

**苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine ammonialyase, PAL）试剂盒说明书**

微量法 100管/96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**

PAL（EC4. 3 1 5）广泛存在于各种植物和少数微生物中，是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶，与一些重要的次生物质如木质素、异黄酮类植保素、黄酮类色素等合成密切相关，在植物正常生长发育和抵御病菌侵害过程中起重要作用。

**测定原理**

PAL催化L-苯丙氨酸裂解为反式肉桂酸和氨，反式肉桂酸在290nm处有最大吸收值，通过测定吸光值升高速率计算PAL活性。

**所需的仪器和用品**

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板(UV板)、研钵、冰和蒸馏水。

**试剂的组成和配制**

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体15mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入4mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃保存；

试剂三：液体1mL×1瓶，4℃保存。

**粗酶液提取**

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。10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

**测定步骤**

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至290nm，蒸馏水调零。
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、在EP管或96孔UV板中按顺序加入下列试剂

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本	5	
试剂一	145	150
试剂二	40	40

混匀，30℃ 准确反应30min

试剂三	10	10
-----	----	----

混匀，静置10min后，290nm处记录测定管吸光值A1和对照管吸光值A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

注意：对照管只要做一管

## PAL活性计算

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

### 1. 按蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白在每mL反应体系中每min使290nm下吸光值变化0.1为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div 0.1 \div T = 13.3 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2. 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织在每mL反应体系中每min使290nm下吸光值变化0.1为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/g鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.1 \div T = 13.3 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； V样：加入样本体积，0.005mL； V样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，30 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

用96孔板测定的计算公式如下

### (1) 按蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白在每mL反应体系中每min使290nm下吸光值变化0.05为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2. 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织在每mL反应体系中每min使290nm下吸光值变化0.05为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/g鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； V样：加入样本体积，0.005mL； V样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，30 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。