

蛋白质羰基含量检测试剂盒说明书

Protein Carbonyl Assay Kit

微量法

货号：AK299

规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES35	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK299-A	粉剂×5 支	4℃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）
AK299-B	6mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK299-C	6mL×1 瓶	4℃保存；
AK299-D	15mL×1 瓶	4℃保存；
AK299-E	自备	根据测定样品量，将乙酸乙酯和无水乙醇等体积混合；
AK299-F	60mL×1 瓶	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：当抗氧化防御的有效性不足以处理活性氧（ROS）的产生时，就会产生氧化应激。ROS 能引起 DNA、脂质和蛋白质的损伤。蛋白质的氧化会产生稳定的羰基，蛋白质羰基是蛋白质的氧化修饰过程中的早期标志，可作为氧化损伤的一种检测手段。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。

原理：蛋白质羰基含量测定试剂盒为各种生物样品中羰基含量的测定提供了一种简单、直接的方法。羰基含量是通过蛋白质羰基与 2,4-二硝基苯肼（DNPH）衍生形成稳定的二硝基苯腙（DNP）腙加合物来测定的，该加合物在 370nm 处有特征吸收峰，与存在的羰基成比例。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、无水乙醇、乙酸乙酯。

样品处理：

1. 组织样品的制备：

按照组织质量（g）：提取液 ES35 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 ES35）进行冰浴匀浆，于 4℃，4000g 离心 10min，取上清，加入 0.1mL AK299-A，室温放置 10min，4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。

2. 细菌、细胞样品的制备：

按照细胞数量（10⁴ 个）：提取液 ES35 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液 ES35），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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体样本：直接测定。

测定步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 370nm，AK299-F 调零点。
- 在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样本	60	60
AK299-B		120
AK299-C	120	
混匀, 37℃避光反应 1h		
AK299-D	150	150
静置 5min, 4℃, 12000rpm 离心 15min, 弃上清, 留沉淀		
AK299-E	300	300
漩涡混匀, 4℃, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
AK299-E	300	300
漩涡混匀, 4℃, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
AK299-E	300	300
漩涡混匀, 4℃, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 留沉淀		
AK299-F	300	300
漩涡混匀, 37℃温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4℃, 12000rpm 离心 15min, 取上清 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 中, AK299-F 调零, 测定 A370。 ΔA=A 测定管-A 对照管		

蛋白质羧基含量计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = 0.227 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/g}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.227 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} = 0.227 \times \Delta A$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羧基毫摩尔消光系数, 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

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

2. 按照样本重量计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/g}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.454 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.454 \times \Delta A_{370} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质羧基含量 } (\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} = 0.454 \times \Delta A$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 0.3 mL; ε: 羧基毫摩尔消光系数, 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. AK299-A 使用前根据要测定的样品数现配，配置好后 4℃ 保存，若变为黑色，则不能使用。
2. AK299-B 见光易分解，反应需严格避光。
3. 本试剂盒中试剂含有有机溶剂，请带一次性手套和口罩，注意防护。