

半胱氨酸 (cysteine, Cys) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体×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 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℃可保存 2 周。

标准品：粉剂×1 瓶，临用前加 10 mL 蒸馏水，充分溶解。1μmol/mL 标准液，4℃避光保存。用不完的试剂 4℃可保存 3 天。

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. 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 20μL 蒸馏水，100μL 试剂二，100μL 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 20μL 标准液，100μL 试剂二，100μL 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 ($\mu\text{mol/mL}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

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

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 ($\mu\text{mol/mL}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) = 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

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：

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

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。

注意事项：

最低检出限为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。