

半胱氨酸亚砷裂解酶 (L-cysteine sulfoxide lyase, CSL)

试剂盒说明书

微量法100T/48S

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

半胱氨酸亚砷裂解酶 (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NH₃。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、酶标仪、96孔板、恒温水浴锅、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

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

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

试剂三：液体15mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂五：液体30mL×1瓶，4℃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℃浸提40min。12000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定操作

	对照管	测定管
样品 (μL)	50	50
试剂一 (μL)		25
蒸馏水 (μL)	25	
试剂二 (μL)	25	25

充分混匀，37°C反应20min		
试剂三 (μL)	100	100
试剂四 (μL)	50	50
充分混匀，室温反应5min		
试剂五 (μL)	250	250
充分混匀，静置5min，吸取200μL至96孔板，测定510nm处吸光值，记为A对照和A测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

计算公式

标准曲线: $y = 0.7313x + 0.0027$, $R^2 = 0.9993$; 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

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase活性 } (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 0.7313 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.068 \times (\Delta A - 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{C-S lyase活性 } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0027) \div 0.7313 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.068 \times (\Delta A - 0.0027) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ ，加入样本上清体积，0.05mL; $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL; C_{pr} ：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1，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。