

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、异黄酮类植色素、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 (μL)	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。