

Ellman's Reagent (DNTB,pH8.0)使用说明书

【包装规格】

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-----------|------------------------------------|---------|
| ED-8482-A | Ellman's Reagent | 40mg |
| ED-8482-B | 5×Buffer RB | 2×100ml |
| ED-8482-C | Cysteine Hydrochloride Monohydrate | 26.34mg |
| | 使用说明书 | 1 份 |

【保存条件】

4°C 保存，有效期一年。Ellman's Reagent 与 Cysteine Hydrochloride Monohydrate 溶解后-20°C 保存。

【操作步骤】

预先准备：

5×Buffer RB 稀释：取 100ml 5×Buffer RB 加入 400ml 去离子水稀释至 1×Buffer RB 备用。

Ellman's Reagent 试剂溶液：将 40mg Ellman's Reagent 试剂溶解在 10mL 1×Buffer RB 中。

1. 通过将以下浓度的 Cysteine Hydrochloride Monohydrate（盐酸半胱氨酸一水合物）溶解在反应缓冲液 1×Buffer RB 中来制备一组半胱氨酸标准品(根据不同实验要求选择不同标准品及体系)：

| 标准品 | 1×Buffer RB 体积 | 盐酸半胱氨酸一水合物 | 最终浓度 |
|-----|----------------|------------|--------|
| A | 100ml | 26.34mg | 1.5mM |
| B | 5ml | 25ml 标准品 A | 1.25mM |
| C | 10ml | 20ml 标准品 A | 1.0mM |
| D | 15ml | 15ml 标准品 A | 0.75mM |
| E | 20ml | 10ml 标准品 A | 0.5mM |

| | | | |
|---|------|-----------|------------|
| F | 25ml | 5ml 标准品 A | 0.25mM |
| G | 30ml | 0ml | 0.0mM(空白组) |

2. 准备一组试管，每个试管含有 50 μ l Ellman Reagent 试剂溶液和 2.5ml 反应缓冲液 1 \times Buffer RB。

3. 将 250 μ L 的每种标准品或待测物加入步骤 2 中制备的单独试管中，总体积 2.8ml。

注意：对于未知物进行稀释，使应用于测定反应的 250 μ L 样品在标准曲线的工作范围内具有巯基浓度（0.1-1.0mM 是理想的）。

4. 混合并在室温下孵育 15 分钟。

5. 测量 412nm 处的吸光度。

6. 绘制为标准品获得的值以生成标准曲线。从该曲线确定实验样品浓度。

计算示例：使用 1cm 分光光度比色皿将 250 μ L 未知物等分试样与 2.5mL 反应缓冲液 1 \times Buffer RB 和 50 μ L Ellman Reagent 试剂溶液混合，得到 0.879 的吸光度（减去空白后）。计算巯基浓度，单位为 μ mol/mL 未知物。已知 TNB 在 412nm 处的缓冲系统中的摩尔吸收率（摩尔消光系数，以 $M^{-1}cm^{-1}$ 为单位表示）为 14,150。

A = 吸光度，b = 以厘米为单位的比色皿长度，c = 以摩尔/升为单位的浓度 (=M)

求解浓度公式为： $c=A/bE$

本例中：A = 0.879，b = 1cm，E = 14,150 $M^{-1}cm^{-1}$ 。因此， $c = 0.879 / (1 \times 14,150) = 6.21 \times 10^{-5} M$
如果检测浓度为：6.21 $\times 10^{-5} M$ ，则 2.8ml 溶液中含有： $2.8 \times 10^{-3} L \times (6.21 \times 10^{-5} moles/L) = 1.74 \times 10^{-7} moles$ 。

测定溶液中这些 1.74×10^{-7} 摩尔的巯基是由原始的 0.25mL 样品贡献的。因此，原始未知样品中游离巯基的浓度为：

$(1.74 \times 10^{-7} moles) / (0.25 \times 10^{-3} L) \times 1000 mL = 6.96 \times 10^{-4} M$

【参考文献】

Riddles, P.W., et al. (1979) Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. *Anal Biochem* 94:75-81.

Kuwata, K., et al. (1982) Liquid chromatographic determination of alkylthiols via derivatization with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Chem* 54:1082-7.

Masamune, S, et al. (1989) Bio-Claisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramigera*. Active site cysteine residues. *Chemtracts- Organic Chem* 2:247-51.