

非蛋白巯基测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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。

自备实验用品：

天平、研钵、可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL 玻璃比色皿、乙醇和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 40 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 2mL×1 瓶，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，
3. 取上清，置冰上待测。



操作步骤:

1、 分光光度计预热 30min, 调节波长至 412nm, 双蒸水调零。

2、 操作表

在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

	对照管	测定管
样品 (μL)	200	200
试剂一 (μL)	750	750
试剂二 (μL)		50
乙醇 (μL)	50	

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: $y = 3.6222 x - 0.0037$, $R^2 = 1$, x 为标品浓度, 单位 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, y 为吸光度 ΔA 。

1. 组织:
(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned} \text{非蛋白巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{样总}} \div W \\ &= 0.276 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{非蛋白巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{样总}} \div C_{\text{pr}} \\ &= 0.276 \times (\Delta A + 0.0037) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 血清、培养液:

$$\begin{aligned} \text{非蛋白巯基含量} (\mu\text{mol}/\text{L}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times 5 \times 10^3 \\ &= 1380 \times (\Delta A + 0.0037) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 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 : $1\text{mmol}/\text{L} = 10^3 \mu\text{mol}/\text{L}$

注意事项:

最低检出限为 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。