

蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法)

产品编号	产品名称	包装
S0145S	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法)	100-200次
S0145M	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法)	500-1000次

产品简介:

- 碧云天生产的蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法), 即Protein Cysteine Assay Kit with DTNB, 也称蛋白质半胱氨酸含量检测试剂盒, 是一种高效、便捷的用于细胞培养上清液、血清、血浆、细胞及组织裂解液样品中暴露的或表面的游离巯基(Exposed/Surface free sulfhydryl groups)和埋藏于蛋白内部的游离巯基(Buried free sulfhydryl groups)以及蛋白质中的二硫键(-S-S-, Disulfide bonds)被还原后的巯基检测试剂盒。本试剂盒采用显色法(吸光度法)进行检测。
- 巯基(Sulfhydryl groups or Thiols), 又称氢巯基或硫醇基, 化学式为-SH。巯基是生物系统中反应性非常强并且广泛存在的基团之一, 它存在于大多数蛋白质中, 也存在于一些低分子量物质中, 如谷胱甘肽(GSH)、CoA、脂酸、DTT、巯基乙酸盐和游离半胱氨酸等[1]。蛋白质中的巯基通常可分为暴露的游离巯基(Exposed/Surface free sulfhydryl groups)和在蛋白质高级结构中的游离巯基(Buried free sulfhydryl groups), 两者之和为总游离巯基(Total free sulfhydryls or unbound thiols)[2]。通常, 蛋白质中的游离巯基指的是暴露的游离巯基, 即活性巯基, 主要存在于半胱氨酸中, 是蛋白质结构和生物体内某些氧化还原反应的重要基团, 在蛋白质中两个巯基脱氢而形成的二硫键(-S-S-, Disulfide bonds), 使相邻多肽得以连接。本试剂盒使用变性剂将样品中的蛋白进行变性, 暴露二硫键和巯基, 然后利用还原剂将所有二硫键进行还原, 最后检测样品经变性和还原后的巯基含量, 作为半胱氨酸的含量。
- 生物体内的巯基主要为谷胱甘肽巯基和蛋白质巯基, 其中谷胱甘肽巯基主要参与修复氧化损伤的蛋白质和活性氧的清除[3]; 蛋白质巯基则主要通过形成二硫键发挥维持蛋白质构象的作用[4], 而蛋白质中检测到增多的游离巯基则提示二硫键发生断裂, 蛋白质结构发生变化。目前, 巯基传统的测定方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)、液相色谱-质谱联用法(HPLC-GC)等[5]。虽然这些方法在游离巯基检测的灵敏度和准确度上有一定优势, 但是样品处理和实验操作相对复杂、对仪器的要求较高、检测耗时较长、且无法同时检测多个样品。
- 本试剂盒采用经典的基于DTNB的游离巯基定量检测方法。5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB), 又称为6,6'-二硝基-3,3'-二硫代苯甲酸、Ellman试剂(Ellman Reagent)、二硫代硝基苯甲酸或双(3-羧基-4-硝基苯基)二硫, 是一种与巯基相互作用的水溶性试剂, 可用于组织、蛋白质和多肽中巯基含量测定, 基本反应原理如下: 样品中的蛋白质通过变性处理, 原有构象发生改变, 蛋白质肽链松散开, 二硫键或者巯基暴露, 还原剂将二硫键还原成巯基(-SH), 巯基(R-SH)与DTNB反应生成黄色可检测的2-硝基-5-硫代苯甲酸盐阴离子(TNB)和混合二硫化物(R-S-S-), TNB在412nm处有强吸收峰, 测定此处的吸光度, 并以谷胱甘肽为标准品, 可计算出样品中半胱氨酸的含量[6]。本试剂盒不仅可检测暴露的或表面的游离巯基, 还可以检测蛋白质高级结构中的游离巯基, 以及蛋白质中二硫键还原后产生的游离巯基, 如需检测总游离巯基, 可使用总巯基检测试剂盒(DTNB法) (S0141), 两者配合使用即可计算出蛋白质中二硫键的含量; 如需检测游离巯基, 可使用游离巯基检测试剂盒(DTNB法) (S0138), 配合总巯基检测试剂盒(DTNB法) (S0141)即可计算出蛋白质高级结构中的游离巯基含量; 如需检测谷胱甘肽, 可使用总谷胱甘肽检测试剂盒(S0052)、GSH和GSSG检测试剂盒(S0053)。碧云天三种巯基检测试剂盒的比较可以参考碧云天的相关网页: <http://www.beyotime.com/support/thiol-assay.htm>。

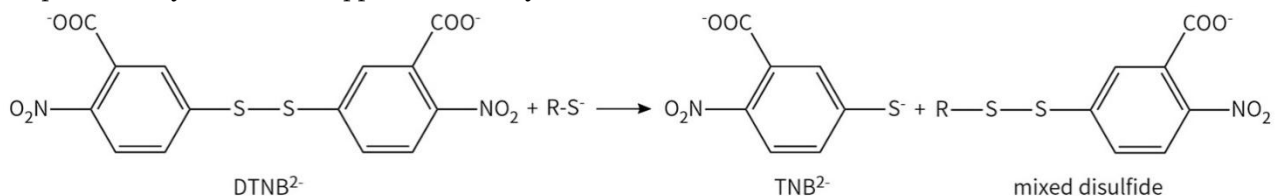


图1. 碧云天蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法) (S0145)工作原理图。

- 本试剂盒样品处理简单, 检测速度快。对于细胞培养上清液、血清、血浆可直接检测; 对于细胞及组织样品只需匀浆裂解, 取上清进行检测。整个检测过程不足4个小时即可完成。
- 本试剂盒的Assay Buffer经过优化, 可螯合可以氧化巯基的二价金属离子, 防止样品被氧化导致样品中巯基含量低于实际值。
- 本试剂盒提供了检测所需的DTNB和Assay Buffer, 同时还提供GSH作为标准品或阳性对照(Positive control)。本试剂盒检测GSH标准曲线的效果如图2所示。最低检测限约为10 μ M。

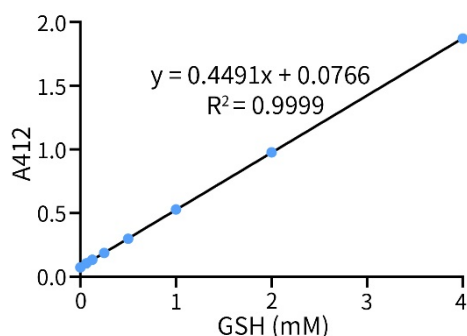


图2. 碧云天蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法) (S0145)用于GSH标准曲线的检测效果图。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

➤ 用于96孔板检测时, 本试剂盒小包装的可以进行100-200次检测, 中包装可以进行500-1000次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0145S-1	Assay Buffer	50ml
S0145S-2	Denaturing Buffer	20ml
S0145S-3	Reduction Buffer	200μl
S0145S-4	Protein Precipitation Solution	200ml
S0145S-5	GSH	4mg
S0145S-6	DTNB	2mg
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0145M-1	Assay Buffer	250ml
S0145M-2	Denaturing Buffer	100ml
S0145M-3	Reduction Buffer	1ml
S0145M-4	Protein Precipitation Solution	500ml×2
S0145M-5	GSH	20mg
S0145M-6	DTNB	10mg
—	说明书	1份

保存条件:

-20℃保存, 两年有效。4℃保存, 3个月有效。GSH和DTNB在配制成溶液后, 需适当分装, -20℃保存至少3个月有效。Protein Precipitation Solution须避光保存。

注意事项:

- 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应, 因此所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。如果在样品中的还原剂例如DTT、巯基乙醇等, 无法避免, 则应尽量控制还原剂的总浓度低于待测样品中的巯基浓度。常用的Triton X-100、Tween-20等去垢剂都含有较高水平的过氧化物, 如果必须使用去垢剂, 最好使用纯度较高并注明含较低过氧化物的去垢剂。
- Reduction Buffer对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。建议在通风橱内操作。Protein Precipitation Solution有腐蚀性, 操作时请小心, 并确保有效防护以避免直接接触人体, 并须注意避免腐蚀其它物品。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 样品的准备。

- 细胞样品准备:** 对于悬浮细胞, 可以离心收集细胞, 并用PBS、HBSS或生理盐水洗涤一遍。后续可以用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)参考相应的说明裂解并制备细胞样品。按照每100万细胞直接加入100-200微升裂解液的比例进行裂解。对于贴壁细胞, 也推荐使用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)进行裂解, 同时可以使用细胞铲或细胞刮(FLFT021/FSCP023/FSCP029)辅助收集细胞样品。如果没有使用推荐的裂解液, 出现裂解效果不佳的情况, 可以把处在裂解液中的细胞样品用玻璃匀浆器在4℃或冰浴匀浆。随后4℃, 12,000×g离心10分钟。取上清用于蛋白质半胱氨酸的测定。
- 细胞培养液上清的准备:** 对于贴壁细胞, 直接吸取培养液上清用于后续的测定; 对于悬浮细胞, 离心后吸取培养液上清用于后续的测定。

- c. **组织样品的准备:** 动物组织可以酌情使用含有0.16mg/ml heparin的生理盐水(0.9% NaCl containing 0.16mg/ml heparin) 灌流清除组织上残留的血液。每20mg组织加入200 μ l Western及IP细胞裂解液(P0013)或其它的裂解液, 用TissueMaster™ 高通量组织研磨仪(1.5/2ml \times 48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在4°C, 12,000 \times g离心10分钟, 取上清用于后续的测定。
- d. **血液样品的准备:** 对于血清样品, 将全血在常温如25°C下放置30分钟至2小时, 不要剧烈摇晃以免溶血, 待全血自然凝固并析出血清后, 4°C约1000-2000 \times g离心10分钟, 取黄色上清即得血清, 注意不要吸取白色或淡黄色沉淀; 对于血浆样品, 将全血用肝素或者EDTA进行抗凝, 4°C约1000-2000 \times g离心10分钟, 取黄色或淡黄色上清即得血浆, 注意不要吸取白色沉淀。
- e. 上述样品可以用碧云天生产的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0010S/P0011/P0012/P0012S)测定蛋白浓度。此时测得的蛋白浓度作为C_{Protein-1}用于步骤3f表格中的计算。

2. 试剂盒准备工作。

- a. GSH Standard (8mM)的配制: 在本试剂盒提供的4mg GSH中加入1.627ml Assay Buffer, 溶解并混匀, 即为8mM的GSH Standard。除立即待用部分外, 其余GSH Standard适当分装后于-20°C保存。
- b. DTNB储存液的配制: 在本试剂盒提供的每2mg DTNB中加入0.5ml Assay Buffer, 溶解并混匀, 即为DTNB储存液。除立即待用部分外, 其余DTNB储存液适当分装后于-20°C保存。
- c. Ellman's Reagent Solution的配制: 每个样品需180 μ l Ellman's Reagent Solution, 请根据样品数量计算所需Ellman's Reagent Solution的总量。将DTNB储存液与Assay Buffer按照1:35的比例混匀, 即得Ellman's Reagent Solution。例如取40 μ l DTNB储存液加入1.4ml Assay Buffer, 混匀即得约1.4ml Ellman's Reagent Solution。注: Ellman's Reagent Solution需根据用量配制, 现用现配。

3. 样品测定。

- a. 标准曲线的设置: 将8mM的GSH Standard用Assay Buffer倍比稀释为0、0.125、0.25、0.5、1、2、4mM。GSH标准曲线请参考图2。也可自行设置适宜的GSH浓度进行标准曲线的设定。
- b. 样品处理:
- (a) 蛋白还原: 每20 μ l样品中加入100 μ l Denaturing Buffer, 混匀后再加入2 μ l Reduction Buffer, 混匀后25°C孵育1小时。
注: 可根据待测样品的重复测试数量及蛋白浓度的测定需求, 确定起始样品总体积。此处以一个样品20 μ l为例。
- (b) 蛋白沉淀: 孵育结束后, 在管中加入1ml Protein Precipitation Solution, 混匀后25°C孵育1小时。
- (c) 离心: 孵育结束后, 4°C 5000 \times g离心15分钟, 弃上清。注意不要吸取到沉淀。
- (d) 蛋白洗涤和重复沉淀: 向沉淀中加入500 μ l Protein Precipitation Solution, 用移液器适当吹打均匀, 4°C 5000 \times g离心15分钟, 弃上清。重复本步骤一次。注意不要吸取到沉淀。
- (e) 蛋白重悬: 将沉淀用30 μ l Assay Buffer重悬, 即得到待测样品。
- (f) 蛋白浓度的再次测定: 由于样品在沉淀处理过程中会造成蛋白损失, 须取约5-10 μ l处理后的待测样品用碧云天生产的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0010S/P0011/P0012/P0012S)测定蛋白浓度; 此时测得的蛋白浓度作为C_{Protein-2}用于步骤3f表格中的计算。
- c. 每孔加入180 μ l Ellman's Reagent Solution, 参考下表分别将20 μ l的标准品或者待测样品加入到96孔板各孔中。空白对照(Blank Control)可以用Assay Buffer代替样品, 也可以不设置而使用标准曲线中浓度为0的吸光度值。室温(约20-25°C)孵育15分钟。

	Blank Control	Sample Group
Ellman's Reagent Solution	180 μ l	180 μ l
Sample	0 μ l	20 μ l
Assay Buffer	20 μ l	0 μ l
Total Volume	200 μ l	200 μ l

注1: 为获取更加可靠的检测结果, 推荐每个样品设置2-3个平行孔。

注2: 如果发现样品中巯基含量过高, 超出标准曲线检测范围, 可先酌情用Assay Buffer或裂解液对样品进行适当稀释, 稀释倍数记录为n。如果样品中巯基含量过低, 则在样品制备时使用更多的组织或细胞样品。

注3: 上述推荐的测定体系为200 μ l, 如果样品中的巯基浓度不是太低, 完全可以把每种试剂的用量减半, 包括3b的样品处理, 这样试剂盒可以测定的总次数可以加倍。

- d. 用酶标仪测定412nm处的吸光度, 测得的空白对照吸光度值, 记录为A_{Blank}, 测得的样品或标准品吸光度值, 记录为A_{Sample}, 用A_{Sample}减掉A_{Blank}, 计算平均吸光度值, 记录为 ΔA_{Sample} 。
- e. 将 ΔA_{Sample} 代入标准曲线, 即可计算出巯基浓度(记录为B)。
- f. 根据实验需求在下表中选择适当的公式计算蛋白质半胱氨酸浓度C。

Calculation Method	Formula	Note
按样品质量计算	$C (\mu\text{mol}/\text{mg}) = B \times n \times V_{\text{Sample}} / W_{\text{Sample}} \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$	V _{Sample} : 细胞或组织裂解后的总体积(ml) W _{Sample} : 样品质量(mg)
按样品蛋白浓度计算	$C (\mu\text{mol}/\text{mg}) = B \times n / C_{\text{Protein-2}}$	C _{Protein-1} : 初始样品蛋白浓度(mg/ml)
按半胱氨酸浓度直接计算	$C (\text{mM}) = B \times n \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$	C _{Protein-2} : 处理后样品蛋白浓度(mg/ml)

- g. 计算示例: 初始样品的蛋白浓度C_{Protein-1}为1.6 mg/ml, 步骤3样品处理后的样品的蛋白浓度C_{Protein-2}经测定为1mg/ml, 未经稀释, 反应步骤3c中的孵育时间为15分钟, 参考样品测定步骤进行测定。如果测出的A_{Sample} = 0.5, A_{Blank} = 0.126, 则 ΔA_{Sample} =

0.374, 根据图2拟合的标准曲线公式: $y = 0.4491x + 0.0766$, 计算出 $B = 0.6622\text{mM}$, 则样品中蛋白质半胱氨酸浓度 $C (\mu\text{mol}/\text{mg}) = 0.6622/1 = 0.6622\mu\text{mol}/\text{mg}$, 样品中半胱氨酸浓度 $C (\text{mM}) = 0.6622 \times (1.6/1) = 1.06\text{mM}$ 。

参考文献:

1. Rothstein A. Current topics in membranes and transport. Academic Press.1971.1: 135-176.
2. Ou S, Kwok K C, Wang Y, et al. Food Chemistry. 2004. 88(2): 317-320.
3. Shen Y, Zhong L, Markwell S, Cao D. Biochimie. 2010. 92(5):530-7.
4. Tang S, Li J, Huang G, Yan L. Protein Pept Lett. 2021. 28(8):938-944.
5. Chen X, Zhou Y, Peng X, Yoon J. Chem Soc Rev. 2010. 39(6):2120-35.
6. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Methods Enzymol. 1983. 91:49-60.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
S0138S	游离巯基检测试剂盒(DTNB法)	100-200次
S0138M	游离巯基检测试剂盒(DTNB法)	500-1000次
S0141S	总巯基检测试剂盒(DTNB法)	100-200次
S0141M	总巯基检测试剂盒(DTNB法)	500-1000次
S0145S	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法)	100-200次
S0145M	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB法)	500-1000次
S0052	总谷胱甘肽检测试剂盒	100次
S0053	GSH和GSSG检测试剂盒	共100次

Version 2024.03.28