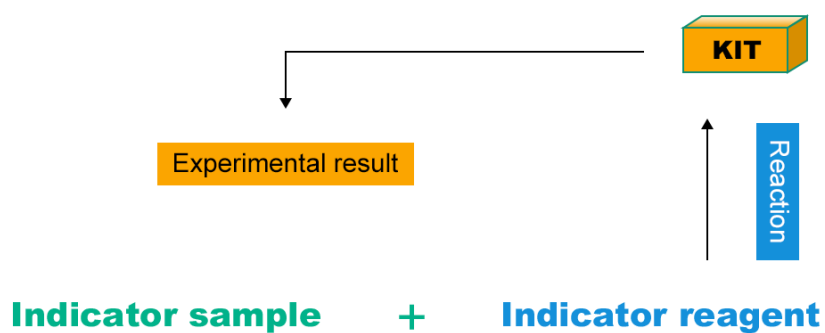


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0347

Size: 100T/48S

## 蛋白质羰基检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、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。

#### 二、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。

#### 三、需自备的仪器和用品：

天平、恒温水浴锅、低温离心机、漩涡振荡仪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔（UV 板）、蒸馏水、无水乙醇、乙酸乙酯。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类  | 试剂规格                         | 储存条件   | 使用方法及注意事项                                    |
|-----|------------------------------|--------|----------------------------------------------|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶                  | 4℃保存   |                                              |
| 试剂一 | 粉剂 0.1g×5 支，                 | 4℃保存   | 使用前根据样品数，每支加 1mL 水震荡溶解后离心取上清使用，每支为 10 个样品用量) |
| 试剂二 | 液体 6mL×1 瓶                   | 4℃避光保存 |                                              |
| 试剂三 | 液体 6mL×1 瓶                   | 4℃保存   |                                              |
| 试剂四 | 液体 15mL×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。（自备） |        |                                              |

|     |               |      |  |
|-----|---------------|------|--|
| 试剂六 | 液体 30mL × 1 瓶 | 4℃保存 |  |
|-----|---------------|------|--|

## 五、操作步骤：

### ● 样品处理：

组织样品：称取约 0.1g 组织样品，加入 1mL 提取液，充分匀浆后于 4℃, 5000rpm 离心 10min，取上清，加入 0.1mL 试剂一，室温放置 10min，4℃, 12000rpm 离心 10min，取上清，然后取 20μL 测定蛋白含量，剩余的作为待测样品。

### ● 测定步骤和操作表：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 370nm，试剂六调零。

### 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℃, 12000rpm 离心 15min，弃上清，留沉淀                                                                      |     |     |
| 试剂五 (μL)                                                                                                   | 300 | 300 |
| 漩涡混匀，4℃, 12000rpm 离心 10min，弃上清，留沉淀。重复 3 次。                                                                 |     |     |
| 试剂六 (μL)                                                                                                   | 300 | 300 |
| 漩涡混匀，37℃温育 15min，沉淀全部溶解后，4℃, 12000rpm 离心 15min，取上清 200μL，微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)，试剂六调零，测定 OD <sub>370</sub> 。 |     |     |

## 六、计算公式：

- 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

### 1、按蛋白浓度计算：

蛋白质羧基含量 ( $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ ) =  $(\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div (\epsilon \times d) \times V \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样品}) = (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div 4.4 \div \text{Cpr}$

### 2、按样本鲜重计算：

蛋白质羧基含量 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  鲜重) =  $(\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div (\epsilon \times d) \times V \div (W \times V \text{ 样品} \div V \text{ 提取}) = (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div 4 \div W$

$\epsilon$ ：蛋白质羧基消光系数， $22 \text{ mL}/\mu\text{mol}/\text{cm}$ ；比色皿光径， $1\text{cm}$ ； $V$ ：加入试剂六体积， $0.3\text{mL}$ ； $V$  样：加入样本体积， $0.06 \text{ mL}$ ； $V$  提取：加入提取液及试剂一体积， $1.1\text{mL}$ ； $\text{Cpr}$ ：样本蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ； $W$ ：样品质量， $\text{g}$ 。

- 用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下： $d$ ：光径， $0.6\text{cm}$ 。

## 七、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  $4^{\circ}\text{C}$  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。