



蛋白质游离巯基含量检测试剂盒(可见分光光度法)

中文名称：**蛋白质游离巯基含量检测试剂盒**

英文名称：Protein Free Thiol Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：2-8℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

自备试剂：

产品组成：

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 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 17mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 2mL×1 支	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°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。

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

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）				-
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℃ 3000rpm 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、蛋白质二硫键含量的计算

1. 按照样本蛋白浓度计算

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

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照液体体积计算

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

4. 按照细胞/细菌数量计算



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

C 标准：标准管浓度，0.125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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 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 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.110-0.021=0.089，

ΔA 标准=A 标准-A 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($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $2.5 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 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 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.339-0.095=0.244， ΔA 标准=A 标准-A 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) = $0.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 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($\mu\text{mol/g}$ 质量) $= 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.625 \mu\text{mol/g}$

质量。