β-葡萄糖苷酶酶活检测方法

1. 酶活力单位定义

在测定条件下，每分钟水解水杨苷产生1μmol还原糖（以葡萄糖计）所需酶量定义为一个酶活力单位，用μmol /ml或μmol /g表示。

2. 测定原理

还原糖能将3，5-二硝基水杨酸分子中的硝基还原成橙黄色的3-胺基-5-硝基水杨酸。溶液橙黄色强度与还原糖量成正比。

3. 主要仪器和设备

1. 分析天平（感量0.1mg和1mg两种）；
2. 离心机；
3. 恒温水浴锅；
4. 磁力搅拌器；
5. 分光光度计（722型）；

4. 试剂和溶液

本标准所用试剂和水在无注明其它要求时，均指分析纯和GB/T6682规定的三级水。

1. DNS试剂：称取3，5—二硝基水杨酸10g加入500 mL水中，分多次加入氢氧化钠16g，搅拌溶解(温度＜45℃)，再分多次加入酒石酸钾钠300g，搅拌至全溶，冷却后用水定容至1000mL。室温下棕色瓶储存暗处放置，一周后使用(如有沉淀过滤后使用)。
2. 0.05mol/L，pH4.80醋酸—醋酸钠缓冲液：吸取冰醋酸2.4mL,加适量水，加无水醋酸钠4.92g，溶解, 定容至1000mL,调节pH至4.80±0.01后使用。室温下存放2个月有效。
3. 0.1%即1mg/mL葡萄糖标准溶液：无水葡萄糖于80℃烘至恒重，称取0.1000g于烧杯中，加适量水溶解，转入容量瓶中并定容至100mL。
4. 1.0%水杨苷溶液：称取1.00g水杨苷（D-（-）-salicin为alfa aesar公司产品，编号A16524 or L11982）溶于烧杯中，加70ml缓冲液（B.4.2）溶解，转入容量瓶中并用缓冲液（B.4.2）定容至100mL，置于冰箱中备用。
5. 葡萄糖标准曲线的绘制

吸取 1mg/mL 无水葡萄糖溶液 0，0.2mL，0.4mL，0.6mL，0.8mL，1.0mL 于具塞刻度

试管中，补水至 2mL，加 DNS 试剂 3mL，混合后于沸水中煮 10min,冷却后加水定容至 15mL,于分光光度计 540nm 波长下测吸光度（A）。以吸光度为纵坐标，葡萄糖量为横坐标,绘制标准曲线,三次重复试验的均值用最小二乘法拟合一元线性方程 y＝ax + b,求出吸光度与葡萄糖量的关系。

6. 待测酶样品的处理

⑴ 液体酶：直接吸取酶液做适当稀释，使测定吸光度值在 0.25～0.4 范围内。

⑵ 固体粉状酶：称取适量于烧杯中（精确至0.0001g），用少量水润湿并调成糊状，再用水溶解，取离心上清液做适当稀释。

⑶ 固体粒状酶：研磨成粉后如⑵处理。

⑷ 液体曲: 离心上清液做适当稀释，使测定光吸收值在0.25～0.4范围内。

⑸ 固体曲：按干重计称取4g于三角瓶中，加水200mL，室温下磁力搅拌浸提30min，取离心上清液做适当稀释。

5. 酶活力测定

取 15 mL 具塞刻度试管按下面的反应顺序进行操作,在反应过程中,从加入底物开始,吸取前摇匀，向每支试管中加入试剂的时间间隔要绝对一致, 50℃水解 30 min。

反应步骤及试剂、溶液用量见表 A.1。

表A.1　反应步骤及试剂、溶液用量

试样	空白
加底物(B.4.4)1.8mL	加底物(B.4.4)1.8mL
50℃预热 3min	50℃预热 3min
加酶液 0.2mL	50℃水解 30 min
混合	加 DNS 试剂 3 mL
50℃水解 30 min	混合
加 DNS 试剂 3 mL	加酶液 0.2 mL
混合	混合
沸水浴中 10 min	沸水浴中 10 min
冷却定容至 15 mL	冷却定容至 15 mL
空白调零 540nm 下测定	空白调零 540nm 下测定

⑴ 酶活力的计算

酶活力=（S×D×1000）/（0.2×30）/180.2

式中：

S—测得光吸收值在标准曲线上对应的葡萄糖量，mg；

D—酶液或酶粉稀释倍数；

1000—mg和μg之间的换算系数；

0.2—测定所取酶液量,mL；

30—反应时间，min；

180.2—葡萄糖的摩尔质量。

⑵ 结果的允许差

a. 同一样品两个平行测定值的相对偏差不大于8%。

b. 水平控制检测酶活力与标准酶活力误差小于10%。

c. 标准曲线至少由5个浓度组成。