

## 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<sup>4</sup> 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 (μL)	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。

$$\text{TAL (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A$$

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。

$$\text{TAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 17.5 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{TAL (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.035 \times \Delta A$$

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。