

Protein Carbonyl (PCO) Kit

蛋白质羰基含量测定试剂盒

货号: BN72184 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

蛋白质不仅是生物体的重要组成成分,而且在生命活动中担负重要的功能,对蛋白质氨基酸侧链的氧化可导致羰基产物的积累。因此蛋白质的羰基化被广泛地用于评价各种生物有机体的氧化程度,该指标的检测极具实际意义。

被氧化后的蛋白质羰基可与 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 反应生成红棕色沉淀的 2,4-二硝基苯腙,接着用盐酸胍溶解沉淀后于 370nm 下的检测,即可得到蛋白质的羰基含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下,使试剂落入底部,加 3mL 的浓盐酸完全溶解后(可超声溶解),再缓缓加 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	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、低温离心机、漩涡震荡仪、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯。

四、蛋白质羰基含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,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,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,8000rpm 室温离心 10min,上清备用;上清液与试剂一按照 9:1 比例混合(如 0.45mL 上清液加 0.05mL 试剂一),室温放置 10min 后,12000rpm 室温离心 10min,取上清待测。

【注】:也可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取

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;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 300w,超声 3 秒,间隔 7 秒,总时间 3min);8000rpm 室温离心 10min,上清备用;上清液与试剂一按照 9:1 比例混合(如 0.45mL 上清液加 0.05mL 试剂一),室温放置 10min 后,12000rpm 室温离心 10min,取上清待测。

【注】:也可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取

③ 液体样本:直接检测。

2、上机检测

- ① 酶标仪预热 30min，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℃，12000rpm 离心 10min，弃上清，留沉淀		
试剂四 (自备)	400	400
漩涡混匀，4℃，12000rpm 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
漩涡混匀，37℃温育 15min (尽量使沉淀溶解)，4℃， 12000rpm 离心 10min，取上清 200μL 于 96 孔板中于 370nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

- 1、按照样本重量计算：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ = 0.51 \times \Delta A \div W \times D$$

- 2、按照细菌或细胞样本：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ = 0.51 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \times D$$

- 3、按照液体体积：

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div V_1 \times D = 0.455 \times \Delta A \times D$$

ϵ ---羰基摩尔消光系数， $22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；

d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

V_1 ---加入样本体积，0.08 mL；

V_2 ---反应体系总体积， $0.4\text{mL} = 4 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

W ---样本质量，g；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。