总巯基测定试剂盒说明书

分光光度法　50 管/24 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

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。

测定原理

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。

自备实验用品

天平、研钵、可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL 玻璃比色皿、乙醇和蒸馏水。

试剂组成和配制

试剂一：液体 40 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 2 mL×1 瓶，4℃避光保存。

样品的制备：

1. 按照组织质量（g）：水体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水）进行冰浴匀浆，然后 8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 血清，培养液：稀释 5 倍后测定，可取 0.1mL 样本，加入 0.4mL 蒸馏水，混匀，置冰上待测。

操作步骤

1、分光光度计预热 30min，调节波长至 412nm，双蒸水调零。

2、操作表

在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

	对照管	测定管
样品（μL）	200	200
试剂一（μL）	750	750
试剂二（μL）		50
乙醇（μL）	50	
混匀，25℃静置 10min，　测定 412nm 吸光值，ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管设一个对照管。		

计算公式

总巯基标准曲线：y =3.6222 x- 0.0037，R^2 = 1，x 为标品浓度，单位 μmol/mL，　y 为吸光度 ΔA。

1. 组织：

（1）按样本重量计算

总巯基含量（μmol/g 鲜重）=（ΔA+0.0037）÷3.6222 ×V 样总÷W

=0.276×（ΔA+0.0037）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

总巯基含量（μmol/mg prot）=（ΔA+0.0037）÷3.6222×V 样总÷Cpr

=0.276×（ΔA+0.0037）÷Cpr

2. 血清、培养液：

总巯基含量（μmol/L）=（ΔA+0.0037）÷3.6222 ×5×10^3

=1380×（ΔA+0.0037）

V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，g ；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；5：血清，培养液等液体样本稀释倍数；10^3 ：1mmol/L=10^3μmol/ L

注意事项

最低检出限为 10μmol/L。