

## 羟脯氨酸（HYP）含量测定试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB9-C24	羟脯氨酸（HYP）含量测定试剂盒	24T	常量法
AYHB9-C48		48T	

### 一、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。

### 二、测定原理：

样本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。通过测定样本水解液 560nm 吸光值，可计算 HYP 含量。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	液体 15 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	液体 15 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	液体 15 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2~8℃保存
标准液的配制：临用前将标准品粉剂中加入 1mL 蒸馏水得到 10mg/mL 的标准液。			

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

1、组织：称取约 0.1g 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 1mL 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（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 NaOH 溶液调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），再蒸馏水定容至 2mL。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。

2、细菌/细胞：取  $5 \times 10^6$  个细菌/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（缠封口膜，防止爆盖），冷却后 NaOH 溶液调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），蒸馏水定容至 2mL，16000rpm，25℃，离心 20min，取上清待测。

3、血清（浆）等液体样本：称取 300μL 液体样本于玻璃管，加入 0.7mL 的提取液（若测定数值过小可调整二者比例），煮沸或 110℃烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 NaOH 溶液调节 pH 值至 6-8 范围内（不可过酸或过碱），再蒸馏水定容至 2mL。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。

### 测定步骤

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 560nm，蒸馏水调零；
- 测定前将 10mg/mL 的标准液用蒸馏水稀释成 12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0.390625、0.1953125 μg/mL 的标准液备用；
- 操作表（在离心管中加入以下试剂）：

试剂名称	测定管	标准管	空白管
样本上清液（μL）	300	-	-
不同浓度标准液（μL）	-	300	-
蒸馏水（μL）	-	-	300
试剂一（μL）	100	100	100
试剂二（μL）	200	200	200
混匀，37℃水浴 25min			
试剂三（μL）	200	200	200
混匀，室温下放置 5min			
试剂四（μL）	200	200	200
混匀，沸水浴 3min（缠封口膜，防止爆盖），冷却后于波长 560nm 处测各管吸光度，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ ，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。			

### 五、羟脯氨酸（HYP）含量计算：

1、标准曲线的绘制：以标准品的浓度为 x 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$  为 y 轴，绘制标准曲线，得到方程  $y=kx+b$ 。将  $\Delta A_{\text{测定}}$  带入方程得到 y ( $\mu\text{g/mL}$ )。

2、羟脯氨酸 (HYP) 含量计算：

(1) 按照蛋白含量计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = y \times V_{\text{样本}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) = y \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/g}) = y \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{组提}}) = y \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样本}} \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{胞提}}) = y \div N$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = y \times V_{\text{液提}} \div V_{\text{液体}} = y \times 3.33$$

$V_{\text{样本}}$ ：加入的样本体积，0.3mL； $V_{\text{组提}}$ ：组织提取液体积，1mL； $V_{\text{胞提}}$ ：

细胞提取液体积，1mL； $V_{\text{液提}}$ ：液体提取液体积，1mL； $V_{\text{液体}}$ ：

前处理中液体加入体积，0.3mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，

以  $10^6$  为单位，百万个；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

## 六、注意事项：

1、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。

2、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。

3、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。

4、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。

## 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日