

(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-K062-S

产品规格: 50Assay(36 samples)/100Assay(86 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计(550-570 nm)

Elabscience®羟脯氨酸 (HYP) 比色法测试盒

Hydroxyproline (HYP) Colorimetric Assay Kit

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、动物组织与尿液样本中羟脯氨酸 (HYP) 含量。

检测原理

样本经水解处理后生成游离羟脯氨酸，其在底物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 558 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 558 nm 处吸光度，可计算出样本中羟脯氨酸含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1(Size 1) (50 assays)	规格 2(Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	氧化剂 (Oxidant Agent)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C 避光 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	8 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	2-8°C 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	氧化剂溶剂 (Oxidant Agent Solvent)	8 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	2-8°C 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂溶剂 (Chromogenic Agent Solvent)	28 mL×1 瓶	52 mL×1 瓶	2-8°C 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	5 mg×1 支	5 mg×2 支	2-8°C 避光 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	调节 pH 值 A 液 (pH Adjusting Solution A)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8°C 保存 3 个月
试剂八 (Reagent 8)	调节 pH 值 B 液 (pH Adjusting Solution B)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8°C 保存 3 个月

试剂九 (Reagent 9)	澄清剂 (Clarificant)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存3个月
--------------------	----------------------	--------	--------	---------------

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：紫外-可见光分光光度计(550-570 nm，最佳检测波长 558 nm)，水浴锅

耗材：玻璃试管，pH 试纸

试剂：6 mol/L 盐酸，浓盐酸(12 mol/L)，正丙醇

试剂准备

① 检测前，将所有试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制：

50 Assay试剂盒：取6 mL试剂三加入试剂一中，震荡至试剂一完全溶解，再向溶液中加入6 mL试剂二，混合均匀，未使用完的试剂可在2-8℃避光保存5天。

100 Assay试剂盒：将12 mL试剂三加入试剂一中，震荡至试剂一完全溶解，再向溶液中加入12 mL试剂二，混合均匀，未使用完的试剂可在2-8℃避光保存5天。

③ 试剂四工作液配制：

50 Assay试剂盒：取25 mL试剂五加入试剂四中，震荡至试剂四完全溶解，未使用完的试剂可在2-8℃避光保存5天。

100 Assay试剂盒：取50 mL试剂五加入试剂四中，震荡至试剂四完全溶解，未使用完的试剂可在2-8℃避光保存5天。

④ 1 mg/mL羟脯氨酸标准溶液配制：

取1支试剂六，用5 mL双蒸水溶解混匀，得到1 mg/mL羟脯氨酸标准溶液，

配制好的工作液在2-8℃可保存15天。

⑤ 100 µg/mL羟脯氨酸标准溶液配制:

按1 mg/mL标准溶液: 双蒸水=1: 9体积比配制, 按需配制, 现配现用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准品浓度(µg/mL)	0	2	3	4	6	8	10
100 µg/mL 标准溶液(µL)	0	20	30	40	60	80	100
试剂一工作液(µL)	1000	980	970	960	940	920	900

样本准备

① 组织、尿液样本处理

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6 mol/L的盐酸溶液1 mL, 加盖密闭, 95℃水解6 h。

尿液样本水解: 量取0.5 mL尿液样本于试管中, 加入0.5 mL浓盐酸, 加盖密闭, 95℃水解6小时。

调节样本水解液pH值:

将样本水解液用流水冷却, 加入1 mL调节pH值A液和0.5 mL调节pH值B液, 充分混匀, 再逐滴加入B液, 并使用精密pH试纸测定溶液pH值至6.5-7.0, 加入双蒸水至10 mL, 混合均匀。

样本水解液脱色:

取1 mL样本水解液于离心管中, 加入约10 mg试剂九混匀, 1500 ×g离心10 min, 取上清液待测。

② 血清样本处理

血清样本: 取200 µL血清样本, 与800 µL正丙醇混合均匀, 4℃条件下8000 ×g离心10 min, 取上清液用双蒸水补足至1 mL待测。

③ 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：0.032-10 $\mu\text{g/mL}$ ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
大鼠肝	不稀释	大鼠肾	不稀释
大鼠肺	不稀释	大鼠脑	不稀释
肌腱	20-30	鱼鳞	20-30
猪软骨	15-25	尿液	不稀释
鸡软骨	15-25	胎牛血清	不稀释
大鼠血浆	不稀释		

注：稀释液为双蒸水；当组织样本量很少时，可按比例降低加入的盐酸溶液、pH值调节液和最终定容体积，测定时需要至少 400 μL 样本水解液。

操作步骤

- ① 标准管：取 400 μL 不同浓度标准品，分别加入到 2 mL 的 EP 管中。
测定管：取 400 μL 待测样本，加入到 2 mL 的 EP 管中。
- ② 向步骤①各管中加入 200 μL 试剂一工作液。
- ③ 混匀，室温放置 15 min。
- ④ 向步骤③的各管中加入 400 μL 试剂四工作液。
- ⑤ 混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。
- ⑥ 流水冷却，各管分别加入到 0.5 cm 光径石英比色皿中，双蒸水调零。
- ⑦ 使用紫外-可见分光光度计测定各管 558 nm 波长的 OD 值。

操作表

	标准管	测定管
不同浓度的标准品(μL)	400	--
待测样本(μL)	--	400
试剂一工作液(μL)	200	200
混匀，室温放置 15 min		
试剂四工作液(μL)	400	400
混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min，流水冷却，各管分别加入到 0.5 cm 光径石英比色皿中，双蒸水调零。使用紫外可见分光光度计测定各管 558 nm 波长的 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织样本中羟脯氨酸含量计算公式：

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

尿液样本中羟脯氨酸含量计算公式：

$$\text{HYP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{g}/\text{mL}) \end{matrix} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div V_1 \times f$$

血清（浆）中游离羟脯氨酸含量计算公式：

$$\text{HYP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{g}/\text{mL}) \end{matrix} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V_3 \div V_2 \times f$$

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)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 称取的样本量 (mg)

V: 样本水解液的调节 pH 后定容体积 (10 mL)

V_1 : 量取的尿液样本体积 (mL)

V_2 : 取用的血清样本体积 (mL)

V_3 : 血清样本上清液的最终定容体积 (mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

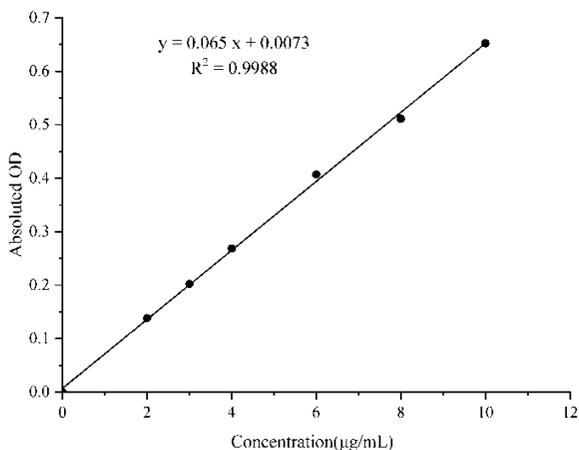
检测范围	0.032-10 $\mu\text{g/mL}$	平均批间差	5.7 %
灵敏度	0.032 $\mu\text{g/mL}$	平均批内差	4.9 %
平均回收率	104.9 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量400 μL , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	3	4	6	8	10
OD 值	0.005	0.140	0.210	0.278	0.413	0.536	0.669
	0.004	0.146	0.204	0.268	0.410	0.496	0.645
平均 OD 值	0.005	0.143	0.207	0.273	0.412	0.516	0.657
绝对 OD 值	0.000	0.139	0.203	0.269	0.407	0.512	0.653

②绘制标曲(如下图):



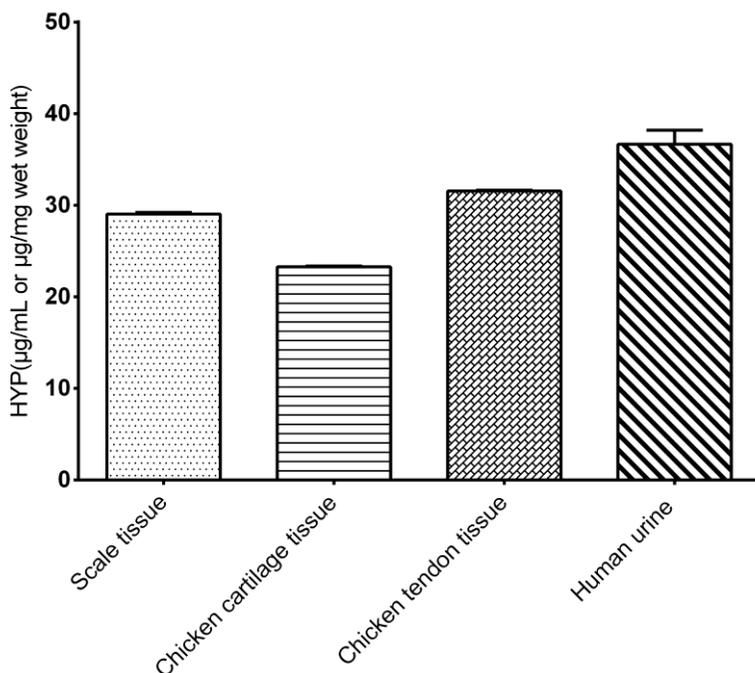
附录2 实例分析

例如检测检测鱼鳞中的羟脯氨酸含量(数据仅供参考):

称取99.6 mg鱼鳞样本,水解并调节pH值后,取定容并脱色的水解液稀释30倍后,按操作表进行检测,其结果如下:标准曲线: $y = 0.0645x + 0.0073$,空白管平均OD值为0.005,测定管平均OD值为0.629,羟脯氨酸含量计算结果为:

$$\text{HYP含量} (\mu\text{g/mg wet weight}) = \frac{0.629 - 0.005 - 0.0073}{0.0645} \times 10 \times 30 \div 99.6 = 29.02 \mu\text{g/mg wet weight}$$

按照说明书,测定鱼鳞(取样量99.6 mg,定容体积10 mL,稀释30倍)、鸡软骨(取样量99.4 mg,定容体积10 mL,稀释25倍)、鸡肌腱(取样量99.5 mg,定容体积10 mL,稀释30倍)和人尿液(取样量0.5 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。

