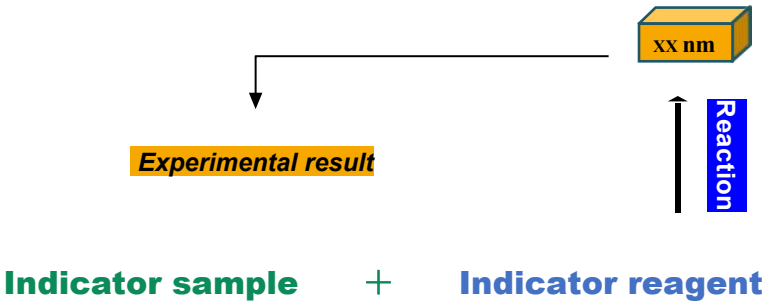
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0473　　规格：100管/48样

非蛋白质巯基含量检测试剂盒说明书
微量法

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。

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致。

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 μmol/mL 的半胱氨酸标准溶液。

产品说明：

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。

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。

技术指标：

最低检出限：0.0061 μmol/mL

线性范围：0.00625-0.8 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。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。

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。

操作步骤：

一、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

3. 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。

二、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50μmol/mL标准溶液用提取液稀释至0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625μmol/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	-
H_2O（μL）	20			80
混匀，室温放置 10min，吸取 200μL 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。				

三、计算公式

1. 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）。
2. 非蛋白质巯基含量计算：

（1）按样本质量计算

非蛋白质巯基含量（μmol/g 质量）=x×V提取÷W=x÷W

（2）按血清、培养液体积计算

非蛋白质巯基含量（μmol/mL）=x×（V提取+V液体）÷V液体=11×x

（3）按细胞数量计算

非蛋白质巯基含量（μmol/10^4cell）=x×V提取÷500=0.002×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。

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。