

酪氨酸酶活性检测试剂盒说明书

微量法

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 125 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×3 瓶	2-8°C保存

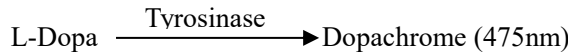
溶液的配制：

1、试剂一：临用前每瓶加入 7 mL 提取液充分溶解待用，现配现用。溶解后易氧化，24h 内要尽快用完。

产品说明：

酪氨酸酶（tyrosinase: EC1.14.18.1）是一种单酚单加氧酶，是具有双功能的含铜糖蛋白，广泛存在于植物、酵母和动物组织中。酪氨酸酶是生物体合成黑色素的关键酶，也是引起果蔬酶促褐变的主要因素，同时也对昆虫的免疫及生长有重要影响

酪氨酸酶催化L-多巴生成多巴色素，其在475nm下有特征吸收峰，进而测定出酪氨酸酶的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、细胞超声破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12000g，4°C离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。12000g，4°C离心 20min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：直接检测。若有浑浊则离心后去上清使用。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min，波长调至475nm。分光光度计蒸馏水调零。

2、加样表（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入）

试剂名称（ μL ）	测定管
试剂一	180

样本	20
----	----

将上述试剂分别加入比色皿/96孔板中后迅速吹打混匀，记录第10s的吸光值A1，迅速置于37°C(哺乳动物)或25°C(其他物种)水浴或培养箱中3min，拿出迅速擦干测定3min10s时的吸光值A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、酪氨酸酶酶活计算

A、按微量玻璃比色皿计算：

1、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化生成1nmol多巴色素的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{酪氨酸酶 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 90.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化生成1nmol多巴色素的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{酪氨酸酶 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 90.09 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细胞或细菌每分钟催化生成1nmol多巴色素的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{酪氨酸酶 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.18 \times \Delta A$$

4、按血清(浆)体积计算：

单位的定义：每mL血清(浆)每分钟催化生成1nmol多巴色素的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\text{酪氨酸酶 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 90.09 \times \Delta A$$

V反总：反应总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：多巴色素的摩尔消光系数： 3.7×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ ；V样：加入的样本体积，0.02mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V提取：提取液体积，1mL；500：细胞或细菌总数，500万；T：反应时间，3min。

B、按96孔板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm 进行计算即可。

注意事项：

- 1、当分光光度计 ΔA 大于0.3或酶标仪 ΔA 大于0.2时，建议将样本用提取液稀释后测量； ΔA 过小时，建议增加酶促反应时间(5min或10min)或增加加入的样本体积来测定。计算时注意同步修改计算公式。

实验实例：

- 1、取0.1g稗草叶加入1mL提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.0821 - 0.0368 = 0.0453$ ，使用微量石英比色皿按样本质量计算酶活得：
酪氨酸酶(U/g 质量) = $90.09 \times \Delta A \div W = 90.09 \times 0.0453 \div 0.1 = 40.81 \text{U/g 质量}$ 。
- 2、取0.1g土豆加入1mL提取液进行匀浆研磨，取上清后稀释4倍按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.2021 - 0.0239 = 0.1782$ ，使用微量石英比色皿按样本质量计算酶活得：
酪氨酸酶(U/g 质量) = $90.09 \times \Delta A \div W \times F$ (稀释倍数) = $90.09 \times 0.1782 \div 0.1 \times 4 = 642.16 \text{U/g 质量}$ 。
- 3、取兔血清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.2981 - 0.2556 = 0.0425$ ，使用微量石英比色皿按样本体积计算酶活得：
酪氨酸酶(U/mL) = $90.09 \times \Delta A = 90.09 \times 0.0425 = 3.83 \text{U/mL}$ 。