

酪氨酸解氨酶（TAL）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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；

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：

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 (μL)	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°C 保温 60min		
试剂三	20	20

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

TAL 活性计算:

1、血清(浆)或果汁 TAL 活性

单位定义: 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。

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

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。

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

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。

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

(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。

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

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。