

半胱氨酸 (cysteine, Cys) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	AC018-100T/96S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	4°C
试剂二：液体	1 瓶	4°C
试剂三：粉剂	1 瓶	4°C
标准品：粉剂	1 瓶	4°C 避光
说明书	1 份	

试剂三用前 1 天，向试剂三中加入 2.5ml 蒸馏水充分溶解，再加 85% 磷酸 0.625ml，混匀后盖紧（防止水分散失）沸水浴 2h；冷却后加 10ml 蒸馏水，4°C 可保存 2 周。

标准品临用前加 10 ml 蒸馏水，充分溶解。1 μ mol/ml 标准液，4°C 避光保存。用不完的试剂 4°C 可保存 3 天。

自备仪器和用品：

低温离心机、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、85% 磷酸和蒸馏水。

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°C 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°C 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（ 10^4 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. 空白管：取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20 μ l 蒸馏水，100 μ l 试剂二，100 μ l 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：取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20 μ l 标准液，100 μ l 试剂二，100 μ l 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：取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20 μ l 上清液，100 μ l 试剂二，100 μ l 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。

注意：空白管和标准管只需要做一次。

计算公式：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按液体样品的体积计算：
半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/ml}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$
2. 按样本质量计算：
半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$
3. 按照蛋白浓度计算：
半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol /mg prot}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$
4. 按细胞数量计算：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol} / 10^4 \text{ cell}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样} \times \text{细胞数量}) \div 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$
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，0.02ml；V 样：反应体系中加入样品提取液体积，0.02 ml；V 样总：样品提取液，1ml；W：样品质量，g。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按液体样品的体积计算：
半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/ml}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$
2. 按质量计算：
半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$
3. 按照蛋白浓度计算：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



半胱氨酸含量 ($\mu\text{mol} / \text{mg prot}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$

4. 按细胞数量计算:

氨基酸含量 ($\mu\text{mol} / 10^4 \text{ cell}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样} \times \text{细胞数量}) = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$

C 标准品: 标准品浓度, $1 \mu\text{mol}/\text{ml}$; V 标准品: 反应体系中加入标准品体积, 0.02ml ; V 样: 反应体系中加入样品提取液体积, 0.02 ml ; V 样总: 样品提取液, 1ml ; W: 样品质量, g 。

注意事项:

最低检出限为 $100\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

