

非蛋白巯基含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10044W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、**甲醇**、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取

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。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 0.4mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 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, 离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设置温度在 25℃, 设定波长为 412nm。

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 96 孔酶标板中依次加入:

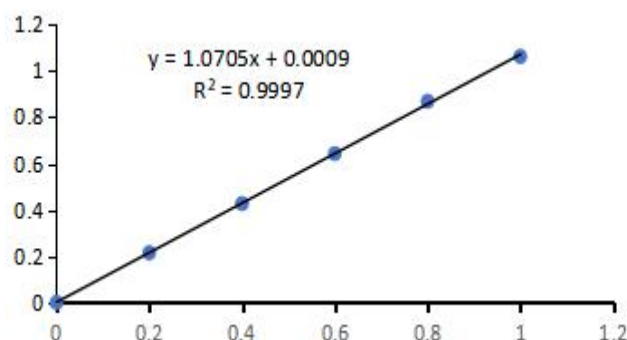
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样品	30	30

蒸馏水		
试剂一	120	140
试剂二	20	
混匀，25℃静置 2min，于 96 孔板，测定 412nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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： $y = 1.0705x + 0.0009$ ， x 为标准品摩尔质量($\mu\text{mol/mL}$)； y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0009) \div 1.0705 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 1.121 \times (\Delta A - 0.0009) \div W \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0009) \div 1.0705 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \\ &= 1.121 \times (\Delta A - 0.0009) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0009) \div 1.0705 \times V1] \div [(0.1 \times V1 \div (V + 0.1))] \\ &= 12.14 \times (\Delta A - 0.0009) \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0009) \div 1.0705 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \\ &= 1.121 \times (\Delta A - 0.0009) \div 500 \end{aligned}$$

V ---上清液总体积，1.2mL； $V1$ ---加入样本体积，0.03 mL；

W ---样本质量，g； GSH 分子量---307.3。

500---细菌或细胞总数，万

Cpr ---样本蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 制备标准品母液（ $1\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品加 2mL 蒸馏水，充分溶解，（母液需在两天内用且-20℃保存）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.2，0.4，0.6，0.8， $1\mu\text{mol/mL}$ ，也可根据实际样本调整标准品浓度；
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品母液 μL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	120	120
试剂二	20	20
混匀，25°C静置 2min，于 96 孔板，测定 412nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		