

## 蛋白质游离巯基含量检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA2111

产品规格：50T/24S

### 产品简介：

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。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体25mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体17mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体2mL×1支	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

### 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：1mL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蒸馏水配制成25μmol/mL，2-8℃保存4周。
4. 0.125μmol/mL标准品配制：取50μL 25μmol/mL标准品，加入950μL蒸馏水，充分混匀，配制成1.25μmol/mL的标准品；然后取100μL 1.25μmol/mL标准品，加入900μL蒸馏水，充分混匀，配制成0.125μmol/mL的标准品备用，现配现用。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、低温离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、丙酮（AR）、蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按质量（g）：提取液体积（mL）1：5~10 比例加入提取液（建议称取 0.1g 样本，加入 1.0mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 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）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<sup>6</sup> 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）。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

3. 血清/血浆、牛奶等液体：取 100 $\mu$ L 液体样本加入 0.9mL 丙酮，4 $^{\circ}$ 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：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. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。
2. 操作表：（建议在 5mL 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	0.5	0.5	-	-
蒸馏水	-	-	0.5	-
标准品	-	-	-	0.5
提取液	0.3	0.3	0.3	0.3
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	0.3	0.3	0.3	0.3
充分混匀，4 $^{\circ}$ C3000 rpm 离心 10min 后取上清于 1.5mL EP 管中			-	-
上清液	0.7	0.7	0.7	0.7
试剂三	0.3	0.25	0.25	0.25
试剂四	-	0.05	0.05	0.05
充分混匀，室温静置 10min 后，测定 412nm 下的吸光度分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。计算 $\Delta A$ 测定 = A 测定 - A 对照， $\Delta A$ 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. 按样本蛋白浓度计算：

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

2. 按照样本质量计算：

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

3. 按照液体体积计算

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

4. 按照细胞/细菌数量计算：

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

C 标准：标准管浓度，0.125 $\mu$ mol/mL；V 样本：加入的样本体积，0.5mL；C<sub>pr</sub>：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<sup>6</sup> 计。

### 注意事项：

1. 若样本  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com