CheKine™ 总巯基测定试剂盒（微量法）

货号: KTB2310　　规格: 48 T/24 S　96 T/48 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.008-0.5 μmol/mL		**灵敏度：**0.008 μmol/mL
	适用样本：动植物组织、血清（浆）或其他液体		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	**96 T**	
Reagent Ⅰ	12 mL	24 mL	4℃
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 412 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、**无水乙醇**	提取样本、稀释标准品/配制试剂、检测用
其他	匀浆器、恒温水浴锅、制冰机、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **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。**
- 对于组织样本，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；48 T 加 0.8 mL 无水乙醇，96 T 加 1.6 mL 无水乙醇充分溶解备用	未用完的试剂 4℃避光保存 1 个月；有毒，建议在通风橱进行实验
25 μmol/mL 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	未用完的试剂 4℃避光保存 2 周

05-1-2 标准品配制

使用 25 μmol/mL Standard，按照下表所示，进一步稀释标准品。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。

序号	标准品（μL）	去离子水（μL）	浓度（μmol/mL）
1	20 μL of 25 μmol/mL	980	0.5
2	500 μL of 0.5 μmol/mL	500	0.25
3	500 μL of 0.25 μmol/mL	500	0.125
4	500 μL of 0.125 μmol/mL	500	0.063
5	500 μL of 0.063 μmol/mL	500	0.031
6	500 μL of 0.031 μmol/mL	500	0.016
7	500 μL of 0.016 μmol/mL	500	0.008
空白	0	500	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把分装的组织块和血清（浆）保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **动植物组织：**称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **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。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备：**预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm。
2. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作，空白孔和标准孔只需测定 1 次，每个测定孔需设置一个对照孔：

试剂	空白孔（μL）	测定孔（μL）	对照孔（μL）	标准孔（μL）
样本上清	0	40	40	0
Standard	0	0	0	40
Reagent Ⅰ	150	150	150	150
Working Reagent Ⅱ	0	10	0	10
无水乙醇	50	0	10	0
混匀，25℃静置 10 min				

3. **吸光度检测：**测定 412 nm 处的吸光值，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{标准}$和 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值（μmol/mL）。

3. 总巯基含量的计算

- 按样本鲜重计算：

总巯基(μmol/g)=$y\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n$**=y÷W×n**

- 按蛋白浓度计算：

总巯基(μmol/mg prot)=$y\times V_{样}\div(Cpr\times V_{样})\times n$**=y÷Cpr×n**

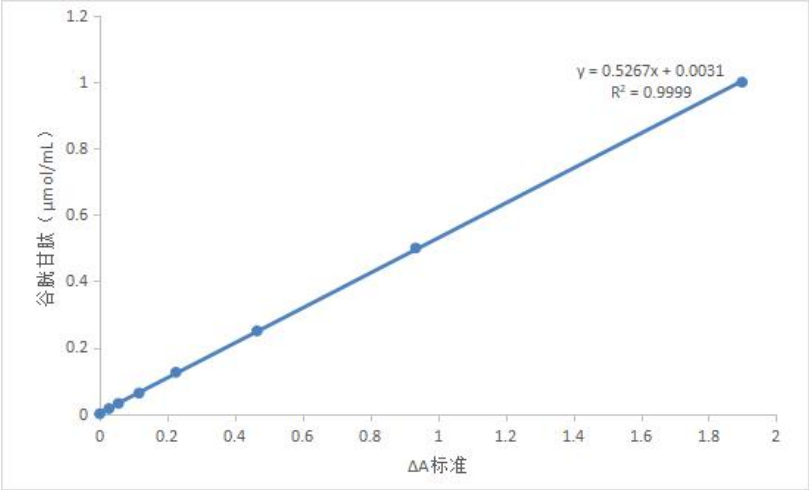
- 按样本体积计算：

总巯基(μmol/mL)=$y\times V_{样本}\div V_{样本}\times n$**=y×n**

$V_{样}$：加入的样本体积，0.04 mL；$V_{样总}$：加入去离子水体积，1 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；n：样本稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线：y=0.5267x+0.0031，R^2=0.9999



示例-1：取 0.1 g 绿萝，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$=0.533-0.437=0.096，代入标准曲线，计算 y=0.054。计算得：总巯基(μmol/g)**=y÷W×n**=0.54 μmol/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办？**

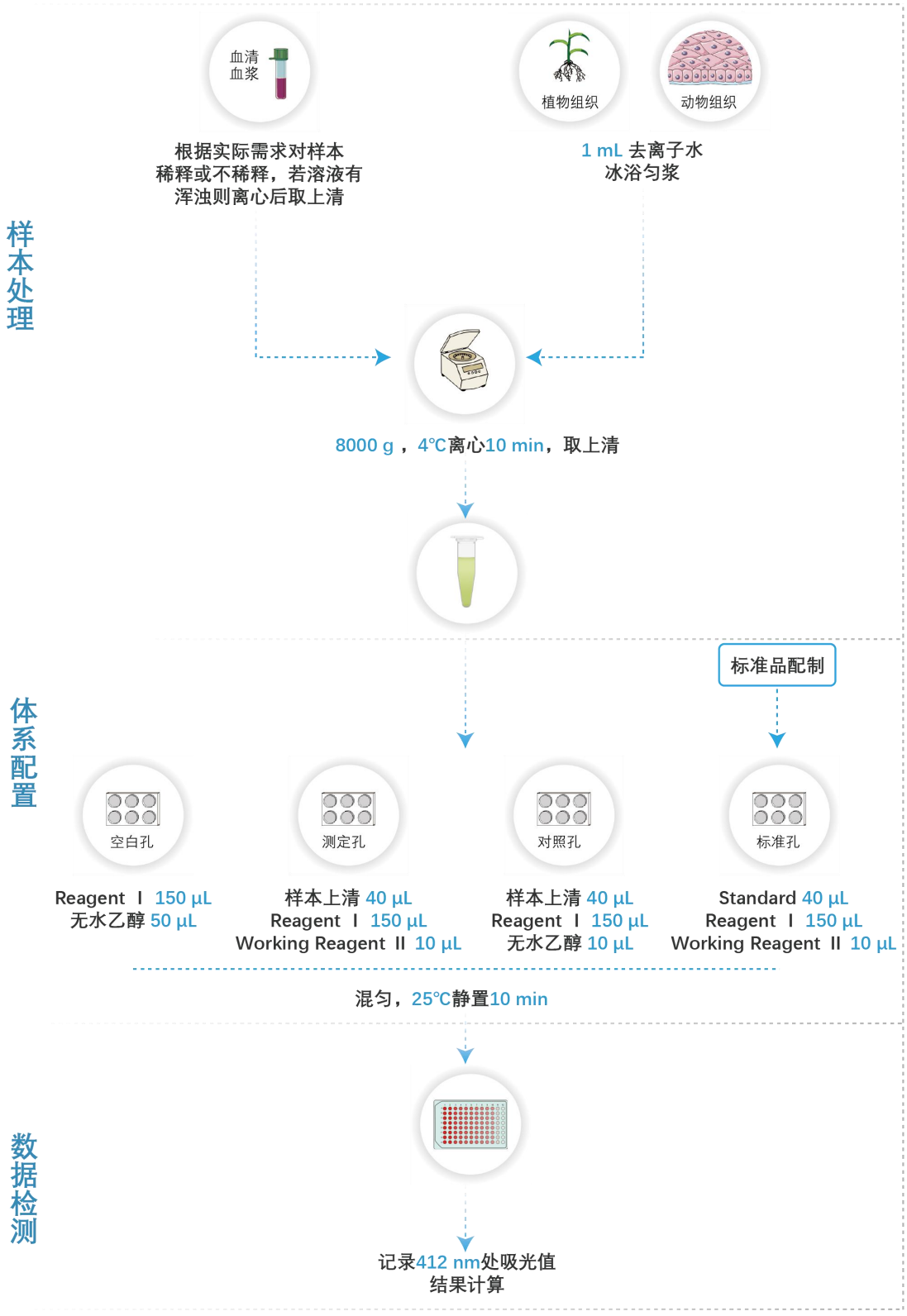
如果样本的$\Delta A_{测定}$>0.5 μmol/mL 的$\Delta A_{标准}$，样本需用去离子水适当进行稀释后，再进行实验，结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。如果样本的$\Delta A_{测定}$<0.008 μmol/mL 的$\Delta A_{标准}$，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
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）

CheKine™ 总巯基测定流程示意图

（Abbkine 货号：KTB2310）



V1.0