

## 蛋白质游离巯基含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC5890

规格：50T/24S

**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 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 17 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

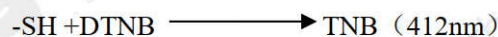
溶液的配制：

- 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。

**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。**

**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（>98%，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°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°C 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°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) 若沉淀溶解不完全, 可4°C 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°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°C 3000 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 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

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

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照液体体积计算

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



$$=2.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

#### 4. 按照细胞/细菌数量计算:

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

C标准: 标准管浓度, 0.125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ; V样本: 加入的样本体积, 0.5mL; 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 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$ , 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 $\Delta A_{\text{测定}} > 1.5$ , 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 $\mu\text{L}$  马血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.110 - 0.021 = 0.089$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.633 - 0.076 = 0.557$ , 按样本液体体积计算蛋白质游离巯基含量得:  
蛋白质游离巯基含量 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) =  $2.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 0.399 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 2、取 0.1036g 鼠肝, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.339 - 0.095 = 0.244$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.633 - 0.076 = 0.557$ , 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 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) =  $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 1.057 \mu\text{mol}/\text{g}$  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 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.108 - 0.033 = 0.075$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.633 - 0.076 = 0.557$ , 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 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) =  $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.625 \mu\text{mol}/\text{g}$  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
- BC5800/BC5805 蛋白质总巯基含量检测试剂盒
- BC5790/BC5795 蛋白质二硫键含量检测试剂盒

