

蛋白质羧基含量测定试剂盒

微量法100T/48S

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：

蛋白质羧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：

羧基与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100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：粉剂0.1g×5支，4°C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°C避光保存。

试剂三：液体6mL×1瓶，4°C保存。

试剂四：液体15mL×1瓶，4°C保存。

试剂五：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60mL×1瓶，4°C保存。

样品处理：

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°C，4000g离心10min，取上清，加入0.1mL试剂一，室温放置10min，4°C，10000g离心10min，取上清待测。

细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4°C，离心10min，取上清置于冰上待测。

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°C避光反应1h		
试剂四 (μL)	150	150
静置5min, 4°C, 12000g离心15min, 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A370。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

按照样本蛋白浓度计算

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

按照样本重量计算

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

3. 按照细胞数量计算

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

按照液体体积计算

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

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; Cpr: 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

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

2. 按照样本重量计算

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

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

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; Cpr: 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。

www.affandi-e.com