

总巯基含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10061W 微板法 96 样 保质期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 26mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 2mL×1 瓶	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、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 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。

③ 细菌/培养细胞

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中, 加 1mL 的提取液, 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); 10000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清测定。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min (等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:

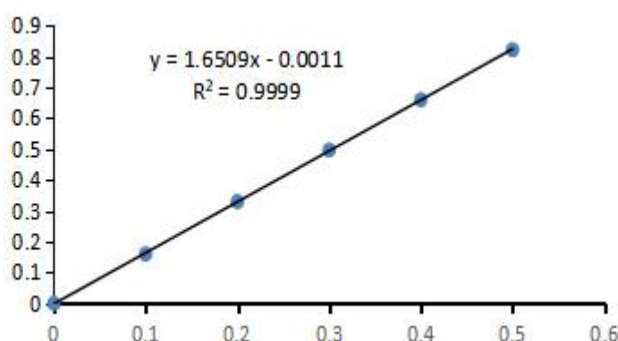
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样品	30	30
试剂一	120	140
试剂二	20	

混匀，25℃静置 2min，于 96 孔板，测定 412nm 吸光值。
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。

- 【注】：1. 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。
 2. 若 A 测定值大于 1.5 可减少样本加样体积 V1（如由 30μL 减至 10μL），试剂一相应增加，或者把上清液用蒸馏水稀释后测定，则改变的 V1 和 D 需带入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 1.6509x - 0.0011$ ，x 为标准品摩尔浓度(μmol/mL)；y 为 ΔA 。



- 2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 1.6509 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.6057 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

- 2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 1.6509 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.6057 \times (\Delta A + 0.0011) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

- 3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 1.6509 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.6057 \times (\Delta A + 0.0011) \times D \end{aligned}$$

- 2、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 1.6509 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.6057 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.03 mL；
 W---样本质量，g； GSH 分子量---307.3；
 D---稀释倍数，未稀释即为 1； 500---细菌或细胞总数，万；
 Cpr---上清液蛋白浓度，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（1μmol/mL）：标准品中加入 2ml 蒸馏水，充分溶解，即 1μmol/mL 标准品母液；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5μmol/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：

吸取标准品母液 500uL，加入 500ml 蒸馏水，混匀得到 0.5.μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	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，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℃静置 2min，于 96 孔板，测定 412nm 吸光值。 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		