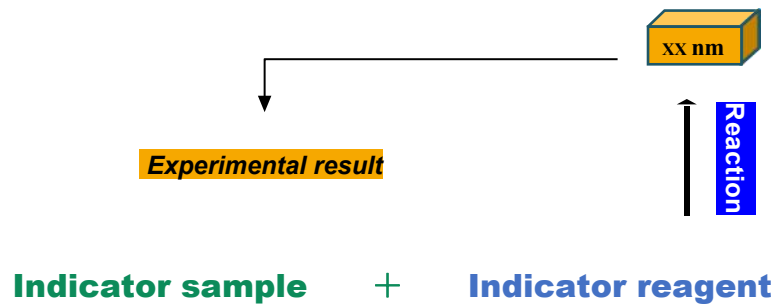


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

蛋白质羰基含量测定试剂盒

紫外分光光度法

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。

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。

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。

自备实验用品及仪器

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。

试剂组成和配制

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	-

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。

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°C避光反应 1h		
试剂四 (mL)	0.5	0.5
静置 5min, 4°C, 12000rpm 离心 15min, 弃上清, 留沉淀		
试剂五 (mL)	1.0	1.0
漩涡混匀, 4°C, 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°C温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 12000rpm 离心 15min, 取上清, 1mL 于石英比色皿, 试剂六调零, 测定OD ₃₇₀		

计算公式

1. 按照样本蛋白浓度计算

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

2. 按照样本鲜重计算

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

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; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL, W : 样品质量, g。

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。