



半胱氨酰亚砷裂解酶（CSL）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5395

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

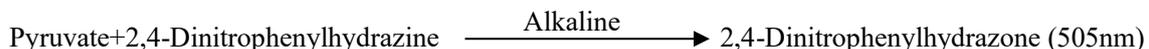
溶液的配制：

- 1、试剂二：试剂放于试剂瓶内 EP 管中。临用前加入 4 mL 蒸馏水溶解，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂二工作液：临用前根据样本量将试剂二用蒸馏水稀释 **5000** 倍，现用现配。
- 1、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠标准液。
- 2、0.625μmol/mL 丙酮酸钠标准液的配制：临用前取 30μL 的 20μmol/mL 标准液于 EP 管中，加入 930μL 蒸馏水充分溶解，配制成 0.625μmol/mL 的丙酮酸钠标准液备用。

产品说明：

半胱氨酰亚砷裂解酶，简称蒜酶，又名蒜氨酸酶。半胱氨酰亚砷裂解酶几乎存在于所有葱属植物中，如大蒜，洋葱，韭菜等。蒜氨酸酶存在于液泡内，其天然底物蒜氨酸存在于细胞质中；蒜氨酸酶与蒜氨酸接触并催化产生蒜素和顺、反式阿霍烯并生成丙酮酸和氨等副产物，也是大蒜等植物辛辣气味的主要来源。

半胱酰胺亚砷裂解酶可以催化 S-甲基-L-半胱氨酸亚砷生成丙酮酸。丙酮酸可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，在碱性条件下显棕红色；测定 505nm 吸光度的变化，即可计算 CSL 酶活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水和冰。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：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 30 分钟。12000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 液体样本：直接测定。（若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定）。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 505nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、操作表：（在 1.5mLEP 管或者 96 孔板中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	标准空白管
样本	20	20	-	-
标准品	-	-	20	-
试剂一	20	-	-	-
试剂二工作液	20	20	20	20
蒸馏水	-	20	20	40
混匀后，37℃反应 30min				
试剂三	20	20	20	20
试剂四	20	20	20	20
混匀后，37℃反应 30min				
试剂五	100	100	100	100

混匀，室温放置 10min，在 505nm 波长处测各管吸光度。记作 A_{测定}，A_{对照}，A_{标准}，A_{标准空白}。ΔA_{测定}=A_{测定}-A_{对照}，ΔA_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}。（标准管和标准空白管只需做 1-2 次。）

三、CSL 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：37℃，每mg组织蛋白每分钟催化产生1μmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$CSL\text{活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = 0.0208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义：37℃，每g组织每分钟催化产生1μmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$CSL\text{活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F = 0.0208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(3) 按血清（浆）等液体体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）等液体每分钟催化产生1μmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$CSL\text{活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 0.0208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C_{标准}：丙酮酸钠标准液的浓度，0.625μmol/mL；V_样：反应体系中加入的样本体积，0.02mL；V_{样总}：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；C_{pr}：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1. 如果测定结果ΔA_{测定}>1，可以对样本用蒸馏水进行稀释或者缩短第一步反应时间；吸光值较小，可以加大样本量或者延长第一步反应时间至 1h 或者更长时间。注意计算时同步修改计算公式。

2. 对于初次测定样本，建议将样本匀浆液用蒸馏水进行梯度稀释后测定，选取最佳的稀释倍数。洋葱、香菇、大蒜类样本建议直接稀释 4-10 倍后再进行最佳稀释倍数摸索。（实验室洋葱进行了 8 倍稀释，蒜进行了 64 倍稀释）

实验实例：

- 1、称取 0.1233g 蒜样本，加入提取液进行冰浴匀浆，上清用蒸馏水稀释 64 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.46-0.113=0.347$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{标准空白}}=0.551-0.064=0.487$ ，带入公式计算：
CSL活性（U/g 质量）= $0.0208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 7.693$ U/g 质量。
- 2、称取 0.1263g 洋葱样本，加入提取液进行冰浴匀浆，上清稀释 4 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.477-0.382=0.095$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{标准空白}}=0.551-0.056=0.487$ ，带入公式计算：
CSL活性（U/g 质量）= $0.0208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.169$ U/g 质量。

参考文献：

- [1] Su Qianqian, Tang Jing, Zhao Liyan, et al. Effects of nanocomposite packaging on the quality and formaldehyde content of shiitake mushrooms during storage [J]. Food Science, 2015(8):6.
- [2] Kumagai H, †Hidetoshi KONO, Sakurai H, et al. Comparison of C-S Lyase in *Lentinus edodes* and *Allium sativum* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2022(66): 2560–2566.