

非蛋白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、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1mL×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。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管设一个对照管。

计算公式：

非蛋白巯基标准曲线: $y = 1.8111x - 0.0037$, $R^2 = 1$, 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

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

2. 血清、培养液:

$$\begin{aligned}\text{非蛋白巯基含量 } (\mu\text{mol/L}) &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times 5 \times 10^3 \\ &= 2761 \times (\Delta A + 0.0037)\end{aligned}$$

$V_{\text{样总}}$: 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=103 $\mu\text{mol/L}$

注意事项

最低检出限为10 $\mu\text{mol/L}$ 。