



非蛋白质巯基 (NPT) 含量检测试剂盒  
Non-Protein Thiol (NPT) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 非蛋白质巯基 (NPT) 含量检测试剂盒

### Non-Protein Thiol (NPT) Content Assay Kit

#### 一、产品描述

生物体内巯基主要包括非蛋白质巯基和蛋白质巯基，巯基化合物在体内具有重要的解毒功能，在抗氧化、蛋白质氧化损伤修复和氨基酸跨膜运输中具有重要作用，对生物体的自我调节具有非常重要的生理意义。

巯基基团能够与 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测非蛋白质巯基的含量。

#### 二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	组分 A	液体 35 mL×1 瓶	4°C 保存	使用前按照组分 A: 组分 B=1:1 体积比配制 (根据使用量现用现配, 充分混匀即为提取应用液)
	组分 B	液体 35 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一		液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		液体 1 mL×1 支	4°C 保存	-
标准品		粉剂×1 支 (10 mg GSH)	4°C 保存	使用前加入 1.3 mL 提取应用液充分溶解 (即为 25 μmol/mL GSH 标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配): 将 25 μmol/mL GSH 标准液使用提取应用液稀释至 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 μmol/mL 即为标准稀释液。				

序号	A	B	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (μmol/mL)	25	10	1.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025
标准液体积 (μL)	400	100	200	200	200	200	200	200
提取应用液体积 (μL)	600	900	300	200	200	200	200	200
稀释后浓度 (μmol/mL)	10	1.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125

### 三、产品使用说明

**测定过程中所需要的仪器和试剂：**可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机和蒸馏水。

#### 1.样品处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ $10^4$ 个）：提取应用液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取应用液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min）， $4^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

②组织：按照组织质量（g）：提取应用液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取应用液）处理样品，冰浴匀浆， $4^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 0.5 mL 液体样本，加入 0.5 mL 提取应用液， $4^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心 10 min，取上清即为待测样本，置于冰上待测。

#### 2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔板或离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 ( $\mu\text{L}$ )	对照组 ( $\mu\text{L}$ )	标准组 ( $\mu\text{L}$ )	空白组 ( $\mu\text{L}$ )
待测样本	40	40	-	-
标准稀释液	-	-	40	-
试剂一	150	150	150	150
试剂二	10	-	10	-
蒸馏水	-	10	-	50

充分混匀，室温准确反应 10 min

**吸光值测定：**测定 412 nm 处测定吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照， $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 空白。注：空白组只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照组。

**标准曲线的建立：**以 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125  $\mu\text{mol/mL}$  为横坐标 (x)，对应的  $\Delta A$  标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$  测定带入公式计算 x ( $\mu\text{mol/mL}$ )。

### 3.非蛋白质巯基（NPT）含量计算

①按组织样本质量计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{W} = \frac{x}{W}$$

②按组织蛋白浓度计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{提}}} = \frac{x}{\text{Cpr}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{非蛋白质巯基含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{V_{\text{液}}} = 2 \times x$$

**注释：** V 提：待测样本总体积，1 mL；V 液：液体样本体积，0.5 mL；W：样品质量，g；

Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量，以万计。

#### 四、注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

②提取液中含有蛋白沉淀组分，若需使用蛋白浓度计算结果，需使用 PBS 或生理盐水单独提取后再进行蛋白浓度测定；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

**boxbio**

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.  
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

