

总巯基含量检测试剂盒

Total Mercapto Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK260

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES35	50 mL×1 瓶	4℃保存;
AK260-A	55 mL× 1 瓶	4℃保存;
AK260-B	3 mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK260-标准品	粉剂× 1 支	4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 氧化还原反应是生物化学中最主要的分子事件。作为氧化还原信号转导中与小分子作用的一个重要主体就是巯基, 生物体内的巯基主要包括谷胱甘肽巯基 (GSH) 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 (ROS) 清除, 而蛋白质巯基完全可以作为影响细胞内氧化还原信号转导过程的更直接、更相关的“探针”。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。

原理: 巍基基团与 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。

自备用品:

天平、研钵、可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL 玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

样品的制备:

- 动物、植物组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES35) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 常温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 血清, 培养液: 直接测定。

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
- 标准品的制备: 临用前加入 1.3 mL 蒸馏水, 浓度为 25 μ mol/mL, 再用蒸馏水稀释至 0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0 μ mol/mL 的标准液, 现用现配。
- 在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μ L)	测定管 (μ L)	标准管 (μ L)
样品	200	200	
标准品			200
AK260-A	750	750	750
AK260-B		50	50
蒸馏水	50		

混匀, 室温静置 10min, 测定 412nm 吸光值, 分别记为 A 对照、A 测定、A 标准, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。

总巯基含量计算公式:

总巯基标准曲线绘制：以标准液浓度为 x 轴，A 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入公式得到 x ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)。

1. 组织样本

(1) 按样本质量计算

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

2. 血清、培养液

$$\text{总巯基含量 } (\mu\text{mol/L}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times 10^{-3}) = 1000x$$

注：V 样：反应中样品种体积，0.2mL；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；10³：1mmol/L=10³ μmol/L。