

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonialyase, PAL)

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注意：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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板(UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂三：液体 1mL×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：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 290nm，蒸馏水调零。
- 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、在 EP 管或 96 孔 UV 板中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	5	
试剂一	145	150
试剂二	40	40
混匀，30℃ 准确反应 30min		

试剂三	10	10
-----	----	----

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：

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$PAL (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div 0.1 \div T = 13.3 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 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。

$$PAL (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.1 \div T = 13.3 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.005mL； 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。

用 96 孔板测定的计算公式如下

(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 0.05 为一个酶活性单位。

$$PAL (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每 min 使 290nm 下吸光值变化 0.05 为一个酶活性单位。

$$PAL (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.05 \div T = 26.6 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.005mL； 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。