

酪氨酸酶 (Tyr) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照说明书操作。

货号：D100538

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，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 125 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×3 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃保存
96 孔板	96 孔×1 块	-
封板膜	2 张	-

溶液的配制：

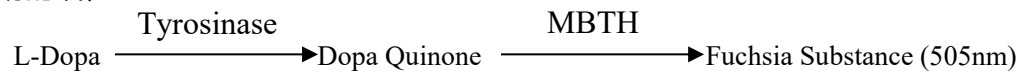
1、试剂一：临用前每瓶加入 7 mL 提取液充分溶解待用，现配现用。溶解后易氧化，24h 内要尽快用完。

2、试剂三：临用前加入 1.65mL 蒸馏水充分溶解待用，该试剂为饱和溶液，若有析出可置于 45℃ 水浴锅加热溶解；用不完的试剂 2-8℃保存 4 周。

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-多巴生成多巴醌，其与 MBTH 生成紫红色物质，在 505nm 下有特征吸收峰，据此可以计算出酪氨酸酶的活性。



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。

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、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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：按照质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，进行冰浴匀浆。12000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）：直接检测。若有浑浊则离心后取上清使用。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min，波长调至 505nm。分光光度计蒸馏水调零。
- 2、实验前根据样本量取适量试剂一 37°C 预热 5min。
- 3、加样表（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	200	200
试剂二	40	40
样本	27	-
蒸馏水	-	27
充分混匀，37°C 准确反应 20min		
试剂三	13	13
充分混匀，于 12000g 4°C 离心 3min，取上清液 200μL 于 96 孔板中，测定 505nm 处的吸光度，分别记为 A 测定、A 空白。计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白。空白管只需测 1-2 次。		

三、酪氨酸酶酶活计算

A、按 96 孔板计算：

1、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.005 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/mg prot) = ΔA 测定 $\times V$ 反总 $\div (V$ 样 $\times C_{pr}) \div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A$ 测定 $\div C_{pr} \times F$

2、按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.005 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/g 质量) = ΔA 测定 $\times V$ 反总 $\div (V$ 样 $\div V$ 提取 $\times W) \div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A$ 测定 $\div W \times F$

3、按血清（浆）体积计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.005 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/mL) = ΔA 测定 $\times V$ 反总 $\div V$ 样 $\div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A$ 测定 $\times F$

V 反总：反应总体积，280μL=0.28mL；V 样：加入的样本体积，0.027mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 提取：提取液体积，1mL；T：反应时间，20min；F：稀释倍数。

B、按微量比色皿计算：

1、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.01 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/mg prot) = $\Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T \times F = 51.85 \times \Delta A_{\text{测定}} \div C_{\text{pr}} \times F$

2、按样本质量计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.01 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/g 质量) = $\Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div 0.01 \div T \times F = 51.85 \times \Delta A_{\text{测定}} \div W \times F$

3、按血清 (浆) 体积计算:

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 在反应体系中每分钟使 505nm 下的吸光值变化 0.01 定义为一个酶活单位。

酪氨酸酶活性 (U/mL) = $\Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T \times F = 51.85 \times \Delta A_{\text{测定}} \times F$

V 反总: 反应总体积, 280 μ L=0.28mL; V 样: 加入的样本体积, 0.027mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 提取: 提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 20min; F: 稀释倍数。

注意事项:

1、当样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 1 时, 建议将样本用蒸馏水稀释后测定。计算时注意同步修改计算公式。

实验实例:

1、取 0.1055g 大鼠脾组织加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.153 - 0.083 = 0.070$, 按样本质量计算酪氨酸酶活性得:

酪氨酸酶活性 (U/g 质量) = $103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} \div W \times F = 68.81 \text{U/g 质量}$ 。

2、取 0.1020g 绿萝加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后用蒸馏水稀释 8 倍按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 1.037 - 0.083 = 0.954$, 按样本质量计算酪氨酸酶活性得:

酪氨酸酶活性 (U/g 质量) = $103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} \div W \times F = 7759.2 \text{U/g 质量}$ 。

3、取 27 μ L 猪血清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.429 - 0.083 = 0.346$, 按样本液体体积计算酪氨酸酶活性得:

酪氨酸酶活性 (U/mL) = $103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} = 35.88 \text{U/mL}$ 。