

铜蓝蛋白(Ceruloplasmin, Cp)测定试剂盒说明书

微量法100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

铜蓝蛋白是血浆的含铜蛋白，有运输铜的功能，同时具有氧化酶的活性，是细胞外液重要的抗氧化剂。

测定原理：

铜蓝蛋白催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺生成蓝色产物，在645nm处有特征吸收峰，依此可得铜蓝蛋白活性。

自备实验用品及仪器：

天平、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体10mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体7mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体15mL×1瓶，4℃避光保存。（使用前37℃预热）

样本前处理：

1. 血清（浆）等液体样本：直接检测。
2. 动植物组织样本：称取约0.1g组织，加入1mL蒸馏水，进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至645nm，蒸馏水调零。
2. 操作表

	空白管	测定管
样品（ μL ）	30	30
试剂一（ μL ）	90	90
试剂二（ μL ）	60	
混匀，37℃预热5min		
试剂三（ μL ）	120	120
混匀，37℃反应30min		
试剂二（ μL ）		60

混匀，25℃室温放置5min，取200μL于微量石英比色皿/96孔板中，测定645nm处吸光值。

$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按体积计算

酶活定义:37℃条件下，每分钟每毫升样品与底物作用吸光度升高0.01为一个酶活单位。

Cp活力 (U/mL) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div V_{\text{样}} \div T = 33.33 \times \Delta A$

2. 按鲜重计算

单位定义：37℃条件下，每分钟每克样品与底物作用吸光值升高0.01为一个酶活单位。

Cp活力 (U/g鲜重) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 33.33 \times \Delta A \div W$

3. 按蛋白浓度计算

单位定义：37℃条件下，每分钟每毫克蛋白样品与底物作用吸光值升高0.01为一个酶活单位。

Cp活力 (U/ mg prot) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 33.33 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V样: 0.03 mL; V反总: 0.3 mL; T: 反应时间, 30min; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按体积计算

酶活定义:37℃条件下，每分钟每毫升样品与底物作用吸光度升高0.005为一个酶活单位。

Cp活力 (U/mL) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div V_{\text{样}} \div T = 66.66 \times \Delta A$

2. 按鲜重计算

单位定义：37℃条件下，每分钟每克样品与底物作用吸光值升高0.005为一个酶活单位。

Cp活力 (U/g鲜重) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 66.66 \times \Delta A \div W$

3. 按蛋白浓度计算

单位定义：37℃条件下，每分钟每毫克蛋白样品与底物作用吸光值升高0.005为一个酶活单位。

Cp活力 (U/ mg prot) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 66.66 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V样: 0.03 mL; V反总: 0.3 mL; T: 反应时间, 30min; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

注意事项:

试剂二和试剂三有一定的毒性和刺激性，请操作时做好防护措施。