Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

酪氨酸酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC4055

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

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。

$$\text{L-Dopa} \xrightarrow{\text{Tyrosinase}} \text{Dopachrome (475nm)}$$

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℃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℃ (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ΔA =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。

酪氨酸酶（U/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V反总×10^9÷(V样×Cpr)÷T=90.09×ΔA÷Cpr

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。

酪氨酸酶（U/g 质量）=ΔA÷（ε×d）×V反总×10^9÷(W÷V提取×V样)÷T=90.09×ΔA÷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。

酪氨酸酶（U/10^4 cell）=ΔA÷（ε×d）×V反总×10^9÷(500÷V提取×V样)÷T=0.18×ΔA

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。

酪氨酸酶（U/mL）=ΔA÷（ε×d）×V反总×10^9÷V样÷T=90.09×ΔA

V反总：反应总体积，2×10^{-4}L；ε：多巴色素的摩尔消光系数：3.7×10^4L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol；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. 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ΔA=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×ΔA÷W=90.09×0.0453÷0.1=40.81U/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ΔA=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×ΔA÷W×F（稀释倍数）=90.09×0.1782÷0.1×4=642.16U/g 质量。

3、取兔血清后按照测定步骤操作，测得计算ΔA=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×ΔA=90.09×0.0425=3.83 U/mL。

相关系列产品：

BC1310/BC1315 总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒