

分型巯基（-SH）测试盒

微板法 24T

一、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。

二、试剂的组成与配制：

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。

500 μ mol/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

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：按透明剂：缓冲液：显色剂=1：50：25 的比例混合，用多少配多少。

工作液二的配制：按透明剂：缓冲液=1：75 的比例混合，用多少配多少。

试剂五：沉淀剂，10ml×1 瓶，室温保存 6 个月。

三、所需仪器：

单道移液器：可进行单孔的加样工作

多道移液器：可进行 8 或 12 孔的加样工作

酶标仪：用于微量样品比色分析，吸光度值测定

96 孔酶标板：用于比色的孔板（本所赠送）

四、操作步骤：

1、**样本前处理：**样本处理详见说明书。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

2、**操作表：**

总巯基测定操作表				
	总 SH 空白孔	总 SH 标准孔	总 SH 测定孔	总 SH 对照孔
试剂三 (μl)	10			
500 μmol/L 标准 (μl)		10		
总 SH 待测样本 (μl)			10	10
工作液一 (μl)	150	150	150	
工作液二 (μl)				150

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）

非蛋白巯基测定操作表				
	非蛋白 SH 空白孔	非蛋白 SH 标准孔	非蛋白 SH 测定孔	非蛋白 SH 对照孔
试剂五 (μl)	10			
125 μmol/L 标准 (μl)		10		
非蛋白 SH 待测样本 (μl)			10	10
工作液一 (μl)	150	150	150	
工作液二 (μl)				150

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）

五、**计算公式：**

(一)、血清（浆）中巯基计算公式：

$$\begin{aligned}
 & \text{血清中总巯基含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{总 SH 测定 OD 值} - \text{总 SH 对照 OD 值}}{\text{总 SH 标准 OD 值} - \text{总 SH 空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测定前稀释倍数} \\
 & \text{血清中非蛋白巯基含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{非蛋白 SH 测定 OD 值} - \text{非蛋白 SH 对照 OD 值}}{\text{非蛋白 SH 标准 OD 值} - \text{非蛋白 SH 空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测定前稀释倍数} \\
 & \text{蛋白结合的巯基}(\mu\text{mol/L}) = \text{总巯基} - \text{非蛋白巯基}
 \end{aligned}$$

(二)、组织中巯基计算公式:

$$\begin{aligned}
 & \text{组织中总巯基含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{总 SH 测定 OD 值} - \text{总 SH 对照 OD 值}}{\text{总 SH 标准 OD 值} - \text{总 SH 空白 OD 值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{\text{样本测定前}} \div \frac{\text{待测匀浆蛋白}}{\text{浓度 (gprot/L)}} \\
 & \text{组织中非蛋白巯基含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{非蛋白 SH 标准 OD 值} - \text{非蛋白 SH 空白 OD 值}}{\text{非蛋白 SH 测定 OD 值} - \text{非蛋白 SH 对照 OD 值}} \times \frac{(500\mu\text{mol/L})}{\text{标准品浓度}} \div \frac{\text{待测样本蛋白}}{\text{稀释倍数 浓度 (gprot/L)}} \\
 & \text{蛋白结合的巯基} (\mu\text{mol/gprot}) = \text{总巯基} - \text{非蛋白巯基}
 \end{aligned}$$

蛋白结合的巯基 ($\mu\text{mol/gprot}$) = 总巯基 - 非蛋白巯基