

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℃保温 60min		
试剂三	20	20

混匀，10000g 4℃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。

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

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。

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

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。

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

(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。

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

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。