

## 酪氨酸解氨酶 (Tyrosine ammonilyase, TAL) 试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**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：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶, 4℃保存；

试剂一：液体 60mL×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（ $10^4$  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：**

试剂名称（ $\mu$ L）	空白管	测定管
样本上清	100	100
试剂一		900
试剂二	900	
充分混匀，40℃保温 60min		
试剂三	50	50

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 333nm，蒸馏水调零。

2、试剂二的配置：临用前在试剂二瓶中加入 15mL 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。3、在 EP 管中依次加入如下试剂混匀，10000g 4℃离心 5min，取 0.8~1mL 上清至 1mL 石英比色皿，333nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A=A$  测定-A 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 0.01 为一个酶活力单位。

$TAL (U/mL) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A$  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 0.01 为一个酶活力单位。

$TAL (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div Cpr$  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 0.01 为一个酶活力单位。

$TAL (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div W$  (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 0.01 为一个酶活力单位。

$TAL (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.035 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，1.05mL；V 样：加入样本体积，0.1mL；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。