

赖氨酸(Lysine, Lys)含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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：

赖氨酸是人体必需氨基酸之一，能促进人体发育、增强免疫功能，并有提高中枢神经组织功能的作用。赖氨酸为碱性必需氨基酸。由于谷物食品中的赖氨酸含量甚低，且在加工过程中易被破坏而缺乏，故称为第一限制性氨基酸。

测定原理：

蛋白质中的赖氨酸具有一个游离的 ϵ -NH₂，它与茚三酮试剂反应生成蓝紫色物质，其颜色的深浅在一定范围内与赖氨酸的含量成线性关系。亮氨酸与赖氨酸的碳原子数目相同，而且仅有一个游离氨基 (ϵ -NH₂)，所以通常用亮氨酸配制标准液。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水、水浴锅。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 12.5mL 试剂三充分溶解混匀；

试剂二：液体 12.5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：60%乙醇，自备。

赖氨酸提取：

样本烘干粉碎，称取约 0.01g 样本，加入 1mL 提取液，充分匀浆。80℃水浴提取 20min，冷却后 10000g 离心 10min，取上清待测。

测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制：取 10mL 试剂一与 10mL 试剂二混合摇匀，取上清备用。用不完的试剂 4℃保存。
- 3、在有盖 EP 管中加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	100	
提取液		100
工作液	200	200

混匀，80℃水浴 30min（盖紧，以防止水分散失），冷却至常温。

试剂四	300	300
-----	-----	-----

混匀，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，于 530nm 波长处记录吸光值 A。ΔA=A 测定管-A 空白管。空白管只要做一管。

赖氨酸含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0062x - 0.0212$ ； x 为亮氨酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)， y 为吸光值。

1.按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{赖氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0212) \div 0.0062 \times V1] \div (\text{Cpr} \times V1) \times 1.1515 \\ &= 185.73 \times (\Delta A + 0.0212) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2.按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{赖氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{g 干重}) &= [(\Delta A + 0.0212) \div 0.0062 \times V1] \div (\text{W} \times V1 \div V2) \times 1.1515 \\ &= 185.73 \times (\Delta A + 0.0212) \div \text{W}\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 1.1515, 校正系数。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0031x - 0.0212$ ； x 为亮氨酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)， y 为吸光值。

1.按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{赖氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0212) \div 0.0031 \times V1] \div (\text{Cpr} \times V1) \times 1.1515 \\ &= 371.45 \times (\Delta A + 0.0212) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2.按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{赖氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{g 干重}) &= [(\Delta A + 0.0212) \div 0.0031 \times V1] \div (\text{W} \times V1 \div V2) \times 1.1515 \\ &= 371.45 \times (\Delta A + 0.0212) \div \text{W}\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 1.1515, 校正系数。