

蛋白质羰基含量测定试剂盒

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下，使试剂落入底部，加 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。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	自备	4°C保存	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)
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、低温离心机、漩涡震荡仪、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯。

四、蛋白质羰基含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

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)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min，调节波长至 370nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (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°C避光反应 30min		
试剂三	200	200
混匀, 4°C, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
试剂四 (自备)	400	400
漩涡混匀, 4°C, 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°C温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 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：

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

3、按照液体体积：

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

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

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, $0.4\text{mL} = 4 \times 10^{-4}\text{L}$;

W---样本质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。