

蛋白质羰基含量测定试剂盒

(货号: BP10065W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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。因此蛋白质的羰基化被广泛地用于评价各种生物有机体的氧化程度, 该指标的检测极具实际意义。

被氧化后的蛋白质羰基可与 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 反应生成红棕色沉淀的 2,4-二硝基苯腙, 接着用盐酸胍溶解沉淀后于 370nm 下的检测, 即可得到蛋白质的羰基含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 的浓盐酸完全溶解后 (可超声溶解), 再缓缓加 15mL 蒸馏水, 溶解混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	自备	4℃保存	1. 无水乙醇: 乙酸乙酯=1:1 比例配制 (如 40mL 的无水乙醇和 40mL 乙酸乙酯混匀备用); 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000rpm 室温离心 10min, 上清备用; 上清液与试剂一按照 9:1 比例混合 (如 0.45mL 上清液加 0.05mL 试剂一), 室温放置 10min 后, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清待测。

【注】: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 8000rpm 室温离心 10min,

上清备用；上清液与试剂一按照 9:1 比例混合（如 0.45mL 上清液加 0.05mL 试剂一），室温放置 10min 后，12000rpm 室温离心 10min，取上清待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 370nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	80	
蒸馏水		80
试剂二	160	160
混匀，37℃避光反应 30min		
试剂三	200	200
混匀，4℃，12000rpm 离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂四（自备）	400	400
漩涡混匀，4℃，12000rpm 离心 10min，弃上清，留沉淀 此步骤（加试剂四这步）需做 2 次		
试剂五	400	400
漩涡混匀，37℃温育 15min，沉淀全部溶解后，4℃，12000rpm 离心 10min，取上清 200μL 于 96 孔板中于 370nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】1.若沉淀不能完全溶解，可增加试剂五的体积即 V2；或 A 测定的值大于 1 可用试剂五稀释检测液；则改变后的 V2 或稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

2.若 ΔA 小于 0.01，则可增加样本加样体积 V1（如增至 160μL，则其他试剂不用变），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本重量计算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ = 0.51 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照蛋白浓度算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/mg Prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ = 0.51 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

3、按照液体体积：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 \times D = 0.455 \times \Delta A \times D$$

4.按照细菌或细胞样本：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ = 0.51 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \times D$$

ϵ ---羰基摩尔消光系数， $22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08 mL；

V2---反应体系总体积，0.4mL= $4 \times 10^{-4} \text{L}$ ；

W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。