

微量分型巯基测试盒说明书（精简版）

（货号：A063-4-1 24T 酶标微板法）

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

一、试剂的组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：标准品粉剂，3 支，4℃保存。

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（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℃保存。

试剂四：显色剂，3mL×1 瓶，4℃避光保存。

工作液配制：按试剂二：试剂三=1：50 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。

试剂五：沉淀剂，10mL×1 瓶，室温保存（过饱和溶液，如有结晶析出，直接取上清使用）。

96 孔板：一块（本公司赠送）。

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）、37℃ 水浴锅或恒温箱、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、血清（浆）样本前处理：

①、总巯基：直接取样进行测定。

②、非蛋白巯基：

待测样本：取血清（浆）50μL,加入 150μL 试剂五沉淀剂（也可按照样本：试剂五=1：3 比例上下调整），充分混匀 3500-4000 转/分离心 10 分钟，取上清 10μL 待测；

待测标准：取 500μmol/L 的标准应用液 50μL，加入 150μL 试剂五沉淀剂，充分混匀后取 10μL 待测（此时标准应用液浓度为 125μmol/L）

2、动、植物组织、培养细胞前处理：

动物组织：准确称取待测动物组织的重量，按重量体积比（动物组织：生理盐水=1g：9mL），将动物组织剪碎后加生理盐水用匀浆机或匀浆管制备成 10%的动物组织匀浆，2500~3000 转/分，离心 10 分钟取上清（即 10%组织匀浆）待测。

植物组织：准确称取待测植物组织的重量，按重量体积比（植物组织：0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液=1g：9mL），将植物组织剪碎后加 0.1mol/L pH 7~7.4 磷酸盐缓冲液用匀浆机或匀浆管制备成 10%的植物组织匀浆，3500~4000 转/分，离心 10 分钟取上清（即 10%组织匀浆）待测。

培养细胞：将细胞进行胰酶消化（也可将细胞直接刮下），取出细胞及液体放入试管，1000 转/分~3000 转/分，离心 5 分钟，弃上清，留沉淀细胞，再加入 1mL 生理盐水轻轻吹打混匀（将胰酶及部分培养液洗去），1000 转/分~3000 转/分，离心 5 分钟，

弃上清，留沉淀细胞加入 0.2~0.3mL 的生理盐水进行匀浆（匀浆的方法有多种：例如① 加细胞裂解液裂解细胞；② 在冰水浴下超声粉碎细胞；③ 手动匀浆管进行匀浆；④ 在冰水浴下用卡富隆电动玻璃匀浆器电动研磨，每次 5~10 秒，间隔 20 秒，总共研磨 3~4 次），取匀浆液待测。

①、总巯基：直接取样进行测定。

②、非蛋白巯基：

待测样本：取匀浆 50μL,加入 150μL 试剂五沉淀剂（也可按照样本：试剂五=1：3 比例上下调整），充分混匀，3500-4000 转/分离心 10 分钟，取上清 10μL 待测；

待测标准：取 500μmol/L 的标准应用液 50μL，加入 150μL 试剂五沉淀剂，充分混匀后取 10μL 待测（此时标准应用液浓度为 125μmol/L）。

3、操作表：

总巯基测定表	空白孔	标准孔	测定孔
试剂三（μL）	10		
500μmol/L 标准（μL）		10	
总 SH 待测样本（μL）			10
工作液（μL）	100	100	100
轻轻摇动孔板，静置 5 分钟，405nm 处，酶标仪测定各孔 OD 值 A ₁			
试剂四（μL）	50	50	50
轻轻摇动孔板，静置 5 分钟，405nm 波长，酶标仪测定各孔 OD 值 A ₂ ，计算 ΔA=A ₂ -A ₁			

非蛋白巯基测定表	空白孔	标准孔	测定孔
试剂五（μL）	10		
125μmol/L 标准（μL）		10	
非蛋白 SH 待测样本（μL）			10
工作液（μL）	100	100	100
轻轻摇动孔板，静置 5 分钟，405nm 处，酶标仪测定各孔 OD 值 A ₁			
试剂四（μL）	50	50	50
轻轻摇动孔板，静置 5 分钟，405nm 波长，用酶标仪测定各孔 OD 值 A ₂ ，计算 ΔA=A ₂ -A ₁			

注 1：96 孔板操作，反应液中绝对不可以产生气泡（气泡会影响读数），所以加工作液时可以考虑用差量法。（差量法：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，按到该加样的档次）

注 2：如果测定 ΔA 值较小（或接近空白孔 ΔA 值），说明样本中巯基含量较低，此时可以将样本加入量（以及空白孔的试剂三或试剂五的量和标准孔的标准液加入量）增加（如取 20μL 或 50μL），而其它试剂量不变，且标准液的浓度需要降低（降低的倍数和上样量增加的倍数相同），计算时标准液浓度为稀释后的浓度。

三、计算公式：

（一）、血清（浆）中巯基计算公式：

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

$$\text{血清中非蛋白巯基含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A_{\text{非蛋白SH测定}} - \Delta A_{\text{非蛋白SH空白}}}{\Delta A_{\text{非蛋白SH标准}} - \Delta A_{\text{非蛋白SH空白}}} \times C_{\text{非蛋白SH标准}} \times N$$

蛋白结合的巯基（μmol/L）=总巯基-非蛋白巯基

C_{总SH标准}：总巯基操作标准液浓度，500μmol/L；



C 非蛋白 SH 标准：非蛋白巯基操作标准液浓度，125 $\mu\text{mol/L}$ ；

N：样本测定前稀释倍数（分型巯基的样本测定前稀释倍数为 4（样本:沉淀剂=1:3））。

（二）、组织中巯基计算公式：

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

$$\text{组织中非蛋白巯基含量 } (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\Delta A_{\text{非蛋白SH测定}} - \Delta A_{\text{非蛋白SH空白}}}{\Delta A_{\text{非蛋白SH标准}} - \Delta A_{\text{非蛋白SH空白}}} \times C_{\text{非蛋白SH标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

C 总 SH 标准：总巯基操作标准液浓度，500 $\mu\text{mol/L}$ ；

C 非蛋白 SH 标准：非蛋白巯基操作标准液浓度，125 $\mu\text{mol/L}$ ；

N：样本测定前稀释倍数（分型巯基的样本测定前稀释倍数为 4（样本:沉淀剂=1:3））；

Cpr：组织匀浆蛋白浓度，gprot/L。

蛋白结合的巯基（ $\mu\text{mol/g 蛋白}$ ）=总巯基 - 非蛋白巯基

四、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。

五、所需仪器：

单道移液器：可进行单孔的加样工作

多道移液器：可进行 8 或 12 孔的加样工作

酶标仪，用于微量样品比色分析，吸光度值测定

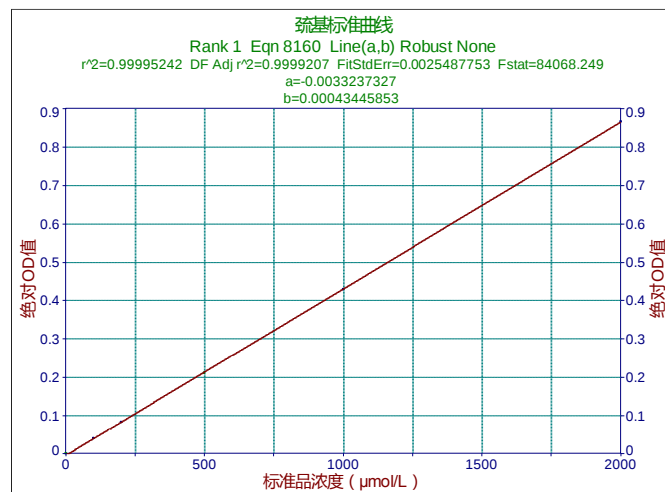
六、检测意义：

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^{2+} 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 (0mmol/L、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 、2000 $\mu\text{mol/L}$) 按标准孔的操作制作标准曲线：。

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	A ₁	A ₂	A ₂ -A ₁	绝对 OD
0	0.043	0.113	0.07	0
100	0.044	0.155	0.111	0.041
200	0.044	0.195	0.152	0.082
500	0.042	0.323	0.281	0.211
1000	0.042	0.542	0.5	0.43
2000	0.041	0.978	0.937	0.867



八、技术参数

试剂盒灵敏度：0.01mmol/L