

半胱氨酸亚砶裂解酶 (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

半胱氨酸亚砶裂解酶 (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砶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-半胱氨酸亚砶反应产生丙酮酸, 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℃ 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 200 μ L 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 样，加入样本上清体积，0.05mL；V 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 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。