

蛋白质羰基含量测定试剂盒

(分光法 48 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 50mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 1mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 mg×1 瓶 | 4°C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°C保存 | |
| 试剂四 | 自备 | 4°C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°C保存 | |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、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 紫外分光光度计预热 30min,调节波长至 370nm,用试剂四调零。

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 | 160 | |
| 蒸馏水 | | 160 |
| 试剂二 | 320 | 320 |
| 混匀, 37°C避光反应 30min | | |
| 试剂三 | 400 | 400 |
| 混匀, 4°C, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 留沉淀 | | |
| 试剂四 (自备) | 800 | 800 |
| 漩涡混匀, 4°C, 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 | 800 | 800 |
| 漩涡混匀, 37°C温育 15min, 沉淀全部溶解后, 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取全部澄清上清液于 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中于 370nm 处测定, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 | | |

【注】若沉淀不能完全溶解, 可增加试剂五的体积即 V2; 或 A 测定的值大于 1.5 可用试剂五稀释检测液; 则改变后的 V2 或稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本重量计算

$$\begin{aligned} \text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V \times 9 \div 10) \times D \\ &= 0.253 \times \Delta A \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照细菌或细胞样本

$$\begin{aligned} \text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) &= [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V \times 9 \div 10) \\ &= 0.253 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3、按照液体体积

$$\text{蛋白质羰基含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 = 0.227 \times \Delta A$$

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

d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.16mL;

V2---反应体系总体积, $0.8\text{mL} = 8 \times 10^{-4}\text{L}$;

W---样本质量, g。