



α -半乳糖苷酶 酶活力测定

A.1 原理

α -半乳糖苷酶能将对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖降解成对硝基酚。通过400nm比色测定释放的对硝基酚的量,从而可以计算出反应液中 α -半乳糖苷酶的酶活力。

A.2 试剂和溶液

除特殊说明外,所用的试剂均为分析纯,水均符合GB/T 6682中规定的二级水。

A.2.1 0.05 mol/L醋酸钠缓冲液(pH5.5):称取无水醋酸钠4.2 g定容至1000 mL作为A液;吸取冰醋酸3.0 mL定容至1000 mL作为B液。用B液调节A液至pH至5.5 $\pm$ 0.1。

A.2.2 0.2 mol/L碳酸钠溶液:称取21.198 g无水碳酸钠,定容至1000 mL。

A.2.3 10 mmol/L对硝基酚标准储备液(现配现用):称取0.139 g对硝基苯酚,精确到0.001 g,用碳酸钠溶液定容至100 mL,即为10 mmol/L对硝基苯酚标准贮备液。该储备液需低温保存。

A.2.4 10 mmol/L对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖:称取3.031 g对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖,用醋酸钠缓冲液定容至1000 mL,置于棕色试剂瓶中于4 $^{\circ}$ C以下保质期3天。

A.3 仪器与设备

A.3.1 实验室用样品粉碎机或研钵。

A.3.2 分析天平:感量0.001 g。

A.3.3 pH计:精确至0.01。

A.3.4 磁力搅拌器(附加热功能)或恒温振荡器。

A.3.5 电磁振荡器。

A.3.6 离心机: 2000 r/min。

A.3.7 恒温水浴锅:温度控制范围在30~60 $^{\circ}$ C,精度为0.1 $^{\circ}$ C。

A.3.8 秒表:每小时误差不超过5S。



A.3.9 分光光度计:能检测350~800 nm的吸光度范围。

A.4 测定步骤

A.4.1标准曲线的绘制

依次准确移取对硝基苯酚标准贮备液1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、7mL，用碳酸钠溶液(A.2.2)定容至100mL,配成浓度为0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L、0.7 mmol/L的对硝基苯酚标准工作液。

准确吸取1mL对硝基酚工作液于试管中，加入1mL醋酸钠缓冲液(A.2. 1);对照的空白试管中加入2 mL 醋酸钠缓冲液(A.2. 1);在所有的试管中准确加入8mL碳酸钠溶液(A.2.2)，振荡，在400nm处测定吸光度OD值。以对硝基酚浓度Y轴、吸光度OD值为X轴，绘制标准曲线。

A.4.2 试样溶液的制备

称取试样1 g，精确至0.001 g。用研钵充分研磨后，用醋酸钠缓冲溶液(A.2. 1)转移至100mL容量瓶中定容。取上清液，再用缓冲溶液(A.2.1) 做适当稀释，稀释倍数见表A.1。

A.4.3 测定步骤

将上述稀释酶液(A.4.2)和底物对硝基酚-a -D-吡喃半乳糖溶液分别于37 °C 下振荡10 min预热。然后再分别吸取各溶液0.1 mL，充分混合，于37 °C恒温振荡10 min，加入0.8 mL碳酸钠溶液，振荡混匀，终止酶反应，以蒸馏水调零，在400 nm处测定吸光度OD值。

酶液空白用经过预热的酶液0.1 mL,然后加入0.8mL碳酸钠溶液，振荡混匀，再各加入0.1 mL预热的底物对硝基酚-a -D-吡喃半乳糖溶液于37 °C，振荡10min，在400 nm处测定吸光度OD值。

A.5 试样酶活力计算

试样中半乳糖苷酶的活力以X计，数值以U/g表示，按式(A.1) 计算:

$$X = \frac{[(A - A_0) \times a + b] \times n}{m \times t} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

A--样品酶液的吸光度OD值;



Ao-- 对应酶液的空白吸光度OD值;

a--对硝基酚的标准曲线的斜率;

b--对硝基酚的标准曲线的截距;

n-- 稀释倍数;

m--称取酶制剂的质量, 单位为克(g);

t-- 反应时间min;

X--试样a-半乳糖苷酶的活力。

每个试样取两个平行样进行测定, 以其算术平均值为结果, 结果保留三位有效数字。

A.6结果允许偏差

同一试样两个平行测定值的相对偏差不超过8%。

A.7 a-半乳糖苷酶酶活力与稀释倍数对照表

a -半乳糖苷酶酶活力与稀释倍数对照表见表A.1。

表 A.1 a- 半乳糖苷酶酶活力与稀释倍数对照表

α -半乳糖苷酶酶活力	称样量	稀释倍数
500 U/g	1.0g	[n=2.50 $\times$ 10 ⁴]称取1.0g $\rightarrow$ 250 mL,再吸取1mL $\rightarrow$ 100 mL
2000 U/g	1.0g	[n=1.00 $\times$ 10 ⁵]称取1.0 g $\rightarrow$ 100 mL,再吸取1mL $\rightarrow$ 50 mL,再吸取5mL $\rightarrow$ 50 mL
10000 U/g	1.0g	[n=5.0 $\times$ 10 ⁵]称取1.0g $\rightarrow$ 100 mL,再吸取1mL $\rightarrow$ 100mL,再吸取1mL $\rightarrow$ 50 mL