

## 蛋白质羰基含量测定试剂盒

(货号：ADS-W-YH006-96 微板法 96 样 有效期：6 个月)

### 一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 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； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	自备	4℃保存	1. 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)； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板（UV 板）、离心管、酶标仪、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取

##### 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、检测步骤

① 酶标仪预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 370nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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  $\Delta A$  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、按照蛋白浓度算：

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

3、按照液体体积：

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

4.按照细菌或细胞样本：

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

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

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;

500---细菌或细胞总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

