

总巯基含量测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

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。

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。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 55mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4mL×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：

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

四、总巯基含量测定：

1、 样本制备

① 组织样本

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。然后 10000rpm，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

澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后再取上清液检测。

2、 上机检测

① 可见分光光度计预热 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。

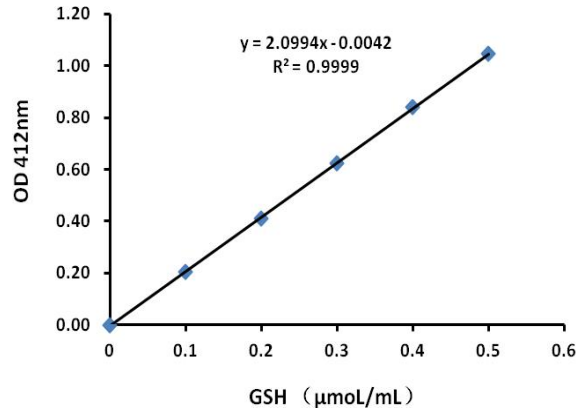
③ 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样品	120	120
试剂一	480	560
试剂二	80	
混匀，25℃静置 2min，测定 412nm 吸光值 A。		
$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【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($\mu\text{mol/mL}$)；y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0042) \div 2.0994 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 0.4763 \times (\Delta A + 0.0042) \div W \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/mL)} &= [(\Delta A + 0.0042) \div 2.0994 \times V1] \div V1 \\ &= 0.4763 \times (\Delta A + 0.0042) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.12 mL；

W---样本质量，g。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1μmol/mL）：标准品溶解在 2mL 蒸馏水中。
- 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。