
赖氨酸(lysine, Lys)含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50管/48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、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水、水浴锅。

试剂的组成和配制:

提取液:液体 50mL×1 瓶,4°C保存;

试剂一:粉剂×1 瓶,4°C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°C保存;

试剂三:液体 15mL×1 瓶,4°C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°C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°C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	200	
提取液		200
工作液	400	400

混匀,80°C水浴 30min (盖紧,以防止水分散失),冷却至常温。

试剂四	600	600
-----	-----	-----

混匀,取 1000μL 至 1mL 玻璃比色皿中,于 530nm 波长处记录吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。

赖氨酸含量计算:

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, 0.2mL; 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。
