

总巯基含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

生物体内巯基主要包括谷胱甘肽巯基和蛋白质巯基。前者不仅能够修复氧化损伤的蛋白质,而且参与活性氧清除,后者对于维持蛋白质构象具有重要作用。通过测定总巯基含量和 GSH 含量,能够间接测定蛋白质巯基含量。

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。

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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 26mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2mL×1 瓶	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。

四、总巯基含量测定:

1、样本制备:

① 组织样本

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。然后 10000rpm, 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

澄清的液体样本直接检测,若浑浊则离心后再取上清液检测。

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:

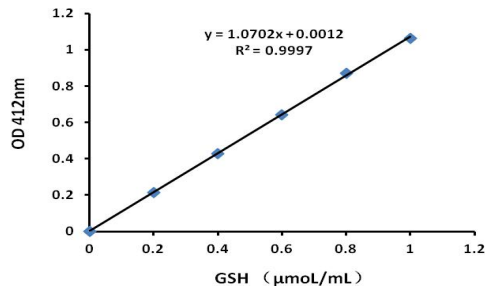
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样品	30	30
试剂一	120	140
试剂二	20	
混匀, 25°C静置 2min, 于 96 孔板, 测定 412nm 吸光值。		
$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】: 1. 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。

2. 若 A 测定值大于 1.5 可减少样本加样体积 V1 (如由 30μL 减至 10μL), 试剂一相应增加, 或者把上清液用蒸馏水稀释后测定, 则改变的 V1 和 D 需带入公式计算。

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：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.9344 \times (\Delta A - 0.0012) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.9344 \times (\Delta A - 0.0012) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.03 mL；

W---样本质量，g； GSH 分子量---307.3；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

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。