

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-M48	羟脯氨酸 (HYP) 含量测定试剂盒	48T	微量法
AYHB9-C48		96T	

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 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
提取液 A	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2~8℃保存
提取液 B	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	液体 3.5 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	液体 7 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 0.2g 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 A, 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), 冷却后用提取液 B(约 1mL)调节 pH 值至 6-8 范围内 (不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至 5mL。最后 10000rpm, 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 1×10^7 个细菌/细胞, 加入 2mL 的提取液 A, 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), 冷却后用提取液 B(约 1mL)调节 pH 值至 6-8 范围内 (不可过酸或过碱), 蒸馏水定容至 5mL, 10000rpm, 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 A(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), 冷却后用提取液 B(约 1mL)调节 pH 值至 6-8 范围内 (不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至 5mL。最后 10000rpm, 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

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 560nm, 蒸馏水调零;
- 2、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;
- 3、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)	120	-	-
不同浓度标准液 (μL)	-	120	-
蒸馏水 (μL)	-	-	120
试剂一 (μL)	30	30	30
试剂二 (μL)	60	60	60
混匀, 37℃水浴 25min			
试剂三 (μL)	60	60	60
混匀, 室温下放置 5min			
试剂四 (μL)	60	60	60
混匀, 沸水浴 3min (缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后取 200μL 在 96 孔板中, 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

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

(2) 按照样本质量计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/g}) = y \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{总}}) = 5 \times y \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g}/10^7 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样本}} \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{总}}) = 5 \times y \div N$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = y \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样本}} = 41.67 \times y$$

$V_{\text{样本}}$ ：加入的样本体积，0.12mL； $V_{\text{总}}$ ：组织提取液体积，5mL；

W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10^7 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。

5、样本提取时，加入提取液 B 后用 pH 计或 pH 试纸检测溶液 pH 值，使其 pH 值至 6-8 范围内，不可过酸或过碱。

【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