

# 微量总巯基测试盒说明书(精简版)

(货号: A063-2-1 微量酶标法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

C<sub>标准</sub>: 标准液浓度, 500μmol/L;  
C<sub>pr</sub>: 组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)。

## 一、试剂的组成与配制: (48T)

试剂一: 标准品粉剂, 3支, 4℃密封保存6个月。

10mmol/L 标准品贮备液的配制: 每次测定前将1支标准品粉剂加1mL试剂三缓冲液溶解, 即为10mmol/L标准品贮备液, 4℃密封保存。

500μmol/L 的标准应用液的配制: 10mmol/L 标准品: 试剂三缓冲液=1:19 即20倍稀释配成应用液, 按所需量现用现配。

试剂二: 透明剂, 2mL×1瓶, 4℃密封保存12个月(天冷时会凝固, 每次测试前适当水浴加温以加速溶解, 直至透明方可应用)。

试剂三: 缓冲液, 20mL×1瓶, 4℃密封保存6个月。

试剂四: 显色剂, 3mL×1瓶, 4℃避光保存6个月。

工作液一的配制: 按试剂二: 试剂二: 试剂四=1:50:25的比例混合, 用多少配多少。

工作液二的配制: 按试剂二: 试剂二=1:75的比例混合, 用多少配多少。

[注]: 按所需检测的样本数加上标准孔及标准空白孔的数, 再放宽2孔进行工作液的配制(避免吸到最后试剂量不够)。工作液需现用现配, 最多可保存1~2天。

[注]: 本试剂盒2℃~8℃密封保存6个月

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含405nm波长的酶标仪及96孔板(附送一块)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或PBS(0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、操作步骤:

### 1、样本前处理:

组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9的比例, 加入9倍体积的生理盐水, 冰浴条件下机械匀浆, 制成10%的组织匀浆, 2500转/分, 离心10分钟, 取上清液待测。

血清(浆)样本: 直接取样10μL

### 2、操作表:

	标准孔	空白孔	测定孔	对照孔
500μmol/L 标准	10μL			
试剂三		10μL		
待测样本			10μL	10μL
工作液一	150μL	150μL	150μL	
工作液二				150μL

轻轻摇动孔板, 静置5分钟, 405nm波长, 用酶标仪测定各孔吸光度OD值(30分钟内完成比色)

注: 1、操作之前注意先将空板读取一下吸光度, 防止孔间差异影响老师的结果。

2、96孔板操作, 反应液中绝对不可以产生气泡(气泡会影响测定), 所以加工作液时可以考虑用微量法。

(微量法: 用移液器时, 吸液前将移液器按到底部, 吸取的液体会比所需的液体要多, 加样时, 按到该加样的档位)

## 四、计算公式:

### 组织中巯基计算公式:

$$\text{组织中总巯基含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

### 血清中巯基计算公式:

$$\text{血清中总巯基含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

## 五、测定原理:

5, 5'-二硫代双, 2-硝基苯甲酸(DTNB)与巯基化合物反应时能产生一种黄色化合物, 可进行比色定量测定。

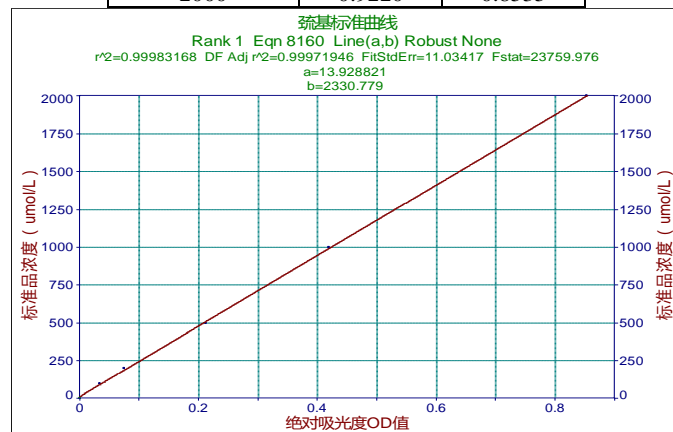
## 六、检测意义:

活性巯基(SH)主要存在于半胱氨酸, 是蛋白质结构和生物体内某些氧化还原反应重要基团。在蛋白质结构中2个巯基脱氢而形成的双硫键, 使相邻多肽得以连接。对于维持蛋白质完整结构十分重要。所有动物组织都含有不同量的活性巯基, 机体内起重要作用的谷胱甘肽, 其生理作用主要是靠所含半胱氨酸中活性巯基起还原作用。巯基还是很多酶活性基团, 一些重金属盐如Hg<sup>2+</sup>等与酶巯基结合, 影响酶活性。巯基化合物与机体许多机能活动, 药物及毒物的作用以及某些疾病的发生发展有着密切关系。测定组织和血液中巯基含量已日益为人们所重视, 以期探索对某些疾病的发生机理、治疗、预防以及预后判断等方面的研究意义。

## 七、标准曲线的制备:

取一定量的10mmol/L标准品贮备液用试剂三缓冲液配制成不同浓度的标准制作标准曲线: 0mmol/L、100μmol/L、200μmol/L、500μmol/L、1000μmol/L、2000μmol/L。

浓度(μmol/L)	测定OD值	绝对OD值
0	0.0685	0.0000
100	0.1025	0.0340
200	0.1440	0.0755
500	0.2805	0.2120
1000	0.4880	0.4195
2000	0.9220	0.8535



## 八、技术参数

试剂盒灵敏度: 0.01mmol/L