



蛋白质羰基含量检测试剂盒

Protein Carbonyl Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



蛋白质羰基含量检测试剂盒

Protein Carbonyl Content Assay Kit

一、产品描述

蛋白质羰基是由氨基酸残基侧链中的氨基或亚氨基受到自由基攻击后转变而来,在体内主要通过金属离子催化氧化系统形成。蛋白质羰基化是一种不可逆的翻译后修饰,是多种氨基酸在蛋白质氧化修饰过程中的早期标志。羰基化蛋白极易相互交联、聚集为大分子从而降低或失去原有蛋白质的功能,其含量能够反应蛋白质氧化损伤的程度,可作为衡量蛋白质氧化损伤的主要指标。

蛋白质羰基能够与 2,4-二硝基苯肼反应生成红色 2,4-二硝基苯腙,产物在 370 nm 处具有特征吸收峰,通过吸光值变化即可定量检测蛋白质羰基的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	-
提取液 B	粉剂×3 瓶	4°C保存	使用前每瓶加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (根据使用量现用现配,变为黑色则停止使用)
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 40 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂四	液体×1 瓶 (自备试剂)	4°C避光保存	按照乙酸乙酯:无水乙醇=1:1 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
试剂五	液体 70 mL×1 瓶	4°C保存	-

自备试剂:乙酸乙酯($C_4H_8O_2$, MW=88.10, CAS:141-78-6);无水乙醇(C_2H_6O , MW=46.07, CAS:64-17-5)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂:酶标仪、96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、乙酸乙酯、无水乙醇和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取全部上清液至离心管中，加入 0.1 mL 提取液 B，室温静置 10 min，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③血清、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 370 nm。

②在离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)
待测样本	60	60
试剂一	120	-
试剂二	-	120
充分混匀，37℃避光准确反应 1 h		
试剂三	150	150
充分混匀，室温静置 5 min		
4℃ 12000 g 离心 10 min，留沉淀		
试剂四	300	300
振荡混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，留沉淀		
重复加入试剂四离心步骤 3 次后留沉淀		
试剂五	300	300
37℃保温 15 min，待沉淀全部溶解		
4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液		

吸光值测定：吸取 200 μ L 上清液至 96 孔 UV 板中，测定 370 nm 处吸光值，记为 A 测定和 A 对照，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照。注：每个样品均需设一个对照管。

3.蛋白质羧基含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} \times V_{S5}}{\epsilon \times d \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}} = \frac{0.455 \times \Delta A_{\text{测定}}}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} \times V_{S5} \times V_1}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}}} = \frac{0.5 \times \Delta A_{\text{测定}}}{W}$$

③按照细菌或细胞数量计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} \times V_{S5} \times V_2}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}}} = \frac{0.455 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} \times V_{S5}}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}}} = 0.455 \times \Delta A_{\text{测定}}$$

注释： V_{S5} ：反应体系中加入试剂五的体积，0.3 mL； V_1 ：组织样品提取后总体积，1.1 mL； V_2 ：细菌或细胞样本提取后总体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入待测样本的体积，0.06 mL； ϵ ：蛋白质羧基摩尔消光系数，22 mL/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$ ； d ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可。

四、注意事项

- ①提取液 B 应根据使用量现用现配，配制后置于 4°C 保存，若变为黑色则停止使用；
- ②试剂一见光易分解，反应过程需在避光条件下进行；
- ③试剂四为沉淀洗涤液，需重复加入三次对沉淀进行洗涤；
- ④若吸光值超过 3，建议检查 96 孔板是否为 96 孔 UV 板，96 孔板会因材质问题造成吸光值接近设备量程；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

