

总巯基含量 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10061W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.01-1 $\mu\text{mol/mL}$

灵敏度：0.01 $\mu\text{mol/mL}$

有效期：6个月

保存温度：2-8 $^{\circ}\text{C}$

检测原理:

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。巯基化合物与 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)反应，在中性或碱性条件下，生成黄色产物，并且在 412nm 处有最大吸收峰。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂名称	规格（48T/20S）	规格（96T/44S）	保存条件
试剂一	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	0.5mL×1 瓶	1mL×1 瓶	2-8℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光

试剂盒组分：

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、恒温箱、无水乙醇。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $0.01-1 \mu\text{mol/mL}$, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为提取液。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **血清(浆)等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。
4. **动物、植物组织样本**: 按照组织重量 (g): 蒸馏水体积 (mL) = 1:5~10 的比例 (称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 的蒸馏水), 冰浴匀浆, 10000 g, 常温离心 10min, 取上清待测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **5 μ mol/mL 标准品母液的配制:** 取一瓶标准品中加入 1.96mL 蒸馏水混匀为 5 μ mol/mL。
3. **标准工作液配置:** 5 μ mol/mL 标准品母液按下表用对应量的蒸馏水稀释成以下浓度的标准品工作液: 0 μ mol/mL、0.05 μ mol/mL、0.1 μ mol/mL、0.2 μ mol/mL、0.4 μ mol/mL、0.6 μ mol/mL、0.8 μ mol/mL、1.0 μ mol/mL。
(注: 配制目标浓度的标准品工作液时, 每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。)

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (μ mol/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
5 μ mol/mL 标准品(μ L)	0	10	20	40	80	120	160	200
蒸馏水(μ L)	1000	990	980	960	920	880	840	800

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线; 本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出, 若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入):

试剂名称(μ L)	对照孔	测定孔	标准孔
样本	40	40	
不同浓度标准品			40
试剂一	150	150	150
试剂二		10	10
无水乙醇	10		
混匀, 室温准确静置 10min, 在 412nm 处测定各孔 OD 值。			

注: 每个测定孔需设一个对照孔。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$

2. 液体样本

(1) 按样本质量计算：总巯基含量（ $\mu\text{ mol/g 质量}$ ） $=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{样总}}\div W\times N=(\Delta A-b)\div a\div W\times N$

(2) 按样本蛋白浓度计算：总巯基含量（ $\mu\text{ mol/mg prot}$ ） $=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{样总}}\div (Cpr\times V_{\text{样总}})\times N=(\Delta A-b)\div a\div Cpr\times N$

(3) 按血清、培养液体积计算：总巯基含量（ $\mu\text{ mol/L}$ ） $=(\Delta A-b)\div a\times V_{\text{样}}\div (V_{\text{样}}\times 10^{-3})\times N=1000\times(\Delta A-b)\div a\times N$

注：

a: 标曲的斜率

ΔA : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

b: 标曲的截距

$V_{\text{样总}}$: 加入蒸馏水体积，1mL

x: 标准品浓度

W: 样品质量，g

$V_{\text{样}}$: 加入的样本体积，0.04mL

10^{-3} : 单位换算系数，1mL= 10^{-3} L。

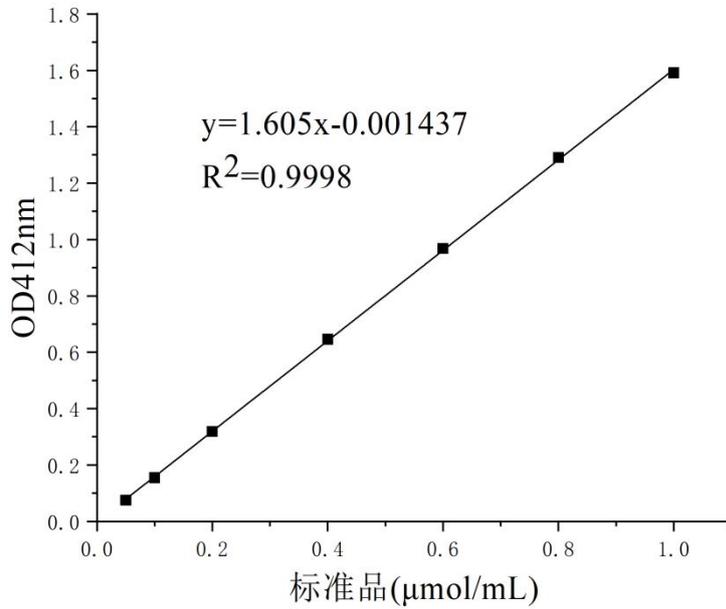
y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

Cpr: 样本的蛋白浓度，mg/mL

N: 样本稀释倍数

参考曲线:

$y=1.605x-0.001437, R^2=0.9998$, x 是标准品的浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。