

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℃ 保存。

试剂二：液体 1mL×1 管，4℃ 避光保存。

样品的制备：

- 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℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 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：

- 酶标仪预热 30min，调节波长至 412nm。
- 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：

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 。

- 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

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

2. 血清、培养液:

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

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; 10^3 : $1\text{mmol/L} = 10^3\mu\text{mol/L}$

注意事项:

最低检出限为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。