

总巯基含量检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10298

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 1 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

标准品: 10 mg 还原型谷胱甘肽 (GSH), 临用前加入 1.3 mL 蒸馏水, 浓度为 25 $\mu\text{mol/mL}$, 4°C保存。**产品说明:**

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。

技术指标:最低检出限: 0.0088 $\mu\text{mol/mL}$ 线性范围: 0.015625-1 $\mu\text{mol/mL}$

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

天平、研钵/匀浆器、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

动物、植物组织: 称取约 0.1g, 加入 1mL 的提取液, 制备成 10%的匀浆, 8000g, 常温离心 10min, 取上清待测。

血清, 培养液: 直接测定。

二、测定步骤

- 分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至412nm, 蒸馏水调零。
- 标准品的制备: 将25 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液用蒸馏水稀释至0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准液, 现用现配。
- 操作表

	对照管	测定管	标准管	空白管
样本 (μL)	40	40		
标准品 (μL)			40	
试剂一 (μL)	150	150	150	150
试剂二 (μL)		10	10	
H ₂ O (μL)	10			50

混匀，室温10min，测定412nm吸光值，分别记为A对照、A测定、A标准、A空白。并计算ΔA标准=A标准-A空白、ΔA测定=A测定-A对照。

三、计算公式

1、标准曲线的绘制：

以标准液浓度为x轴，ΔA标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将ΔA测定代入公式得到x (μmol/mL)。

2、总巯基含量计算：

(1) 按样本质量计算：总巯基含量 (μmol/g 质量) = $x \times V_{\text{样总}} \div W = x \div W$

(2) 按样本蛋白浓度计算：总巯基含量 (μmol/mg prot) = $x \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = x \div C_{\text{pr}}$

(3) 按血清、培养液体积计算：总巯基含量 (μmol/L) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times 10^{-3}) = 1000x$

V样总：加入提取液体积，1mL；V样：加入的样本体积，0.04mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10⁻³：单位换算系数，1mL=10⁻³L。

注意事项：

如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

相关发表文献：

[1] Yang X, Xu J, Fu C, et al. The cataract-related S39C variant increases γS-crystallin sensitivity to environmental stress by destroying the intermolecular disulfide cross-links[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020.