

羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1253

产品规格：100管/96样

产品简介：

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。

样品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。通过测定样品水解液560nm吸光值，可计算HYP含量。

产品内容：

提取液：6mol/L盐酸，自备。浓盐酸：H₂O（V/V）= 1:1，室温保存。

试剂一：液体8mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体8mL×1瓶，4℃避光保存。

标准品：液体0.5mL×1支，0.5mg/mL羟脯氨酸标准品，4℃保存。

需自备的仪器和用品：

天平、烘箱、玻璃管、离心机、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、6mol/L盐酸和蒸馏水。

操作步骤：

一、羟脯氨酸提取：

1、组织：称取约0.2g样品于玻璃管，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，煮沸或110℃烘箱2至6小时消化至没有可见大的团块，16000rpm，25℃，离心20min（若离心后仍有杂质，可通过过滤去除），用10mol/LNaOH（约1mL）调节pH值至6~8范围内。蒸馏水定容至4mL，取上清待测。（过程中可能有黑色物质生成，若长时间不能消化，可能为碳化的物质）

2、细胞：取500万个细胞，加入1mL的提取液，煮沸或110℃烘箱2至6小时消化至透明状，16000rpm，25℃，离心20min，用10mol/LNaOH（约0.5mL）调节pH值至6~8范围内。蒸馏水定容至2mL，取上清待测。

二、测定步骤：

1、将标准品稀释为30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234μg/mL的标准溶液。

2、分光光度计预热30min以上，调节波长至560nm，蒸馏水调零。

3、按下表进行操作：

	空白管	测定管	标准管
样品（μL）		60	
标准溶液（μL）			60
试剂一（μL）	60	60	60
混匀，室温静置20min			
试剂二（μL）	60	60	60
H ₂ O（μL）	180	120	120



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719779

Q Q：807961520 731791866

邮箱：shsunbao@126.com

http://www.saint-bio.com

混匀，60℃，20min水浴，取出后室温静置15min，取200μL于微量玻璃比色皿/96孔板中检测 A560吸光值。ΔA=A测定管-A空白管

三、羟脯氨酸含量计算公式

1、标准曲线的绘制：

以标准溶液的浓度为x轴，ΔA标准（ΔA=A标准管-A空白管）为y轴，绘制标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将ΔA测定（ΔA=A测定管-A空白管）带入方程得到x。

2、羟脯氨酸含量的测定：

（1）按样本鲜重计算：

组织羟脯氨酸含量（μg/g鲜重）= $x \times V_{\text{样品}} \div (W \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{组提}}) = 4x \div W$

（2）按样本蛋白浓度计算：

组织羟脯氨酸含量（μg/mg prot）= $x \times V_{\text{样品}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样品}}) = x \div C_{\text{pr}}$

（3）按细菌或细胞数量计算：

细胞羟脯氨酸含量（μg/10⁴cell）= $x \times V_{\text{样品}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样品}} \div V_{\text{胞提}}) = 2x \div \text{细胞数量}$

V样品：加入的样品体积，0.06mL；V组提：组织提取液体积，4mL；V胞提：细胞提取液体积，2mL；W：样本鲜重，g；细胞数量：以10⁴为单位，万个；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

注意事项：

- 1、OD值大于1.0，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、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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719779

Q Q：807961520 731791866

邮箱：shsunbao@126.com

http://www.saint-bio.com