

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 $1\ \mu\text{g}$ 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 (37 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 。

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 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}=157.63$) 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 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 $\text{pH}=5.5$, 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 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 0.0002 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 $\text{pH}=7.0$, 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 ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) 17.99 g, 加无水乙酸钠 (CH_3COONa) 29.94 g 和冰乙酸 (CH_3COOH) 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°C 干燥至恒重的酪氨酸 50 mg (精确至 0.0002 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 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 50 mL	——
20 万	0.5 g \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 100 mL	——
60 万	0.4 g \rightarrow 100 mL	2 mL \rightarrow 100 mL	——
100 万	0.7 g \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 50 mL	5 mL \rightarrow 100 mL
120 万	0.6 g \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 50 mL	5 mL \rightarrow 100 mL
200 万	0.7 g \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 100 mL	5 mL \rightarrow 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 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min, 加入在 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5.00 mL, 摇匀, 置 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 反应 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, 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_1 。

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。