

半胱氨酸(Cys)含量检测试剂盒说明书

Cysteine Assay Kit

微量法

货号: AK053

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK053-A	液体 100ml×1 瓶	4℃保存
AK053-B	液体 20ml×1 瓶	4℃保存
AK053-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 使用前 1 天, 向试剂瓶中加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解, 再加磷酸 0.375mL, 混匀后盖紧(防止水分散失)沸水浴 2h; 冷却后加 6mL 蒸馏水, 4℃可保存 2 周有效。
AK053-S	标准品×1 支	4℃保存; 临用前加入 1ml 蒸馏水得到 10μmol/mL 标准液, 4℃避光可保存 3 天有效。

简介:

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。

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。

自备用品,

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、85% 磷酸、冰和蒸馏水。

样品处理(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 AK053-A 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): AK053-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK053-A)进行冰浴匀浆, 8000g 4℃离心 10 min, 取上清液待测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 600 nm, 蒸馏水调零。
2. 标准液的配制: 用蒸馏水稀释为 2、1.5、1、0.5、0.25、0.125μmol/mL 浓度的标准溶液。

试剂名称	空白管 (ul)	标准管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	20		
标准品(AK053-S)		20	
上清液			20
AK053-B	160	160	160
AK053-C	20	20	20
混匀后室温静置 15 min, 于 600nm 处测定吸光值			

注意: 空白管和标准管各只需做 1-2 次。

半胱氨酸(Cys)含量计算公式:

1. 标准曲线的绘制: 以各标准溶液浓度为 x 轴, 以 ΔA (A 标准管-A 空白管) 为 y 轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。将 (A 测定管-A 空白管) 带入方程求 x 值。
2. 半胱氨酸含量计算:
 - (1) 按液体样本的体积计算半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $x \times V_{\text{样总}} \div V_{\text{样 1}} = 10x$
 - (2) 按样本质量计算半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{样 2}} \div (W \times V_{\text{样 2}} \div V_{\text{样总}}) = x \div W$
注: $V_{\text{样 1}}$: 提取体系中加入的样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样 2}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取体系体积, 1mL; W : 样本质量, g。

注意事项: 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。