

蛋白质羰基 (PCO) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YH006-48 微板法 48样)

有效期: 3个月

注意: 正式实验之前选择 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、漩涡震荡仪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水、无水乙醇、乙酸乙酯。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 粉剂 ×5 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 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: 自备。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 30mL×1 瓶, 4℃ 保存。

样品处理:

1. 组织样品: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 于 4℃, 4000g 离心 10min, 取上清, 加入 0.1mL 试剂一, 室温放置 10min, 4℃, 10000g 离心 10min, 取上清待测。
2. 细菌、细胞: 按照细菌、细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌、细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细菌、细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体样本: 直接测定。

测定步骤和操作表:

1、分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 370nm。

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℃ 避光反应 1h		
试剂四 (μL)	150	150
静置 5min, 4℃, 12000g 离心 15min, 弃上清, 留沉淀		
试剂五 (μL)	300	300
漩涡混匀, 4℃, 12000g 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		

试剂五(μL)	300	300
漩涡混匀, 4°C, 12000g 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
试剂五(μL)	300	300
漩涡混匀, 4°C, 12000g 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
试剂六(μL)	300	300
漩涡混匀, 37°C 温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 12000g 离心 15min, 取上清 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中, 测定 A ₃₇₀ 。ΔA=A 测定管-A 对照管		

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div C_{pr}$$

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.227 \times \Delta A_{370} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div V \text{ 样} = 0.227 \times \Delta A_{370}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羰基毫摩尔消光系数, 22 L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.06 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL, W: 样本质量, g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div C_{pr}$$

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.454 \times \Delta A_{370} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [\Delta A_{370} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d)] \div V \text{ 样} = 0.454 \times \Delta A_{370}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羰基毫摩尔消光系数, 22 L/mmol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.06 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL, W: 样本质量, g

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。