

P-32 如何用DTNB定量巯基浓度

. 试剂

DTNB 1 g

. 试剂配制

- 反应用缓冲液 (100 mmol/l 磷酸钠, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA)
- 400 $\mu\text{mol/l}$ DTNB溶液用1 ml反应用缓冲液溶解4 mg DTNB [5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 货号: D029], DTNB浓度为10 mmol/l, 再加入24 ml反应用缓冲液, 稀释成浓度为400 $\mu\text{mol/l}$ 的DTNB溶液。

* 测定时每孔加入DTNB溶液量为100 μl , 请根据自己的样品和L-Cysteine标准液的数量计算所需的DTNB溶液量。

- L-Cysteine标准液

用5 ml反应用缓冲液溶解2.42 mg L-Cysteine, 制成浓度为4 mmol/l的溶液a。用900 μl 反应用缓冲液稀释100 μl 溶液a, 制成浓度为400 $\mu\text{mol/l}$ 的溶液b。

用反应用缓冲液按照1/2比例等比稀释溶液b, 分别制成浓度为200 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$, 12.5 $\mu\text{mol/l}$, 0 $\mu\text{mol/l}$ 的L-Cysteine标准液。

- 样品溶液

根据自己实验需要, 用反应用缓冲液稀释样品 (细胞溶解液、蛋白质溶液等), 制成合适比例的样品溶液。

* 每个样品测定3个复孔, 需要配制>350 μl 的样品溶液。

. 操作步骤

1. 在96孔板设置L-Cysteine标准液的孔, 每孔分别加入100 μl 浓度为200 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$, 12.5 $\mu\text{mol/l}$, 0 $\mu\text{mol/l}$ 的L-Cysteine标准液, 每个L-Cysteine标准液设置3个复孔 (图1)。
2. 在96孔板每孔中加入100 μl 样品溶液, 每个样品溶液设置3个复孔 (图1)。
3. 每孔加入100 μl 400 $\mu\text{mol/l}$ DTNB溶液后, 吹打混匀。
4. 在室温放置15 min后, 用酶标仪测定412 nm的吸光度。
5. 制备L-Cysteine标准曲线 (图2)。
6. 用L-Cysteine标准曲线计算样品溶液中的巯基浓度。
7. 根据样品溶液的稀释比例计算样品中的巯基浓度。

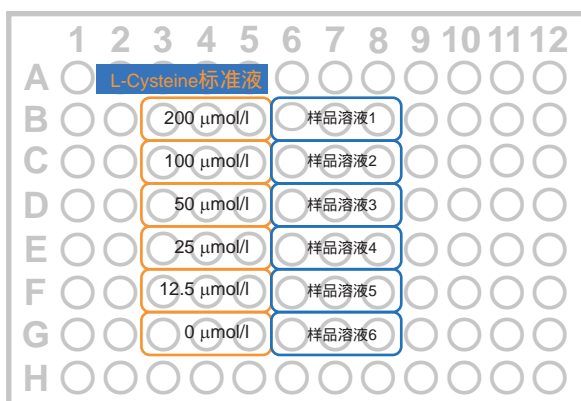


图1. 96孔板的设置

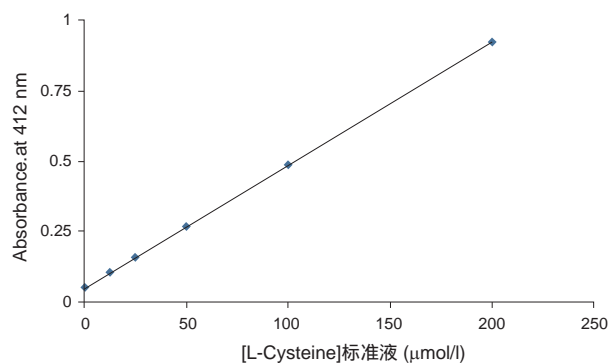


图2. L-Cysteine标准曲线