



使用LAMBDA 465 紫外可见分光光度计 测定酪氨酸酶活性

介绍

酶是生物催化剂。如果细胞中没有酶，大多数生化反应将不能以需要的速率进行。从19世纪早期就开始对酶的生理学和生物学性质进行研究。人们对酶持续的兴趣来源于几个因素-酶在细胞中的动力学和基本角色，非凡的催化能力和选择性。本实验评估了动力学性质中的2个性质，即酶活性和分子选择性的动力学描述。

本应用报告以酪氨酸酶描述酶活性的测定。使用LAMBDA™ 465紫外/可见分光光度计和UV Lab™软件快速采集数据并进行处理。

本应用报告以酪氨酸酶描述酶活性的测定。使用LAMBDA™ 465紫外/可见分光光度计和UV Lab™软件快速采集数据并进行处理。

原理

酪氨酸酶是含有铜的氧化还原酶，可以催化单酚的邻位羟基化和邻苯二酚的有氧氧化。通过监控3, 4-二羟(基)苯丙氨酸(多巴)氧化为红色多巴色素，进行酶活性测定。

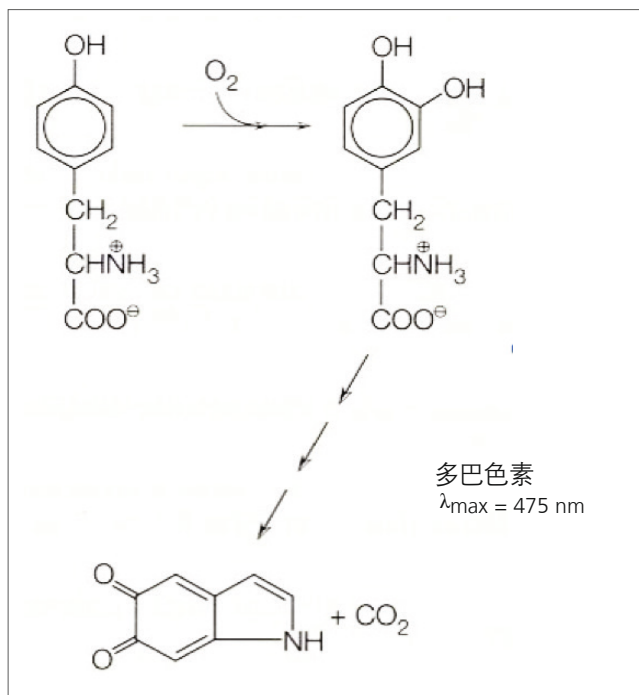
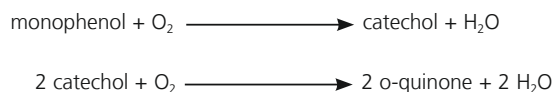


图1. 酪氨酸酶催化酪氨酸和多巴氧化

酪氨酸酶性质

酪氨酸酶通常被称为多元酚氧化酶，具有双催化活性：单酚的o-羟基化和o-双酚的有氧化。



蘑菇酪氨酸酶为四聚体，分子量为128000，含有4个Cu⁺。酶中有2种底物结合部位，分别用于酚类底物和双氧结合位；因此，能与铜形成复合物的物质为酪氨酸酶活性的可能抑制剂。

酶活性单位

溶液中酶的量常以活性单位来表示。常用的活性单位有三种：国际单位（IU），缩酮，比活性。国际酶生化委员会联合会推荐使用标准单位，国际单位或单位。在指定的PH、温度、离子强度和底物浓度下，1IU酶酶对应的量可以在1分钟催化1umol底物转变为产物。

$$\text{单位} = \frac{\text{生成的 umol}}{\text{min}} = \frac{\Delta A}{\Delta T} \cdot \frac{1}{\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})} \cdot 1(\text{cm}) \cdot \frac{10^6 \mu\text{m}}{\text{M}} \cdot V_f(l) \dots (i)$$

其中，
 ϵ = 摩尔吸收系数 (M⁻¹cm⁻¹)
 V_f = 比色皿中最终体积 (l)
 A = 吸光度
 t = 时间 (min, sec 等)

试剂和仪器

磷酸钠缓冲液，0.1M，PH7.0

蘑菇中提取的酪氨酸酶(Sigma)，5单位/ul于磷酸钠缓冲溶液中

L-3,4-二羟(基)苯丙氨酸(L-多巴)，2mg/ml于磷酸钠缓冲液中

LAMBDA 465 紫外/可见分光光度计

UV Lab软件

比色皿 (10mm光程)

过程

1. 准备0.1M 磷酸钠缓冲液。
2. 将酪氨酸酶和L-多巴溶解于0.1M磷酸钠缓冲液。
3. 测定酪氨酸酶的量
 - 3-1. 按下表配制试剂

表1. 酪氨酸酶测定一般过程，单位：ml

Reagent	1	2	3	4	5
Phosphate buffer	1.995	1.990	1.980	1.960	1.940
L-Dopa	1	1	1	1	1
Tyrosinase	0.005	0.01	0.02	0.04	0.06

- 3-2. 在475nm读取吸光度
- 3-3. 被选酶的水平需覆盖的 $\Delta A/\text{min}$ 为0.025/min~0.25/min。
4. 计算酪氨酸酶浓度和酶活性因子
 - 4-1. 测定酪氨酸酶浓度

记录280nm下的吸光度 (按结果部分计算酪氨酸酶浓度)
 - 4-2. 计算酶活性因子 (见公式(I))

$$\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (产物多巴色素的摩尔吸收系数)}$$

$$V_f = 0.003 \text{ L (比色皿中最终体积)}$$

将这些值代入公式(I)，得到

$$\text{单位} = \Delta A / \Delta t \times 0.83$$

因此，酪氨酸酶活性因子为0.83

5. 仪器参数设置如下：

实验设置

数据类型: Absorbance

采样: 单池

模式: Faster (Spectra No: 1, Scan No.:10, Integration No: 1, Gain No: 1)

实验类型: 酶活性

(见图. 2)

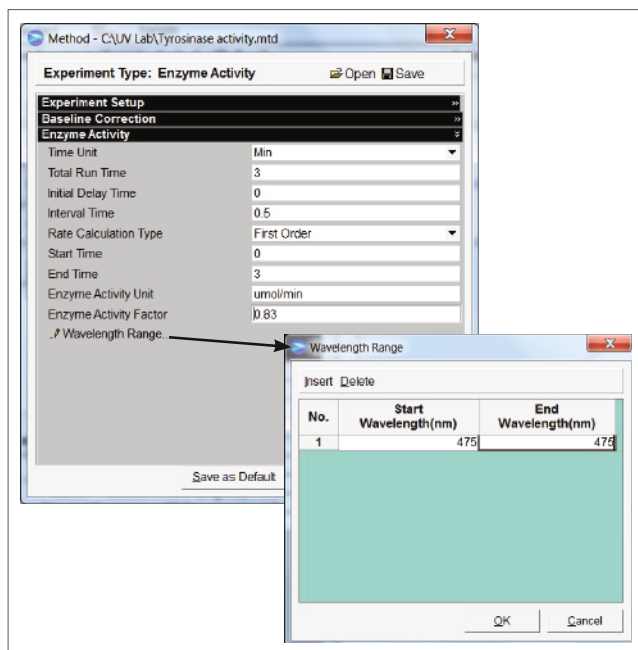


图2. 测定酪氨酸酶活性的实验设置

6. 测定最终样品溶液的A₄₇₅。

结果

1. 计算酪氨酸酶浓度

酪氨酸酶的吸收系数E_{2801%}是24.9。即, 1% (w/v) 酪氨酸酶在1cm比色皿中280nm下的吸收尾24.9。Beer's定律:

$$A = E \cdot l \cdot c$$

因此, 从比值可以计算酪氨酸酶浓度

$$\frac{C_1}{A_1} = \frac{C_2}{A_2}$$

式中, C₁=标准酪氨酸酶溶液浓度, 即1%

A₁=标准酪氨酸酶溶液在280nm的吸收, 即24.9

C₂=未知浓度酪氨酸溶液 X%(w/v)

A₂=未知浓度酪氨酸溶液在280nm的吸收, **0.045**

因此, **X=0.0018%(w/v)**

将浓度转化为mg/ml并乘以稀释因子(最终体积/样品体积),

酪氨酸酶浓度=0.18 mg/ml。

2. 测定酪氨酸酶活性 (见图3, 表2, 表3)

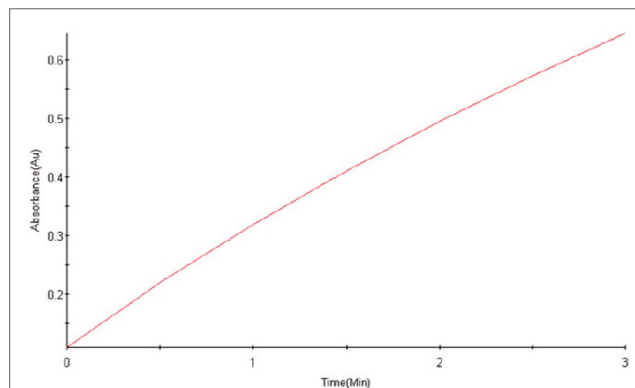


图3. 每分钟A₄₇₅的变化

表2. 每30秒测定的吸收值

Time (Min)	475.000 nm
0	0.1091
0.5	0.219
1	0.3186
1.5	0.4106
2	0.4956
2.5	0.5724
3	0.6451

表3. 人血清中的酚类底物水平

Name	Start (Min)	End (Min)	Rate (Au/Min)	Activity Factor	Activity (μmol/min)
Tyrosinase	0	3	0.1780	0.8300	0.1477

3. 比活性

酪氨酸酶的比活性为82单位/mg

结论

使用LAMBDA 465紫外/可见分光光度计和UV Lab软件测定了酪氨酸酶活性。谱图测定快速, 灵敏度良好, 软件能有效定量和处理数据。

参考文献

1. Maniatis, F.L., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1982.
2. Rodney Boyer, Modern Experimental Biochemistry, 3rd ed.: Benjamin/Cummings, 2000.

珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司
地址：上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编：201203
电话：021-60645888
传真：021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2014, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。