



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyysw@sina.com

蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法) Protein Cysteine Assay Kit with DTNB

产品编号	产品名称	规格
R43129	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)	100-200 次
R43129	蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)	500-1000 次

产品简介:

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。蛋白质中的游离巯基通常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 sulfhydryl groups or unbound thiols)。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; 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, 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-MS)等。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、蛋白质和多肽中游离巯基含量的测定, 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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyysw@sina.com

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-TNB), TNB 在 412nm 处有强吸收峰, 通过酶标仪测定此处的吸光度, 并以谷胱甘肽为标准品, 可计算出样品中半胱氨酸的含量。

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); 如需检测蛋白质中二硫键的含量, 可以使用蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法), 同时设置未添加 Reduction Bufer 的样品组, 通过相应的差值就能计算出蛋白质中的二硫键含量; 如需检测游离巯基, 可使用游离巯基检测试剂盒(DTNB 法), 配合总巯基检测试剂盒(DTNB 法)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、GSH 和 GSSG 检测试剂盒。

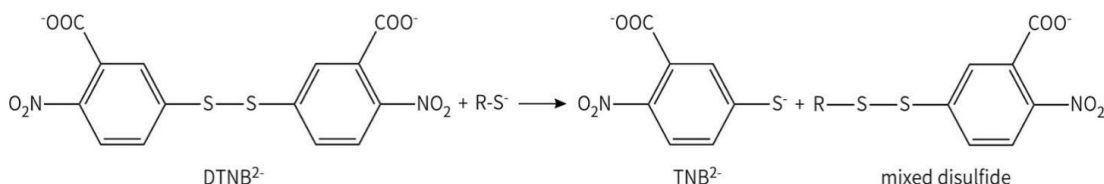


图 1. 半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)工作原理图。

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 小时即可完成。

本试剂盒的 Assay Buffer 经过优化, 可整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 Bufer, 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 10μM。

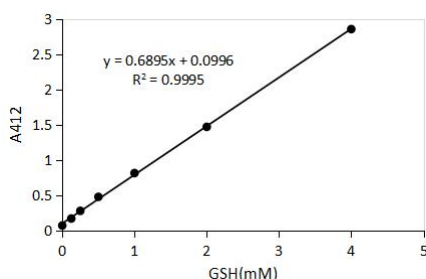


图 2.蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)用于 GSH 标准曲线的检测效果图。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

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。

本产品仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

试剂名称	100-200 次	500-1000 次	保存要求
------	-----------	------------	------



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyysw@sina.com

试剂一: Assay Buffer	50ml	250ml	4℃
试剂二: Denaturing Buffer	20ml	100ml	4℃
试剂三: Reduction Buffer	200μl	1ml	-20℃
试剂四: Protein Precipitation Solution	200ml	500ml×2	4℃ 避光
试剂五: GSH	4mg	20mg	-20℃
试剂六: DTNB	2mg	10mg	4℃
说明书	1 份		

【注】: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

操作步骤(仅供参考):

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

一、样品的准备:

- 1、细胞样品的准备: 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 Western 及 IP 细胞裂解液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 Western 及 IP 细胞裂解液进行裂解, 同时可以使用细胞铲或细胞刮辅助收集细胞样品。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。4℃ 12000×g 离心 10 分钟。取上清用于蛋白质半胱氨酸的测定。
- 2、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。
- 3、组织样品的准备: 动物组织可以酌情使用含有 0.16mg/ml 肝素的生理盐水(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 μl Western 及 IP 细胞裂解液或其它的裂解液, 用组织研磨仪或玻璃匀浆器在 4℃或冰浴等条件下匀浆。4℃ 12000×g 离心 10 分钟, 取上清用于后续的测定。
- 4、血液样品的准备: 对于血清样品, 将全血在常温下(如 25℃)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℃ 1000-2000×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℃ 1000-2000×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。
- 5、上述样品可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度; 此时测得的蛋白浓度作为 $C_{\text{Protein-1}}$ 用于后续的计算。

二、试剂盒的准备工作:

- 1、GSH Standard (8mM)的配制: 每 4mg GSH 中加入 1.627ml Assay Bufer, 溶解并混匀, 即为 8mM 的 GSH Standard。GSH Standard 适当分装后于-20℃保存。
- 2、DTNB 储存液的配制: 每 2mg DTNB 中加入 0.5ml Assay Buffer, 溶解并混匀, 即为 DTNB 储存液。DTNB 储存液适当分装后于-20℃保存。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyysw@sina.com

- 3、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 Denaturing Buffer 按照 1:35 的比例混匀, 即得 Ellman's Reagent Solution。例如取 50 μ l DTNB 储存液加入 1.75ml Denaturing Buffer, 混匀即得约 1.8ml Ellman's Reagent Solution。

注: Ellman's Reagent Solution 需根据用量配制, 现用现配。

三、样品测定:

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。
2、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。

3、样品处理:

- (a)蛋白还原: 每 20 μ l 样品中加入 100 μ l Denaturing Bufer, 混匀后再加入 2 μ l Reduction Bufer, 混匀后 25 $^{\circ}$ 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。如需测定蛋白质中二硫键的含量, 本步骤需要增加未添加 2 μ l Reduction Buffer 的样品组, 此时二硫键不会被还原, 和添加了 Reduction Buffer 的样品组相比, 其中的差值就是由于二硫键导致的。

- (b)蛋白沉淀: 孵育结束后, 在管中加入 1ml Protein Precipitation Solution, 混匀后 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

- (c)离心: 孵育结束后, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 30ml 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 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度; 此时测得的蛋白浓度作为 $C_{\text{Protein-2}}$ 用于后续的计算。

- 4、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 孔板中。空白对照(Blank Control)可以用 Assay Bufer 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 $^{\circ}$ C)孵育 15 分钟。

	Blank	Standard	Sample
Ellmans Reagent Solution	180 μ l	180 μ l	180 μ l
Assay Bufer	20 μ l	-	-
Standard	-	20 μ l	-
Sample	-	-	20 μ l
Total Volume	200 μ l	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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyysw@sina.com

注 2: 如果样品中巯基含量过高, 超出标准曲线检测范围, 可用 Assay Bufer 或裂解液对样品进行适当稀释, 稀释倍数记录为 D。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, 这样试剂盒可以测定的总次数可以加倍。

- 5、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} 或 $A_{Standard}$, 用 A_{Sample} 减掉 A_{Blank} , 计算平均吸光度值, 记录为 ΔA_{Sample} 。

四、结果计算:

- 1、计算标准品组中每个点的平均吸光度 $A_{Standard}$, 用 $A_{Standard}$ 减掉 A_{Blank} , 即为各个标准品的吸光度。以 GSH 标准(mM)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制出标准曲线。
- 2、将 ΔA_{Sample} 代入标准曲线, 即可计算出巯基浓度(记录为 B)。
- 3、根据实验需求选择适当的公式计算蛋白质半胱氨酸浓度 C。

按样品质量计算:

$$C(\mu\text{mol}/\text{mg}) = B \times D \times V_{\text{Sample}} / W_{\text{Sample}} \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$$

按样品蛋白浓度计算:

$$C(\mu\text{mol}/\text{mg}) = B \times D / C_{\text{Protein-2}}$$

按半胱氨酸浓度直接计算:

$$C(\text{mM}) = B \times D \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$$

V_{Sample} ---细胞或组织裂解后的总体积, ml W_{Sample} ---样本质量, mg

$C_{\text{Protein-1}}$ ---初始样品蛋白浓度, mg/ml $C_{\text{Protein-2}}$ ---处理后样品蛋白浓度, mg/ml

- 4、计算示例: 初始样品的蛋白浓度 $C_{\text{Protein-1}}$ 为 1.6mg/ml, 处理后样品蛋白浓度 $C_{\text{Protein-2}}$ 为 1mg/ml, 未经稀释, 室温孵育 15 分钟。如果测出的 $A_{\text{Sample}}=0.5$, $A_{\text{Blank}}=0.126$, 则 $\Delta A_{\text{Sample}}=0.374$, 根据图 2 标准曲线公式: $y=0.6895x+0.0996$, 计算出待测样品中的巯基浓度 $B=0.3980\text{mM}$, 则

样品中蛋白质半胱氨酸浓度 $C(\mu\text{mol}/\text{mg})=0.3980/1=0.3980\mu\text{mol}/\text{mg}$,

样品中半胱氨酸浓度 $C(\text{mM})=0.3980 \times (1.6/1)=0.6368\text{mM}$ 。

注意事项:

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyssw@sina.com

4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

低温运输。-20℃保存，两年有效；4℃保存，3个月有效。

GSH 和 DTNB 配制成溶液后，需适当分装，-20℃保存至少3个月有效。

