

1 酶活力的测定

1.1 原理 蛋白酶在一定温度与 PH 条件下，水解酪蛋白底物，然后加入三氯乙酸终止酶反应，并使未水解的 酪蛋白沉淀除去，滤液对紫外光有吸收，可用紫外分光光度法测定，根据吸收度计算酶活力。

1.2 酶活力定义

在一定的条件下，每分钟水解酪蛋白生成 1 μ g 酪氨酸所需的酶的量，为 1 个酶活力单位 (u)。

1.3 仪器和设备

恒温水浴锅：温控 40℃ \pm 0.2℃。

紫外分光光度计。

1.4 试剂和溶液

1.4.1 酶稀释液

称取 L-半胱氨酸盐酸盐 [C₃H₇N₂S • HCl • H₂O=157.63] 5.27 g，氯化钠 [NaCl] 23.4g，加水 500 mL 溶解，另取乙二胺四乙酸二钠 [C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ • 2H₂O] 2.23 g，加水 200 mL，溶解，合并两液混匀，用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调至 pH=5.5，(4.5 日)加水定容至 1000 mL。

1.4.2 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液

称取磷酸氢二钠 [Na₂HPO₄ • 12H₂O] 17.89 g 加水溶解，并定容至 1000 mL。

1.4.3 酪蛋白溶液

称取经硅胶干燥器中干燥至恒重的酪蛋白 0.600g (精确至 0.001g)，置烧杯中，加入 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液 80 mL，在沸水浴中边加热边搅拌，直至完全溶解，冷却后，用 0.1 mol/L 盐酸调至 pH=7.0，转移到 100 mL 容量瓶中，加水至刻度。临用现配。

1.4.4 三氯乙酸溶液

称取三氯乙酸 [C₂HCl₃O₂] 17.99g 加无水乙酸钠 [CH₃COONa] 29.94g 和冰乙酸 [CH₃COOH] 18.9mL，加适量水溶解后，转移至 1000mL 容量瓶中，加水至刻度，振摇均匀。

1.4.5 酪氨酸标准液溶液

精密称取于 105℃干燥至恒重的酪氨酸 50mg (精确至 0.0001 g)，用 0.1 mol/L 盐酸溶解，移入 100 mL 容量瓶中加，并用 0.1 mol/L 盐酸定容至刻度，摇匀。精密量取 1.00mL 置 10mL 容量

瓶中加 0.1 mol/L 盐酸至刻度，摇匀。即得含酪氨酸 50 μ g/mL 的溶液。

1.4.6 试样溶液

精密称取酶试样 0.2 g (精确到 0.0002 g) 置研钵中，加少量酶稀释液研磨 20 min，用酶稀释液移至 100 mL 容量瓶中，加酶稀释液至刻度，充分摇匀；精密量取试样溶液 2.00 mL 至 100 mL 容量瓶中，用酶稀释液至刻度 (稀释至试样溶液吸光度在 0.25~0.40 范围内)，充分摇匀，供测试用 (60 min 内使用)。

1.5 测定步骤

精密量取试样溶液 1.00 mL，置于 10mL 具塞试管中，于 37℃ \pm 0.2℃ 水浴中保温 10 min，精密量取在 37℃ \pm 0.2℃ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5.0 mL，迅速加入，立即震荡均匀，置 37℃ \pm 0.2℃ 水浴中准确反应 10 min，立即精密加入在 37℃ \pm 0.2℃ 水浴中预热的三氯乙酸溶液 5.0 mL，立即振摇均匀，于 37℃ \pm 0.2℃ 水浴中放置 40min，用干燥滤纸滤过，取续滤液，在 2h 内，在波长为 275 nm 处用蒸馏水作参比测出滤液的吸光度 A₁。另精密量取试样溶液 1.00 mL，

置于 10mL 具塞试管中，于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min，精密加入在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的三氯乙酸溶液 5.0 mL，立即摇匀，准确反应 10min，立即精密加入在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5.0 mL，立即震荡均匀，于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 40min，用干燥滤纸滤过，取续滤液，在 2h 内，在波长为 275 nm 处用蒸馏水作参比测出滤液的吸光度 A_2 。另外用蒸馏作参比，在波长为 275 nm 处测定 50 $\mu\text{g/mL}$ 的酪氨酸标准溶液的吸光度 A_2 。

1.6 结果计算

试样中酶活力 X_1 (u/g) 按式 (1) 计算：

$$X_1 = [(A_1 - A_2) / A_3] \times 50 \times (m_1 / m_2) \times (11/10) \times n$$

式中：

A_1 ——待测酶溶液测试滤液的吸光度；

A_2 ——待测酶空白测试滤液的吸光度；

A_3 ——酪氨酸标准液的吸光度；

m_1 ——对照品溶液每毫升中含酪氨酸的量， μg ；

m_2 ——试样的取样量，g；

n ——试样溶液的稀释倍数。