

## 非蛋白巯基测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

**测定意义：**

生物体内巯基主要包括非蛋白质巯基和蛋白质巯基。巯基化合物在体内具有重要的解毒功能，对生物体的自我调节具有非常重要的生理意义。

**测定原理：**

巯基基团与 5,5’ -二硫代-双-硝基苯甲酸 (DTNB) 反应，生成黄色化合物，在 412nm 处有最大吸收峰。

**需自备的仪器和用品：**

天平、研钵、恒温水浴锅、酶标仪、96 孔板、乙醇和蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 18 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 1mL×1 管，4℃避光保存。

**样品的制备：**

1、按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆，然后 8000g, 4℃离心 10min, 取上清，置冰上待测。

2、血清，培养液 取 0.1mL 样本，加入 0.4mL 提取液，混匀，室温静置 10min，然后 8000g, 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**操作步骤:**

1、酶标仪预热 30min, 调节波长至 412nm。

**2、操作表**

在 96 孔板中加入如下试剂

	对照管	测定管
样品 ( $\mu\text{L}$ )	40	40
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	150	150
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )		10
乙醇 ( $\mu\text{L}$ )	10	
混匀, 25°C静置 10min, 测定 412nm 吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 每个测定管设一个对照管。		

**计算公式:**

非蛋白巯基标准曲线:  $y = 1.8111x - 0.0037$ ,  $R^2 = 1$ ,  $x$  为标品浓度, 单位  $\mu\text{mol/mL}$ ,  $y$  为吸光度  $\Delta A$ 。

**a. 组织:**
**(1) 按样本重量计算**

非蛋白巯基含量 ( $\mu\text{mol/g}$  鲜重) =  $(\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V_{\text{样总}} \div W = 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div W$

**(2) 按样本蛋白浓度计算**

非蛋白巯基含量 ( $\mu\text{mol/mg prot}$ ) =  $(\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V_{\text{样总}} \div C_{\text{pr}} = 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div C_{\text{pr}}$

**b. 血清、培养液:**

非蛋白巯基含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $(\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times 5 \times 10^3 = 2761 \times (\Delta A + 0.0037)$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g ; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白浓度, mg/mL;

5: 血清, 培养液等液体样本稀释倍数; 10<sup>3</sup> : 1mmol/L=10<sup>3</sup>  $\mu\text{mol/L}$

**注意事项:**

最低检出限为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。