酪氨酸解氨酶（Tyrosine ammonia-lyase，TAL）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-YHKY002-96　微板法 96 样　有效期：3 个月）

一、指标介绍：

酪氨酸解氨酶（TAL，EC 4.3.1.23）是对香豆酸合成的另一种途径中的关键酶。在生物体内，对香豆酸的合成有两条途径。一是以苯丙氨酸为底物，经苯丙氨酸解氨酶催化生成肉桂酸， 再经细胞色素 P450 酶系催化生成对香豆酸。而部分苯丙氨酸解氨酶被发现可以直接催化酪氨酸，生成对香豆酸，成为对香豆酸合成的另一途经，

本试剂盒根据酪氨酸解氨酶（TAL）催化 L-酪氨酸生成对香豆酸，该物质在 310nm 处有最大吸收值，通过测定吸光值升高速率计算 TAL 活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存

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）、96 孔板（UV 板）、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

【注】：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 必须使用 UV 板

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 0.1g 组织，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】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 310nm。

② 在 96 孔 UV 板中按顺序加入下列试剂：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	130	180
试剂二	50	
混匀，37℃反应 60 min，立即于 310nm 处读取吸光值 A，△A=A 测定-A 对照**（每个样本需做一个对照管）。**		

【注】若△A 在零附近徘徊，可增加样本加样量 V1（如增至 30μL，则试剂一相应减少）或延长反应时间 T（如增至 90min），则改变后的加样量 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算

酶活定义：在 37℃下，每克组织在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

TAL（$\triangle OD_{310}$/h/g 鲜重）= ΔA÷(W× V1÷V)÷0.05÷T =1000×ΔA÷W

2、按蛋白浓度计算

酶活定义：在 37℃下，每毫克组织蛋白在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

TAL（$\triangle OD_{310}$/h/mg prot）=ΔA÷（V1×Cpr）÷0.05÷T =1000×ΔA÷Cpr

3、按液体体积计算

酶活定义：在 37℃下，每克组织在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位(U)。

TAL（$\triangle OD_{310}$/h/mL）= ΔA÷ V1÷0.05÷T =1000×ΔA

4、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 37℃下，每 10^4 个细胞/细菌在反应体系中每小时使 A310 吸光值变化 0.05 为一个酶活单位（U）。

TAL（$\triangle OD_{310}$/h/10^4 cell)= ΔA÷(500×V1÷V) ÷0.05÷T=2×ΔA

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

T---反应时间，60 min=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。