

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： $H_2O (V/V) = 1:1$ ，室温保存。

细胞提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂二：液体6mL×1瓶，4°C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°C烘箱，水解6至12小时，用提取液定容至2mL，12000g，25°C，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°C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 (Hydroxyproline, HYP) 试剂盒说明书 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: $y=64.875x+0.0251$, $R^2=0.9991$

(1) 按样品重量计算

$$\begin{aligned} \text{组织羟脯氨酸含量 (mg/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \div W \end{aligned}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{细胞羟脯氨酸含量 (mg/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} = 0.077 \times (\Delta A - 0.0251) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(3) 按血清体积计算

$$\begin{aligned} \text{HYP含量 (mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 \\ &= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \end{aligned}$$

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: $y=32.4375x+0.0251$, $R^2=0.9991$

(1) 按样品重量计算

$$\begin{aligned} \text{HYP含量 (mg/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 32.4375 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.308 \times (\Delta A - 0.0251) \div W \end{aligned}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{HYP含量 (mg/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A - 0.0251) \div 32.4375 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} = 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(3) 按血清体积计算

$$\begin{aligned} \text{HYP含量 (mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 32.4375 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 \\ &= 0.308 \times (\Delta A - 0.0251) \end{aligned}$$

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。

www.pyram.cn