

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℃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℃，20min，取出后 25℃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： $y=64.875x+0.0251$ ， $R^2=0.9991$

(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

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

(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

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

(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。