

铜蓝蛋白(Ceruloplasmin, Cp)测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

铜蓝蛋白是血浆的含铜蛋白，有运输铜的功能，同时具有氧化酶的活性，是细胞外液重要的抗氧化剂。

测定原理：

铜蓝蛋白催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺生成蓝色产物，在 645nm 处有特征吸收峰，依此可得铜蓝蛋白活性。

自备实验用品及仪器：

天平、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 7mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。（使用前 37℃ 预热）

样本前处理：

- 1、血清（浆）等液体样本：直接检测。
- 2、动植物组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水，进行冰浴匀浆。10000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 645nm，蒸馏水调零。
- 2、操作表

	空白管	测定管
样品 (μL)	30	30
试剂一 (μL)	90	90
试剂二 (μL)	60	
混匀，37℃ 预热 5min		
试剂三 (μL)	120	120
混匀，37℃ 反应 30min		
试剂二 (μL)		60
混匀，25℃ 室温放置 5min，取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中，测定 645nm 处吸光值。		
ΔA=A 测定-A 空白。		

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1.按体积计算

酶活定义:37℃条件下, 每分钟每毫升样品与底物作用吸光度升高 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div V_{\text{样}} \div T = 33.33 \times \Delta A$$

2.按鲜重计算

单位定义: 37℃条件下, 每分钟每克样品与底物作用吸光值升高 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 33.33 \times \Delta A \div W$$

3.按蛋白浓度计算

单位定义: 37℃条件下, 每分钟每毫克蛋白样品与底物作用吸光值升高 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/ mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 33.33 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

V 样: 0.03 mL; V 反总: 0.3 mL; T: 反应时间, 30min; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按体积计算

酶活定义:37℃条件下, 每分钟每毫升样品与底物作用吸光度升高 0.005 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div V_{\text{样}} \div T = 66.66 \times \Delta A$$

2、按鲜重计算

单位定义: 37℃条件下, 每分钟每克样品与底物作用吸光值升高 0.005 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 66.66 \times \Delta A \div W$$

3、按蛋白浓度计算

单位定义: 37℃条件下, 每分钟每毫克蛋白样品与底物作用吸光值升高 0.005 为一个酶活单位。

$$\text{Cp 活力 (U/ mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div 0.005 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 66.66 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

V 样: 0.03 mL; V 反总: 0.3 mL; T: 反应时间, 30min; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

注意事项:

试剂二和试剂三有一定的毒性和刺激性, 请操作时做好防护措施。