

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F066

产品规格: 96T

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 485 nm、发射波长 535 nm)

## Elabscience®胱氨酸摄取荧光法试剂盒

### Cystine Uptake Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测细胞胱氨酸摄取的能力。

## 检测原理

胱氨酸(Cystine)是抗氧化物质谷胱甘肽的来源,在细胞内的氧化还原平衡中发挥着重要的作用。细胞膜上的胱氨酸/谷氨酸转运体(xCT)是氨基酸转运体之一,它按照 1:1 的比例将细胞外的胱氨酸转运至细胞内,同时将胞内的谷氨酸转运至细胞外。xCT 通过胱氨酸摄取调节细胞内谷胱甘肽合成,维持细胞氧化还原平衡。当细胞膜上的 xCT 活性降低后,细胞胱氨酸摄取的能力会下降,可能会导致细胞铁死亡发生。近年来,xCT 与癌症、神经退行性疾病、免疫等相关疾病的关联逐渐成为研究的热点之一。

本试剂盒是一种通过荧光法便捷的检测细胞摄取胱氨酸能力的试剂盒。胱氨酸类似物与胱氨酸一样可以通过细胞膜上的 xCT 转运进入细胞内,胱氨酸类似物与荧光探针反应后会发出荧光。因此,可以通过检测细胞胱氨酸类似物所产生的荧光强度来判断细胞胱氨酸摄取的能力。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer)	28 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	胱氨酸类似物 (Cystine Analog)	0.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	荧光探针 (Fluorescence Probe)	0.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	还原剂 (Reducing Reagent)	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同试剂盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**荧光酶标仪(激发波长 485 nm、发射波长 535 nm)、37°C 恒温箱

**试剂：**PBS(0.01 M, pH 7.4)(可用不含胱氨酸的无血清培养基替换)、无水乙醇

## 试剂准备

① 各试剂平衡至室温 (25°C)，试剂二可分装后-20°C避光保存，避免反复冻融。

② 试剂二工作液的配制：

按照试剂二：PBS=1: 499的比例稀释得到试剂二工作液。现配现用，避光备用，2 h内使用有效。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂三：试剂四=1979: 1: 20配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

## 实验关键点

① 若使用 PBS 进行细胞洗涤，需要在实验前配制足量的 PBS。

② 试剂二工作液要提前静置在 37°C 恒温箱内进行预热 2-5 min。配制好的试剂二工作液无法保存，2 h内使用有效。

## 操作步骤

### 悬浮细胞:

- ① 以 2 mL 离心管为例, 每管细胞个数最少为  $1 \times 10^5$  个, 用 PBS 清洗两次, 室温,  $500 \times g$  离心 3 min, 每次实验建议设置阴性对照。
- ② 阴性对照组使用 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 样本组使用 200  $\mu\text{L}$  试剂二工作液重悬。37°C 避光孵育 30 min, 此步骤为细胞摄取胱氨酸类似物的过程, 因细胞种类和数量差异, 孵育时间需要做预实验摸索。
- ③ PBS 清洗细胞 2 次, 室温,  $500 \times g$  离心 3 min, 弃上清, 尽可能将细胞上清吸取完全, 否则对后续显色反应有影响。
- ④ 阴性对照和样本组均加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇混匀, 裂解细胞。
- ⑤ 吸取 50  $\mu\text{L}$  细胞裂解液加入 96 孔黑色酶标板孔中, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  测定工作液, 37°C 避光孵育 30 min。
- ⑥ 检测, 荧光酶标仪设置激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 测定各孔荧光值, 荧光值大小反应细胞摄取胱氨酸的能力。

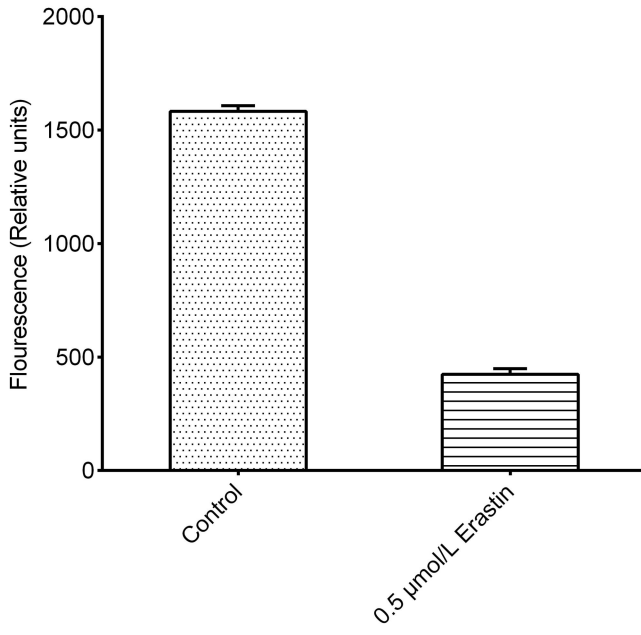
### 贴壁细胞:

- ① 以 96 孔板为例, 每孔接种细胞个数最少为  $5 \times 10^4$  个, 用 PBS 清洗两次, 每次实验建议设置阴性对照。
- ② 阴性对照加 100  $\mu\text{L}$  PBS, 样本组加 200  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。37°C 避光孵育 30 min, 此步骤为细胞摄取胱氨酸类似物的过程, 因细胞种类和数量差异, 孵育时间需要做预实验摸索。
- ③ PBS 清洗细胞 2 次, 弃上清, 尽可能将细胞上清吸取完全, 否则对后续显色反应有影响。
- ④ 阴性对照组和样本组均加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 使用移液器反复吸打, 裂解细胞。
- ⑤ 吸取 50  $\mu\text{L}$  细胞裂解液加入 96 孔黑色酶标板孔中, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  测定工作液, 37°C 避光孵育 30 min。

⑥ 荧光酶标仪设置激发波长 485 nm，发射波长 535 nm 测定各孔荧光值，荧光值大小反应细胞摄取胱氨酸的能力。

## 实例分析

293T 细胞于 24 孔板培养，药物组加入铁死亡诱导剂 erastin，终浓度为  $0.5\mu\text{mol/L}$ ，收集细胞后检测结果如下：



## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

