

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0360

Size: 100T/48S

总巯基检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

天平、研钵、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 1 mL×1 支	4°C 避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	10mg 还原型谷胱甘肽 (GSH) 临用前加 1.3mL 蒸馏水,浓度为 25 μ mol/mL,取一部分稀释成 0.5 μ mol/mL 待测,其余 4°C 保存

五、操作步骤：

● 样品的制备：

(1) 动物、植物组织：称取约 0.1g，加入 1mL 的提取液，制备成 10%的匀浆，8000g，常温离心 10min，取上清待测。

(2) 血清，培养液：直接测定。

● 测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2. 操作表

	对照管	测定管	标准管	空白管
样品 (μL)	40	40		
标准品 (μL)			40	40
试剂一 (μL)	150	150	150	150
试剂二 (μL)		10	10	
H ₂ O (μL)	10			10

混匀，室温 10min，双蒸水调零，微量玻璃比色皿/96 孔板，测定 412nm 吸光值，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准、A 空白。

六、计算公式：

1、组织：

(1) 按样本鲜重计算

$$\text{总巯基含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = 0.5 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样总} \div W$$

$$= 0.5 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} = 0.5 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{Cpr}$$

2. 血清、培养液:

$$\text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/L)} = 0.5 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times 1000$$

$$= 250 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})$$

0.5: 标准品还原型谷胱甘肽的浓度, $\mu\text{mol/mL}$; 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 ; 1000: 单位换算系数, 1L=1000mL。