



苯丙氨酸解氨酶(PAL)测定试剂盒说明书

(货号: A137-1-1 Phenylalanine Ammonialyase Kit, 分光光度法 50T/48 样)

一、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。

二、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, 通过测定吸光度值计算PAL 活性。

三、所需仪器及试剂:

紫外分光光度计及1cm光径石英比色皿 (2mL以下容量)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器, 蒸馏水。

四、试剂组成: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂编号	试剂名称	试剂装量	保存条件
试剂一	提取液	60mL×1 瓶	4℃
试剂二	缓冲液	80mL×1 瓶	4℃
试剂三	底物液	20mL×1 瓶	4℃
试剂三	终止液	5mL×1 瓶	4℃

五、操作步骤:

1、粗酶液提取: 按组织质量 (g): 试剂一 (mL) =1:9 的比例加入试剂一 (建议 0.1g 组织加入 0.9mL 试剂一), 冰水浴匀浆, 10000rpm 离心 10min, 取上清待测。

2、操作表:

试剂名称	测定管	空白管
粗酶液 (μL)	40	
试剂二 (μL)	1480	1520
试剂三 (μL)	400	400
混匀, 30℃准确水浴30min		
试剂四 (μL)	80	80
混匀, 室温静置10min, 蒸馏水调零, 波长290nm, 1cm光径石英比色皿, 紫外分光光度计测定各管吸光度值A。 (计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$)		

注: 空白管每批实验只需做 1-2 管; 操作表各组份体积可按需要量同比增大或缩小。

六、单位定义与计算公式:

1、样本按鲜重计算:

单位定义: 每克组织在每毫升反应体系中每分钟使290nm吸光度变化0.1为一个酶活力单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{PAL活力} &= \frac{\Delta A}{0.1} \div \left(\frac{W}{V_{\text{样总}}} \times V_{\text{样}} \right) \times \frac{V_{\text{反总}}}{1} \div T \\ &= 16.67 \times \Delta A \div \frac{W}{V_{\text{样总}}} \end{aligned}$$

2、样本按蛋白计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白对应的样本在每毫升反应体系中每分钟使290nm吸光度变化0.1为一个酶活力单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{PAL活力} &= \frac{\Delta A}{0.1} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \times \frac{V_{\text{反总}}}{1} \div T \\ &= 16.67 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

以上两公式中:

Cpr 为粗酶液蛋白浓度, mg/mL;

V_样 为测定时粗酶液的上样量, 0.04mL;

V_{反总} 为反应体系总体积, 2mL;

T 为反应时间, 30min;

W 为样本重量,g;

V_{样总} 为提取的粗酶液的总体积, mL;

七、计算举例

例 1: 取水稻叶片 0.1g, 加试剂一 1mL 作提取, 测得空白管吸光度为 0.026, 测定管吸光度为 0.475。计算为:

$$\begin{aligned} \text{PAL活力} &= 16.67 \times (0.475 - 0.026) \div \frac{0.1}{1} \\ &= 74.85 \text{ U/g 鲜重} \end{aligned}$$

例 2: 取番茄叶片组织 0.1g, 加试剂一 1mL 作提取, 测得空白管吸光度为 0.025, 测定管吸光度为 0.364, 粗酶液蛋白浓度为 0.3427mg/mL。计算为:

$$\begin{aligned} \text{PAL活力} &= 16.6 \times (0.364 - 0.025) \div 0.3427 \\ (\text{U/mg 蛋白}) &= 16.42 \text{ U/mg 蛋白} \end{aligned}$$