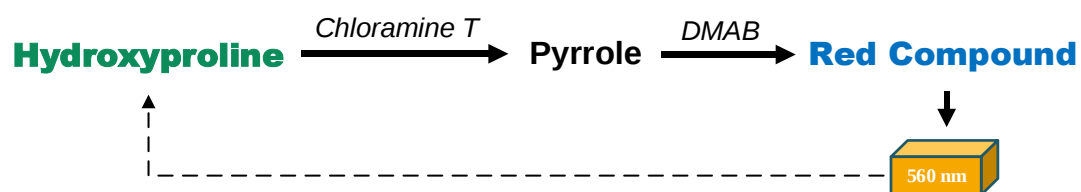




羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒  
Hydroxyproline (HYP) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒

## Hydroxyproline (HYP) Content Assay Kit

## 一、产品描述

羟脯氨酸（HYP）是一种非必需氨基酸，机体内胶原组织的主要成分之一，除弹性蛋白含少量羟脯氨酸外，羟脯氨酸大多存在于胶原中，羟脯氨酸含量可作为衡量机体胶原组织代谢的重要指标，并对组织纤维化程度的判定具有重要意义。

待测样本经酸水解产生游离羟脯氨酸，被氯胺 T 氧化为吡咯，吡咯能够与对二甲氨基苯甲醛（DMAB）反应生成红色化合物，产物在 560 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可定量检测羟脯氨酸的含量。

## 二、产品内容

| 名称                                                                            | 试剂规格                    | 储存条件    | 使用说明及注意事项                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------|----------------------------------------------------------|
| 提取液                                                                           | 液体 100 mL×1 瓶<br>(自备试剂) | 4°C保存   | <b>6 mol/L 盐酸</b><br>(按照浓盐酸：H <sub>2</sub> O=1:1 的体积比配置) |
| 试剂一                                                                           | 液体 60 mL×1 瓶            | 4°C保存   | -                                                        |
| 试剂二                                                                           | 液体 15 mL×1 瓶            | 4°C避光保存 | -                                                        |
| 试剂三                                                                           | 液体 15 mL×1 瓶            | 4°C避光保存 | -                                                        |
| 标准液                                                                           | 液体 1 mL×1 支             | 4°C避光保存 | <b>1000 µg/mL 羟脯氨酸标准液</b>                                |
| 标准稀释液的制备：使用前将 1000 µg/mL 羟脯氨酸标准液使用蒸馏水稀释至 10、6、3、1.5、0.75、0.375 µg/mL 即为标准稀释液。 |                         |         |                                                          |

需自备试剂：浓盐酸（HCl，AR，Content≥36%，12 mol/L，MW=36.46）；

无水乙醇（C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O，MW = 46.07，CAS: 64-17-5）；异丙醇（C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O，MW = 60.01，CAS: 67-63-0）；

| 序号           | A    | 1   | 2   | 3   | 4   | 5    | 6     |
|--------------|------|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| 稀释前浓度（µg/mL） | 1000 | 100 | 100 | 6   | 3   | 1.5  | 0.75  |
| 标准液体积（µL）    | 100  | 100 | 60  | 500 | 500 | 500  | 500   |
| 蒸馏水体积（µL）    | 900  | 900 | 940 | 500 | 500 | 500  | 500   |
| 稀释后浓度（µg/mL） | 100  | 10  | 6   | 3   | 1.5 | 0.75 | 0.375 |

### 三、产品使用说明

**测定过程中所需要的仪器和试剂：**可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、可调式移液器、台式离心机、烘箱、恒温水浴、浓盐酸、无水乙醇、异丙醇和蒸馏水。

#### 1. 羟脯氨酸（HYP）的提取（可根据预实验结果适当调整样本量）

①组织：称取 0.2 g 组织样本于玻璃管中，将组织剪碎以便消化，加入 2 mL 提取液，沸水浴或 110℃烘箱消化 2-5 h 直至组织消化完全（无明显团块），12000 g 室温离心 20 min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除），取全部上清液，使用试剂一（约 1 mL）调节 pH 至 6-8 范围，蒸馏水定容至 4 mL 即为待测样本（注：过程中可能出现黑色块状物质，若长时间未能消化，可能为碳化物质）。

②细胞：离心收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液，沸水浴或 110℃烘箱消化 2-5 h 直至透明状，12000 g 室温离心 20 min，取全部上清液，使用试剂一（约 0.5 mL）调节 pH 至 6-8 范围，蒸馏水定容至 2 mL 即为待测样本。

③血清：吸取 200  $\mu$ L 血清，入 1 mL 无水乙醇使蛋白质沉淀，4℃ 8000 g 离心 5 min，取全部上清，氮吹或沸水浴使乙醇完全挥发，冷却后加入 400  $\mu$ L 50%（v/v）异丙醇充分溶解即为待测样本。

#### 2. 测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 560 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

| 试剂                         | 测定管<br>( $\mu$ L) | 标准管<br>( $\mu$ L) | 空白管<br>( $\mu$ L) |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 待测样本                       | 200               | -                 | -                 |
| 标准稀释液                      | -                 | 200               | -                 |
| 试剂二                        | 200               | 200               | 200               |
| 充分混匀，室温静置 20 min           |                   |                   |                   |
| 试剂三                        | 200               | 200               | 200               |
| 蒸馏水                        | 400               | 400               | 600               |
| 60℃显色 20 min 后，室温静置 15 min |                   |                   |                   |

**吸光值测定：**将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 560 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 空白， $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次。

**标准曲线的建立：**以 10、6、3、1.5、0.75、0.375  $\mu$ g/mL 为横坐标（x），以其对应的  $\Delta A$  标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$  测定带入公式中得到 x（ $\mu$ g/mL）。

### 3. 羟脯氨酸 (HYP) 含量计算

#### ①按组织蛋白浓度计算

$$\text{HYP 含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = \frac{x \times V_{\text{样}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}}} = \frac{x}{\text{Cpr}}$$

#### ②按组织样本质量计算

$$\text{HYP 含量 } (\mu\text{g/g}) = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_1}{W \times V_{\text{样}}} = \frac{4 \times x}{W}$$

#### ③按细胞数量计算

$$\text{HYP 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_2}{\text{细胞数量} \times V_{\text{样}}} = \frac{2 \times x}{\text{细胞数量}}$$

#### ④按血清体积计算

$$\text{HYP 含量 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{x \times V_3}{V_4} = 2 \times x$$

**注释：** V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.2 mL；V1：组织提取后总体积，4 mL；V2：细胞提取后体积，2 mL；V3：血清提取后总体积，0.4 mL；V4：提取过程中加入血清的体积，0.2 mL；W：样本质量，g；细胞数量：以万计；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

### 四、注意事项

- ①若测定吸光值超出标准线性吸光值范围：高于最高值建议将待测样本适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ②试剂具有一定的毒性，请操作时做好防护措施，防止吸入或与皮肤接触；
- ③测定蛋白浓度时需要使用 PBS 单独提取样本蛋白后进行测定；
- ④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，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

**boxbio**

**Manufactured and Distributed by**

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.  
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

