

## 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。

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

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

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

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

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。