

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

分光光度法 50 管/24 样

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:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4°C 保存;

试剂三: 液体 5mL×1 瓶, 4°C 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°C 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°C 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 333nm, 蒸馏水调零。

2、试剂二的配置: 临用前在试剂二瓶中加入 15mL 试剂一充分溶解待用 (用不完的试剂 4°C 保存一周, 注意现配现用), 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上。

3、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	100	100
试剂一		900
试剂二	900	
充分混匀, 40°C 保温 60min		
试剂三	50	50

混匀, 10000g 4°C 离心 5min, 取 0.8~1mL 上清至 1mL 石英比色皿, 333nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A$$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div W$$

(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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.035 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1.05mL；V 样：加入样本体积，0.1mL；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。