

## 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：**

- 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。
- 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（ $\mu\text{L}$ ）	40	40
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	150	150
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）		10
乙醇（ $\mu\text{L}$ ）	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  $\Delta A$ 。

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 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  $10 \mu\text{mol/L}$ 。