（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K061-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(555-565 nm)

Elabscience®羟脯氨酸（HYP）比色法测试盒（碱水解法）

Hdroxyproline (HYP) Colorimetric Assay Kit (Alkali Hydrolysis Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）和动物组织样本中羟脯氨酸(HYP)含量。

检测原理

羟脯氨酸(Hydroxyproline，HYP)是脯氨酸的衍生物，主要存在于胶原蛋白中。胶原蛋白是动物体内最丰富的蛋白质，构成了皮肤、骨骼、软骨、肌腱和韧带等结缔组织。HYP 通过其结构中的羟基，增强了胶原纤维的交联，从而提升了胶原蛋白的稳定性和抗张强度。由于 HYP 几乎只存在于胶原蛋白中，其含量可以反映胶原蛋白的合成与分解代谢情况，因此，检测 HYP 水平可以作为监测胶原蛋白代谢的指标。

本试剂盒检测原理：样本经碱试剂水解处理后生成游离 HYP，其在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与显色剂作用反应呈紫红色，该物质在 565 nm 处有吸收峰，在一定范围内，其吸光度与浓度呈线性关系。通过测定 565 nm 处吸光度，可计算出样本中 HYP 含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱试剂 (Alkali Reagent)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	氧化剂 (Oxidant Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Reagent)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	澄清剂 (Clarificant)	6 g×1 瓶	6 g×2 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	酸试剂 (Acid Reagent)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8ºC 避光保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	100 μg/mL 标准品溶液 (100 μg/mL Standard Solution)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	2-8ºC 避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(555-565 nm，最佳检测波长 565 nm)、水浴锅

耗材：精密 pH 试纸，玻璃试管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂三按体积比=1：1配制，现配现用，避光待用，当天使用有效。

③ 5 μg/mL标准品配制：

将试剂八：双蒸水按体积比=1：19配制，现配现用，避光待用，当天使用有效。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μg/mL)	**0**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
5 μg/mL 标准品(mL)	0	0.6	0.9	1.2	1.8	2.1	2.4	3.0
双蒸水(mL)	3.0	2.4	2.1	1.8	1.2	0.9	0.6	0

样本准备

① 样本处理

a. 样本水解：

组织样本水解：准确称取0.1 g的组织样本，剪碎后放入玻璃试管中，加入1 mL试剂二，保鲜膜覆盖管口并开小孔透气，95°C水解20 min；

血清(浆)样本水解：量取1 mL样本于试管中，加入1 mL试剂二，保鲜膜覆盖管口并开小孔透气，95°C水解20 min。

b. 调节样本水解液pH值：

将样本水解液用流水冷却，加入1 mL 试剂七，充分混匀，再逐滴加入试剂二或试剂七，并使用精密pH试纸测定溶液pH值调节至6.5左右，加入双蒸水至10 mL，混合均匀。

c. 样本水解液脱色：

取1.5 mL样本水解液于离心管中，加入约15 mg 试剂六混匀，15000×g离心10 min，取上清液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.036-5 μg/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
鱼鳞组织	4-10	鱼尾组织	4-10
鱼鳍组织	4-10	小鼠肺组织	不稀释
小鼠肌肉组织	2-5	大鼠血清	不稀释
小鼠腿骨组织	4-10	大鼠血浆	不稀释
人血清	不稀释		

注：稀释液为双蒸水。

操作步骤

① 标准管：取 1 mL 不同浓度标准品，分别加入到 5 mL 的 EP 管中；
测定管：取 1 mL 待测样本，加入到 5 mL 的 EP 管中。

② 向步骤①各管中加入 0.5 mL 测定工作液，混匀，室温放置 20 min。

③ 向步骤②各管中加入 0.5 mL 试剂五，混匀，室温放置 5 min。

④ 向步骤③各管中加入 0.5 mL 试剂四，混匀，65°C 水浴 15 min。

⑤ 流水冷却，各管取 0.2 mL 反应液加入到对应酶标板孔中。酶标仪于 565 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

	标准管	测定管
不同浓度的标准品(mL)	1	--
待测样本(mL)	--	1
测定工作液(mL)	0.5	0.5
混匀，室温放置 20 min		
试剂五(mL)	0.5	0.5
混匀，室温放置 5 min		
试剂四(mL)	0.5	0.5
混匀，65°C 水浴 15 min，流水冷却，各管取 0.2 mL 反应液加入到对应酶标板孔中。酶标仪于 565 nm 测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

① 组织样本中羟脯氨酸(HYP)含量计算公式：

$$\text{HYP 含量 (μg/mg wet weight)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div m \times f$$

② 血清（浆）样本中羟脯氨酸(HYP)含量计算公式：

$$\text{HYP 含量 (μg/mL)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div V_1 \times f$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA：样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-空白 OD 值)

V：样本水解液的调节 pH 后定容体积，10 mL

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

m：样本水解前称取的样本量，mg

V_1：样本水解前量取的血清（浆）样本体积，mL

附录1 关键数据

1.技术参数

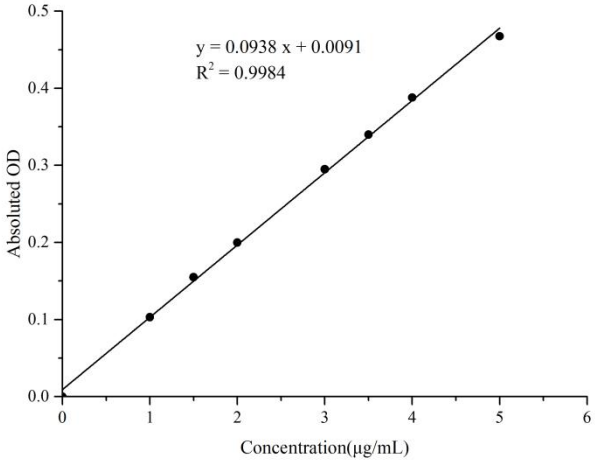
检测范围	0.036-5 μg/mL	**批间差**	2.4-3.4%
灵敏度	0.036 μg/mL	**批内差**	1.4-2.1%
加标回收率	95-98%		

2.标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量1 mL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (μg/mL)	**0**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
OD 值	0.081	0.185	0.236	0.282	0.374	0.424	0.472	0.555
	0.081	0.183	0.236	0.280	0.378	0.418	0.466	0.542
平均 OD 值	0.081	0.184	0.236	0.281	0.376	0.421	0.469	0.549
绝对 OD 值	0	0.103	0.155	0.200	0.295	0.340	0.388	0.468

② 绘制标曲(如下图)：



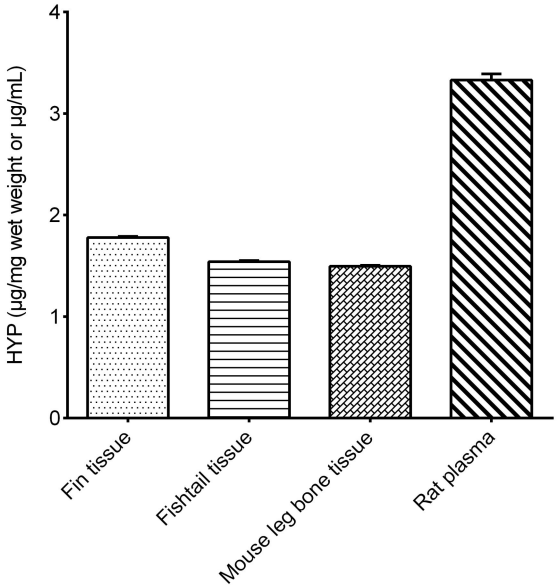
附录2 实例分析

例如检测鱼鳍中的羟脯氨酸含量(数据仅供参考)：

取1 mL处理后稀释4倍的鱼鳍样本，按操作表进行检测，其结果如下： 标准曲线：y = 0.0938 x + 0.0091，空白孔OD值为0.081，测定孔OD值为0.507，ΔA = 0.507 - 0.081 = 0.426，羟脯氨酸含量计算结果为：

$$\text{HYP含量 (μg/mg wet weight)} = \frac{0.426 - 0.0091}{0.0938} \times 10 \times 4 \div 100 = 1.78\ \text{μg/mg wet weight}$$

按照说明书，测定鱼鳍组织 (取样量100 mg，定容体积10 mL，稀释4倍)、鱼尾组织(取样量100 mg，定容体积10 mL，稀释4倍)、小鼠腿骨组织(取样量100 mg，定容体积10 mL，稀释4倍)和大鼠血浆(取样量1 mL，定容体积10 mL，不稀释)羟脯氨酸含量(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。