

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 μg 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（37±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（C₃H₇N₂O₂S·HCl·H₂O=157.63）5.27 g，氯化钠（NaCl）23.4 g，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 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调至 pH=5.5，加水稀释至 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 0.6 g(精确至 0.000 2 g),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）17.99 g，加无水乙酸钠（CH₃COONa）29.94 g 和冰乙酸（CH₃COOH）18.9 mL，加适量水溶解后，加水使成 1000 mL，振摇均匀。

1.4.5 酪氨酸标准溶液

称取于 105℃ 干燥至恒重的酪氨酸 50 mg（精确至 0.000 2 g），用 1.0 mol/L 盐酸溶解，移入 100 mL 容量瓶中，并用 1.0 mol/L 盐酸定容至刻度，摇匀。吸取 10.00 mL 置 100 mL 容量瓶中，加 0.1 mol/L 盐酸至刻度，摇匀，即得含酪氨酸 50 μg/mL 的溶液。

5.3.1.4.6 试样溶液

精密称取适量的酶试样（精确到 0.0002 g）置研钵中，加少量酶稀释液研磨 10 min，用酶稀释液移至 100 mL 容量瓶中，按下表的稀释倍数稀释，充分摇匀，供测试用（60 min 内使用）。

酶活力单位	第一次稀释	第二次稀释	第三次稀释
5 万	1.0 g→100 mL	5 mL→50 mL	——
20 万	0.5 g→100 mL	5 mL→100 mL	——
60 万	0.4 g→100 mL	2 mL→100 mL	——
100 万	0.7 g→100 mL	5 mL→50 mL	5 mL→100 mL
120 万	0.6 g→100 mL	5 mL→50 mL	5 mL→100 mL
200 万	0.7 g→100 mL	5 mL→100 mL	5 mL→100 mL

1.5 测定步骤

吸取试样溶液 1.00 mL 置于 10 mL 具塞比色管中，于 37℃±0.2℃ 水浴中保温 10 min，加入在 37℃±0.2℃ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5.00 mL,摇匀,置 37℃±0.2℃ 水浴中,反应 10 min,加入在 37℃±0.2℃ 水浴中预热的三氯乙酸溶液 5.00 mL，摇匀，于 37℃±0.2℃ 水浴中放置 40 min.用干燥滤纸滤过，取续滤液，在 2 h 内，在波长为 275 nm 处用蒸馏水作参比测出滤液的吸光度 A_i。

空白试验：吸取试样溶液 1.00 mL 置于 10 mL 具塞比色管中，于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min，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 5.00 mL，摇匀，反应 10 min，加入在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5.00 mL，摇匀，于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 40 min，用干燥滤纸滤过，取续滤液，在 2 h 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 。

酪氨酸标准溶液的吸光度：用 0.1 mol/L 的盐酸作参比，在波长 275 nm 处测定 50 $\mu\text{g/mL}$ 酪氨酸标准溶液的吸光度 A_3 。

1.6 结果计算

试样中酶活力 X_1 (U/g) 按式 (1) 计算：

$$X_1 = \frac{(A_1 - A_2) \cdot m_1 \cdot n \times 11}{A_3 \cdot m_2 \times 10}$$

式中：

A_1 ——试样溶液的吸光度；

A_2 ——空白试验的吸光度；

A_3 ——酪氨酸标准溶液的吸光度；

m ——对照品溶液每毫升中含酪氨酸的量，单位为微克 (μg)；

m_2 ——试样的质量，单位为克 (g)；

n ——试样溶液的稀释倍数。