提取液，于高压消毒器中15磅保持30min，自然降压后待测。
3. 血清游离羟脯氨酸提取：取0.1mL血清，加入0.5mL无水乙醇使蛋白质沉淀，8000g4℃离心5min。将上清倒入另一个EP管，氮吹或沸水浴将乙醇挥发干。冷却后再加入0.2mL50%异丙醇，充分溶解混匀待测。

测定操作表：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至560nm，蒸馏水调零。
2. 操作表

	对照管	测定管
样本（μL）		60
试剂一（μL）	60	60
混匀，室温静置20min		
试剂二（μL）	60	60
H ₂ O（μL）	180	120

混匀，60°C，20min，取出后25°C静置15 min，取200μL于微量石英比色皿/96孔板中检测560nm处吸光值。ΔA=A测定-A对照

羟脯氨酸含量计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线：y=64.875x+ 0.0251，R2=0.9991

(1) 按样品重量计算

组织羟脯氨酸含量 (mg/g 鲜重) = (ΔA-0.0251) ÷ 64.875 × V反总 ÷ (V样 ÷ V样总 × W)

$$= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \div W$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

细胞羟脯氨酸含量 (mg/104 cell) = (ΔA-0.0251) ÷ 64.875 × V反总 ÷ V样 × V样总 ÷ 细胞数量 (万个) = 0.077 × (ΔA-0.0251) ÷ 细胞数量 (万个)

(3) 按血清体积计算

HYP含量 (mg/mL) = (ΔA-0.0251) ÷ 64.875 × V反总 ÷ V样 × 2

$$= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251)$$

V反总：反应总体积，0.3 mL；V样：反应中样品体积，0.06mL；V样总：加入提取液体积， mL；W：样本重量， g

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y=32.4375x+ 0.0251，R2=0.9991

(1) 按样品重量计算

HYP含量 (mg/g 鲜重) = (ΔA-0.0251) ÷ 32.4375 × V反总 ÷ (V样 ÷ V样总 × W)

$$= 0.308 \times (\Delta A - 0.0251) \div W$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

HYP含量 (mg/104 cell) = (ΔA-0.0251) ÷ 32.4375 × V反总 ÷ V样 × V样总 ÷ 细胞数量 (万个) = 0.154 × (ΔA-0.0251) ÷ 细胞数量 (万个)

(3) 按血清体积计算

HYP含量 (mg/mL) = (ΔA-0.0251) ÷ 32.4375 × V反总 ÷ V样 × 2

$$= 0.308 \times (\Delta A - 0.0251)$$

V反总：反应总体积，0.3 mL；V样：反应中样品体积，0.06mL；V样总：加入提取液体积， mL；W：样本重量， g；2，血清吹干后复溶的倍数。

注意事项：

1. 吸光值大于0.8，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. 最低检出限为3.8mg/L。

