

酪氨酸解氨酶 (Tyrosine ammonilyase, TAL) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

TAL 广泛存在于植物和微生物中,是苯丙氨酸代谢途径的关键酶之一。TAL 能够跃过肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)直接将酪氨酸转化为香豆酸,香豆酸可进一步生成白藜芦醇、柚皮素等具有抗氧化、抗衰老作用的苯丙素类天然产物。

测定原理：

TAL 能够分解酪氨酸产生香豆酸,使反应溶液 333nm 下的吸光度随反应时间而上升,根据吸光度的变化率可计算出 TAL 活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存；

试剂一：液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存；

试剂二：粉剂×2 瓶, 4℃ 保存；

试剂三：液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存；

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 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。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 果汁等液体样品: 直接检测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 333nm。

2、准备 96 孔 UV 板一块 (非普通酶标板, 普通酶标板只能透过可见光, 不能透过紫外光, 检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板)。

3、试剂二的配置: 临用前在试剂二瓶中加入 10mL 试剂一充分溶解待用 (用不完的试剂 4℃ 保存一周, 注意现配现用), 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。

4、在 EP 管中依次加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本上清	40	40
试剂一		360
试剂二	360	
充分混匀, 40°C 保温 60min		
试剂三	20	20

混匀, 10000g 4°C 离心 5min, 取 200μL 上清至 96 孔 UV 板, 333nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照

TAL 活性计算:

1、血清 (浆) 或果汁 TAL 活性

单位的定义: 每分钟每 mL 血清 (浆) 或果汁在每 mL 反应体系中使 333nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mL)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞 TAL 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 333nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A \div Cpr$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 333nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每分钟每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中使 333nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div 0.005 \div T = 0.07 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.42mL; V 样: 加入样本体积, 0.04mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 60 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。