

蛋白质游离巯基含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5895

规格：100T/48S

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 1mL×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，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 蒸馏水配置成 25μmol/mL，2-8°C 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/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/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 (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°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/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:

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

2. 按照样本质量计算:

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

3. 按照液体体积计算:



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

4. 按照细胞/细菌数量计算:

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

C标准: 标准管浓度, 0.125 $\mu\text{mol/mL}$; 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 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=0.113-0.047=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:
蛋白质游离巯基含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2.5 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 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:
蛋白质游离巯基含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 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 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W \times F = 0.788 \mu\text{mol/g}$ 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

