北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

蛋白质羰基含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号： D17142

规格： 100 T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂 0.1g×5 支	2-8℃ 保存
试剂二	液体 8mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 8mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 18mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	自备试剂	_
试剂六	液体 25mL×1 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制：

1、 试剂一：使用前根据样本数，每支加 1mL 水震荡溶解后离心取上清使用，每支为 10 个样本用量，溶液变黑后即不可再继续使用。

2、 试剂五：白备试剂，大约需要 100 mL。根据测定样本量，将乙酸乙酯和无水乙醇等体积混合，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。

产品说明：

蛋白质羰基化是指氨基酸残基侧链中的氨基或亚氨基受到氧自由基攻击最后转变成醛基，并释放 NH_3 的过程．其在体内的形成主要是通过金属离子催化氧化系统完成。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 2,4- 二硝基苯腙，在 370 nm 处有特征吸收峰。

Protein Carbonyl+2,4-Dinitrophenylhydrazine ———— 2,4-Dinitrobenzene(370nm)

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

天平、恒温水浴锅 / 培养箱、低温离心机、研钵 / 匀浆器 / 超声细胞破碎仪、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 (>98%, AR)、乙酸乙酯 (>98%, AR)。

操作步骤：

一 、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织样本：称取约 0.1 g 组织样本，加入 1mL 提取液，充分匀浆后于 4℃,5000 rpm 离心 10min, 取上清（若用蛋白浓度计算最终结果，需要在此步取出 20μL 上清液，加入 2 μL 蒸馏水后用于测定蛋白含量，剩余的进行后续步骤），加入 0. lmL 试剂一，室温放置 10min,4℃,12000rpm 离心 10min, 取上清待测。

细菌或细胞样本：收集细胞至离心管内，建议收集 500~1000 万细胞，加入 1 mL 提取液，冰浴超声破碎（功率 200W，超声开 3s，间隔 9s，总时长 3min），于 4℃,5000rpm 离心 10min，取上清（若用蛋白浓度计算最终结果，需要在此步取出 20 μL 上清液，加入 2 μL 蒸馏水后用于测定蛋白含量，剩余的进行后续步骤），加入 0.1mL 试剂一，室温放置 10 min,4℃,12000rpm 离心 10 min，取上清待测。

血清（浆）：直接检测。

二、测定步骤

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

2. 操作表

试剂名称	对照管	测定管
样本（μL）	160	160
试剂二（μL）	_	120
试剂三（μL）	120	_
混匀，37℃ 避光反应 1h，每 10min 振荡一次		
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）	200	200
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 UV 板，试剂六调零，测定 A370 。		

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：

蛋白质羰基含量（μmol/mg prot)=(A370 测定管 -A370对照管）÷(ε×d)×V÷(Cpr×V 样本)

=(A370测定管 -A370 对照管）÷ 17.6 ÷Cpr

2、按样本质量计算：

蛋白质羰基含量（μmol/g质 量）=(A370测定管 - A370对照管）÷(ε×d)×V÷(W×V 样本 ÷V提取）

=(A_{370}测定管 - A370 对照管）÷ 16 ÷W

3、按细菌或细胞数量计算：

蛋白质羰基含量（μmol/10^4cell)=(A370 测定管 - A370 对照管）÷(ε×d)×V÷(500×V 样本 ÷V提取)

=(A370测定管 - A370 对照管）÷ 8000

4、按液体体积计算：

蛋白质羰基含量（μmol/mL)=(A370 测定管 -A370 对照管）÷(ε×d)×V÷V 样本

=(A370测定管 - A370 对照管）÷ 17.6

8：蛋白质羰基消光系数，22mL/μmol/cm；微量石英比色皿光径，1cm;V：加入试剂六体积，0.2mL;V 样本：加入样本体积，0.16 mL;V 提取：加入提取液及试剂一体积，1.1mL;500：细菌或细胞总数，500 万;Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL;W：样本质量，g。

b) 用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下：

将微量石英比色皿光径 d=1cm 换成d=0.6cm 进行计算即可。

注意事项：

1. 试剂一使用前根据要测定的样本数现配，配制好后 4℃ 保存，若变为黑色，则不能使用。

实验实例：

1、 取 0. 1g 小鼠心脏加入 1mL 提取液充分匀浆后于 4℃, 5000 rpm 离心 10 min, 取上清，加入 0. 1mL 试剂一，室温放置 10 min,4℃,12000rpm 离心 10min, 取上清，按照测定步骤操作，用 96 孔UV 板测得A_{370}测定管 =0. 723, A370对照管 =0. 609, 按样本质量计算酶活得：

蛋白质羰基含量 （μ mol/g质 量 ）=(A370 测定管 -A370对照管)÷9. 6÷W=0.1188μmol/g 质量。

2、 取 0. 1 g 国槐加入 1 mL 提取液充分匀浆后于 4℃, 5000 rpm 离心 10 min, 取上清，加入 0. 1mL 试剂一，室温放置 1 0min,4℃,12000rpm 离心 10 min, 取上清，按照测定步骤操作，用 96 孔UV 板测得A370测定管 =0. 127,A370对照管 =0. 071, 按样本质量计算酶活得：

蛋白质羰基含量 （μmol/g质 量 ）= (A370测定管 -A370 对照管)÷9. 6÷ W=0.0583 μmol/g 质量。

3、 取胎牛血清样本按照说明步骤操作，直接测定，用 96 孔UV 板测得A370测定管 =0. 344,A370对照管 =0. 145, 按液体体积计算酶活得：

蛋白质羰基含量 （μmol/mL)=(A370 测定管 -A370 对照管)÷10. 56-0. 0188 μmol/mL。