

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S1006

Size: 100T/48S

酪氨酸解氨酶 (TAL) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板 (UV 板) 研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 50mL × 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	

五、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。

六、测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 333nm。

2、准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，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 务必使用 UV 板）。

3、试剂二的配置：临用前在试剂二瓶中加入 10mL 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。

4、在 EP 管中依次加入如下试剂

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本上清	40	40
试剂一		360
试剂二	360	
充分混匀，40℃保温 60min		
试剂三	20	20

混匀，10000g 4℃离心 5min，取200 μL 上清至96 孔 UV 板，333nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

七、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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A$$

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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 35 \times \Delta A \div W$$

(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 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{TAL (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.07 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.42mL；V 样：加入样本体积，0.04mL；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。