

蛋白质羰基(PCO)含量测定试剂盒 微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使 用 说 明 书

货号: JL-T0805

有效期: 6个月

规格: 48T(24S)/96T(48S)

保存温度: 2-8°C

实验原理：

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。被氧化后的蛋白质羰基含量增多，羰基可与 2,4-二硝基苯肼反应生成一种红棕色沉淀，将沉淀溶解后在 370 nm 处读取吸光度值，从而计算出蛋白质的羰基含量。本试剂盒检测样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号 JL-T0336）。

检测范围：1-10mg/mL 灵敏度 1mg/mL

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成:

试剂名称	规格 (48T/24S)	规格 (96T/48S)	保存条件
试剂一	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×3 瓶	粉剂×6 瓶	2-8°C, 避光
试剂三	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8°C, 避光
试剂四	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8°C
试剂五	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	2-8°C
试剂六	70mL×1 瓶	140mL×1 瓶	2-8°C

所需仪器耗材及试剂:

离心机、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱、石英酶标板、无水乙醇、乙酸乙酯。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1-10mg/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为蒸馏水或者试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**：按照组织质量(g)：试剂一体积(mL)为 1:9 的比例（建议取 0.1 g 组织，加入 0.9mL 试剂一）进行冰浴匀浆，离心机 4°C，2500 g，10min，取上清即 10%匀浆 450 μ L，加入 50 μ L 试剂二工作液，混匀，室温放置 10min 后，11000 g 离心 10min 取上清液待测。
4. **血清（浆）等液体样本**：直接测定（若有浑浊则离心后取上清测定）。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂二工作液**：取一瓶试剂二加入 1mL 蒸馏水，混匀现用现配。
3. **酸乙酯混合应用液的配制**：无水乙醇：乙酸乙酯 1:1 比例混合，现用现配。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 370nm。
2. 样本测定（在 EP 管中依次加入）：

试剂名称(mL)	测定管	对照管
样本	0.1	0.1
试剂三	0.4	
试剂四		0.4
涡旋混匀 1min, 37°C 准确避光反应 30min		
试剂五	0.5	0.5
涡旋混匀 1min, 4°C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4°C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min, 4°C, 13780 g, 离心 10min, 弃上清, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1

涡旋混匀 1min,4°C,13780 g,离心 10min,弃上清,留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液	1	1
涡旋混匀 1min,4°C,13780 g,离心 10min,弃上清,留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。		
试剂六	1.25	1.25
混匀, 37°C 反应 15min		
涡旋混匀使沉淀溶解, 4°C, 13780 g, 离心 15min, 用微量移液器取上清液 0.3mL 到石英酶标板, 酶标仪上测定 370nm 处的 OD 值; 同时取测定管上清液, 用 BCA 法测其蛋白浓度。		

注:

1. 每个测定孔设置一个对照孔。
2. 待测样本的蛋白含量在 1-10 mg/mL 之间。
3. 检测后不要丢弃上清液, 还需测蛋白浓度。
4. 反应后, 需将残留的试剂三要除干净。
5. 取测定管上清液测蛋白含量不能用考马斯亮蓝法, 建议使用 BCA 法。
6. 吸取上清液到酶标板时, 避免产生气泡。
7. 动物组织样本需用 PBS(0.01 M, pH 7.4)将表面的血液洗去。

实验结果结算：

$$\begin{aligned}
 \text{蛋白质碳基含量} &= \frac{A_1 - A_2}{\epsilon \times d} \div \left(\text{Cpr} \times \frac{V_1}{V_2} \right) \times 10^6 \times N \\
 (\text{nmol/mgprot}) &= (A_1 - A_2) \times 4.55 \div \text{Cpr} \times N
 \end{aligned}$$

注：

- ϵ ：羰基摩尔消光系数，22000 L/mol/cm A_1 ：测定管 OD 值
 V_1 ：反应体系总体积，1.25 mL A_2 ：对照管 OD 值
 V_2 ：加入反应体系中待测样本体积，0.1 mL N：样本稀释倍数
 Cpr：测定管上清液的蛋白浓度，mgprot/mL 10^6 ：1 mol/L=10⁶nmol/mL

d：比色光径=体积÷底面积，标准 96 孔平底板底面积 0.32cm²中加入 0.3mL 液体时光径为 0.9375。

参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
大鼠肝脏组织 (10%匀浆)	2 倍稀释	0.34nmol/mgprot
大鼠脑组织 (10%匀浆)	2 倍稀释	0.74nmol/mgprot
人血清	10 倍稀释	1.37nmol/mgprot
人血浆	10 倍稀释	1.08nmol/mgprot

咨询电话：400-0066-400

传 真：021-55660885

电子邮箱：shjls@163.com

网 址：www.jonln.com