

总巯基测定试剂盒说明书

微量法100T/48S

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。

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、恒温水浴锅、酶标仪、96孔板、乙醇和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体18mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体1mL×1管，4°C避光保存。

样品的制备：

1. 按照组织质量（g）：水体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL蒸馏水）进行冰浴匀浆，然后8000g，4°C离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 血清，培养液：稀释5倍后测定，可取0.1mL样本，加入0.4mL蒸馏水，混匀，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°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：

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

1. 组织：

(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V_{\text{样总}} \div W \\ &= 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div W\end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V_{\text{样总}} \div C_{\text{pr}} \\ &= 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

2. 血清、培养液:

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 } (\mu\text{mol/L}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times 5 \times 103 \\ &= 2761 \times (\Delta A + 0.0037)\end{aligned}$$

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; 103 : 1mmol/L=103μmol/ L

注意事项

最低检出限为10μmol/L。