

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ107

产品规格：48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器：酶标仪(360-385 nm)

Elabscience®蛋白质羧基含量比色法测试盒
(测血清、组织)

Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit
(Tissue And Serum Samples)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

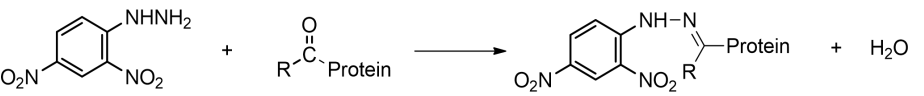
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、胸水、细胞上清、组织样本中蛋白质羰基的含量。

检测原理

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，如图，将沉淀溶解后可在分光光度计上读取 370 nm 下的吸光度值，从而计算出蛋白质的羰基含量。



本试剂盒检测样本时,需测定蛋白浓度,推荐使用 BCA 法(货号:GBQ162)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	匀浆介质 (Homogenate Medium)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	硫酸盐 (Sulfates)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	DNPH 试剂 (DNPH Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酸试剂 (Acid Reagent)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	变性剂 (Denaturant)	37.5 mL×2 瓶	50 mL×3 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，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。

所需自备物品

仪器：酶标仪(360-385 nm，最佳检测波长 370 nm)、涡旋混匀仪、台式高速冷冻离心机、37°C 恒温箱、微量移液器(1000 μ L, 200 μ L, 50 μ L, 10 μ L)。

耗材：枪头(1 mL, 200 μ L)、EP 管(5 mL, 2 mL)。

试剂：双蒸水、无水乙醇、乙酸乙酯。

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 试剂二应用液的配制：取一支试剂二用3 mL双蒸水溶解即可，2-8°C避光可保存3天。
- ③ 无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液的配制：按无水乙醇：乙酸乙酯为1:1比例混合，现用现配。

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(试剂一)。

② 样本的稀释

本试剂盒要求样本的蛋白含量在1-10 mg/mL之间，在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，结合此范围，选取最佳稀释倍数，进行正式批量实验。不同样本的稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	8-10	人乳汁	不稀释
大鼠血清	8-10	人尿液	不稀释
10%大鼠肝匀浆	2-3	10%小鼠心匀浆	不稀释
10%小鼠脑匀浆	不稀释	10%鱼肉匀浆	不稀释

注：稀释液为双蒸水或试剂一。

实验关键点

- ① 待测样本的蛋白含量在 1-10 mg/mL 之间。
- ② 检测后不要丢弃上清液，还需测蛋白浓度。
- ③ 反应后，需将残留的试剂三要除干净。
- ④ 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。
- ⑤ 吸取上清液到酶标板时，避免产生气泡。
- ⑥ 动物组织样本需用 PBS(0.01 M, pH 7.4)将表面的血液洗去。

操作步骤

① 样本前处理:

血清(浆)、胸水、细胞上清: 直接测定蛋白质羰基含量即可。

组织样本: 取组织匀浆 0.45 mL, 加 0.05 mL 试剂二应用液(即 9:1 比例), 室温放置 10 min, 4°C, $11580 \times g$ 离心 10 min, 取上清液进行蛋白质羰基含量测定。

② 测定管: 取 0.1 mL 待测样本、0.4 mL 试剂三加入到 2 mL EP 管中;

对照管: 取 0.1 mL 待测样本、0.4 mL 试剂四加入到 2 mL EP 管中。

③ 涡旋混匀 1 min, 37°C 准确避光反应 30 min。

④ 向③步骤中各管加入 0.5 mL 试剂五, 涡旋混匀 1 min, 4°C, $13780 \times g$ 离心 10 min。

⑤ 用移液枪取出上清液丢弃, 留沉淀(不能把沉淀取出丢弃)。

⑥ 向⑤步骤中的各管加 1 mL 无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液, 涡旋混匀 1 min, 4°C, $13780 \times g$ 离心 10 min, 用移液枪取出上清液丢弃, 留沉淀。(涡旋混匀不能少于 1 min)。

⑦ 重复步骤⑥3 次(若沉淀物还有黄色残留, 则适当增加无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液的洗涤次数)。

⑧ 洗涤完毕后的各管加入 1.25 mL 试剂六, 涡旋混匀, 37°C 反应 15 min。

⑨ 涡旋混匀使沉淀溶解, 4°C, $13780 \times g$, 离心 15 min。

⑩ 用微量移液器取上清液 0.3 mL 到酶标板, 酶标仪上测定 370 nm 处的 OD 值; 同时取测定管上清液, 用 BCA 法测其蛋白浓度。

操作表

	测定管	对照管
待测样本 (mL)	0.1	0.1
试剂三 (mL)	0.4	--
试剂四 (mL)	--	0.4
涡旋混匀 1 min, 37°C 准确避光反应 30 min		
试剂五 (mL)	0.5	0.5
涡旋混匀 1 min, 4°C, 13780 × g, 离心 10 min, 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 (mL)	1	1
涡旋混匀 1 min, 4°C, 13780 × g, 离心 10 min, 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 (mL)	1	1
涡旋混匀 1 min, 4°C, 13780 × g, 离心 10 min, 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 (mL)	1	1
涡旋混匀 1 min, 4°C, 13780 × g, 离心 10 min, 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 (mL)	1	1
涡旋混匀 1 min, 4°C, 13780 × g, 离心 10 min, 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 15 min		
涡旋混匀使沉淀溶解, 4°C, 13780 × g, 离心 15 min, 用微量移液器取上清液 0.3 mL 到酶标板, 酶标仪上测定 370 nm 处的 OD 值; 同时取测定管上清液, 用 BCA 法测其蛋白浓度。		

结果计算

$$\text{蛋白质羧基含量} = \frac{A_1 - A_2}{\varepsilon \times d} \div \left(C_{\text{pr}} \times \frac{V_1}{V_2} \right) \times 10^6 \times f = (A_1 - A_2) \times 4.55 \div C_{\text{pr}} \times f$$

(nmol/mgprot)

注解:

A₁: 测定管 OD 值

A₂: 对照管 OD 值

ε: 羧基摩尔消光系数, 22000 L/mol/cm

d: 比色光径(0.8 cm)

V₁: 反应体系总体积(1.25 mL)

V₂: 加入反应体系中待测样本体积(0.1 mL)

C_{pr}: 测定管上清液的蛋白浓度(mgprot/mL)

10⁶: 单位换算, 1 mol/L=10⁶ nmol/mL

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

4.55: 公式简化之后的常数

附录1 关键数据

1. 技术参数

平均批间差	8.5%	平均批内差	5.2%
平均回收率	97%		

附录2 实例分析

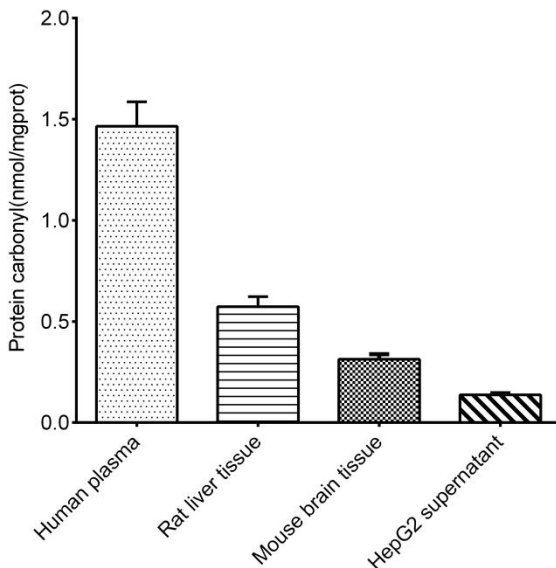
例如检测人血浆(数据仅供参考):

将人血浆:双蒸水=1:9稀释,取0.1 mL稀释后的人血浆,按操作表检测,结果如下:

测定管平均OD值为0.082,对照管平均OD值为0.069,同时测得测定管上清液蛋白含量0.43 mgprot/mL,计算结果为:

$$\text{蛋白质羰基含量} = (0.082 - 0.069) \times 4.55 \div 0.43 \times 10 = 1.38 \text{ nmol/mgprot}$$

按照说明书操作,测定人血浆(稀释10倍,加样量0.1 mL,测定管上清液蛋白含量0.43 mgprot/mL)、10%大鼠肝组织(稀释2倍,加样量0.1 mL,测定管上清液蛋白含量0.29 mgprot/mL)、10%小鼠脑组织(加样量0.1 mL,测定管上清液蛋白含量0.23 mgprot/mL)和HepG2细胞上清(加样量0.1 mL,测定管上清液蛋白含量0.35 mgprot/mL)中蛋白质羰基含量(如下图)。



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	操作前认真阅读操作步骤和注意事项
	实验过程中未 4℃ 离心	按说明书进行实验
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本蛋白含量低于 1 mg/mL	制备组织匀浆时,浓度提高
对照管 OD 值大于测定管 OD 值	对照管未洗涤至白色	增加用无水乙醇与乙酸乙酯混合应用液洗涤次数
沉淀在试剂六中未溶解	属于正常现象	操作最后一步离心即可

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233