

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

微量法 100管/48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：

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（10⁴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（ μ L）	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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

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

0.005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。

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

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0.005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。

$$\text{TAL (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.07 \times \Delta A$$

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。