

蛋白质二硫键含量检测试剂盒（可见分光光度法）

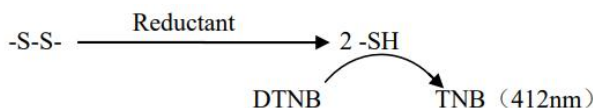
产品货号：BA2109

产品规格：50T/24S

产品简介：

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处有最大吸收峰，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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体25mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体15mL×1支	2-8℃
试剂四	液体3mL×1支	2-8℃
粉剂一	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

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：1mL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25μmol/mL，2-8℃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的标准品使用，现配现用。

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（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℃，3000rpm 离 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，



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 (10^6 个): 提取液一体积 (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 100 μ L 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:

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

2. 按照样本质量计算:

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

3. 按照液体体积计算:



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

4. 按照细胞/细菌数量计算:

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

C 标准: 标准管浓度, 0.125 $\mu\text{mol/mL}$; V 样本: 加入的样本体积, 0.5mL; 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 Δ 测定 $A < 0.01$, 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>