



半胱氨酸(Cys)含量试剂盒说明书

(货号: PB1041F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

蛋白质含有三种含硫氨基酸: 甲硫氨酸、胱氨酸和 Cys。其中, Cys 是唯一一种含有巯基的含硫氨基酸, 从甲硫氨酸转化而来, 并且可与胱氨酸互相转化。Cys 参与蛋白质二硫键的形成, 经常是蛋白质活性中心的组成部分, 还可以为其它生理生化反应提供巯基。此外, Cys 大量积聚在皮肤和粘膜表面, 在角蛋白生成中维持重要的巯基酶的活性, 并且补充巯基, 以维持皮肤的正常代谢, 调节表皮最下层的色素细胞生成的底层黑色素。具有美白、解毒、改善炎症和过敏性皮肤等作用。

测定原理:

Cys 还原磷钨酸生成钨蓝, 在 600nm 处有吸收峰; 通过 600nm 吸光度, 计算 Cys 含量。

自备仪器和用品:

酶标仪、低温离心机、可调式移液枪、酶标板、磷酸和蒸馏水。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体 60ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 30ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存。用前 1 天, 向试剂三中加入 5 mL 蒸馏水充分溶解, 再加磷酸 1.25mL, 混匀后盖紧(防止水分散失)沸水浴 2h; 冷却后加 20 mL 蒸馏水, 4℃ 可保存 2 周。

标准品: 液体×1 瓶, 1μmol/mL 标准液, 4℃ 保存。

半胱氨酸提取:

1、液体样品中半胱氨酸提取: 取 0.1mL 液体样品, 加试剂一 0.9mL, 充分混匀, 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清液, 待测。

2、组织中半胱氨酸提取: 按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一)进行冰浴匀浆, 8000g 4℃ 离心 10 min, 取上清液待测。

3、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量(10⁴ 个): 试剂一体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定操作:

1. 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 600 nm, 蒸馏水调零。

2. 空白管: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 100 μL 蒸馏水, 500μL 试剂二, 500μL 试剂三, 混匀后室温静置 15 min, 于 600nm 处测定吸光值, 记为 A 空白管。

3. 标准管: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 100 μL 标准液, 500μL 试剂二, 500μL 试剂三, 混匀后室温静置 15 min, 于 600nm 处测定吸光值, 记为 A 标准管。

4. 测定管: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 100 μL 上清液, 500μL 试剂二, 500μL 试剂三, 混匀后室温静置 15 min, 于 600nm 处测定吸光值, 记为 A 测定管。

样品中半胱氨酸含量计算:

1. 按液体样品的体积计算

半胱氨酸含量(μmol/mL)



$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \div (V \text{ 液} \times V \text{ 样}) \\ =10 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})$$

2. 按鲜重计算

半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \\ =1 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

3. 按蛋白浓度计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \div V \text{ 样} \div C_{pr} \\ =1 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{pr}$$

4. 按细菌、细胞个数计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div 500 \\ =1 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500$$

C 标准品: 标准品浓度, $1 \mu\text{mol/mL}$; V 标准品: 反应体系中加入标准品体积, 0.1 mL ; W: 样品质量, g ; V 样: 反应体系中加入样品提取液体积, 0.1 mL ; V 样总: 样品提取液总体积, 1 mL ; V 液: 加入液体的体积, 0.1 mL ; C_{pr}: 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。