# CheKine™ 羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1490　　规格: 96 T/96 S　　批号：见产品标签

| | |
|---|---|
| | **适用样本：**动物组织、细菌和细胞、血清（浆）或其他液体 |
| | **保质期：**4℃避光保存 6 个月 |

## 01 背景与原理

羟脯氨酸（Hydroxyproline，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。

本试剂盒检测原理是样本经水解产生游离的 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 560 nm 处有特征吸收峰。通过测定样本水解液 560 nm 吸光值，可计算 HYP 含量。

## 02 包装清单

| 试剂盒组分 | 规格<br>96 T | 储存要求 |
|---|---|---|
| **Cell Extraction Buffer** | 120 mL | 4℃ |
| **Reagent Ⅰ** | 8.4 mL | 4℃，避光保存 |
| **Reagent Ⅱ** | 8.4 mL | 4℃，避光保存 |
| **Standard** | 0.5 mL | 4℃，避光保存 |

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

## 03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称 | 备注 |
|---|---|---|
| **仪器** | 酶标仪 | 能测 560 nm 处的吸光度 |
| **耗材** | 96 孔酶标板 | 普通透明板 |
| **试剂** | 去离子水、浓盐酸/异丙醇、氢氧化钠/无水乙醇 | 试剂配制/样本处理/检测体系配制用 |
| **其他** | 匀浆器（组织样本）、玻璃管、水浴锅、离心机、烘箱、可调节式移液枪及枪头 | 检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率 |

## 04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

## 05 实验流程

### 05-1 试剂准备

#### 05-1-1 试剂准备

**注意：本试剂盒组分均有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护。**

| 试剂名称 | 试剂准备 | 注意事项 |
|---|---|---|
| **Tissue Extraction Buffer** | 即用型；6 mol/L 盐酸，浓盐酸：去离子水（V/V）=1:1 | 室温保存（自备） |
| **Cell Extraction Buffer** | 即用型；使用前平衡到室温 | 4℃保存 |
| **Reagent Ⅰ** | 即用型；使用前平衡到室温 | 4℃避光保存 |
| **Reagent Ⅱ** | 即用型；使用前平衡到室温 | 4℃避光保存 |
| **0.5 mg/mL L Standard** | 即用型；0.5 mg/mL L-羟基脯氨酸标准品；使用前平衡到室温 | 4℃避光保存 |

#### 05-1-2 标准品配制

使用 0.5 mg/mL L-羟基脯氨酸标准品，按照下表所示，进一步稀释成标准品。按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

| 序号 | Standard 体积（μL） | 去离子水体积（μL） | 浓度（μg/mL） |
|---|---|---|---|
| **1** | 24 μL 0.5 mg/mL Standard | 376 | 30 |
| **2** | 200 μL of 30 μg/mL | 200 | 15 |
| **3** | 200 μL of 15 μg/mL | 200 | 7.5 |
| **4** | 200 μL of 7.5 μg/mL | 200 | 3.75 |
| **5** | 200 μL of 3.75 μg/mL | 200 | 1.875 |
| **6** | 200 μL of 1.875 μg/mL | 200 | 0.938 |
| **7** | 200 μL of 0.938 μg/mL | 200 | 0.469 |
| **8** | 200 μL of 0.469 μg/mL | 200 | 0.234 |
| 空白 | 0 | 400 | 0 |

### 05-2 样本制备

**注意：1. 建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。**

**2. 提取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，不影响实验。**

- **动物组织**：称取约 0.2 g 样品于玻璃管，加入 2 mL Tissue Extraction Buffer，置于 110℃烘箱，水解 6-12 h，冷却后用氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.0 左右，用去离子水定容至 4 mL，12000 g，25℃，离心 20 min，取上清待测。
- **细胞或细菌**：收集 $5\times10^6$ 个细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Cell Extraction Buffer，于高压消毒器中 15 磅保持 30 min，自然降压后用浓盐酸调节 pH 为 7.0 左右，用去离子水定容至 2 mL，12000 g，25℃，离心 20 min，取上清待测。
- **血清中游离 HYP 提取**：取 0.1 mL 血清，加入 0.5 mL 无水乙醇使蛋白质沉淀，8000 g，4℃离心 5 min。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 0.2 mL 50%异丙醇，充分溶解混匀待测。

### 05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 560 nm。
2. **检测体系配制**：空白管和标准管只需做 1-2 次。在 1.5 mL 离心管中按照如下方式操作

| 试剂 | 空白管（μL） | 标准管（μL） | 测定管（μL） |
|---|---|---|---|
| 样本 | 0 | 0 | 60 |
| Standard | 0 | 60 | 0 |
| Reagent Ⅰ | 60 | 60 | 60 |
| | 混匀，室温静置 20 min | | |
| Reagent Ⅱ | 60 | 60 | 60 |
| 去离子水 | 180 | 120 | 120 |

3. **吸光度检测：**充分混匀，60℃反应 20 min，取出后室温静置 15 min，取 200 μL 至 96 孔板中，测定 560 nm 处吸光度，分别记为 $A_{测定}$、$A_{空白}$、$A_{标准}$。

## 06 结果计算

### 06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”工具。

### 06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

**1. 数据处理**

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$、$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

**2. 标准曲线绘制**

以标准溶液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将$\Delta A_{测定}$带入方程得到 y (μg/mL)。

**3. 样本 HYP 含量计算**

- 按样本蛋白浓度计算：

HYP(μg/mg prot)=y×$V_{样}$÷(Cpr×$V_{样}$)×n**=y÷Cpr×n**

- 按样本鲜重计算：

HYP(μg/g)=y×$V_{样}$÷($V_{样}$÷$V_1$×W)×n**=4y÷W×n**

- 按照细菌或细胞数量计算

HYP(μg/$10^4$)=y×$V_{样}$÷($V_{样}$÷$V_2$×N)×n**=2y÷N×n**

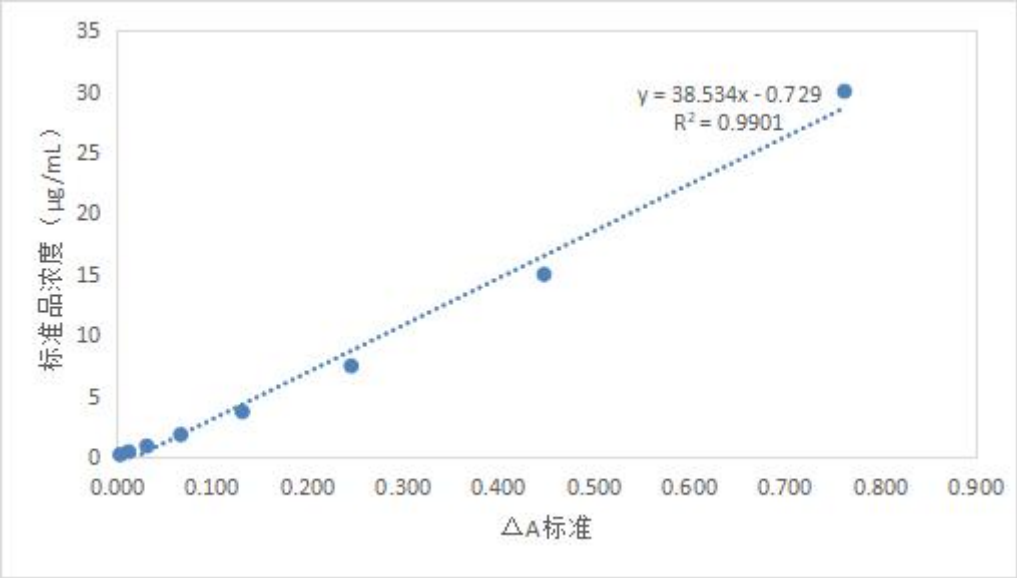
- 按样本体积计算：

HYP(μg/mL)=y×$V_{样}$÷($V_{样}$÷$V_3$×$V_4$)×n**=2y×n**

$V_{样}$：反应中样品体积，0.06 mL；$V_1$：组织提取后总体积，4 mL；$V_2$：细菌或细胞提取后总体积，2 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 $10^4$ 为单位（例如细胞数量为 $5\times10^6$，N=500）；$V_3$：血清样本提取后总体积，0.2 mL；$V_4$：提取时加入的血清样本体积，0.1 mL；n：样本稀释倍数。

## 07 结果展示

典型标准曲线：y=38.534x-0.729，$R^2$=0.9901




示例-1：取 0.225 g 小鼠腿肌，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$=0.165-0.098=0.067，代入标准曲线，计算 y=1.853。按样本鲜重计算得：HYP(μg/g)=4y÷W×n=32.942 μg/g。

## 08 FAQ

- **检测得到的样本 $A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

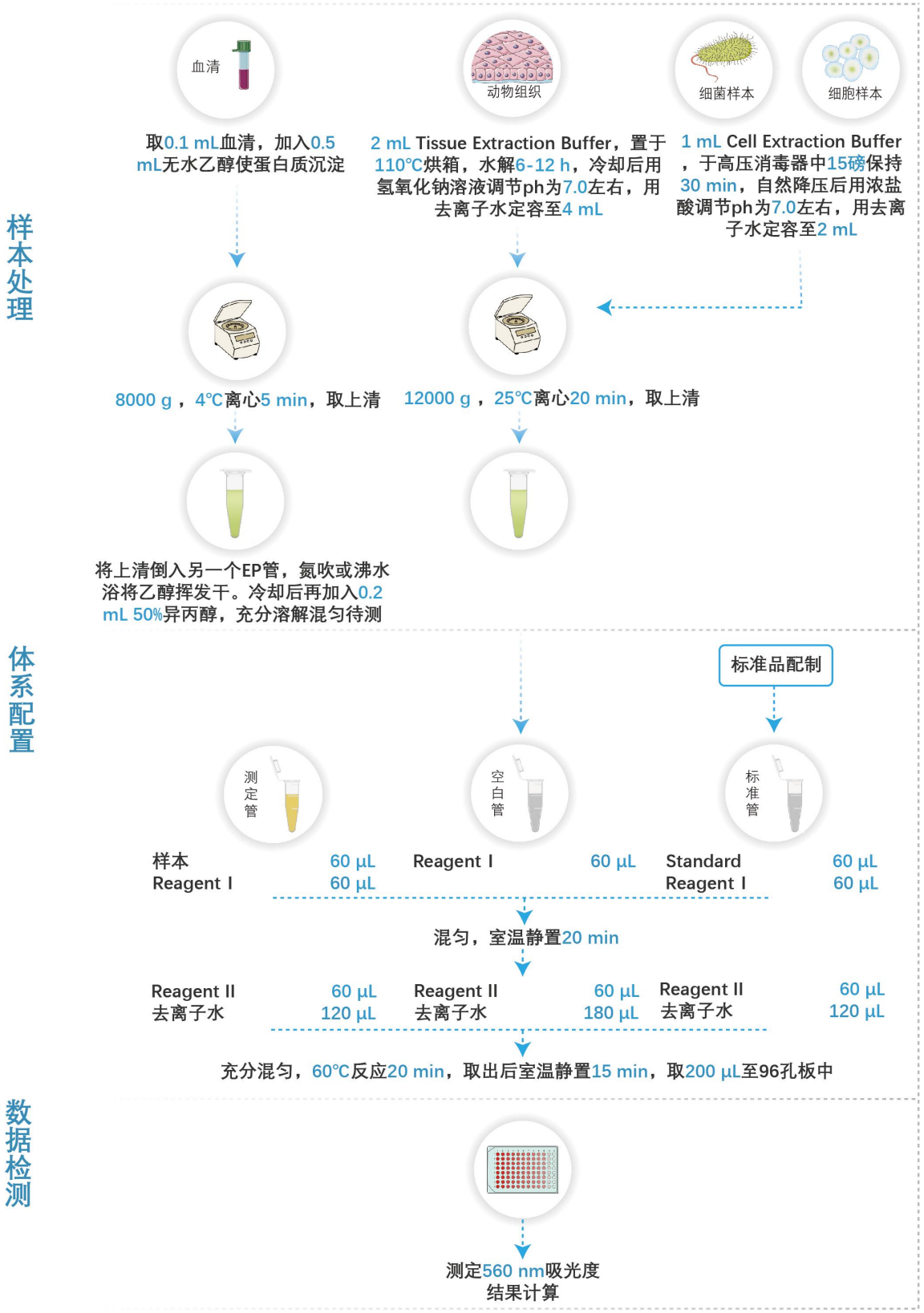
如果$\Delta A_{测定}$小于 0.005 可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测定}$大于 30 μg/mL 的$\Delta A_{标准}$，样本可用相应提取液一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

## 09 相关产品

| 货号 | 试剂盒名称 |
| --- | --- |
| **KTB1410** | CheKine™ 谷丙转氨酶（ALT/GPT）活性检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1420** | CheKine™ 谷草转氨酶（AST/GOT）活性检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1430** | CheKine™ 脯氨酸（PRO）含量检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1440** | CheKine™ 谷氨酸（Glu）含量检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1450** | CheKine™ 半胱氨酸（Cys）含量检测试剂盒（微量法） |
| **KTB1460** | CheKine™ 氨基酸（AA）含量检测试剂盒（微量法） |

# CheKine™ 羟脯氨酸（HYP）含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1490）




V1.0