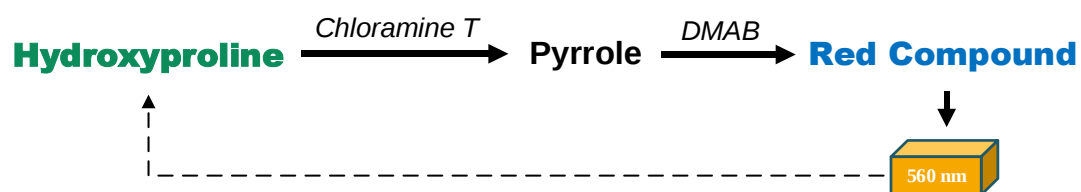




羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒
Hydroxyproline (HYP) Content Assay Kit



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 200 mL×1 瓶 (自备试剂)	4°C保存	6 mol/L 盐酸 (按照浓盐酸：H ₂ O=1:1 的体积比配置)
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C避光保存	1000 µg/mL 羟脯氨酸标准液
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 12、10、8、4、2、1 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（C₂H₆O，MW = 46.07，CAS: 64-17-5）；异丙醇（C₃H₈O，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	100	8	4	2
标准液体积（µL）	100	120	100	80	200	200	200
蒸馏水体积（µL）	900	880	900	920	200	200	200
稀释后浓度（µg/mL）	100	12	10	8	4	2	1

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/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、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 μ L 血清，加入 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 μ L 50% (v/v) 异丙醇充分溶解即为**待测样本**。

2. 测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 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 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
待测样本	60	-	-
标准稀释液	-	60	-
试剂二	60	60	60
充分混匀，室温静置 20 min			
试剂三	60	60	60
蒸馏水	120	120	180
60℃显色 20 min 后，室温静置 15 min			

吸光值测定：吸取 200 μ L 反应液于 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 560 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 12、10、8、4、2、1 μ g/mL 为横坐标 (x)，以其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x (μ g/mL)。

3. 羟脯氨酸 (HYP) 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

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

②按组织样本质量计算

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

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

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

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.06 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.

