

羟脯氨酸(HYP)测试盒

经典法：:50管/48样

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℃冰箱保存 3 个月。

试剂二：液体 30ml×1瓶，4℃冰箱避光保存 6 个月。

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℃冰箱避光保存 1 个月。

试剂四：羟脯氨酸标准品 5mg×3支，4℃冰箱保存 6 个月。100μg/ml 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，4℃冰箱保存 2 周。5μg/ml 标准应用液的配制：取 100μg/ml 的标准贮备液 1ml 加双蒸水定容至 20ml，配成 5μg/ml 的标准应用液，现用现配。

三、组织中羟脯氨酸的测定:

（一）、样本前处理试剂:

- 1、指示剂 5ml×1瓶
- 2、PH 调整甲液 100ml×1瓶
- 3、PH 调整乙液 20ml×1瓶
- 4、活性炭×1袋

(二)、样本前处理:

1、组织样本水解: 准确称取组织 80~100mg, 剪碎, 加 6mol/l HCL (自备) 1ml, 放磨口试管中加盖, 95℃ 或者沸水浴水解 5 小时, 也可放 100℃ 烤箱中水解 5 小时。

2、水解液调 PH 值至 6.0~6.8。

①、流水冷却后各管加指示剂 10 μl, 摇匀;

②、各管加入调 PH 甲液 1.5ml, 混匀;

③、各管加入调 PH 乙液 0.2ml, 混匀, 并用 PH 试纸测 PH, (大约在 5~6 之间);

④、各管逐滴小心加入乙液, 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。

此时 PH 值在 6.0~6.8 左右;

⑤、然后加双蒸水至 10ml, 混匀。

⑥、取 3~4ml 稀释的检测液加适量活性炭 (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。

(三)、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水(ml)	1		
5μg/ml 标准应用液(ml)		1	
检测液(ml)			1
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, 取上清在 550nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度。			

四、计算公式：

$$\text{羟脯氨酸含量} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品含量} \times \frac{\text{水解液总体积}(10\text{ml})}{\text{组织湿重}(mg)}$$

($\mu\text{g} / \text{mg}$ 湿重) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)