

羟脯氨酸(HYP)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A030-2-1 50管/48样 碱水解法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色, 根据其呈色的深浅可推算出其含量。

二、试剂盒组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 粉剂×1 瓶, 甲液 10mL×1 瓶, 乙液 20mL×1 瓶, 临用时将粉剂一瓶, 先加甲液 10mL 充分溶解(从瓶口向内看, 完全溶解完)。然后再加乙液 20mL 充分混匀, 配好后的试剂 4℃~8℃ 保存。[注]: 粉剂加甲液 10mL 后一定要完全溶解后才能加乙液。

试剂二: 液体 30mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 溶剂 30mL×1 瓶, 临用时将粉剂一支加到 30mL 溶剂中充分溶解, 配好后 4℃ 避光保存 1 个月内有效。

试剂四: 羟脯氨酸标准品 5mg×3 支, 4℃ 保存。

100μg/mL 标准储备液的配制: 测试前将一支标准品用双蒸水溶解后定容至 50mL, 4℃ 保存 2 周内有效。

5μg/mL 标准应用液的配制: 取 100μg/mL 标准储备液 1mL 加双蒸水定容至 20mL, 现用现配。

样本前处理试剂 (4℃ 保存): 碱水解液 60mL×1 瓶; 调 pH 指示剂 5mL×1 瓶; 调 pH 甲液 60mL×1 瓶; 调 pH 乙液 30mL×1 瓶; 活性炭×1 袋。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、60℃ 及 100℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管。

四、羟脯氨酸的测定:

(一)、样本前处理:

1、样本水解:

- ①、血清(浆):** 取 0.5mL 血清(浆)准确加水解液 1mL, 混匀。放试管中加盖后, 95℃ 或者沸水浴水解 20 分钟。
- ②、尿液(培养液):** 取 1.0mL 尿液(培养液)准确加水解液 1mL, 混匀。放试管中加盖后, 95℃ 或者沸水浴水解 20 分钟。
- ③、组织:** 精确称取组织湿重 30~100mg 放入试管中, 准确加水解液 1mL, 混匀。加盖后 95℃ 或者沸水浴水解 20 分钟(水解 10 分钟时混匀一次, 目的是使水解更充分)。

2、调 pH 值至 6.0~6.8 左右。

- ①、将各试管流水冷却后各管加指示剂 10μL, 摇匀;
 - ②、各管准确加入调 pH 甲液 1.0mL, 混匀(此时溶液应为红色);
 - ③、用 200μL 的加样器吸取调 pH 乙液向各管内逐滴小心加入调 pH 乙液, 每滴加入后均要混匀*, 直至液体中指示剂的颜色变成黄绿色** (亦即红色消失时)。此时 pH 值在 6.0~6.8 左右(约加入调 pH 乙液 100μL~500μL 左右);
- * 加调 pH 乙液时, 每加一滴均要混匀, 为防止液体外溢, 如果没有带盖的玻璃磨口试管, 可用普通玻璃试管代替, 每次混匀时可用塑料薄膜或冰箱保鲜膜压住试管口, 充分旋涡混匀即可。
- **若您的样本是细胞培养液, 因其中含有酚红, 所以液体中的混合指示剂在 pH 为 6.0~6.8 左右时为橙黄红色, 而不是黄绿色。
- ④、然后加双蒸水至 10mL, 混匀;

⑤、取 3~4mL 稀释的水解液加适量活性炭(约 20~30mg 左右, 以上清液离心后澄清无色为准), 混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 小心取上清 1mL 作检测。

注 1: 样本碱水解法的参考取样量: 皮肤组织湿重 0.03~0.05g, 软骨湿重 0.08~0.1g, 肝组织湿重 0.08~0.1g, 细胞培养液 0.5mL, 血清(浆) 0.5mL。

注 2: 加水解液及调 pH 值甲液一定都要准确, 否则较难调 pH 值。

注 3: 样本称重时, 一定要很精确, 以免影响测定结果。先将组织在保鲜薄膜上剪成湿重约 10mg 左右的块状后再连同保鲜薄膜一起称重, 称完后将样本放进试管中, 再将保鲜薄膜称重, 计算出组织净重量。

注 4: 如果您的样本量少, 则可以从取样、水解、调 pH 均按比例减少, 不影响结果。

注 5: 每次混匀时可用塑料薄膜或冰箱保鲜膜压住试管口, 充分旋涡混匀, 以免混匀过程中液体外溅。

注 6: 95℃ 或者沸水浴时可以用带盖的玻璃磨口试管, 也可用普通玻璃试管代替, 用保鲜薄膜封口扎紧, 用针头刺一小孔即可。我们建议用普通玻璃试管比带盖的玻璃磨口试管更安全。

(二)、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水(mL)	1.0		
5μg/mL 标准应用液(mL)		1.0	
检测液(mL)			1.0
试剂一(mL)	0.5	0.5	0.5
混匀, 静置 10 分钟			
试剂二(mL)	0.5	0.5	0.5
混匀, 静置 5 分钟			
试剂三(mL)	0.5	0.5	0.5
混匀, 60℃ 水浴 15 分钟, 冷却后, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清于波长 550nm, 测定各管吸光度值 A			

五、计算:

(一)、血清(浆)或尿液的计算:

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{水解液}}}{V_{\text{样}}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准液浓度, 5μg/mL;

$V_{\text{水解液}}$: 水解液总体积, 10mL;

$V_{\text{样}}$: 样本取样量, 血清(浆)0.5mL, 尿液 1mL。

(三)、组织的计算:

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g/组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{水解液}}}{W}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准液浓度, 5μg/mL;

$V_{\text{水解液}}$: 水解液总体积, 10mL;

W : 组织质量, mg。

六、测定意义:

羟脯氨酸在胶原蛋白中占 13.4%, 在弹性蛋白中占极少量, 其它蛋白中均不存在。而胶原蛋白大多分布在皮肤、腱、软骨、血管等处, 因此羟脯氨酸的量能反映结缔组织疾病的胶原代谢情况。

有人把皮肤中羟脯氨酸的测定作为筛选抗衰老药物的一个指标。在发育阶段随年龄的增长, 其羟脯氨酸在尿中排泄增加, 而发育停止后稳定。老年人的羟脯氨酸比年轻人要少。

鼠患有自发性高血压及继发性高血压时, 尿中羟脯氨酸含量增加。

手术创伤会导致尿羟脯氨酸排泄量的增加，因高脂、低蛋白、酒精中毒及毒物、营养不良，或肝细胞变性坏死，通过炎症使纤维增加，分割肝小叶，导致肝硬化。肝纤维化时，肝内主要增加的成分为胶原纤维，羟脯氨酸为胶原纤维所特有，测定肝羟脯氨酸的含量，可换算成肝胶原蛋白的含量，以反映肝纤维化程度。胶原纤维分解主要依赖胶原酶和其它蛋白酶的作用，其分解产物羟脯氨酸从尿中排出，测定尿羟脯氨酸的含量，可反应胶原降解的情况。通过测定组织及尿中羟脯氨酸的含量，一方面可以判断纤维化程度，同时可以筛选预防与治疗的药物。