总巯基检测试剂盒(DTNB 法)

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-500T
MCK-0038	Assay Buffer	25 mL
	Denaturing Buffer	100 mL
	GSH	20 mg
	DTNB	10 mg
	说明书	1 份

产品简介

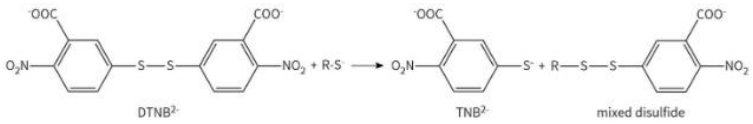
默科生产的总巯基检测试剂盒(DTNB 法)，即 Total Sulfhydryl Assay Kit with DTNB 或 Total Thiol Assay Kit with DTNB，也称总游离巯基检测试剂盒、总巯基含量检测试剂盒或总巯基定量检测试剂盒，是一种高效、便捷的用于细胞培养上清液、血清、血浆、细胞及组织裂解液样品中总游离巯基含量的检测试剂盒，即暴露的或表面的游离巯基(Exposed/Surface free sulfhydryl groups)和埋藏于蛋白内部的游离巯基(Buried free sulfhydryl groups)的检测试剂盒。本试剂盒采用显色法(吸光度法)进行检测。

巯基(Sulfhydryl groups or Thiols)，又称氢硫基或硫醇基，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 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。本试剂盒可以同时检测暴露的游离巯基和在蛋白质高级结构中的游离巯基，即总游离巯基的检测，但不会检测已经形成二硫键的巯基。

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-GC)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，原有构像发生改变，蛋白质肽链松散开，从而使原来埋藏于蛋白质内部的巯基(-SH)暴露，所有游离巯基(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-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，可计算出样品中总游离巯基含量。



总巯基检测试剂盒(DTNB 法) 工作原理图

本试剂盒可同时检测暴露的或表面的游离巯基以及在蛋白质高级结构中的游离巯基，如仅需检测暴露的或表面的游离巯基，可使用游离巯基检测试剂盒(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) ，同时设置未进行步骤 3（2）中设置未添加 Reduction Buffer 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。

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。整个检测过程不足半小时即可完成。

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)。最低检测限约为 10μM。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。

保存条件

-20°C 保存，有效期 2 年。4°C 保存，有效期 6 个月。

GSH 和 DTNB 在配制成溶液后，需适当分装，-20°C 保存，有效期 3 个月。

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. 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。

3. 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

（1）**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。后续可以用默科生产的 Western 及 IP 细胞裂解液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 100-200μL 裂解液的比例进行裂解。对于贴壁细胞，也推荐使用默科生产的 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。随后 4℃，12,000×g 离心 10 分钟。取上清用于总巯基的测定。

（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 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 200μL Western 及 IP 细胞裂解液或其它的裂解液，用 TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2mL×48) 、TissueMaster™手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约 4°C 或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在 4°C，12,000×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×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×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）上述样品可以用默科生产的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

2. 试剂盒准备工作

（1）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。

（2）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。

（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 40μL DTNB 储存液加入 1.4mL Denaturing 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

（1）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。可自行设置适宜的 GSH 浓度进行标准曲线的设定。

（2）每孔加入 180μL Ellman's Reagent Solution，参考下表分别将 20μL 的标准品或者待测样品加入到 96 孔板各孔中。空白对照可以用 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。

	空白对照	样本组
Ellman 试剂溶液	180μL	180μL
样品	0μL	20μL
Assay Buffer	20μL	0μL
总体积	200μL	200μL

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。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。③上述推荐的测定体系为 200μL，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。

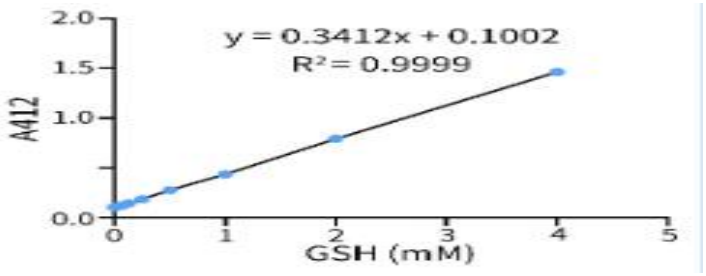
（3）用酶标仪测定 412nm 处的吸光度，测得的空白对照吸光度值，记录为 ABlank，测得的样品或标准品吸光度值，记录为 ASample，用 ASample 减掉 ABlank，计算平均吸光度值，记录为 ASample。

（4）将 ASample 代入标准曲线，即可计算出巯基浓度(记录为 B)。

（5）根据实验需求在下表中选择适当的公式计算游离巯基浓度 C。

Calculation Method	Formula	Note
按样品质量计算	C (μmol/mg) = B × n × VSample / WSample	VSample：细胞或组织裂解后的总体积(mL) WSample：样品质量(mg)
按样品蛋白浓度计算	C (μmol/mg) = B × n / CProtein	CProtein：样品蛋白浓度(mg/mL)
按巯基浓度直接计算	C (mM) = B × n	/

（6）计算示例：样品的蛋白浓度 CProtein 经测定为 1mg/mL，未经稀释，反应步骤 3（2）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 ASample = 0.312，ABlank = 0.064，则 ASample = 0.248，根据下图拟合的标准曲线公式：y = 0.3412x + 0.1002，计算出待测样品中的总巯基浓度 B = 0.4331mM，则待测样品中总巯基浓度 C (μmol/mg) = 0.4331/1 = 0.4331μmol/mg。



总巯基检测试剂盒(DTNB 法)用于 GSH 标准曲线的检测效果图