

非蛋白巯基含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

巯基化合物在生物体内具有重要的解毒功能,可与烯烃类、氢氰酸、醛类、环氧化物、砷和很多重金属产生反应。因此,在动植物受到某些化学毒物干扰后,巯基含量有可能降低,其中非蛋白巯基成分下降得更快。

本试剂盒采用 Ellman 方法,由 DTNB 与样品中的巯基进行反应,在 412nm 处有特征吸收峰,可通过该吸光值计算出非蛋白巯基的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、**甲醇**。

四、非蛋白巯基 (NPT) 的测定:

1、样本制备

① 组织样本

称取约 0.1g 组织,加入 0.4mL 提取液,进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇,室温震荡 10min (防止液体蒸发丢失,可加甲醇补齐),12000rpm,4°C离心 10min,取上清置冰上待测。

【注】: ①根据实验室条件,可先液氮研磨,再加提取液,进行冰浴匀浆。

②根据研究需求,可按组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1:10 的比例进行提取。

② 液体样本

取 0.1ml 液体,加入 0.4mL 提取液,进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇,室温震荡 10min (防止液体蒸发丢失,可加甲醇补齐至 1.3mL),12000rpm,4°C离心 10min,取上清液置冰上待测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min,设置温度在 25°C,设定波长为 412nm。

② 所有试剂在使用前均须在室温或 25°C 水浴锅中温育 10min。

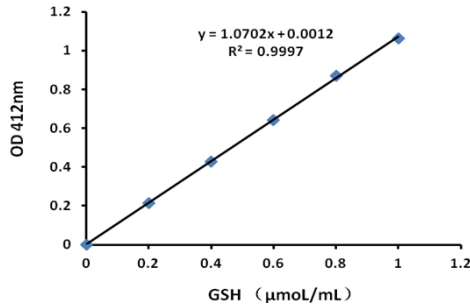
③ 在 96 孔酶标板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样品	30	30
蒸馏水		
试剂一	120	140
试剂二	20	
混匀,25°C静置 2min,于 96 孔板,测定 412nm 吸光值, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: 若加入试剂二有白色浑浊产生,立即混匀样本即可恢复澄清。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=1.0702x+0.0012$ ， x 为标准品摩尔浓度($\mu\text{mol/mL}$)； y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 1.12 \times (\Delta A - 0.0012) \div W\end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned}\text{非蛋白质基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div [(0.1 \times V1) \div (V + 0.1)] \\ &= 12.14 \times (\Delta A - 0.0012)\end{aligned}$$

V ---上清液总体积，1.2mL；

$V1$ ---加入样本体积，0.03 mL；

W ---样本质量，g；

GSH 分子量---307.3。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($10\mu\text{mol/mL}$)：标准品溶解在 2mL 蒸馏水中，(母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
 - 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0，0.2，0.4，0.6，0.8， $1\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
 - 3 依据加样表的测定管操作，根据结果即可制作标准曲线。
-