



蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)

Protein Cysteine Assay Kit with DTNB

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0051	Assay Buffer	50 mL
	Denaturing Buffer	20 mL
	Reduction Buffer	200μL
	Protein Precipitation Solution	200mL
	GSH	4mg
	DTNB	2mg
	说明书	1 份

产品简介

默科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)。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), 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。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), 同时设置未进行步骤 3b 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。

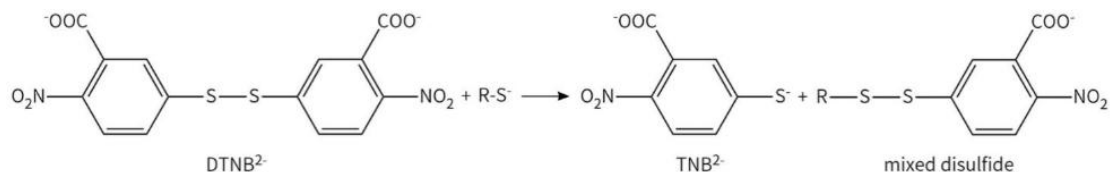


图 1: 蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)工作原理图。

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 个小时即可完成。



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 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。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。

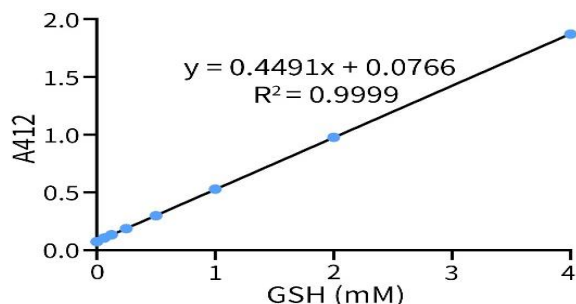


图 2: 默科蛋白质半胱氨酸检测试剂盒(DTNB 法)用于 GSH 标准曲线的检测效果图。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

保存条件

-20°C 保存,有效期两年。4°C 保存,有效期三个月。

GSH 和 DTNB 在配制成溶液后,需适当分装,-20°C 保存至少三个月有效。

Protein Precipitation Solution 须避光保存。

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。

4. 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 100-200 微升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(P0013)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°C 或冰浴匀浆。随后 4°C, 12,000×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 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,用高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)、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。此时测得的蛋白浓度作为 CProtein-1 用于步骤 3 (6) 表格中的计算。

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 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

(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。

(2) **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 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℃ 孵育 1 小时。

(c) 离心: 孵育结束后, 4℃ 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℃ 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默科生产的 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 CProtein-2 用于步骤 3 (6) 表格中的计算。

(3) 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℃)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 3(2)的样品处理, 这样试剂盒可以测定的总次数可以加倍。

(4) 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。

(5) 将 ASample 代入标准曲线, 即可计算出巯基浓度(记录为 B)。

(6) 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	$C (\mu\text{mol/mg}) = B \times n \times V_{\text{Sample}} / W_{\text{Sample}} \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$	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	$C (\mu\text{mol/mg}) = B \times n / C_{\text{Protein-2}}$	$C_{\text{Protein-1}}$: 初始样品蛋白浓度(mg/mL)
按半胱氨酸浓度直接计算	$C (\text{mM}) = B \times n \times (C_{\text{Protein-1}} / C_{\text{Protein-2}})$	$C_{\text{Protein-2}}$: 处理后样品蛋白浓度(mg/mL)

(7) 计算示例: 初始样品的蛋白浓度 $C_{\text{Protein-1}}$ 为 1.6 mg/mL, 步骤 3 样品处理后的样品的蛋白浓度 $C_{\text{Protein-2}}$ 经测定为 1mg/mL, 未经稀释, 反应步骤 3(3)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 $A_{\text{Sample}} = 0.5$, $A_{\text{Blank}} = 0.126$, 则 $A_{\text{Sample}} = 0.374$, 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 $C (\mu\text{mol/mg}) = 0.6622/1 = 0.6622\mu\text{mol/mg}$, 样品中半胱氨酸浓度 $C (\text{mM}) = 0.6622 \times (1.6/1) = 1.06\text{mM}$ 。