

半胱氨酸 (Cys) 含量检测试剂盒说明书

(货号: BP10363W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

半胱氨酸 (cysteine, Cys) 是组成蛋白质的氨基酸之一, 半胱氨酸的定量测定在营养学和生物化学的研究中具有重要意义。

本试剂盒利用半胱氨酸的还原性将磷钼杂多酸还原为磷钼杂多蓝, 通过在 710 nm 读取其吸光值, 进而计算得出半胱氨酸 (Cys) 含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃ 保存
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品	液体 1mL×1 支	4℃ 保存

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织样本, 加 1mL 的提取液研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 室温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样品:

取 0.2mL 液体样品于 EP 管中, 再加 0.8mL 提取液充分混匀, 12000rpm, 常温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min, 设定波长到 710nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	130		
蒸馏水		130	

标准品			130
试剂一	140	140	140
试剂二	10	10	10
试剂三	20	20	20
混匀，置 95℃水浴 30min（盖紧，防止水分散失），冷却，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 710nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注】：测定管的 A 值若超过 1，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{半胱氨酸(Cys)含量(mg/g)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div W \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{半胱氨酸(Cys)含量(mg/g)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div 500 \end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{半胱氨酸(Cys)含量(mg/mL)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times V_2) \times D \\ &= 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{半胱氨酸(Cys)含量(mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，2mg/mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Mr---半胱氨酸分子量，121.16

V---提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.13mL；

V2---液体样本取样量，0.2mL；

500---细胞数量，万；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。