

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。

溶液的配制：

1、试剂一：临用前每瓶加入 16 mL 提取液充分溶解待用，现配现用。溶解后易氧化，24h 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、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、1mL玻璃比色皿、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℃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℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：直接检测。若有浑浊则离心后取上清使用。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min，波长调至475nm。蒸馏水调零。

2、加样表（在1mL玻璃比色皿中分别加入）

将上述试剂分别加入比色皿后迅速吹打混匀，记录第 10s 的吸光值 A1，迅速置于 37℃（哺乳动物）或 25℃

（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

1、按样本蛋白浓度计算：

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。

酪氨酸酶 (U/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 90.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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104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。

$$\text{酪氨酸酶 (U/104 cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.18 \times \Delta A$$

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, 10-3L; ϵ : 多巴色素的摩尔消光系数: $3.7 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; 109:

单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$; V样: 加入的样本体积, 0.1mL; 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。

注意事项:

1. 当 ΔA 大于0.3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

$\Delta A = A_2 - A_1 = 0.105 - 0.054 = 0.051$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{酪氨酸酶 (U/g 质量)} = 90.09 \times \Delta A \div W = 90.09 \times 0.051 \div 0.1 = 45.95 \text{U/g 质量}。$$

2、取 0.1g 土豆加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清稀释 4 倍后按照测定步骤操作, 测得计算

$\Delta A = A_2 - A_1 = 0.200 - 0.047 = 0.153$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{酪氨酸酶 (U/g 质量)} = 90.09 \times \Delta A \div W \times F (\text{稀释倍数}) = 90.09 \times 0.153 \div 0.1 \times 4 = 551.35 \text{U/g 质量}。$$

3、取兔血清后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.388 - 0.328 = 0.06$, 按样本体积计算酶活得:

$$\text{酪氨酸酶 (U/mL)} = 90.09 \times \Delta A \div V = 90.09 \times 0.06 = 5.4 \text{U/mL}。$$