

酪氨酸解氨酶 (Tyrosine ammonia-lyase, TAL) 试剂盒说明书

(货号: BP10048W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

酪氨酸解氨酶 (TAL, EC 4.3.1.23) 是对香豆酸合成的另一种途径中的关键酶。在生物体内, 对香豆酸的合成有两条途径。一是以苯丙氨酸为底物, 经苯丙氨酸解氨酶催化生成肉桂酸, 再经细胞色素 P450 酶系催化生成对香豆酸。而部分苯丙氨酸解氨酶被发现可以直接催化酪氨酸, 生成对香豆酸, 成为对香豆酸合成的另一途径,

本试剂盒根据酪氨酸解氨酶 (TAL) 催化 L-酪氨酸生成对香豆酸, 该物质在 310nm 处有最大吸收值, 通过测定吸光值升高速率计算 TAL 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃ 避光保存

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

【注】: 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 必须使用 UV 板

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 310nm。

② 在 96 孔 UV 板中按顺序加入下列试剂:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	130	180
试剂二	50	
混匀, 37°C 反应 60 min, 立即于 310nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本需做一个对照管)。		

【注】若 ΔA 在零附近徘徊, 可增加样本加样量 V1 (如增至 30μL, 则试剂一相应减少) 或延长反应时间 T (如增至 90min), 则改变后的加样量 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算

酶活定义: 在 37°C 下, 每克组织在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$\text{TAL} (\Delta \text{OD}_{310}/\text{h/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 1000 \times \Delta A \div W$$

2、按蛋白浓度计算

酶活定义: 在 37°C 下, 每毫克组织蛋白在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$\text{TAL} (\Delta \text{OD}_{310}/\text{h/mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 0.05 \div T = 1000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按液体体积计算

酶活定义: 在 37°C 下, 每克组织在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$\text{TAL} (\Delta \text{OD}_{310}/\text{h/mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.05 \div T = 1000 \times \Delta A$$

4、按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每 10⁴ 个细胞/细菌在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位 (U)。

$$\text{TAL} (\Delta \text{OD}_{310}/\text{h}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 2 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

T---反应时间, 60 min=1h;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。