



蛋白质游离巯基含量检测试剂盒(微量法)

中文名称：**蛋白质游离巯基含量检测试剂盒(微量法)**

英文名称：Protein Disulfide Bond Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：2-8℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 40mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 40mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 7mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 1mL×1 支	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液配制：临用前根据样本量按照提取液一：提取液二=1mL：1 mL 进行配制，请勿一次性全部混合。
- 2、若试剂二有析出，可置于 37℃水浴加热至澄清透明后使用。
- 3、标准品：10mg 还原型谷胱甘肽(GSH)。临用前加入 1.3mL 蒸馏水配置成 25μmol/mL ，



2-8°C保存 4 周。

4、0.125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准品配制：取 50 μL 25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准品，加入 950 μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 1.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$

的标准品；然后取 100 μL 1.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准品，加入 900 μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准品备用，现配现用。

产品说明：

巯基的存在使得蛋白质能够进行二硫键的形成，从而维持分子的稳定性和功能性。此外，巯基还参与到氧化还原反应中，具有重要的生物学作用。在细胞内，巯基含量的变化与多种疾病的发生和进展密切相关，因此巯基也成为了生物医学领域中的重要研究对象。本试剂盒测定的是蛋白质中的游离巯基含量。一定条件下巯基会发生亲核反应，即巯基与 5,5'-二硫代-双-硝基苯甲酸 (DTNB) 反应，生成黄色化合物，在 412nm 处有最大吸收峰，据此可以计算蛋白质游离巯基含量。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、天平、低温离心机、研钵/匀浆器、丙酮 (AR)、蒸馏水。

一、样本处理

操作步骤：

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液) 加入提取液，冰浴匀浆后于 4°C，3000rpm 离心 10min，弃上清。在沉淀中



加入 2mL 试剂一，搅匀后溶解沉淀，沉淀溶解液 作为样本进行实验。(注：(1) 植物叶片等纤维含量较高的样本，溶解沉淀后 4℃ 3000rpm 离心 3min ，取上清 作为样本进行实验；(2) 加入试剂一后会有大量气泡产生，请缓慢加入，建议使用 5mL 的 EP 管)。

2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量 (10^6 个)：提取液体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例 (建议 5 百万细菌/细胞加入 1mL 提取液)，冰浴超声波破碎 (功率 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，总时间 3min) 后，于 4℃，3000rpm 离心 10min，弃上清。在沉淀中加入 2mL 试剂一，搅匀后溶解沉淀，沉淀溶解液作为样本进行实验。(注：(1) 若沉淀溶解 不完全，可 4℃ 3000rpm 离心 3min ，取上清作为样本进行实验；(2) 加入试剂一后会有大量气泡产生，请缓慢加入,建议使用 5mL 的 EP 管)。

3. 血清/血浆、牛奶等液体：取 100 μ L 液体样本加入 0.9mL 丙酮，4℃，3000rpm 离心 10min ，弃上清。在沉淀中 加入 2mL 试剂一，搅匀后溶解沉淀，沉淀溶解液作为样本进行实验。(注：若测定数值偏小，可改变样本与丙 酮的比例，如取 0.2mL 液体样本加入 0.8mL 丙酮或 0.3mL 液体样本加入 0.7mL 丙酮，注意同步修改计算公式)。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 412nm ，分光光度计用蒸馏水调零。

2、操作表：(建议在 2mL 的 EP 管中操作)

试剂名称 (mL)	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	0.3	0.3	-	-
蒸馏水	-	-	0.3	-
标准品	-	-	-	0.3
提取液	0.18	0.18	0.18	0.18
请缓慢加入提取液混匀，并用吸头反复吹打至气泡不再产生 (期间会有大量气泡产生，开盖放置)				-



试剂二	0.18	0.18	0.18	0.18
充分混匀, 4°C 3000rpm 离心 10min 后取上清于 1.5mL EP 管/96 孔板中				-
上清液	0.14	0.14	0.14	0.14
试剂三	0.06	0.05	0.05	0.05
试剂四	-	0.01	0.01	0.01
充分混匀, 室温静置 10min 后, 412nm 下测定吸光度, 分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照, ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准管只需测 1-2 次。每个测定管需设一个对照管。				

三、蛋白质游离巯基含量的计算

1. 按照样本蛋白浓度计算:

蛋白质游离巯基含量($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) $\times V$ 样本 \div (V 样本 \times Cpr) $\times F$ = $0.125 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\times Cpr \times F$

2. 按照样本质量计算:

蛋白质游离巯基含量($\mu\text{mol}/\text{g}$ 质量) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) $\times V$ 试剂一 $\div W \times F$
= $0.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W \times F$

3. 按照液体体积计算:

蛋白质游离巯基含量($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) $\times V$ 试剂一 $\div V$ 液样 $\times F$
= $2.5 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\times F$

4. 按照细胞/细菌数量计算:

蛋白质游离巯基含量($\mu\text{mol}/10^6$ cell) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) $\times V$ 试剂一 $\div N \times F$ = $0.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div N \times F$

C 标准: 标准管浓度, $0.125 \mu\text{mol}/\text{mL}$; V 样本: 加入的样本体积, 0.3mL ; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL , 蛋白浓度需自行测定; W: 样本质量, g; V 试剂一: 提取时加入试剂一体积, 2mL ; V 液样: 提取时加入的样本体积, 0.1mL ; F: 稀释倍数; N: 细胞/细菌总数, 以 10^6 计。



注意事项:

1. 若样本 ΔA 测定 <0.01 ,可适当增大样本量后测定,注意同步修改空白管和标准管及计算公式;若样本 ΔA 测定 >1.5 ,可用试剂一稀释沉淀溶解液后测定,注意同步修改计算公式中的稀释倍数。
2. 可使用 BCA 法测定蛋白浓度。

实验实例:

1、取 100 μ L 马血清,按照测定步骤操作,用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.113-0.047=0.066, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.417-0.105=0.312,按样本液体体积计算蛋白质游离巯基含量得:

$$\text{蛋白质游离巯基含量}(\mu\text{mol/mL}) = 2.5 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F = 0.529 \mu\text{mol/mL}.$$

2、取 0.1036g 鼠肝,按照测定步骤操作,用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.261-0.105=0.156, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.417-0.105=0.312,按样本质量计算蛋白质游离巯基含量得:

$$\text{蛋白质游离巯基含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = 0.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F = 1.207 \mu\text{mol/g 质量}.$$

3、取 0.1078g 黄豆粉,沉淀溶解液用试剂一稀释 2 倍后,按照测定步骤操作,用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.123-0.070=0.053, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.417-0.105=0.312,按样本质量计算蛋白质游离巯基含量得:蛋白质游离巯基含量(μ mol/g 质量)=0.25 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 \div W \times F=0.788 μ mol/g 质量。