

蛋白质总巯基含量检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC5805

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 40 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 40 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 1.2 mL×1 支	2-8°C保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

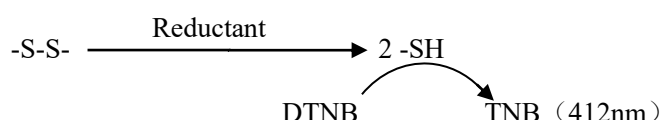
溶液的配制:

- 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, 现配现用, 请勿一次性全部混合。
- 2、若试剂二有析出, 可置于 37°C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 25 μ mol/mL, 2-8°C保存 4 周。
- 4、0.125 μ mol/mL 标准品配制: 取 50 μ L 25 μ mol/mL 标准品, 加入 950 μ L 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 1.25 μ mol/mL 的标准品; 然后取 100 μ L 1.25 μ mol/mL 标准品, 加入 900 μ L 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 0.125 μ mol/mL 的标准品使用, 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。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二硫键断裂产生的巯基和本身游离巯基的总和。

还原剂会使二硫键裂解生成巯基, 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总巯基含量。



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、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℃，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（10⁶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100μL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，分光光度计蒸馏水调零。

2、操作表：（建议在2mL的EP管中操作）

试剂名称（mL）	测定管	空白管	标准管
样本	0.3	-	-
蒸馏水	-	0.3	-
标准品	-	-	0.3
粉剂一	3mg	-	-
开盖反应30min，期间每隔10min用吸头吹打至气泡不再产生，禁止扣盖			
提取液	0.18	0.18	0.18
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
充分混匀，4℃ 3000rpm离心10min后取上清于1.5mL EP管中			
上清液	0.14	0.14	0.14
试剂三	0.05	0.05	0.05
充分混匀，测定412nm下的吸光度，记为A对照			
试剂四	0.01	0.01	0.01
充分混匀，室温静置10min后测定412nm下的吸光度，分别记为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。			
注：第一步测定412nm吸光度时，可将反应液全部倒入96孔板中/微量玻璃比色皿中测定，之后可直接在96孔板中/微量玻璃比色皿中加入试剂四混匀后继续测定。			

三、蛋白质总巯基含量的计算

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{蛋白质总巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ &= 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{蛋白质总巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{试剂一}} \div W \times F \\ &= 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$

3. 按照液体体积计算

$$\text{蛋白质总巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{试剂一}} \div V_{\text{液样}} = 2.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

4. 按照细胞/细菌数量计算：

$$\text{蛋白质总巯基含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{试剂一}} \div N \div 2 \times F = 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

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，推荐使用BCA方法测定；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。

实验实例：

- 1、取 100 μL 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=0.348-0.045=0.303， 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总巯基含量得：
蛋白质总巯基含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $2.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 2.428 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 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=0.475-0.107=0.368， 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总巯基含量得：
蛋白质总巯基含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 2.846 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。
- 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=0.762-0.084=0.678， 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总巯基含量得：
蛋白质总巯基含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 10.079 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。

相关系列产品：

- BC1370/BC1375 总巯基含量检测试剂盒
- BC1430/BC1435 非蛋白巯基含量检测试剂盒
- BC5790/BC5795 蛋白质二硫键含量检测试剂盒
- BC5890/BC5895 蛋白质游离巯基含量检测试剂盒

