

羟脯氨酸（HYP）测试盒/测动物血清、组织、尿液

碱水解法: 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 个月有效。

试剂二：液体 30ml×1 瓶，4℃冰箱避光保存 3 个月有效。

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 个月有效。

试剂四：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，4℃冰箱保存 2 周。5μg/ml 标准应用液的配制：取 100μg/ml 标准贮备液 1ml 加双蒸水定容至 20ml，现用现配。

三、羟脯氨酸的测定:

（一）、样本前处理试剂（4℃保存）：（50T）

- 1、水解液 60 ml×1 瓶
- 2、指示剂 5ml×1 瓶
- 3、调整 PH 甲液 60ml×1 瓶
- 4、PH 调整乙液 30ml×1 瓶
- 5、活性炭×1 袋

（二）、样本前处理:

1、样本水解：

- ①、血清（浆）：取 0.5ml 血清（浆）准确加水解液 1ml，混匀。放试管中加盖后，95℃或者沸水浴水解 20 分钟。
- ②、尿液（培养液）：取 1.0ml 尿液（培养液）准确加水解液 1ml，混匀。放试管中加盖后，95℃或者沸水浴水解 20 分钟。
- ③、组织：精确称取组织湿重 30~100mg 放入试管中，准确加水解液 1ml，混匀。加盖后 95℃或者沸水浴水解 20 分钟（水解 10 分钟时混匀一次，目的是使水解更充分）。

2、调 PH 值至 6.0~6.8 左右

- ①、将各试管流水冷却后各管加指示剂 10 μl，摇匀；
- ②、各管准确加入调 PH 甲液 1.0ml，混匀（此时溶液应为红色）；
- ③、用 200 μl 的加样器吸取调 PH 的乙液向各管内逐滴小心加入调 PH 的乙液，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**（亦即红色消失时）。此时 PH 值在 6.0~6.8 左右（约加入调 PH 乙液 100 μl~500 μl 左右）；*加调 PH 乙液时，每加一滴均要混匀，为防止液体外溢，如果没有带盖的玻璃磨口试管，可用普通玻璃试管代替，每次混匀时可用塑料薄膜或冰箱保鲜膜压住试管口，充分旋涡混匀即可。

**若您的样本是细胞培养液，因其中含有酚红，所以液体中的混合指示剂在 PH 为 6.0~6.8 左右时为橙黄红色，而不是黄绿色。

- ④、然后加双蒸水至 10ml，混匀；
- ⑤、取 3~4ml 稀释的水解液加适量活性炭（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)	1.0		
5μg/ml 标准应用液(ml)		1.0	
检测液(ml)			1.0
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，取上清于波长 550nm，1cm 光径，双蒸水调零，测定各管吸光度值。			

四、计算公式：

(一)、血清（浆）计算公式：

1、计算公式：

$$\begin{aligned}
 & \text{羟脯氨酸含量} \\
 & (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \frac{\text{标准品含量}}{\text{g/ml}} \times \frac{\text{水解液总体积(ml)}}{\text{取样量(ml)}} \times (5\mu)
 \end{aligned}$$

(二)、尿液的计算公式：

1、计算公式：

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \frac{\text{标准品含量} (5\mu\text{g/ml})}{\text{取样量} (ml)} \times \text{水解液总体积} (ml)$$

(二)、组织的计算公式：

1、计算公式：

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g/mg 湿重}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \frac{\text{标准品含量} (5\mu\text{g/ml})}{\text{组织湿重} (mg)} \times \text{水解液总体积} (10ml)$$