

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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

PAL (EC4. 3. 1. 5) 广泛存在于各种植物和少数微生物中, 是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶, 与一些重要的次生物质如木质素、异黄酮类植保素、黄酮类色素等合成密切相关, 在植物正常生长发育和抵御病菌侵害过程中起重要作用。

测定原理

PAL 催化 L-苯丙氨酸裂解为反式肉桂酸和氨, 反式肉桂酸在 290nm 处有最大吸收值, 通过测定吸光值升高速率计算 PAL 活性。

所需的仪器和用品

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×3 瓶, 4℃ 保存。临用前每瓶加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 4℃ 保存;

试剂三: 液体 2.5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

粗酶液提取

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。10000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	
试剂一	780	800
试剂二	200	200
混匀, 30℃ 准确水浴 30min		
试剂三	40	40

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, $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意: 对照管只要做一管

PAL 活性计算

(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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每 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。

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

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;