

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 1 mL×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 (μL)	40	40
试剂一 (μL)	150	150
试剂二 (μL)		10
乙醇 (μL)	10	
混匀, 25℃静置 10min, 测定 412nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 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 ΔA 。

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

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W : 样品质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL;
5: 血清, 培养液等液体样本稀释倍数; 10^3 : 1mmol/L = $10^3 \mu\text{mol/L}$

注意事项:

最低检出限为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。