

羟脯氨酸（HYP）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：D100048

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 0.5 mL×1 支	2-8°C保存

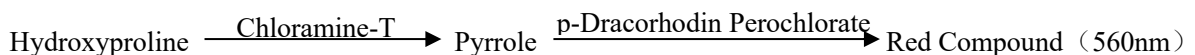
溶液的配制：

1. 提取液：自备 6 mol/L 盐酸溶液，大约需要 200mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称
2. 6 mol/L 盐酸提取液的配制：按浓盐酸（37%）和 H₂O 的体积比是 1：1 进行配制。
3. 标准品：0.5 mg/mL 羟脯氨酸标准品。

产品说明：

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。

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 560nm 处有特征吸收峰。通过测定样本水解液 560nm 吸光值，可计算 HYP 含量。

**技术指标：**

最低检出限：0.057 μg/mL

线性范围：0.234-30 μg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

天平、EP 管、离心机、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、6mol/L 盐酸、氢氧化钠溶液和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：称取约 0.2g 样本于 EP 管，将组织尽量剪碎以便消化，盖子稍松不密闭。加入 2mL 的提取液，煮沸或 110°C 烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块（缠封口膜，防止爆盖），冷却后用 NaOH 溶液（10mol/L 的大约

需要 1mL) 调节 pH 值至 **6-8 范围内** (不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至 4mL。最后 16000rpm, 25°C, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 取上清待测。

2. 细菌/细胞: 取 5×10^6 个细菌/细胞, 加入 1mL 的提取液, 煮沸或 110°C 烘箱 2 至 6 小时消化至透明状 (缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后用 NaOH 溶液 (10mol/L 的大约需要 0.5mL) 调节 pH 值至 **6-8 范围内** (不可过酸或过碱), 蒸馏水定容至 2mL, 16000rpm, 25°C, 离心 20min, 取上清待测。

3. 液体样本: 称取 300 μ L 液体样本于 EP 管, 加入 0.7mL 的提取液 (若测定数值过小可调整二者比例), 煮沸或 110°C 烘箱 2 至 6 小时消化至没有可见大的团块 (缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后用 NaOH 溶液调节 pH 值至 **6-8 范围内** (不可过酸或过碱), 再蒸馏水定容至 2mL。最后 16000rpm, 25°C, 离心 20min (若离心后仍有杂质, 可通过过滤去除), 取上清待测。

注: 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。

二、测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 560nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2、将 0.5 mg/mL 羟脯氨酸标准品用蒸馏水稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234 μ g/mL 标准品。

3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度 (μ g/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ g/mL)
1	500 (即 0.5 mg/mL)	60	940	30
2	30	500	500	15
3	15	500	500	7.5
4	7.5	500	500	3.75
5	3.75	500	500	1.875
6	1.875	500	500	0.938
7	0.938	500	500	0.469
8	0.469	500	500	0.234

备注: 下述实验中每个标准管需 60 μ L 标准品 (注意不要在此步骤直接检测吸光度)。

4、按下表进行操作:

试剂名称	空白管	测定管	标准管
样本 (μ L)	-	60	-
标准品 (μ L)	-	-	60
试剂一 (μ L)	60	60	60
混匀, 常温静置 20min			
试剂二 (μ L)	60	60	60
蒸馏水 (μ L)	180	120	120
混匀, 60°C, 20min 水浴, 取出后常温静置 15 min, 取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板中检测 560nm 下的吸光值, 记为 A 空白管、A 测定管、A 标准管, 计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管, ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。标准曲线和空白管只需做 1-2 次。			

三、羟脯氨酸含量计算公式

1. 标准曲线的绘制:

以标准品的浓度为 x 轴, ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。

2. 羟脯氨酸含量的计算:

(1) 按样本质量计算:

$$\text{组织羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{组提}}) \times F = 4x \div W \times F$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

$$\text{组织羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = x \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = x \div C_{\text{pr}} \times F$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

$$\text{细胞羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样本}} \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{胞提}}) \times F = 2x \div N \times F$$

(4) 按液体体积计算:

$$\text{液体羟脯氨酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = x \times V_{\text{液提}} \div V_{\text{液体}} \times F = 6.67 \times x \times F$$

$V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积, 0.06mL; $V_{\text{组提}}$: 组织提取液体积, 4mL; $V_{\text{胞提}}$: 细胞提取液体积, 2mL; $V_{\text{液提}}$: 液体提取液体积, 2mL; $V_{\text{液体}}$: 前处理中液体加入体积, 0.3mL; W : 样本质量, g; N : 细胞数量, 以 10^6 为单位, 百万个; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

- 1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用蒸馏水稀释样本后再进行测定。
- 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、按样本蛋白浓度计算时, 需单独提取样本中的蛋白质并测定。

实验实例:

- 1、取 0.2g 小鼠皮肤进行样本处理, 取上清后蒸馏水稀释 32 倍后按测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.375-0.123=0.252, 带入标准曲线 $y=0.0344x+0.015$, $R^2=0.9975$, 计算 $x=6.89$, 按样本质量计算含量得:
组织羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g/g 质量}$) = $4x \div W \times 32$ (稀释倍数) = $4 \times 6.89 \div 0.2 \times 32 = 4409.6 \mu\text{g/g 质量}$ 。
- 2、取 8×10^6 个 HMC-1 细胞进行样本处理, 取上清后按测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.183-0.126=0.057, 带入标准曲线 $y=0.0344x+0.015$, $R^2=0.9975$, 计算 $x=1.22$, 按细胞数量计算含量得:
细胞羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$) = $2x \div N = 2 \times 1.22 \div 8 = 0.305 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ 。
- 3、取 300 μL 牛血清进行样本处理, 取上清后按测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.194-0.123=0.071, 带入标准曲线 $y=0.0344x+0.015$, $R^2=0.9975$, 计算 $x=1.63$, 按液体体积计算含量得:
液体羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $6.67 \times x = 6.67 \times 1.63 = 10.87 \mu\text{g/mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Zhao P, Sun T, Lyu C, Liang K, Niu Y, Zhang Y, Cao C, Xiang C, Du Y. Scar-Degrading Endothelial Cells as a Treatment for Advanced Liver Fibrosis. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Feb;10(4):e2203315. doi: 10.1002/advs.202203315. Epub 2022 Dec 9. PMID: 36494102; PMCID: PMC9896053.

- [2] Chen G, An N, Shen J, Chen H, Chen Y, Sun J, Hu Z, Qiu J, Jin C, He S, Mei L, Sui Y, Li W, Chen P, Guan X, Chu M, Wang Y, Jin L, Kim K, Li X, Cong W, Wang X. Fibroblast growth factor 18 alleviates stress-induced pathological cardiac hypertrophy in male mice. *Nat Commun.* 2023 Mar 4;14(1):1235. doi: 10.1038/s41467-023-36895-1. PMID: 36871047; PMCID: PMC9985628.
- [3] Wu K, Liu Y, Xia J, Liu J, Wang K, Liang H, Xu F, Liu D, Nie D, Tang X, Huang A, Chen C, Tang N. Loss of SLC27A5 Activates Hepatic Stellate Cells and Promotes Liver Fibrosis via Unconjugated Cholic Acid. *Adv Sci (Weinh).* 2024 Jan;11(2):e2304408. doi: 10.1002/advs.202304408. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37957540; PMCID: PMC10787101.
- [4] Xia S, Liu Z, Cai J, Ren H, Li Q, Zhang H, Yue J, Zhou Q, Zhou T, Wang L, Liu X, Zhou X. Liver fibrosis therapy based on biomimetic nanoparticles which deplete activated hepatic stellate cells. *J Control Release.* 2023 Mar;355:54-67. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.01.052. Epub 2023 Feb 2. PMID: 36693527.

参考文献:

- [1] Naeini A, Miri R, Shafiei N. et al. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats[J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2012, 21: 253-257.
- [2] Ignat'eva N, Danilov N, Averkiev S. et al. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 62: 51-57.