

苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性检测试剂盒说明书

Phenylalanine Ammonia-lyase Assay Kit

微量法

货号: AK055

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES05	100ml×1	4℃保存
AK055-A	15ml×1	4℃保存
AK055-B	粉剂×1 瓶	4℃保存, 临用前每瓶加入 4mL 双蒸水充分溶解备用; 可 4℃保存一周。
AK055-C	5ml×1	4℃保存

简介:

意义: L-苯丙氨酸解氨酶 (L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 存在于所有绿色植物, 是植物体内次生代谢的关键酶和限速酶。在植物形成次生物资如木质素、植保素等中起重要作用。对植物生长发育、抵御病虫害、防紫外辐射及构成植物支撑系统等方面具有重要意义 (抗逆境)。

原理: 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是催化直接脱掉 L-苯丙氨酸上的氨而生成反式桂皮酸的酶。反式桂皮酸在波长 290nm 处有最大吸收值。如果酶的加入量适当, 反式桂皮酸的生产速率即 A290 升高的速率可在几小时内保持不变, 规定 1 小时内 A290 增加 0.01 为 PAL 的一个活力单位。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

按照组织质量 (g): 提取液 ES05 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 ES05), 进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 290nm, 蒸馏水调零。
2. 注意: 空白管和标准管只需要测定一次。
3. 取 1.5ml 离心管, 按照下表操作

所加试剂	测定管 (ul)	对照管 (ul)
待测样品	5	
AK055-A	145	150
AK055-B	40	40
混匀后, 置于 30℃水浴锅半个小时。		
AK055-C	10	10
混匀, 静置 10min 后, 290nm 处记录测定管吸光值 A1 和对照管吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。		

PAL 活性计算公式

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每 min 使 290nm 下吸光值变化 0.1 为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div 0.1 \div T = 17.3 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每 min 使 290nm 下吸光值变化 0.1 为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.1 \div T = 17.3 \times \Delta A \div W$$

注： V 反总：反应体系总体积，1.04mL；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量(g)；

用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每 min 使 290nm 下吸光值变化 0.05 为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每 min 使 290nm 下吸光值变化 0.05 为一个酶活性单位。

$$\text{PAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div W$$

注： V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.005mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量(g)。