非蛋白巯基含量测定试剂盒说明书

（分光法 24 样）

一、产品简介：

巯基化合物在生物体内具有重要的解毒功能，可与烯烃类、氢氢酸、醛类、环氧化物、砷和很多重金属产生反应。因此，在动植物受到某些化学毒物干扰后，巯基含量有可能降低，其中非蛋白巯基成分下降得更快。

本试剂盒采用 Ellman 方法，由 DTNB 与样品中的巯基进行反应，在 412nm 处有特征吸收峰，可通过该吸光值计算出非蛋白巯基的含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、**甲醇**。

四、非蛋白巯基（NPT）的测定：

1、样本制备

① 组织样本

称取约 0.1g 组织，加入 0.4mL 提取液，进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇，室温震荡 10min（防止液体蒸发丢失，可加甲醇补齐），12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

【注】：①根据实验室条件，可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆。

②根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1:10 的比例进行提取。

② 液体样本

取 0.1ml 液体，加入 0.4mL 提取液，进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇，室温震荡 10min（防止液体蒸发丢失，可加甲醇补齐至 1.3mL），12000rpm，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

2、上机检测

① 分光光度计预热 30min，设定波长为 412nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂在使用前均须在室温或 25℃水浴锅中温育 10min。

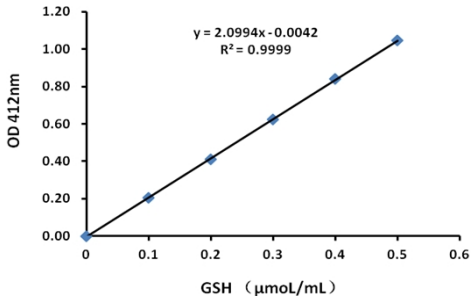
③ 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样品	120	120
蒸馏水		
试剂一	480	560
试剂二	80	
混匀，25℃静置 2min，测定 412nm 吸光值 A， ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】：若加入试剂二有白色浑浊产生，立即混匀样本即可恢复澄清。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y =2.0994x - 0.0042，x 为标准品摩尔浓度(μmoL/mL)；y 为 ΔA。



2、按样本质量计算：

非蛋白质巯基含量(μmoL/g 鲜重)=[(ΔA+0.0042)÷2.0994×V1]÷(W×V1÷V)

=0.572×(ΔA+0.0042)÷W

3、按液体体积计算：

非蛋白质基含量(μmol/mL)=[(ΔA+0.0042)÷2.0994×V1]÷[(0.1×V1÷(V+0.1)]

=6.19×(ΔA+0.0042)

V---加入提取液体积，1.2mL；　　V1---加入样本体积，0.12 mL；

W---样本质量，g；　　GSH 分子量---307.3。

附：标准曲线制作过程：

1　制备标准品母液（10μmol/mL）：标准品溶解在 2mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2　把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5.μmoL/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3　依据加样表的测定管操作，根据结果即可制作标准曲线。