

(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-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(550-570 nm)

Elabscience®羟脯氨酸(HYP)比色法试剂盒(酸水解法)

Hydroxyproline (HYP) Colorimetric Assay Kit

(Acid 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、动物组织与尿液样本中羟脯氨酸含量。

检测原理

样本经水解处理后生成游离羟脯氨酸，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，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)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	羟脯氨酸标准品 (HYP Standard)	5 mg×1 支	5 mg×2 支	2-8℃ 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℃ 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℃ 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
	96 孔酶标板		1 板	
	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(550-570 nm, 最佳检测波长为 558 nm), 恒温水浴锅, 常温离心机。

耗材: 玻璃试管, PH 试纸。

试剂: 2 mol/L 盐酸、6 mol/L 盐酸、浓盐酸(12 mol/L)、正丙醇。

试剂准备

① 检测前, 将试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制:

48T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;

96T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:

48T试剂盒: 取25 mL试剂五加入试剂四中, 震荡至试剂四全部溶解均匀, 未使用完的试剂可在2-8℃避光保存5天。

96T试剂盒: 取50 mL试剂五加入试剂四中, 震荡至试剂四全部溶解均匀, 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, 配制好后可在2-8℃环境下保存15天。

⑤ 100 $\mu\text{g/mL}$ 羟脯氨酸标准溶液配制:

按1 mg/mL羟脯氨酸标准溶液: 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	⑧
标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)	0	1	2	3	4	6	8	10
100 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液(μL)	0	10	20	30	40	60	80	100
双蒸水(μL)	1000	990	980	970	960	940	920	900

样本准备

① 样本处理

a. 组织、尿液样本处理:

组织样本水解: 准确称取 100 mg 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 0.5 mL A 液和 0.25 mL 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, 如果 PH 超过 7.0, 可用 2 mol/L 盐酸调至 6.5-7.0, 加入双蒸水至 10 mL, 混合均匀。

样本水解液脱色:

取 2 mL 样本水解液于离心管中, 加入约 20 mg 试剂九混匀, 1500 \times g 离心 10 分钟, 取上清液待测。

b. 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 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8000 \times g 离心 10 min, 取上清液用双蒸水补足至 1 mL 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：0.04-10 $\mu\text{g/mL}$ ，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

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。

实验关键点

- ① 严格控制反应时间和温度；
- ② 样本水解后将 pH 值调节至 6.5-7.0。
- ③ 组织样本剪碎，样本偏多时建议提前一天制备样本，调完 pH 值定容后可放 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

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，各管分别取 200 μL 加入到酶标板各对应孔中。
- ⑦ 使用酶标仪测定各孔 558 nm 波长 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，各管分别取 200 μL 加入到酶标板各对应孔中，使用酶标仪测定各孔 558 nm 波长 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本:

$$\text{羟脯氨酸含量} \quad (\mu\text{g}/\text{mg wet weight}) = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div m \times f$$

尿液样本:

$$\text{羟脯氨酸含量} \quad (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div V_1 \times f$$

血清游离羟脯氨酸含量:

$$\text{羟脯氨酸含量} \quad (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{\Delta A - b}{a} \times V_3 \div V_2 \times f$$

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)

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: 称取的样本量(mg)

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

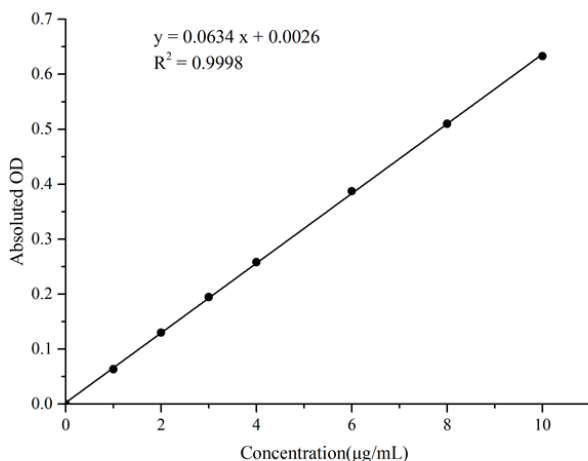
检测范围	0.04-10 µg/mL	平均批间差	4.4 %
灵敏度	0.04 µg/mL	平均批内差	1.2 %
平均回收率	101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准品浓度测定数据(数据仅供参考):

标准品浓度(µg/mL)	0	1	2	3	4	6	8	10
OD 值	0.068	0.132	0.198	0.264	0.328	0.456	0.575	0.697
	0.067	0.131	0.198	0.261	0.324	0.454	0.580	0.703
平均 OD 值	0.068	0.131	0.198	0.262	0.326	0.455	0.577	0.700
绝对 OD 值	0.000	0.064	0.130	0.195	0.258	0.387	0.510	0.633

② 按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

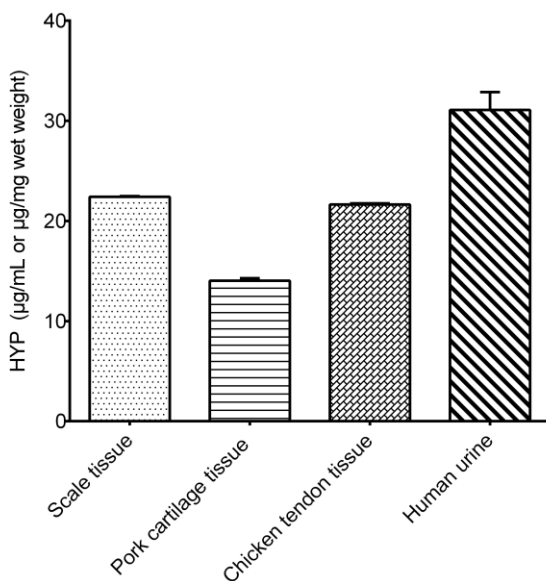
例如检测鱼鳞中的羟脯氨酸含量(数据仅供参考):

称取98.3 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25倍后,按操作表进行检测,其结果如下。

标准曲线: $y = 0.0615x + 0.0035$, 空白孔平均OD值为0.069, 测定孔平均OD值为0.615, 羟脯氨酸含量计算结果为:

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g}/\text{mg wet weight}) = \frac{0.615 - 0.069 - 0.0035}{0.0615} \times 10 \times 25 \div 98.3 = 22.43 \mu\text{g}/\text{mg wet weight}$$

按照说明书,测定鱼鳞(取样量98.3 mg,定容体积10 mL,稀释25倍)、猪软骨(取样量95.8 mg,定容体积10 mL,稀释20倍)、鸡肌腱(取样量92.5 mg,定容体积10 mL,稀释25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):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品或样本不显色	标准品过期失效	更换新的标准品重新实验
	样本中羟脯氨酸含量过低	减少水解液定容体积
	显色反应未在合适温度下进行	在 60℃ 条件下水浴保温
标准曲线斜率很低(小于 0.04)	显色剂放置时间过长或被污染	重新配置新的显色剂工作液

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。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. *Life sciences*, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
11. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al.

- Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
12. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 13. Li J, Ma X J, Wu X, et al. Adiponectin modulates steroid hormone secretion, granulosa cell proliferation and apoptosis via binding its receptors during hens' high laying period[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101197. IF:3.352
 14. Fu H, Liu L, Tong Y, et al. The antidepressant effects of hesperidin on chronic unpredictable mild stress-induced mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019. IF:3.04
 15. Guo Y, Liu C, Zhang J, et al. A relationship between MAPK/ERK pathway expression and neuronal apoptosis in rats with white matter lesions[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2020, 24(8): 4412-4419. IF:3.024
 16. Li L C , Dong S H , Li S H , et al. Downregulation of circular RNA circDOCK7 identified from diabetic rats after sleeve gastrectomy contributes to hepatocyte apoptosis through regulating miR-139-3p and MCM3[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 548:134-142. IF:2.985
 17. Kumar S, Ivanov S, Lagunin A, et al. Attenuation of Hyperhomocysteinemia Induced Vascular Dementia by Sodium Orthovanadate Perhaps via PTP1B: Pertinent Downstream Outcomes[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019. IF:2.77
 18. Yin X, Zhao J, Jiang H, et al. Impact of Xenon on CLIC4 and Bcl-2 Expression in Lipopolysaccharide and Hypoxia-Ischemia-Induced Periventricular White Matter Damage[J]. *Neonatology*, 2018. IF:2.554
 19. Pan H Z, Zhang L J, Liu Y W, et al. Cold-inducible RNA binding protein agonist enhances the cardioprotective effect of UW solution during extended heart preservation[J]. *Artificial Organs*, 2020. IF:2.259
 20. Uysal N, Yuksel O, Kizildag S, et al. Regular Aerobic Exercise Correlates with Reduced Anxiety and Increased Levels of Irisin in Brain and White Adipose Tissue[J]. *Neuroscience Letters*, 2018. IF:2.173