



## 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**

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°C

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

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°C保存
提取液二	液体 25mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 15mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
粉剂一	粉剂×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，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 $\mu$ mol/mL，2-8°C保存 4 周。

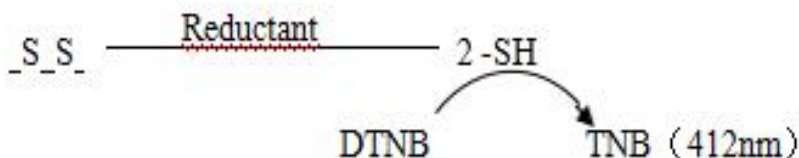
4、0.125 $\mu$ mol/mL 标准品配制：取 50 $\mu$ L 25 $\mu$ mol/mL 标准品，加入 950 $\mu$ L 蒸馏水，充分混匀，配制成 1.25 $\mu$ mol/mL

的标准品；然后取 100 $\mu$ L 1.25 $\mu$ mol/mL 标准品，加入 900 $\mu$ L 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.125 $\mu$ 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。

2. (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 (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℃，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 $\Delta A$ 测定 = (A2 测定 - A1 测定) - (A2 对照 - A1 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。 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

$$\text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \div 2 \times F = 0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times Cpr \times F$$

2. 按照样本质量计算

$$\text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 试剂一} \div W \div 2 \times F = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F$$



### 3. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 试剂一} \div V \text{ 液样} \div 2 \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F \end{aligned}$$

### 4. 按照细胞/细菌数量计算：

$$\begin{aligned} \text{蛋白质二硫键含量}(\mu\text{mol} / 10^6 \text{cell}) &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 试剂一} \div N \div 2 \times F \\ &= 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F \end{aligned}$$

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，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  $10^6$  计。

### 注意事项：

1. 若样本 $\Delta A$  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 $\Delta A$  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 $\mu\text{L}$  马血清,按照测定步骤操作,用 1mL 玻璃比色皿测得 $\Delta A$  测定= (A2 测定-A1 测定) - (A2 对照-A1 对照)= (0.557-0.110)-(0.038-0.021)=0.430 ,  $\Delta A$  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：

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

2、取 0.1036g 鼠肝,按照测定步骤操作,用 1mL 玻璃比色皿测得 $\Delta A$  测定= (A2 测定-A1 测定) - (A2 对照-A1 对照) = (0.727-0.111) - (0.339-0.095) =0.372 ,  $\Delta A$  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：



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  $\Delta A_{\text{测定}} =$

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

$\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.633 - 0.076 = 0.557$ ，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。