

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 试剂盒说明书

(货号: BP10063W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

苯丙氨酸解氨酶 (PAL, EC 4.3.1.24) 是催化苯丙烷类代谢途径第一步反应的酶, 也是这个途径的关键酶和限速酶, 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, 另外研究发现许多植物在遭受寒冷、伤害、紫外辐射时, 植物的防卫体系特别是苯丙烷类代谢被激活, PAL 活性迅速上升, 因此 PAL 活性也可以作为植物抗逆境能力的一个生理指标。

本试剂盒根据苯丙氨酸解氨酶 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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.8mL 试剂一溶解 (可超声溶解), 备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 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。

【注意】若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5, 可在样本提取过程中增加除色素步骤: 取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/真菌样本:

按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 12000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (或等待仪器过自检程序亦可), 调节波长至 290nm。

② 在 96 孔 UV 板中按顺序加入下列试剂:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	25
试剂一	150
试剂二	25
混匀后, 1min 时于 290nm 处读取吸光值 A1, 37°C 孵育 1h 后再读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 若 ΔA 在零附近, 可增加取样质量 W (如增至 0.3g 或更多), 或增加样本加样体积 V1 (如增至 50μL 或更多, 则试剂一相应减少), 或延长反应时间 T, 则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入公式重新计算。

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 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 800 \times \Delta A \div W$$

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 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.05 \div T = 800 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每毫升样本在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/ml) = \Delta A \div (V1 \div V) \div 0.05 \div T = 800 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每克组织在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 1.6 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.025mL;

T---反应时间, 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。