

羟脯氨酸（HYP）检测试剂盒（分光光度法）

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。

试剂组成和配制：

组织提取液：6mol/L 盐酸，自备。浓盐酸：H₂O（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 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

羟脯氨酸提取：

- 组织：**称取约 0.5g 样品于玻璃管，加入 5mL 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 5mL，12000g，25℃，离心 20min，取上清待测。
- 细胞：**取 500 万个细胞，加入 2mL 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。
- 血清游离羟脯氨酸提取：**取 0.2mL 血清，加入 1mL 无水乙醇使蛋白质沉淀，8000g 4℃ 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 0.4mL 50% 异丙醇，充分溶解混匀待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
 - (1) **混合液的配制**: 首先将试剂三和试剂四配成溶液（见试剂的组成和配制），临用前根据用量按照试剂二（V）：试剂三（V）：试剂四（V）=7.2（mL）：0.9（mL）：0.9（mL）的比例充分混匀。（**注意：现配现用，用多少配多少**），置于 30℃水浴 5min；
 - (2) 试剂五的配制：取试剂五一支，临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用，现配现用。
 - (3) 1mL 玻璃比色皿中加入 175μL 样本、75μL 试剂五和 750μL 混合液，混匀，立即记录 600nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

羟脯氨酸含量计算公式:

标准曲线: $y=64.875x+0.0251$, $R^2=0.9991$

- (1) 按组织计算

$$\begin{aligned} \text{HYP 含量 (mg/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.385 \times (\Delta A - 0.0251) \div W \end{aligned}$$

- (2) 按细胞计算

$$\begin{aligned} \text{HYP 含量 (mg/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \\ &= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

- (3) 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{HYP 含量 (mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0251) \div 64.875 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 \\ &= 0.154 \times (\Delta A - 0.0251) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 1mL;

V 样: 反应中样品体积, 0.2mL;

V 样总: 加入提取液体积, mL;

W: 样品质量, g;

2, 血清吹干后复溶的倍数。

注意事项:

- 1、OD 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。