

## 总巯基（TTs）检测试剂盒说明书

（货号：PB1021F48 分光法 48样）

有效期：3个月

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

### 测定意义

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GSH含量，能够间接测定蛋白质巯基含量。

### 测定原理

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412nm处有最大吸收峰。

### 自备实验用品

天平、研钵、可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL石英比色皿、蒸馏水。

### 试剂组成和配制

提取液：液体 100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体 80 mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体 10mL×1瓶，4℃避光保存。

### 样品的制备：

1. 按照组织质量（g）：水体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水）进行冰浴匀浆，然后 8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 血清，培养液：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后再取上清液检测。

### 操作步骤

1、分光光度计预热30min，调节波长至412nm，双蒸水调零。

2、操作表

在 1mL 石英比色皿中加入如下试剂

	对照管	测定管
样品（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	750	750
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）		50
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	50	

混匀，25℃静置 10min，测定412nm吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管设一个对照管。

### 计算公式

总巯基标准曲线： $y = 3.6222x - 0.0037$ ， $R^2 = 1$ ， $x$  为标品浓度，单位  $\mu\text{mol/mL}$ ， $y$  为吸光度  $\Delta A$ 。



1. 组织:

(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{样总}} \div W \\ &= 0.276 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{样总}} \div C_{\text{pr}} \\ &= 0.276 \times (\Delta A + 0.0037) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/mL)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \\ &= 0.276 \times (\Delta A + 0.0037) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;