

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-S0473

Size: 100T/48S

非蛋白质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。

如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、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。

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：

可见分光光度计/酶标仪、离心机、恒温水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、甲醇、研钵/匀浆器和蒸馏水。

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
提取液一	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	

溶液的配制:

- 1、提取液的配制: 将提取液一和提取液二按体积比 1: 1 的比例混合配制, 按照样本数量配制并在当天用完;
- 2、试剂二: 临用前加入 2 mL 无水甲醇充分溶解备用;
- 3、标准品: 10 mg 半胱氨酸, 临用前加入 1.65 mL 提取液溶解为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 的半胱氨酸标准溶液。

技术指标:

最低检出限: 0.0061 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围: 0.00625-0.8 $\mu\text{mol/mL}$

五、操作步骤:

● 样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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, 10000g, 常温离心 10min, 取上清待测。
2. 细胞或细菌: 按照细胞数量 (10^4 个) 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议500万细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min) 然后 10000g, 常温离心 10min, 取上清置冰上待测。血清 (浆) 培养液: 向0.1mL 血清 (浆) 或培养液中加入1mL 提取液, 10000g, 常温离心10min, 取上清待测。

● 测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品的制备: 将 50 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液用提取液稀释至 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准液, 现用现配。

3. 操作表

	对照管	测定管	标准管	空白管
上清液 (μL)	60	60	—	—
标准品 (μL)	—	—	60	—
试剂一 (μL)	130	130	130	130
试剂二 (μL)	—	20	20	—
H2O (μL)	20			80

混匀，室温放 10min，吸取 200 μL 于微量比色皿/96 孔板中测定 412nm 吸光值，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准、A 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照，算 ΔA 标准=A 标准-A 空白。

六、计算公式

● 标准曲线的绘制：

以标准液浓度为 x 轴 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入公式得到 x (μmol/mL)

1. 非蛋白质巯基含量计算：

(1) 按样本质量计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 (}\mu\text{mol/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

(2) 按血清、培养液体积计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 (}\mu\text{mol/mL)} = x \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{液体}}) \div V_{\text{液体}} = 11 \times x$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 (}\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002 \times x$$

V 提取：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；Cpr，样本蛋白浓度，mg/mL；500：500 万个细胞；V 液体：血清（浆）或培养液体积，0.1mL。

七、注意事项：

如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。