

总巯基（TTs）检测试剂盒说明书

（货号：PB1021W96 微量法 96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、恒温水浴锅、酶标仪、96孔板、乙醇和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100 mL×2 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 30 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 2 mL×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、酶标仪预热30min，调节波长至412nm。

2、操作表

在96孔板中加入如下试剂

	对照管	测定管
样品（μL）	40	40
试剂一（μL）	150	150
试剂二（μL）		10
乙醇（μL）	10	
混匀，25℃静置 10min，测定412nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管设一个对照管。		

计算公式

总巯基标准曲线： $y = 1.8111x - 0.0037$ ， $R^2 = 1$ ， x 为标品浓度，单位 $\mu\text{mol/mL}$ ， y 为吸光度 ΔA 。

1. 组织:

(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V \text{ 样总} \div W \\ &= 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div W\end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \times V \text{ 样总} \div \text{Cpr} \\ &= 0.552 \times (\Delta A + 0.0037) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 按液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{总巯基含量 (}\mu\text{mol/L)} &= (\Delta A + 0.0037) \div 1.8111 \\ &= 0.552 \times (\Delta A + 0.0037)\end{aligned}$$

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;