

CheKine™ 总巯基测定试剂盒（微量法）

Cat #: KTB2310

Size: 48 T/24 S

96 T/48 S

	总巯基测定试剂盒（微量法）		
REF	货号: KTB2310	LOT	批号: 见产品标签
	检测范围: 0.008-0.5 $\mu\text{mol/mL}$		灵敏度: 0.008 $\mu\text{mol/mL}$
	适用样本: 动植物组织、血清（浆）或其他液体		
	保质期: 4°C避光保存 6 个月		

原理

生物体内巯基主要包括谷胱甘肽巯基和蛋白质巯基。前者不仅能够修复氧化损伤的蛋白质，而且参与活性氧清除，后者对于维持蛋白质构象具有重要作用。通过测定总巯基含量和谷胱甘肽含量，能够间接测定蛋白质巯基含量。巯基基团与 5, 5'-二硫代-双-硝基苯甲酸（DTNB）反应，生成黄色化合物，在 412 nm 处有最大吸收峰。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Reagent I	12 mL	24 mL	4°C
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C，避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C，避光保存

注意：正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或可见分光光度计（能测 412 nm 处的吸光度）
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
- 恒温水浴锅、制冰机、离心机
- 去离子水、无水乙醇
- 匀浆器或研钵（如果是组织样本）

试剂准备

Reagent I: 即用型；使用前，平衡到室温。4°C 保存。

Reagent II: 临用前配制；48 T 加入 0.8 mL 无水乙醇，96 T 加入 1.6 mL 无水乙醇充分溶解备用。4°C 避光可以保存一个月。

注意：**Reagent II** 有毒，建议在通风橱进行实验。

Standard: 临用前配制；加入 1.3 mL 去离子水配制成 25 μmol/mL 的谷胱甘肽标准品备用，4℃避光可保存 2 周。

标准品制备: 使用 25 μmol/mL 谷胱甘肽标准液，按照下表所示，进一步稀释成标准品：

序号	Standard 体积	去离子水体积 (μL)	浓度 (μmol/mL)
Std.1	20 μL 25 μmol/mL Standard	980	0.5
Std.2	500 μL of Std.1 (0.5 μmol/mL)	500	0.25
Std.3	500 μL of Std.2 (0.25 μmol/mL)	500	0.125
Std.4	500 μL of Std.3 (0.125 μmol/mL)	500	0.063
Std.5	500 μL of Std.4 (0.063 μmol/mL)	500	0.031
Std.6	500 μL of Std.5 (0.031 μmol/mL)	500	0.016
Std.7	500 μL of Std.6 (0.016 μmol/mL)	500	0.008
Blank	0	500	0

注意：每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- 1. 组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水，冰浴匀浆，8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 2. 血清（浆）等液体样本：直接测定。若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：**KTD3001** 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm。可见分光光度计用去离子水调零。
- 2. 酶促反应（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中进行）：

试剂	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)	标准孔 (μL)	空白孔 (μL)
样本上清	40	40	0	0
Standard	0	0	40	0
Reagent I	150	150	150	150
Reagent II	10	0	10	0
无水乙醇	0	10	0	50

混匀，25℃静置 10 min 后，于 412 nm 处测定吸光值，分别记为 A_{测定}、A_{对照}、A_{标准}、A_{空白}，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

注意：每个测定孔需设一个对照孔，标准曲线和空白孔只用测 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测定}$ 小于 0.01 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测定}$ 大于 0.8，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴， $\Delta A_{标准}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 总巯基含量的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

总巯基含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$)= $x \times V_{\text{样总}} \div \text{Cpr} = x \div \text{Cpr}$

(2) 按样本鲜重计算：

总巯基含量 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$)= $x \times V_{\text{样总}} \div W = x \div W$

(3) 按样本体积计算：

总巯基含量 ($\mu\text{mol/mL}$)= x

$V_{\text{样总}}$ ：加入去离子水体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

结果展示

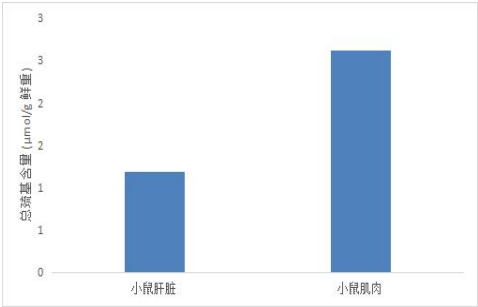


Figure 1. 本试剂盒测定小鼠肝脏和小鼠肌肉中总巯基的含量

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

