

Limonin Converting Enzyme Kit

柠檬苦素转化酶活性测定试剂盒说明书

货号: BN72396 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

以柠檬苦素为代表的三萜化合物是柑橘类水果在加工过程中产生“后苦味”的主要原因, 采用酶法转化使柠檬苦素的含量降低是目前较适合果汁加工业的方法。柠檬苦素转化酶的活性大小与消耗掉的柠檬苦素含量成正比, 柠檬苦素与 Ehrlich 试剂形成稳定的红色配合物, 测定其吸光度 OD 值变化, 即可得出柠檬苦素转化酶的活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 4.8mL 试剂二溶解备用。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	三 A: 粉体 mg×1 支 三 B: 粉体 mg×6 支	4℃保存	三 A 试剂在临用前甩几下使粉体落入底部, 再向三 A 中加 0.5mL 水溶解备用。
			取一支三 B 试剂, 甩几下使粉体落入底部, 再加 4mL 的 35%硫酸 (溶剂是乙醇, 即硫酸: 无水乙醇 =35:65) 溶解备用, 避光保存, 溶解后的三 B 尽量两天内用完 (操作过程可戴上手套谨慎操作)。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、UV 板、石油醚、无水乙醇、浓硫酸、研钵和冰。

四、柠檬苦素转化酶测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取 0.1g, 加入 1mL 石油醚进行研磨匀浆, 12000rpm, 25℃离心 10min, 弃上清 (尽量保留沉淀), 再加入 1mL 石油醚重复以上操作, 最后一步沉淀中加入 1mL 提取液, 涡旋震荡混匀, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000 rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 500 nm。

② 试剂三 mix 配制: 向一支已经溶解成液体的三 B 中加 20 μ L 的三 A, 混匀后作为试

剂三 mix（最好现配现用）。

③ 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

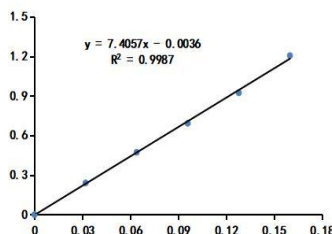
试剂名称（μL）	测定管	空白（仅做一次）
样本	30	
试剂一	40	40
试剂二	30	60
混匀，室温孵育 20min（间隔 5min 混匀一次）		
试剂三 mix	200	200
混匀，室温孵育 30min，吸取 200μL 至 UV 板中于 500nm 处读值。 $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 7.4057x - 0.0036$ ；x 为标准品质量（mg），y 为 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每小时分解 1mg 柠檬苦素定义为一个酶活单位（U）。

$$\begin{aligned} \text{柠檬苦素转化酶活性}(\text{mg/h/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 7.4057] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 13.5 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每小时分解 1mg 柠檬苦素定义为一个酶活单位（U）。

$$\begin{aligned} \text{柠檬苦素转化酶活性}(\text{mg/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 7.4057] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 13.5 \times (\Delta A + 0.0036) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 1 万细胞数量每小时分解 1mg 柠檬苦素定义为一个酶活单位（U）。

$$\begin{aligned} \text{柠檬苦素转化酶活性}(\text{mg/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 7.4057] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 13.5 \times (\Delta A + 0.0036) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每小时分解 1mg 柠檬苦素定义为一个酶活单位（U）。

$$\text{柠檬苦素转化酶活性}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0036) \div 7.4057] \div V1 \div T \times D = 13.5 \times (\Delta A + 0.0036) \times D$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.03mL；

T---反应时间，20 min=1/3h；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。