

蛋白质羰基(PCO)含量 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10065W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：1-10mg/mL

灵敏度：1mg/mL

有效期：6个月

保存温度：2-8℃

检测原理:

蛋白质不仅是生物体的重要组成成分，而且在生命活动中担负重要的功能，对蛋白质氨基酸侧链的氧化可导致羰基产物的积累。被氧化后的蛋白质羰基含量增多，羰基可与 2,4-二硝基苯肼反应生成一种红棕色沉淀，将沉淀溶解后在 370 nm 处读取吸光度值，从而计算出蛋白质的羰基含量。本试剂盒检测样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，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。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/24S）	规格（96T/48S）	保存条件
试剂一	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×3 瓶	粉剂×6 瓶	2-8℃，避光
试剂三	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃，避光
试剂四	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃
试剂五	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	2-8℃
试剂六	70mL×1 瓶	140mL×1 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱、石英酶标板、无水乙醇、乙酸乙酯。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 1-10mg/mL, 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, 样本的稀释液为蒸馏水或者试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为 1:9 的比例 (建议取 0.1g 组织, 加入 0.9mL 试剂一) 进行冰浴匀浆, 离心机 4℃, 2500 g, 10min, 取上清即 10%匀浆 450 μ L, 加入 50 μ L 试剂二工作液, 混匀, 室温放置 10min 后, 11000 g 离心 10min 取上清液待测。
4. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定 (若有浑浊则离心后取上清测定)。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂二工作液**：取一瓶试剂二加入 1mL 蒸馏水，混匀现用现配。
3. **酸乙酯混合应用液的配制**：无水乙醇：乙酸乙酯 1:1 比例混合，现用现配。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 370nm。
2. 样本测定 (在 EP 管中依次加入):

试剂名称(mL)	测定管	对照管
样本	0.1	0.1
试剂三	0.4	
试剂四		0.4
涡旋混匀 1min, 37° C 准确避光反应 30min		
试剂五	0.5	0.5
涡旋混匀 1min, 4° C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4° C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4° C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4° C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		

无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4° C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
试剂六	1.25	1.25
混匀, 37° C 反应 15min		
涡旋混匀使沉淀溶解, 4° C, 13780 g, 离心 15min, 用微量移液器取上清液 0.3mL 到石英酶标板, 酶标仪上测定 370nm 处的 OD 值; 同时取测定管上清液, 用 BCA 法测其蛋白浓度。		

注:

1. 每个测定孔设置一个对照孔。
2. 待测样本的蛋白含量在 1-10 mg/mL 之间。
3. 检测后不要丢弃上清液, 还需测蛋白浓度。
4. 反应后, 需将残留的试剂三要除干净。
5. 取测定管上清液测蛋白含量不能用考马斯亮蓝法, 建议使用 BCA 法。
6. 吸取上清液到酶标板时, 避免产生气泡。
7. 动物组织样本需用 PBS(0.01 M, pH 7.4)将表面的血液洗去。

实验结果结算：

$$\begin{aligned} \text{蛋白质碳基含量} &= \frac{A_1 - A_2}{\varepsilon \times d} \div \left(\text{Cpr} \times \frac{V_1}{V_2} \right) \times 10^6 \times N \\ (\text{nmol/mgprot}) & \\ &= (A_1 - A_2) \times 4.55 \div \text{Cpr} \times N \end{aligned}$$

注：

ε ：羰基摩尔消光系数，22000
L/mol/cm

A_1 ：测定管 OD 值

V_1 ：反应体系总体积，1.25 mL

A_2 ：对照管 OD 值

V_2 ：加入反应体系中待测样本体积，
0.1 mL

N ：样本稀释倍数

Cpr ：测定管上清液的蛋白浓度，
mgprot/mL

10^6 ：1 mol/L=10⁶nmol/mL

d ：比色光径=体积÷底面积，标准 96 孔平底板底面积 0.32cm² 中加入 0.3mL 液体时光径为 0.9375。