

羟脯氨酸(HYP)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号：A030-1-1 消化法 50 管/48 样)

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

[注]：本试剂盒适用于血清、体液及各种组织匀浆、细胞培养液、培养细胞等样本检测。

一、试剂盒组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：粉剂×1 瓶，甲液 10mL×1 瓶，乙液 20mL×1 瓶，4℃保存。临用时取粉剂一瓶，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℃可保存 3 个月。**[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 60mL×1 瓶，4℃避光保存。临用时将粉剂一瓶加到 60mL 溶剂中充分溶解，配好后 4℃避光可保存 1 个月。

试剂四：羟脯氨酸标准品粉剂 5mg×3 支，4℃保存。

标准贮备液的配制：测试前将一支标准品用双蒸水溶解后定容至 50mL，配成 100µg/mL 的标准贮备液。

5µg/mL 标准应用液的配制：取 100µg/mL 的标准贮备液用双蒸水 20 倍稀释后，配成 5µg/mL 的标准应用液，现用现配。

消化液：粉剂×1 瓶，溶剂 3mL×1 瓶，4℃保存。临用前将粉剂倒入溶剂中，并用溶剂将粉剂瓶洗干净，现用现配。***注意：混匀时用双手小心旋动小瓶，切勿上下颠倒混匀，以免引起大量气泡**

二、所需仪器耗材及试剂：

含 536nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿（或酶标仪及 96 孔板）、37℃水浴锅或恒温箱、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、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

三、操作步骤：

（一）样本前处理：

血清、体液、培养液等液体样本直接取样操作。**[注]：若您的样本中所含羟脯氨酸过低，可以增加您的样本取样量。**

组织样本：准确称取组织重量,按重量(g)：体积(mL)=1：9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件机械匀浆，制备成 10%的匀浆，不离心，混匀后待测。**注：若您的样本中所含羟脯氨酸过低，可以增加您的样本取样量或增加匀浆浓度。**

（二）操作表

	空白管	标准管	测定管
双蒸水（mL）	0.25		
5µg/mL 标准应用液（mL）		0.25	
待测样本（mL）			0.25
消化液（mL）	0.05	0.05	0.05
混匀，37℃水浴 3 小时			

试剂一（mL）	0.5	0.5	0.5
混匀，室温静置 10 分钟			
试剂二（mL）	0.5	0.5	0.5
混匀，室温静置 5 分钟			
试剂三（mL）	1.0	1.0	1.0
混匀，60℃水浴 15 分钟，流水冷却后，3500 转/分离心 10 分钟，取上清（注意不要混入下面沉淀）在 550nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度。			

注意：若您的样本中所含羟脯氨酸过低，可以增加您的样本取样量或增加匀浆浓度。

四、计算公式：

1、血清（浆）、细胞培养液等液体样本公式：

羟脯氨酸含量 (µg/mL) = (A_{测定} - A_{空白}) / (A_{标准} - A_{空白}) × C_{标准} × N

2、组织样本计算公式：

羟脯氨酸含量 (µg/g组织) = (A_{测定} - A_{空白}) / (A_{标准} - A_{空白}) × C_{标准} ÷ (W / V_{样总})

C_{标准}：标准液浓度, 5µg/mL;

N：样本测试前稀释倍数。

W：样本质量,g;

V_{样总}：匀浆液总体积,mL。

五、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。

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。

七、参考文献:

CLIN.CHEM.40/9,1735-1738(1994) Automation and Analytical Techniques

八、技术参数:

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂盒检出限	0.01µg/mL
2	试剂盒批内 CV	2.2%
3	试剂盒批间 CV	4.65%
4	试剂盒回收率	102%
5	线性范围 0-20µg/mL	R ² =0.9998
6	呈色稳定	1 小时内完成比色

附录 I：标准曲线的制作

1、前处理:

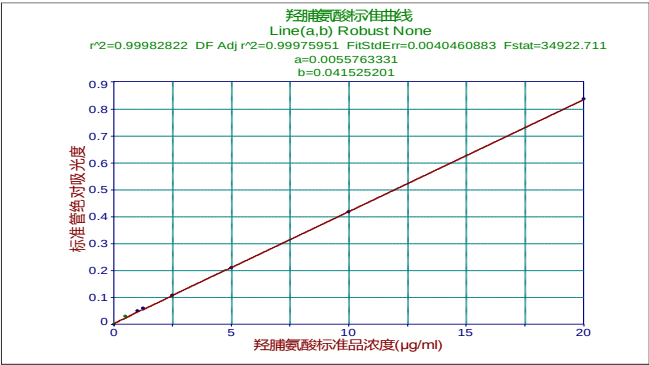
取 100µg/mL 羟脯氨酸标准贮备液用双蒸水稀释成不同浓度制作标准曲线：20µg/mL、10µg/mL、5µg/mL、2.5µg/mL、1.25µg/mL、1µg/mL、0.5µg/mL。

2、操作表:

	空白管	标准管
双蒸水（mL）	0.25	
不同浓度标准应用液（mL）		0.25
消化液（mL）	0.05	0.05
混匀，37℃水浴 3 小时		
试剂一（mL）	0.5	0.5
混匀，室温静置 10 分钟		
试剂二（mL）	0.5	0.5
混匀，室温静置 5 分钟		
试剂三（mL）	1.0	1.0
混匀，60℃水浴 15 分钟，流水冷却后在 550nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度。		

3、测定结果:

标准品浓度(µg/mL)	测得 OD 值	绝对 OD 值
空白（0）	0.033	0
0.5	0.066	0.033
1	0.087	0.054
1.25	0.097	0.064
2.5	0.147	0.114
5	0.254	0.221
10	0.473	0.44
20	0.914	0.881



标准曲线用户可以不²做，按提供的计算公式计算即可，不影响结果。