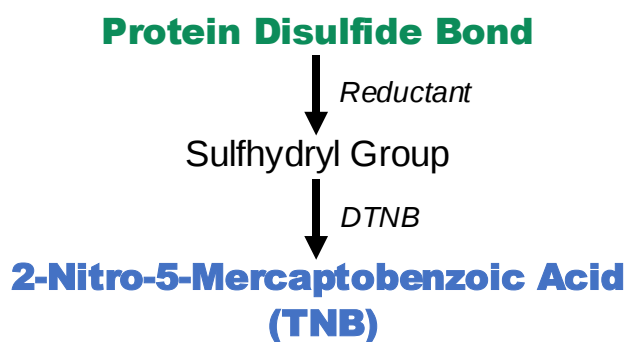




蛋白质二硫键含量检测试剂盒

Protein Disulfide Bond Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



蛋白质二硫键含量检测试剂盒

Protein Disulfide Bond Content Assay Kit

一、产品描述

蛋白质二硫键是指两个半胱氨酸残基之间的共价键，通过二硫键能够将不同的肽链或蛋白质结构域连接在一起，增加蛋白质的稳定性和结构刚性，在蛋白质的折叠和稳定性中起着关键作用，二硫键的形成和断裂可以调节蛋白质的构象变化，从而影响蛋白质的功能和活性。

还原剂会使二硫键裂解，裂解后的巯基会发生亲核反应，即巯基基团能够与 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) 反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测蛋白质二硫键的含量。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	组分 A	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	按照组分 A：组分 B=1:1 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一		液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三		液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四		液体 1.2 mL×1 支	4°C 保存	-
试剂五		粉剂×1 瓶	4°C 保存	-
标准品		粉剂×1 支 (10 mg GSH 标准品)	4°C 保存	使用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 25 μmol/mL GSH 标准液)
标准应用液的制备 (现用现配): 将 25 μmol/mL GSH 标准液使用蒸馏水稀释至 0.1 μmol/mL, 即为标准应用液。				

需自备试剂: 丙酮 (CH_3COCH_3 , MW = 58.08, CAS: 67-64-1)

三、产品使用说明

1. 样本处理 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

①组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 5000 g 离心 10 min, 弃上清, 留沉淀, 在沉淀中加入 2 mL 试剂一, 充分振荡使沉淀溶解, 即为待测样本置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为(500-1000)：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1 mL提取液）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率20%或200 W，超声3 s，间隔10 s，总时间3 min），4℃ 5000 g离心10 min，弃上清，留沉淀，在沉淀中加入2 mL试剂一，充分振荡使沉淀溶解，即为待测样本置于冰上待测。

③液体样本：吸取100 μ L液体样本加入900 μ L丙酮充分混匀，4℃ 5000 g离心10 min，弃上清，留沉淀，在沉淀中加入2 mL试剂一，充分振荡使沉淀溶解，即为待测样本置于冰上待测。

注：①若充分振荡后沉淀无法完全溶解，可4℃ 5000 g离心5 min，取上清作为待测样本；

②加入试剂一后会产生大量气泡，建议使用5 mL离心管操作并缓慢加入试剂一；

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热30 min以上，调节波长至412 nm，蒸馏水调零。

②在2 mL离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
待测样本	300	300	-	-
标准应用液	-	-	300	-
蒸馏水	-	-	-	300
试剂五	3 mg	-	-	-
开盖反应30 min，每隔10 min吹打混匀一次 直至气泡不再产生				
提取液	180	180	180	180
应缓慢加入提取液，并反复吹打至气泡不再产生 (加入提取液期间会有大量气泡产生，建议开盖放置)				
试剂二	180	180	180	180
充分混匀，4℃ 5000 g离心10 min，取上清液				
在96孔板中依次加入下列试剂：				
上清液	140	140	140	140
试剂三	50	50	50	50
测定412 nm处吸光度 记为A1测定和A1对照				
试剂四	10	10	10	10
充分混匀，室温静置10 min				

吸光值测定：测定412 nm处吸光值，记为A2测定、A2对照、A标准和A空白；计算 ΔA 测定 = (A2测定-A1测定) - (A2对照-A1对照)， ΔA 标准=A标准-A空白。注：每个样品均需设一个对照管，空白管只需测定1-2次。

注：第一次测定 412 nm 吸光度并记录 A1 测定和 A1 对照后，直接在 96 孔板中加入试剂四，充分混匀后再进行后续反应和吸光值测定。

3.蛋白质二硫键含量计算

①按组织样本质量计算

$$\text{蛋白质二硫键含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{S1} \times D}{W \times \Delta A_{\text{标准}} \times 2} = \frac{0.1 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织蛋白浓度计算

$$\text{蛋白质二硫键含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}} \times 2} = \frac{0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{蛋白质二硫键含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{S1} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}} \times 2} = \frac{0.1 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{蛋白质二硫键含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{S1} \times D}{V_S \times \Delta A_{\text{标准}} \times 2} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

注释：C 标：标准应用液浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ； V_{S1} ：提取过程中加入试剂一的体积，2 mL； V_S ：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；D：待测样本稀释倍数。

四、注意事项

①若 A 测定或 ΔA 测定大于 1.2，建议将待测样本适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

