

苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine ammonialyase, PAL）试剂盒说明书 （紫外分光法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 支	4℃ 保存	临用前甩几下，使粉剂落入底部，再加入 4.5mL 试剂一溶解（可超声溶解），备用。

三、需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿(光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、苯丙氨酸解氨酶（PAL）的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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。4℃×12000rpm，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，可在样本制备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 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、上机检测：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，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：

试剂名称（ 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℃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 200 μL 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)。

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

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)。

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

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；

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。
