

蛋白质羰基含量测定试剂盒

微量法 100T/48S

注意：正式实验之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

蛋白质羰基是多种氨基酸在蛋白质的氧化修饰过程中的早期标志，其含量高低表明蛋白质氧化损伤程度的大小，是衡量蛋白质氧化损伤的主要指标。

测定原理：

羰基与 2,4-二硝基苯肼反应生成红色 2,4-二硝基苯腙，在 370nm 处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、恒温水浴锅、低温离心机、漩涡震荡仪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水、无水乙醇、乙酸乙酯。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂 0.1g×6 支，4℃ 避光保存。（使用前根据样品数，每支加 1mL 水溶解，每支为 10 个样品用量）

试剂二：液体 8mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 8mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 18mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：根据测定样品量，将乙酸乙酯和无水乙醇等体积混合。

试剂六：液体 35mL×1 瓶，4℃ 保存。

样品处理：

1. 组织样品：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，于 4℃，4000g 离心 10min，取上清，加入 0.1mL 试剂一，室温放置 10min，4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体样本：直接测定。

测定步骤和操作表：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 370nm。

2、操作表

	对照管	测定管
样品 (μL)	60	60
试剂二 (μL)		120
试剂三 (μL)	120	
混匀，37℃ 避光反应 1h		
试剂四 (μL)	150	150
静置 5min，4℃，12000g 离心 15min，弃上清，留沉淀		
试剂五 (μL)	300	300
漩涡混匀，4℃，12000g 离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂五 (μL)	300	300
漩涡混匀，4℃，12000g 离心 10min，弃上清，留沉淀		

试剂五 (μL)	300	300
漩涡混匀, 4°C, 12000g 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
试剂六 (μL)	300	300
漩涡混匀, 37°C 温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 12000g 离心 15min, 取上清 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中, 测定 A ₃₇₀ 。ΔA=A 测定管-A 对照管		

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} = 0.227 \times \Delta A_{370}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羰基毫摩尔消光系数, 22 L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.06 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, W: 样本质量, g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羰基含量} (\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A_{370} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} = 0.454 \times \Delta A_{370}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羰基毫摩尔消光系数, 22 L/mmol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.06 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, W: 样本质量, g

注意事项:

1. 试剂一使用前根据要测定的样品数现配, 配置好后 4°C 保存, 若变为黑色, 则不能使用。
2. 试剂二见光易分解, 反应需严格避光。