

蛋白质羰基含量检测试剂盒

(货号: SH3005 酶标法 96T)

一、产品简介

蛋白质羰基 (Protein Carbonyl, PCO) 是多种氨基酸 (赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、苏氨酸等) 在蛋白质氧化修饰过程中的早期产物, 其含量高低是衡量蛋白质氧化损伤程度的主要指标。氧化应激时, 蛋白质侧链被氧化生成羰基衍生物, 因此羰基水平可反映机体氧化损伤状态。

二、检测原理

本试剂盒采用 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 比色法: 在酸性条件下, DNPH 与蛋白质羰基反应生成红色的 2,4-二硝基苯腙沉淀。该沉淀经有机溶剂反复洗涤去除游离 DNPH 后, 用盐酸胍溶液溶解, 在 370 nm 波长处有特征吸收峰。在特定浓度范围内, 吸光度值与蛋白质羰基含量呈正比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	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), 再缓慢加入 15mL 蒸馏水, 溶解混匀备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	自备	4℃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℃保存	

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、恒温水浴锅、涡旋震荡仪、可调式移液器、96

孔板、匀浆器、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯。

五、蛋白质羰基含量测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定，了解本批样本情况，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（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，在 4℃ 12000g 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 上清加 0.05mL 试剂一），室温放置 10min 后，8000g 室温离心 10min，取上清待测。

【注】若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

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；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 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 上清加 0.05mL 试剂一），室温放置 10min 后，12000g 室温离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测，若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，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℃避光反应 30min		
试剂三	200	200
混匀，4℃，8000g 离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂四（自备）	400	400
涡旋混匀，4℃，8000g 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
涡旋混匀，37℃孵育 15min（尽量使沉淀溶解），4℃ 8000g 离心 10min，取上清 200μL 于 96 孔板中于 370nm 处测吸光值，ΔA=A 测定管-A 空白管		

六、结果计算

1、按照样本重量计算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V \times 9 \div 10) \times D$$

2、按照细菌或细胞数量计算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V \times 9 \div 10) \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div V_1 \times D$$

ε---羰基摩尔消光系数， $2.2 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应体系总体积，0.4mL；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1