

苯丙氨酸解氨酶（PAL）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-KN005 紫外法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

苯丙氨酸解氨酶（PAL，EC 4.3.1.24）是催化苯丙烷类代谢途径第一步反应的酶，也是这个途径的关键酶和限速酶，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，另外研究发现许多植物在遭受寒冷、伤害、紫外辐射时，植物的防卫体系特别是苯丙烷类代谢被激活，PAL 活性迅速上升，因此 PAL 活性也可以作为植物抗逆境能力的一个生理指标。

本试剂盒根据苯丙氨酸解氨酶 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。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 4.5mL 试剂一溶解（可超声溶解），备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5，可在样本提取过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/真菌样本：

按照细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 12000rpm，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

2、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 290nm，蒸馏水调零。

② 在 1ml 石英比色皿（光径 1cm）中按顺序加入下列试剂：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	600
试剂二	80
混匀后, 1min 时于 290nm 处读取吸光值 A1, 37°C 孵育 1h 后再读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 在零附近，可增加取样质量 W （如增至 0.3g 或更多），或增加样本加样体积 $V1$ （如增至 200μL 或更多，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T ，则改变后的 W 和 $V1$ 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：在 37°C 下，每克组织在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 333.3 \times \Delta A \div W$$

2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37°C 下，每毫克组织蛋白在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.05 \div T = 333.3 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：在 37°C 下，每毫升样本在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/ml) = \Delta A \div (V1 \div V) \div 0.05 \div T = 333.3 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 37°C 下，每克组织在反应体系中每小时使 A290 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

$$PAL(\Delta OD_{290}/h/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 0.67 \times \Delta A$$

V ---加入提取液体积, 1 mL;

$V1$ ---加入样本体积, 0.06mL;

T ---反应时间, 1h;

W ---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。