

# 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。**

**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°C保存
试剂一	粉剂×3 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 支	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。
- 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°C 水浴锅加热溶解；用不完的试剂 2-8°C 保存 4 周。

**产品说明：**

酪氨酸酶（tyrosinase；EC 1.14.18.1）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°C 离心 10min，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/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。

$$\text{酪氨酸酶活性 (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

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0.005定义为一个酶活单位。

$$\text{酪氨酸酶活性 (U/g 质量)} = \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} \div W \times F$$

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0.005定义为一个酶活单位。

$$\text{酪氨酸酶活性 (U/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{反应总}} \div V_{\text{样}} \div 0.005 \div T \times F = 103.7 \times \Delta A_{\text{测定}} \times F$$

V反应总：反应总体积，280μL=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；N：细胞或细菌总数，以百万计；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。

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

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。

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

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。

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

V反应总：反应总体积，280μL=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；N：细胞或细菌总数，以百万计；T：反应时间，20min；F：稀释倍数。

注意事项：

1、当样本ΔA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  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 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) =  $103.7 \times \Delta A$  测定  $\div W \times F = 68.81$  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  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 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) =  $103.7 \times \Delta A$  测定  $\div W \times F = 7759.2$  U/g 质量。
- 3、取 27 $\mu$ L 猪血清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 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) =  $103.7 \times \Delta A$  测定 = 35.88 U/mL。