（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K522-S

产品规格：50 assays(48 samples)/100 assays(98 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计(290 nm)

Elabscience®苯丙氨酸解氨酶(PAL)比色法测试盒

Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中 PAL 的活力。

检测原理

PAL 催化 L-苯丙氨酸产生反式肉桂酸和氨，反式肉桂酸在 290 nm 处有最大吸收，通过测定 290 nm 处 OD 值的升高来计算 PAL 活性。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1(Size 1) (50 assays)	规格 2(Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8°C 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8°C 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	2-8°C 保存 12 个月
试剂四 (Reagent 4)	终止液 (Stop Solution)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8°C 保存 12 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计（290 nm）、37°C 恒温培养箱或 37°C 恒温水浴锅

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液配制：

取一瓶试剂三用6 mL双蒸水溶解，2-8°C保存一个月。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照样本质量(g)：体积(mL)为 1: 9 的比例加入试剂一(建议取 0.05 g 组织，加入 0.45 mL 试剂一)，进行机械匀浆，10000 × g，4°C 离心 10 min，取上清置冰上待测。若有漂浮物，取上清再次离心，直至上清完全澄清。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，结合检测范围：0.78-156 U/g组织，不同样本稀释比例如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%绿萝叶组织	不稀释	10%玉米组织	不稀释
10%青椒组织	不稀释	10%胡萝卜组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

组织匀浆离心后，必须保证上清澄清无杂质，否则需再次离心，至上清澄清无杂质。

操作步骤

① 测定管：取 20 μL 待测样本、780 μL 试剂二、200 μL 试剂三工作液加入到 1.5 mL EP 管中；

对照管：取 800 μL 试剂二、200 μL 试剂三工作液加入到 1.5 mL EP 管中。

② 涡旋混匀 3 s，37°C 准确反应 30 min。

③ 向步骤②中各管加入 40 μL 试剂四。

④ 涡旋混匀 3 s，静置 5 min，紫外分光光度计 290 nm 处，1mL 石英比色皿，双蒸水调零测定各管 OD 值。

操作表

	测定管	**对照管**
待测样本(μL)	20	--
试剂二(μL)	780	800
试剂三工作液(μL)	200	200
涡旋混匀 3 s，37°C 准确反应 30 min		
试剂四(μL)	40	40
涡旋混匀 3 s，静置 5 min，紫外分光光度计 290 nm 处，1 mL 石英比色皿，双蒸水调零测定各管 OD 值。		

结果计算

定义：在 37°C 条件下，每克组织在每毫升反应体系中，每分钟使吸光度值下降 0.1 为一个酶活单位。

$$\underset{(U/g\ 组织)}{PAL} = \Delta A_{290} \times V_2 \div 0.1^* \div t \div (m \div V_3 \times V_1) \times f$$

注解:

ΔA_{290}：样本测定OD值-对照OD值

V_1：加入样本体积(0.02 mL)

V_2：反应体系总体积(1.04 mL)

V_3：加入试剂一的体积(当m = 0.05 g时V_3取0.45 mL)

m：加入的样本质量(建议取0.05 g)

t：酶促反应时间(30 min)

*：吸光度值下降0.1

f：样本加入检测体系前稀释的倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.78-156 U/g 组织	**平均批间差**	4.6 %
灵敏度	0.78 U/g 组织	**平均批内差**	3.1 %
平均回收率	99 %		

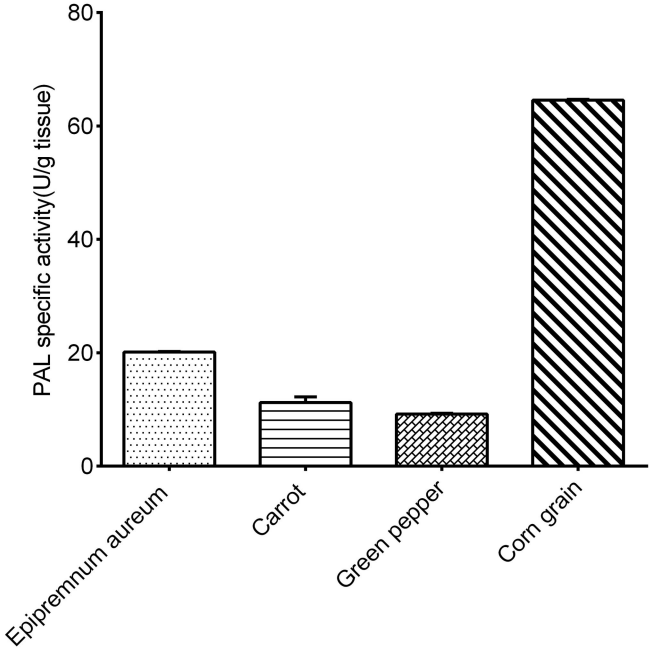
附录2 实例分析

例如检测青椒(数据仅供参考)：

取新鲜制备的10%青椒组织匀浆上清，按照说明书操作，结果如下：测定孔平均OD值为0.116，对照孔平均OD值为0.057，计算结果如下：

$$\underset{(\text{U/g 组织})}{\text{PAL}} = (0.116 - 0.057) \times 1.04 \div 0.1 \div 30 \div 0.05 \times 0.45 \div 0.02 = 9.20\ \text{U/g 组织}$$

按照说明书操作，测定10%绿萝组织(加样量0.02 mL)、10%胡萝卜组织(加样量0.02 mL)、10%青椒组织(加样量0.02 mL)、10%玉米粒组织(加样量0.02 mL)(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未离心完全	取上清再次离心，使上清完全透亮无杂质
样本测不出值	样本稀释倍数太大，或者样本值低	减小稀释倍数、升高样本检测液制备过程中的组织浓度，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。