

葡萄糖氧化酶酶活测定方法

1 酶活单位与定义

在 pH 5.50、37℃ 的条件下，每分钟能把 1.0 μmol 的 β -D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸和 H_2O_2 的酶量为一个单位 U。

2 测定原理

葡萄糖和氧反应，在葡萄糖氧化酶的作用下，生成葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢和无色的还原型邻联茴香胺在过氧化物酶的作用下，生成水和红色的氧化型邻联茴香胺。

3 试剂和溶液

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水（如娃哈哈纯净水）。

3.1 0.25mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，pH 5.50

称取 34.02g 三水合乙酸钠于 1000ml 烧杯中，加入 900ml 经煮沸冷却（去 CO_2 ）的水，搅拌溶解，用冰乙酸调节 pH 至 5.50 ± 0.01 ，用煮沸冷却的水定容至 1000ml。

3.2 邻联茴香胺甲醇缓冲液

称取 0.1000g 邻联茴香胺，加入 10ml 甲醇，混匀器振荡溶解。临用时现配，取 0.1ml 加入到上述缓冲液（3.1）12ml 中混匀。均避光保存。

3.3 180g/L 葡萄糖水溶液

18.00g 无水葡萄糖加适量蒸馏水溶解，并定容至 100ml。配制完毕后室温须放置 2h 以上（或 4℃ 过夜），待变旋平衡后方可使用，4℃ 保存，有效期为 3 天。

3.4 0.03%辣根过氧化物酶液

称取辣根过氧化物酶（HRP，美国 Ameresco 公司，250U/mg）10mg，溶于 30ml 蒸馏水。

4 仪器设备

4.1 可见分光光度计

4.2 恒温水浴锅: $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$

4.3 秒表

4.4 分析天平:感量 1mg

4.5 磁力搅拌器

4.6 漩涡混合器

4.7 酸度计: pH 精确至 0.01

5 分析步骤

5.1 待测酶样品的处理

称取固体样品精确至 0.0001g，置于 100ml 容量瓶中，加入缓冲溶液 3.2 摇匀并定容至刻度。放入一个磁力棒，在磁力搅拌器上搅拌 30min。6000r/min 离心 5min，取上清用缓冲溶液(3.1)做适当稀释后进行试验，使得测定 ΔA 值在 0.25~0.4。液体样品直接用缓冲溶液(3.1) 做适当稀释后进行试验，使得测定 ΔA 值在 0.25~0.4。

5.2 测定

取 2 支干净试管，按顺序分别加入以下试剂，酶样品置于试管中 37℃预 5min。取 10ml 稀释好的酶液置 37℃恒温水浴锅中，恒温 5min。取两支洁净试管，分别加入邻联茴香胺甲醇缓冲液（3.2）2.5mL，葡萄糖溶液(3.3) 0.3mL，辣根过氧化物酶溶液（3.4）0.1mL，置 37℃恒温水浴锅中，恒温 5min 后向其中一管加入 0.1mL 蒸馏水，以空白管调零，随后向样品管中加入 0.1mL 恒温后的样品溶液摇匀，立即在 460nm 波长处用 1cm 杯比色。读取初始吸光度值为 A0 并计时，反应 3min 时读取吸光度值为 A1，得出 $A = A1 - A0$ 。

6 结果表示与计算

$$X = (\Delta A \times n \times 3) / (11.3 \times t \times 0.1)$$

t—测定时间，min

0.1—样品体积，ml

11.3—消光系数

n—稀释倍数

3—反应液体积，ml