

非蛋白巯基含量测定试剂盒说明书

(货号: G0121F 分光法 24 样)

一、产品简介:

巯基化合物在生物体内具有重要的解毒功能,可与烯烃类、氢氰酸、醛类、环氧化物、砷和很多重金属产生反应。因此,在动植物受到某些化学毒物干扰后,巯基含量有可能降低,其中非蛋白巯基成分下降得更快。

本试剂盒采用 Ellman 方法,由 DTNB 与样品中的巯基进行反应,在 412nm 处有特征吸收峰,可通过该吸光值计算出非蛋白巯基的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、甲醇。

四、非蛋白巯基(NPT)的测定:

1、样本制备

① 组织样本

称取约 0.1g 组织,加入 0.4mL 提取液,进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇,室温震荡 10min(防止液体蒸发丢失,可加甲醇补齐),12000rpm,4°C 离心 10min,取上清置冰上待测。

【注】:①根据实验室条件,可先液氮研磨,再加提取液,进行冰浴匀浆。

②根据研究需求,可按组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:10 的比例进行提取。

② 液体样本

取 0.1ml 液体,加入 0.4mL 提取液,进行冰浴匀浆。然后加入 0.8mL 甲醇,室温震荡 10min(防止液体蒸发丢失,可加甲醇补齐至 1.3mL),12000rpm,4°C 离心 10min,取上清液置冰上待测。

2、上机检测

① 分光光度计预热 30min,设定波长为 412nm,蒸馏水调零。

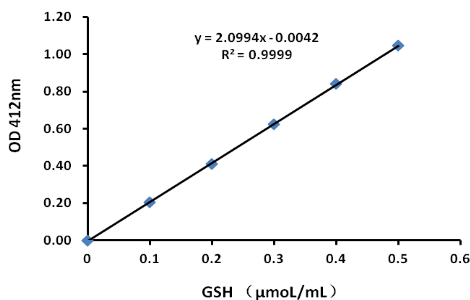
② 所有试剂在使用前均须在室温或 25°C 水浴锅中温育 10min。

③ 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样品	120	120
试剂一	480	560
试剂二	80	
混匀,25°C 静置 2min,测定 412nm 吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=2.0994x - 0.0042$ ，x 为标准品摩尔浓度($\mu\text{mol/mL}$)；y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0042) \div 2.0994 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 0.572 \times (\Delta A + 0.0042) \div W \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A + 0.0042) \div 2.0994 \times V1] \div [(0.1 \times V1) \div (V + 0.1)] \\ &= 6.19 \times (\Delta A + 0.0042) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1.2mL；

V1---加入样本体积，0.12 mL；

W---样本质量，g；

GSH 分子量---307.3。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $10\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品溶解在 2mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且 -20°C 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表的测定管操作，根据结果即可制作标准曲线。