



蛋白质游离巯基含量检测试剂盒
Protein Free Thiol Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



蛋白质游离巯基含量检测试剂盒

Protein Free Thiol Content Assay Kit

一、产品描述

蛋白质游离巯基是蛋白质中常见的非标准氨基酸残基之一，主要由半胱氨酸残基形成，可以与其他巯基或金属离子形成二硫键或金属配位，从而维持蛋白质的稳定性和功能性，并在生物体内具有多种生化功能，包括氧化还原反应、酶催化和信号传导等，对于维持机体的正常功能和适应环境变化等方面具有重要作用。

一定条件下巯基会发生亲核反应，即巯基基团能够与 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测蛋白质巯基的含量。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	组分 A	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	按照组分 A：组分 B=1:1 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一		液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三		液体 17 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四		液体 2 mL×1 支	4°C 保存	-
标准品		粉剂×1 支 (10 mg GSH 标准品)	4°C 保存	使用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 25 μmol/mL GSH 标准液)
标准应用液的制备 (现用现配): 将 25 μmol/mL GSH 标准液使用蒸馏水稀释至 0.1 μmol/mL, 即为标准应用液。				

需自备试剂: 丙酮 (CH_3COCH_3 , MW = 58.08, CAS: 67-64-1)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、5 mL 离心管、丙酮和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 5000 g 离心 10 min，弃上清，留沉淀，在沉淀中加入 2 mL 试剂一，充分振荡使沉淀溶解，即为待测样本置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，总时间 3 min），4°C 5000 g 离心 10 min，弃上清，留沉淀，在沉淀中加入 2 mL 试剂一，充分振荡使沉淀溶解，即为待测样本置于冰上待测。

③液体样本：吸取 100 μ L 液体样本加入 900 μ L 丙酮充分混匀，4°C 5000 g 离心 10 min，弃上清，留沉淀，在沉淀中加入 2 mL 试剂一，充分振荡使沉淀溶解，即为待测样本置于冰上待测。

注：①若充分振荡后沉淀无法完全溶解，可 4°C 5000 g 离心 5 min，取上清作为待测样本；

②加入试剂一后会产生大量气泡，建议使用 5 mL 离心管操作并缓慢加入试剂一；

2. 测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

②在 5 mL 离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
待测样本	500	500	-	-
标准应用液	-	-	500	-
蒸馏水	-	-	-	500
提取液	300	300	300	300
应缓慢加入提取液，并反复吹打至气泡不再产生 (加入提取液期间会有大量气泡产生，建议开盖放置)				
试剂二	300	300	300	300
充分混匀，4°C 5000 g 离心 10 min，取上清液				
上清液	700	700	700	700
试剂三	250	300	250	250
试剂四	50	-	50	50
充分混匀，室温静置 10 min				

吸光值测定：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 412 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：每个样品均需设一个对照管，空白管只需测定 1-2 次。

3.蛋白质游离巯基含量计算

①按组织样本质量计算

$$\text{蛋白质游离巯基含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V_{S1} \times D}{W \times \Delta A \text{ 标准}} = \frac{0.2 \times \Delta A \text{ 测定} \times D}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

②按组织蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质游离巯基含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times D}{C_{pr} \times \Delta A \text{ 标准}} = \frac{0.1 \times \Delta A \text{ 测定} \times D}{C_{pr} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{蛋白质游离巯基含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V_{S1} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准}} = \frac{0.2 \times \Delta A \text{ 测定} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{蛋白质游离巯基含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V_{S1} \times D}{V_s \times \Delta A \text{ 标准}} = \frac{2 \times \Delta A \text{ 测定} \times D}{\Delta A \text{ 标准}}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ； V_{S1} ：提取过程中加入试剂一的体积，2 mL； V_s ：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；D：待测样本稀释倍数。

四、注意事项

①若 A 测定或 ΔA 测定大于 1.2，建议将待测样本适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

