

非蛋白巯基含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY021 微板法 48 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、氢氢酸、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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉剂 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:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长为 412nm。

② 所有试剂在使用前均须在室温或 25°C 水浴锅中温育 10min。

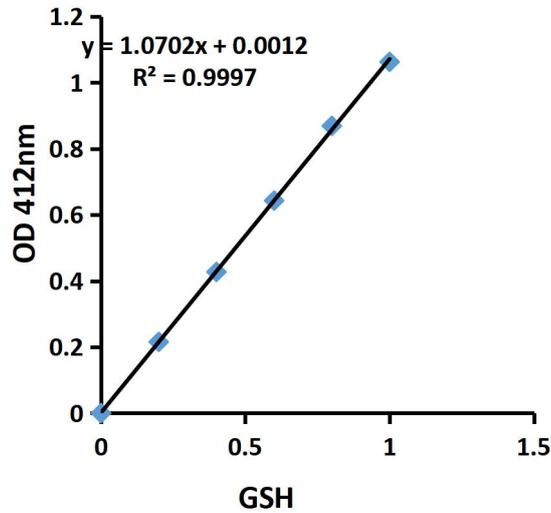
③ 在 96 孔酶标板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样品	30	30
蒸馏水		
试剂一	120	140
试剂二	20	
混匀, 25°C 静置 2min, 于 96 孔板, 测定 412nm 吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: 若加入试剂二有白色浑浊产生, 立即混匀样本即可恢复澄清。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y=1.0702x + 0.0012$, x 为标准品摩尔质量($\mu\text{mol/mL}$); y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质巯基含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 1.12 \times (\Delta A - 0.0012) \div W \end{aligned}$$

3、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{非蛋白质基含量}(\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - 0.0012) \div 1.0702 \times V1] \div [(0.1 \times V1) \div (V + 0.1)] \\ &= 12.14 \times (\Delta A - 0.0012) \end{aligned}$$

V---上清液总体积, 1.2mL;

V1---加入样本体积, 0.03 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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol/mL}$ 。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。