

# 蛋白质羰基含量测试盒说明书

(货号: A087-1 紫外比色法)

## 一、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂组成	试剂状态	50 管/24 样 A087-1-1	100 管/48 样 A087-1-2	保存条件
试剂一	匀浆介质	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	4℃
试剂二	浅砖红色液体	2.5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃避光
试剂三	黄色液体	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	4℃避光
试剂四	无色液体	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	4℃
试剂五	无色液体	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4℃
试剂六	无色液体	70mL×1 瓶	70mL×2 瓶	4℃

洗涤液的配制: 将无水乙醇和乙酸乙酯按照体积比 1:1 的比例混合配制成溶液, 现用现配。

## 二、所需仪器及试剂:

紫外分光光度计及石英比色皿, 涡旋混匀器, 高速离心机 (12000rpm), 无水乙醇 (分析纯), 乙酸乙酯 (分析纯), 蛋白测定试剂 (本公司有售)。

## 三、操作步骤:

- 1、血清(浆)样本:** 直接取样测定(同时用双缩脲试剂盒(本公司有售,货号 A045-1)测定血清(浆)中总蛋白浓度);
- 2、组织样本前处理:** 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍的试剂一(如准确称取组织重量 0.1g 加入 0.9mL 的试剂一),冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分,离心 10min, 取上清(同时取部分上清用考马斯亮蓝试剂盒(本公司有售,货号 A045-2)测定匀浆的总蛋白浓度)即 10%匀浆 450μL, 加入 50μL 试剂二, 混匀, 室温放置 10min 后, 11000rpm 离心 10min, 取上清按操作表测定;

## 3、操作表:

	测定管	对照管
样本 (mL)	0.1	0.1
试剂三 (mL)	0.4	
试剂四 (mL)		0.4
漩涡混匀 1 分钟, 37℃准确避光反应 30 分钟		
试剂五 (mL)	0.5	0.5
洗涤第一次: 漩涡混匀 1 分钟, 在 4℃下, 以 12000rpm 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀		
洗涤液 (mL)	1.0	1.0
洗涤第二次: 漩涡混匀 1 分钟, 在 4℃下, 以 12000rpm 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀		
洗涤液 (mL)	1.0	1.0
洗涤第三次: 漩涡混匀 1 分钟, 在 4℃下, 以 12000rpm 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀		
洗涤液 (mL)	1.0	1.0
洗涤第四次: 漩涡混匀 1 分钟, 在 4℃下, 以 12000rpm 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀		
洗涤液 (mL)	1.0	1.0
洗涤第五次: 漩涡混匀 1 分钟, 在 4℃下, 以 12000rpm 离心 10min, 弃上清液, 留沉淀		
试剂六 (mL)	1.25	1.25
混匀后, 37℃水浴 15 分钟, 取出漩涡混匀, 12000rpm 离心 15min, 取上清液在 370nm 处, 0.5cm 光径石英比色皿, 试剂六调零, 测定各管吸光值 A。		

## 4、计算公式:

$$\text{蛋白质羰基含量 (nmol/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{22 \times d \times \text{Cpr}} \times 125 \times 10^5$$

d: 比色光径, cm;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/L。

## 四、测定意义:

一种检测蛋白质羰基含量的试剂盒。可简便、灵敏的检测各种组织器官、血清、培养细胞(做法同组织样本)和细胞器等蛋白质羰基含量。其使用不需要昂贵的设备, 样品处理简单, 可广泛应用于各种疾病如衰老、动脉硬化症, 糖尿病和帕金森综合症、风湿性关节炎等疾病的早期诊断, 抗氧化保健食品、抗氧化药物和化妆品等的评价, 还可以用于评价由于一些环境有害因子如辐射、化学毒物等对机体造成的氧化损伤。

## 五、实验注意点:

- 1、在用无水乙醇乙酸乙酯混合应用液对反应沉淀进行洗涤时, 漩涡混匀一定要剧烈充分, 混匀时间不得少于一分钟, 反应沉淀物必须洗涤至白色, 如果沉淀物还有黄色残留, 适当增加无水乙醇乙酸乙酯混合应用液的洗涤次数, 以保证洗涤充分, 否则会使得测定结果偏高;
- 2、在进行蛋白质羰基测定时, 离心的转速不可以随意降低, 否则会使得测定结果偏高;
- 3、在进行蛋白质羰基测定时, 建议使用圆底的离心管进行实验, 这样在进行无水乙醇乙酸乙酯混合应用液洗涤时, 可以保证沉淀被充分洗涤。不建议使用尖底的离心管进行实验。