

微量总巯基测试盒说明书

（货号：A063-2-1 微量酶标法 48T）

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℃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：试剂三：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：试剂三=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。

二、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，按到该加样的档位)

三、计算公式：

组织中巯基计算公式：

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

血清中巯基计算公式：

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

C_{标准}:标准液浓度,500μmol/L;

C_{pr}:组织匀浆蛋白浓度,gprot/L(prot 指蛋白)。

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。

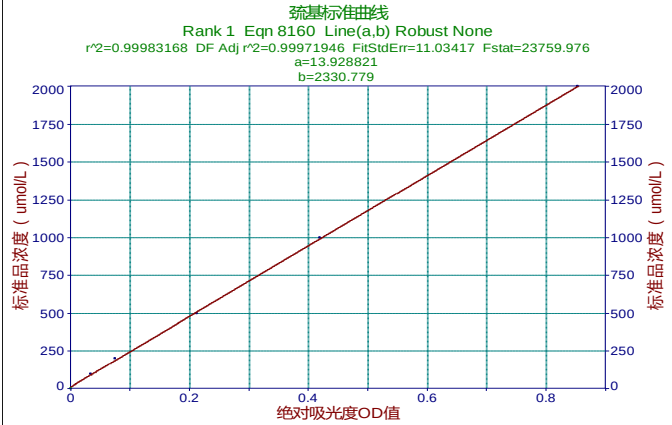
五、检测意义：

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 Hg²⁺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。

六、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



七、技术参数

试剂盒灵敏度：0.01mmol/L