

半胱氨酰亚砷裂解酶 (L-cysteine sulfoxide lyase, CSL)

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

半胱氨酰亚砷裂解酶 (CSL) 广泛存在于百合科葱属(如大蒜和洋葱), 十字花科芸薹属(如卷心菜, 菜花, 西兰花), 以及豆科中的合金欢属中, 并通常被称为蒜氨酸酶(Alliinase)。香菇酸在 γ -谷氨酰转肽酶和半胱氨酸亚砷裂解酶的作用下转化成香菇精, 以及产生丙酮酸、乙醛、甲醛和 NH_3 。CSL 是内源性甲醛生成的关键酶之一, 测定 CSL 活性对于研究食品安全具有重要意义。

测定原理

CSL 催化 S-甲基-L-半胱氨酸亚砷反应产生丙酮酸, 与 2,4-二硝基苯肼反应, 在碱性条件下显棕红色, 在 510nm 下有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、离心机、分光光度计、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 避光保存, 临用前加入 2mL 水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 避光保存, 临用前加入 10mL 水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C 保存;

试剂三: 液体 15mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂四: 液体 6mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

试剂五: 液体 30mL×1 瓶, 4°C 保存。

样本处理

按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 4°C 浸提 40min。12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定操作

	对照管	测定管
样品 (μL)	100	100
试剂一 (μL)		50
蒸馏水 (μL)	50	
试剂二 (μL)	50	50
充分混匀, 37°C 反应 20min		
试剂三 (μL)	200	200
试剂四 (μL)	100	100

充分混匀，室温反应 5min		
试剂五 (μL)	500	500
充分混匀，静置 5min，于 1mL 玻璃比色皿测定 510nm 处吸光值，记为 A 对照和 A 测定， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照。每个测定管设一个对照管。		

计算公式

标准曲线: $y = 1.4626x + 0.0027$, $R^2 = 0.9993$; x 为标准品浓度: $\mu\text{mol/mL}$; y 为吸光度 ΔA

1. 按蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase 活性 } (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 1.4626 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.034 \times (\Delta A - 0.0027) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase 活性 } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 1.4626 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.034 \times (\Delta A - 0.0027) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ ，加入样本上清体积，0.1mL; $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL; Cpr: 蛋白浓度，mg/mL; W: 样本质量，g; T, 反应时间，20min。

注意事项

1. 若测定结果中吸光值超过 2，请将样本稀释后进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。香菇类样本活性较大，可能需要稀释 80-100 倍。