



蛋白质二硫键含量检测试剂盒(可见分光光度法)

中文名称：**蛋白质二硫键含量检测试剂盒(可见分光光度法)**

英文名称：Protein Disulfide Bond 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

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 15mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂四 | 液体 3mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 粉剂一 | 粉剂×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，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 25 μ mol/mL , 2-8 $^{\circ}$ C保存 4 周。

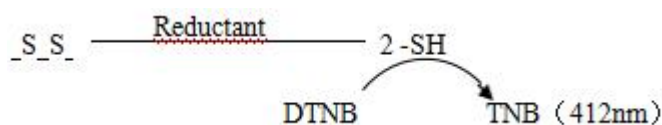
4、0.125 μ mol/mL 标准品配制: 取 50 μ L 25 μ mol/mL 标准品, 加入 950 μ L 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 1.25 μ mol/mL

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:

蛋白质是一类重要的生物大分子, 存在于一切生物体内, 是生命的基础物质。二硫键是连接不同肽链或同一 肽链中, 两个不同半胱氨酸残基的巯基的化学键。二硫键对蛋白质的结构影响很大, 在蛋白质分子中, 起着稳定 肽链空间结构的作用, 所以测定蛋白质二硫键含量尤为重要。

还原剂会使二硫键裂解, 裂解后的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二硫键含量。



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:



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 |



| | | | | |
|--|------|------|------|------|
| 粉剂一 | - | 5mg | - | - |
| 开盖反应 30min , 期间每隔 10min 用吸头吹打至气泡不再产生, 禁止扣盖反应 | | | | |
| 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 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 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 充分混匀, 测定 412nm 下的吸光度, 分别记为 A1 对照、 A1 测定。 | | | | |
| 试剂四 | 0.05 | 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 A2 对照、 A2 测定、 A 空白、 A 标准。计算 ΔA 测定 = (A2 测定 - A1 测定) - (A2 对照 - A1 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。 注: 第一步测定 412nm 吸光度时, 可将反应液全部倒入 1mL 玻璃比色皿中测定, 之后可直接在比色皿中加入试剂四混匀后继续测定。 | | | | |

三、蛋白质二硫键含量的计算

1. 按照样本蛋白浓度计算

蛋白质二硫键含量($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) \times V 样本 \div (V 样本 \times Cpr)

$\div 2 \times F = 0.0625 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 \times Cpr $\times F$

2. 按照样本质量计算

蛋白质二硫键含量($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) \times V 试剂一 \div W $\div 2 \times F$

= $0.125 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W \times F$

3. 按照液体体积计算

蛋白质二硫键含量($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) \times V 试剂一 \div V 液样 $\div 2 \times F$

= $1.25 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\times F$

4. 按照细胞/细菌数量计算:

蛋白质二硫键含量($\mu\text{mol}/10^6\text{cell}$) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准 \div C 标准) \times V 试剂一 $\div N \div 2 \times F$



$$= 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

C 标准: 标准管浓度, 0.125 μ mol/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, 可以使用 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; 2: 一个二硫键裂解产生两个巯基; F: 稀释倍数。N: 细胞/细菌总数, 以 10⁶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 μ L 马血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = (A2 测定 - A1 测定) - (A2 对照 - A1 对照) = (0.557 - 0.110) - (0.038 - 0.021) = 0.430, 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二硫键含量得:

$$\text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol/mL}) = 1.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 0.965 \mu\text{mol/mL}.$$

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 = (A2 测定 - A1 测定) - (A2 对照 - A1 对照) = (0.727 - 0.111) - (0.339 - 0.095) = 0.372, 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二硫键含量得:

$$\text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.806 \mu\text{mol/g 质量}.$$

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 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 =

$$(A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}) - (A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}}) = (1.080 - 0.068) - (0.108 - 0.033) = 0.937,$$



$\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.633 - 0.076 = 0.557$, 按样本质量计算蛋白质二硫键含量得:

蛋白质二硫键含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 3.901 \mu\text{mol/g}$ 质量。