

胱氨酸摄取检测试剂盒

产品货号: 26815

产品规格: 96T

产品简介:

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。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。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方便快捷检测xCT活性。试剂盒中附带的胱氨酸类似物与胱氨酸一样通过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。因此可以通过检测进入细胞内的胱氨酸类似物所产生的荧光强度来判断xCT的活性。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
Cystine Analog Solution	220μL	-20℃, 避光
Fluorescent Probe	50μL	-20℃, 避光
Reducing Agent	500μL	-20℃, 避光
Reaction Buffer	30mL	-20℃, 避光
DMEM (without Cystine)	100mL	-20℃, 避光

摄取工作液的配制:

将Cystine Analog Solution按照1:100稀释到DMEM(without Cystine)细胞培养基中, 在37℃培养箱内预热, 备用。

注意: 摄取工作液现配现用。

实验方案:

A. 贴壁细胞

1. 将细胞按照6000-10000个/孔的密度接种到96孔板中, 在37℃、5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 小心吸掉细胞上清, 用200μL 37℃预热的PBS清洗细胞3次。
3. 每孔加入200μL 37℃预热的DMEM(without Cystine), 在37℃、5% CO₂培养箱内培养5min。
4. 小心吸掉细胞上清, 每孔加入200μL 37℃前述预热的摄取工作液作为(Uptake Work Control)或DMEM(without Cystine)作为空对照(Blank Control), 待测试的样品按照实验预设的浓度要求稀释到摄取工作液中作为样品组 (Sample), 在37℃、5% CO₂培养箱内培养30min。
5. 小心吸掉细胞上清, 用200μL冷却的PBS清洗细胞3次。
6. 小心吸掉PBS, 每孔加入100μL甲醇, 小心吹打、混匀。
7. 小心转移到1.5mL离心管中, 6000g, 室温离心1min。
8. 均匀吸取顶部50μL至黑色酶标板中。
9. 配制反应工作液 (每孔反应液200μL, 现配现用)

	25孔用量体积
Fluorescent Probe	10μL
Reducing Agent	100μL
Reaction Buffer	5mL

10. 将反应工作液按照每孔200μL加入到黑色酶标板中, 37℃、5%CO₂培养箱中静置30min。
11. 荧光酶标仪检测荧光 (优先推荐 $\lambda_{ex}=490nm$, $\lambda_{em}=535nm$)。
备注: 激发波长范围允许在485-495nm
发射波长范围允许在525-540nm
12. 用样品Sample孔的值减去Blank Control的值, 得到各组的有效荧光强度。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

备注：建议多复孔操作以减少实验误差（ $n \geq 3$ ）。

B. 贴壁细胞

1. 将细胞分别加入到1.5mL离心管中。
2. 在1000g室温离心3min。
3. 小心吸掉细胞上清，加入300 μ L 37°C DMEM(without Cystine)，重悬细胞后在1000g离心3min，重复此操作2次。
4. 小心吸掉细胞上清，加入500 μ L 37°C DMEM(without Cystine)，重悬细胞，在37°C，5% CO₂培养箱中培养5min，1000g离心3min。
5. 小心吸掉细胞上清，每孔加入200 μ L 37°C前述预热的摄取工作液作为(Uptake Work Control)或DMEM(without Cystine)作为空对照(Blank Control)，待测试的样品按照实验预设的浓度要求稀释到摄取工作液中作为样品组 (Sample)，重悬细胞，在37°C、5% CO₂培养箱内培养30min。
6. 1000g，离心3min，小心吸掉细胞上清，加入500 μ L冷却的PBS，重悬细胞后在1000g，离心3min，重复此操作2次。
7. 小心吸掉PBS，加入100 μ L甲醇，小心吹打、混匀。

备注：当用蛋白质定量的方法来校正测定值时：取操作步骤7的50 μ L溶液用于本产品的测定，剩余溶液用于测定蛋白质浓度。

8. 均匀吸取顶部50 μ L至黑色酶标板中。
9. 同A.9配制反应工作液（每孔反应液200 μ L，现配现用）。
10. 将反应工作液按照每孔200 μ L加入到黑色酶标板中，37°C、5%CO₂培养箱中静置30min。
11. 荧光酶标仪检测荧光（优先推荐 $\lambda_{ex}=490\text{nm}$, $\lambda_{em}=535\text{nm}$ ）。

备注：激发波长范围允许在485-495nm

发射波长范围允许在525-540nm

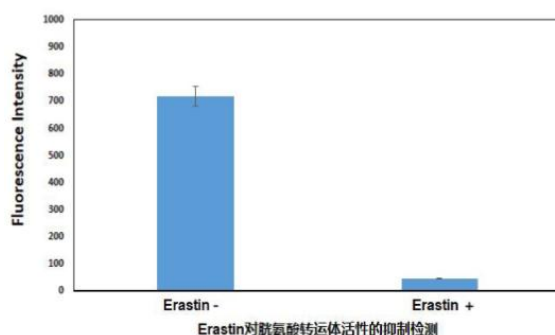
12. 用样品Sample孔的值减去Blank Control的值，得到各组的有效荧光强度。

备注：建议多复孔操作以减少实验误差（ $n \geq 3$ ）。

注意事项：

1. 由于运输过程中震动等原因，试剂管中的试剂可能会附在管壁或瓶盖内侧，请先将试剂离心至管底再使用。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 试剂盒检测范围不等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。
4. 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。
5. 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。

实验示例（HeLa细胞株，Erastin工作浓度2 μ M）：



备注：铁死亡诱导剂Erastin系抑制胱氨酸转运体活性的阳性对照物。

保存条件：

-20°C避光保存，3个月有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com