

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-S0620

Size: 50T/24S

蛋白质羰基检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水，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 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 0.1g×3 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 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 25mL×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 50mL×1 瓶	4℃保存	

五、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 20ul 测定蛋白含量，剩余的作为待测样品。

六、测定步骤和操作表

	空白管	测定管
样品 (mL)	0.2	0.2
试剂二 (mL)		0.4
试剂三 (mL)	0.4	
混匀，37℃避光反应 1h		
试剂四 (mL)	0.5	0.5
静置 5min，4℃，12000rpm 离心 15min，弃上清，留沉淀		
试剂五 (mL)	1.0	1.0
漩涡混匀，4℃，12000rpm 离心 10min，弃上清，留沉淀。重复三次		
试剂六 (mL)	1.0	1.0
漩涡混匀，37℃温育 15min，沉淀全部溶解后，4℃，12000rpm 离心 15min，取上清，1mL 于石英比色皿，试剂六调零，测定 OD370		

七、计算公式

1. 按照样本蛋白浓度计算

蛋白质羧基含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $[\text{OD370 测定管} - \text{OD370 空白管}] \div (\epsilon \times d) \times V \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样品}) = [\text{OD370 测定管} - \text{OD370 空白管}] \div 4.4 \div \text{Cpr}$

2. 按照样本鲜重计算

蛋白质羧基含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$) = $[\text{OD370 测定管} - \text{OD370 空白管}] \div (\epsilon \times d) \times V \div [\text{W} \times V \text{ 样品} \div V \text{ 提取}] = [\text{OD370 测定管} - \text{OD370 空白管}] \div 4 \div \text{W}$

ϵ : 蛋白质羰基消光系数, $22\text{ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; d : 比色皿光径, 1cm ; V : 加入试剂六体积, 1ml ; V 样品: 加入样品体积, 0.2ml ; V 提取: 加入提取液及试剂一体积, 1.1 mL ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL , W : 样品质量, g 。

八、注意事项

1. 试剂一使用之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。