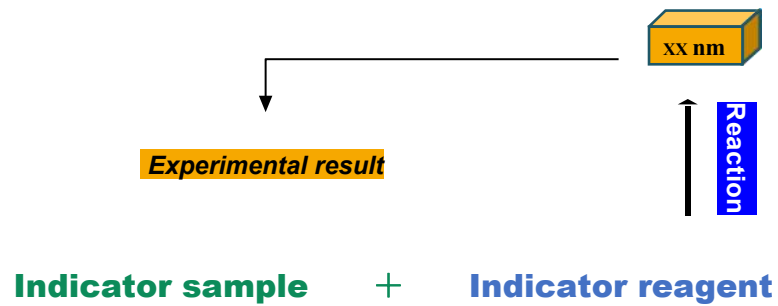


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

蛋白质羰基检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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	—

产品说明：

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。

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、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。

操作步骤：

一、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。

二、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°C避光反应 1h		
试剂四 (μL)	150	150
静置 5min, 4°C, 12000rpm 离心 15min, 弃上清, 留沉淀		
试剂五 (μL)	300	300
漩涡混匀, 4°C, 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°C温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 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 ₃₇₀ 。		

三、计算公式:

a. 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:

$$\begin{aligned} \text{蛋白质羰基含量 } (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样品}) \\ &= (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div 4.4 \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{蛋白质羰基含量 } (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \div (W \times V \text{ 样品} \div V \text{ 提取}) \\ &= (\text{OD}_{370} \text{ 测定管} - \text{OD}_{370} \text{ 对照管}) \div 4 \div W \end{aligned}$$

ε : 蛋白质羰基消光系数, 22 mL/μmol/cm; 比色皿光径, 1cm; V: 加入试剂六体积, 0.3mL; V 样: 加入样本体积, 0.06 mL; V 提取: 加入提取液及试剂一体积, 1.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g。

b. 用96孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下: d: 光径, 0.6cm。

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。