

蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)

产品编号: **MA1536**

规格: **100-200T / 500-1000T**

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1536-1 100-200T	MA1536-2 500-1000T	保存条件	有效期	运输条件
Assay Buffer	50mL	250mL	2-8℃	自生产之日 24 个月	湿冰运输
Denaturing Buffer	20mL	100mL	2-8℃		
Reduction Buffer	200μL	1mL	-20℃		
Protein Precipitation Solution	200mL	500mL×2	2-8℃, 避光		
GSH	4mg	20mg	-20℃		
DTNB	2mg	10mg	2-8℃		
说明书	1 份	1 份			

产品简介

蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法) (Protein Cysteine Assay Kit with DTNB) 基于 DTNB 显色法, 可定量检测细胞培养上清、血清、血浆、细胞及组织裂解液中的蛋白游离巯基与二硫键还原后总巯基含量, 既能够检测蛋白表面暴露的游离巯基, 也可检测蛋白高级结构中包埋的隐藏巯基。

巯基 (-SH) 是生物体系中高活性的功能基团, 广泛存在于蛋白质、谷胱甘肽、辅酶 A、游离半胱氨酸等多种生物分子中。蛋白游离巯基分为表面暴露型与结构埋藏型, 共同构成总游离巯基; 蛋白巯基可通过氧化形成二硫键 (-S-S-), 维持蛋白质空间构象, 而游离巯基异常升高通常提示二硫键断裂、蛋白结构受损。传统巯基检测多依赖 HPLC、毛细管电泳、色谱质谱联用等技术, 操作繁琐、仪器要求高、检测通量低, 难以满足大批量样本快速检测需求。

本试剂盒采用经典 Ellman 试剂 (DTNB, 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)) 显色体系。检测过程中通过蛋白变性处理舒展肽链, 充分暴露蛋白内部巯基与二硫键, 再经还原剂将所有二硫键彻底还原为巯基; 体系中游离巯基可与 DTNB 特异性反应, 生成在 412 nm 处具有特征吸收的黄色 TNB 阴离子, 通过测定吸光度并结合 GSH 标准曲线, 即可精准计算样本蛋白半胱氨酸含量。

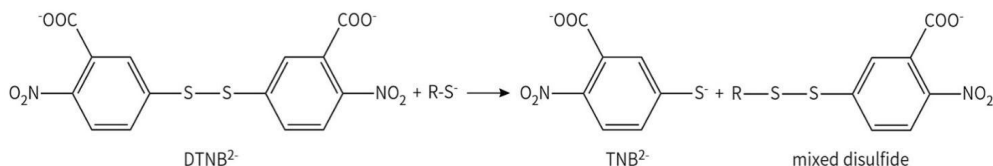


图 1. 蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)工作原理图

本系列试剂盒可搭配使用, 实现不同指标的差异化检测: 如需检测蛋白质中二硫键的含量, 通过设置未添加 Reduction Buffer 的样品组, 可利用本试剂盒差值法计算蛋白二硫键含量; 如需检测谷胱甘肽, 可配套使用 GSH 和 GSSG 检测试剂盒(美仑货号: MA1516)。

本试剂盒性能优势显著: 样品处理简便, 体液样本可直接检测, 细胞、组织样本仅需匀浆裂解取上清即可上机, 整体实验可在 4 h 内完成。优化的检测缓冲液可螯合金属离子, 有效防止巯基氧化降解, 保障检测结果准确稳定。试剂盒配套齐全, 自带 DTNB 显色液、专用缓冲液及 GSH 标准品/阳性对照, 检测灵敏度高, 最低检测限可达 10 μM。适配 96 孔板高通量检测, 小包装可完成 100-200 次检测, 中包装



可检测 500-1000 次，满足不同实验用量需求。

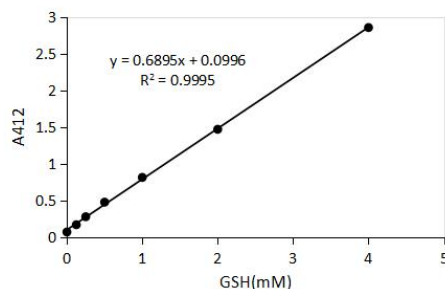


图 2. 蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)用于 GSH 标准曲线的检测效果图。

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。

使用方法(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 100-200μL 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 10min。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 200μL 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 10min，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 30min 至 2h，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 10min，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 10min，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_{Protein-1} 用于后续的计算。

二、试剂的准备：

1. GSH Standard (8mM)的配制：每 4mg GSH 中加入 1.627mL Assay Buffer，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。

3. Ellman's Reagent Solution 的配制：每个样品需 180μL 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 Buffer，混匀后再加入 2 μ L Reduction Buffer，混匀后 25℃ 孵育 1h。

【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℃ 孵育 1h。

(c)离心：孵育结束后，4℃ 5000 $\times$ g 离心 15min，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℃ 5000 $\times$ g 离心 15min，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 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℃)孵育 15min。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
Ellmans Reagent Solution	180 μ L	180 μ L	180 μ L
Assay Buffer	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。

【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 Buffer 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：

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

按样品蛋白浓度计算：

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

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 15min。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 $C(\mu\text{mol/mg})=0.3980/1=0.3980\mu\text{mol/mg}$ ，

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. GSH 和 DTNB 配制成溶液后，需适当分装，-20℃ 保存至少 3 个月有效。
2. 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。
3. 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。
4. 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

S260801

大连美仑生物技术有限公司

官网: <https://www.meilunbio.com/>

电话/邮箱: 0411-62910999 sales@meilunbio.com

本产品仅供科研使用

