

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20μL上清液，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 $\mu\text{mol/L}$ 。