



中华人民共和国国家标准

GB/T 25879—2010

鸡蛋蛋清中溶菌酶的测定 分光光度法

Determination of lysozyme in chicken egg white—
Spectrophotometry

2011-01-10 发布

2011-06-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：扬州大学动物科学与技术学院。

本标准主要起草人：王金玉、谢恺舟、戴国俊、侯启瑞、刘大林。

鸡蛋蛋清中溶菌酶的测定

分光光度法

1 范围

本标准规定了鸡蛋蛋清中溶菌酶的分光光度测定方法。

本标准适用于鸡蛋蛋清中溶菌酶含量和活力的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

蛋清 egg white

位于鸡蛋蛋壳内膜和蛋黄膜之间的半流动胶体物质。

3.2

溶菌酶 lysozyme

一种专门作用于微生物细胞壁的糖苷水解酶。

4 鸡蛋蛋清中溶菌酶含量的测定

4.1 原理

溶菌酶在 281 nm 波长处有最大吸收峰。溶菌酶标准品用每升溶液含 9 g 氯化钠的溶液溶解并稀释成不同梯度浓度,在 281 nm 波长处测定吸光度并绘制标准曲线,求出标准曲线回归方程。试样经过处理,按溶菌酶标准品测定方法,测定试样中的吸光度,根据其吸光度值由标准曲线回归方程计算试样中溶菌酶含量。

4.2 仪器

4.2.1 紫外-可见分光光度计(波长范围 190 nm—900 nm,波长确定性 ± 0.3 nm,波长重复精度 ± 0.1 nm)。

4.2.2 电子分析天平(感量 0.1 mg,1 mg)。

4.2.3 离心机(最大离心力 2 325g,具 10 mL 离心管)。

4.3 试剂与材料

4.3.1 溶菌酶标准品,优级纯,活力在 20 000 U/mg 左右。

4.3.2 氯化钠,分析纯。

4.3.3 蒸馏水,按 GB/T 6682 执行。

4.3.4 医用脱脂纱布。

4.4 试剂配制

4.4.1 0.9%氯化钠溶液:称取氯化钠(4.3.2)0.9 g,溶解于蒸馏水中,定容至 100 mL。

4.4.2 溶菌酶标准工作液:称取溶菌酶标准品(4.3.1)0.500 g,以0.9%氯化钠溶液(4.4.1)溶解定容至1 000 mL,得到500 μg/mL的溶菌酶标准工作液,于4℃密封保存备用,1周内使用。

4.5 分析步骤

4.5.1 标准曲线的绘制

分别吸取溶菌酶标准工作液(4.4.2)1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL于25 mL容量瓶中,以0.9%氯化钠溶液(4.4.1)稀释至刻度,混匀。用10 mm石英比色皿比色,以0.9%氯化钠溶液(4.4.1)为参比溶液,在波长281 nm处依次测定各标准工作液的吸光度,以溶菌酶标准工作液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,并求出标准曲线回归方程。

4.5.2 试样测定

鸡蛋蛋清用4层纱布过滤,取过滤试样1 mL,用0.9%氯化钠溶液稀释定容至100 mL,混匀,避免起泡沫。吸取5 mL蛋清的氯化钠溶液,1 310g离心5 min,取上清液,按照绘制标准曲线的操作步骤(4.5.1),在波长281 nm处测定试样溶液的吸光度。平行测定三次,取结果的算术平均值,由标准曲线回归方程计算试样溶液中溶菌酶的浓度。

4.6 结果的计算与表述

根据试样溶液吸光度值,用标准曲线回归方程计算试样溶液中溶菌酶的浓度c。鸡蛋蛋清中溶菌酶的含量按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{V_1} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——鸡蛋蛋清中溶菌酶的含量,单位为微克每毫升(μg/mL);

c——试样溶液中溶菌酶的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V——试样溶液定容的体积,单位为毫升(mL);

V₁——试样的体积,单位为毫升(mL)。

4.7 精密性、准确性、灵敏度

4.7.1 精密性

本方法检测鸡蛋蛋清中溶菌酶含量的批内变异系数CV≤3%,批间变异系数CV≤5%。

4.7.2 准确性

鸡蛋蛋清溶液中添加溶菌酶标准品浓度在20 μg/mL~60 μg/mL范围内,回收率≥95%。

4.7.3 灵敏度

本方法检测鸡蛋蛋清溶液中溶菌酶含量的最低检测限为0.3 μg/mL。

5 鸡蛋蛋清中溶菌酶活力的测定

5.1 原理

溶菌酶通过溶解G⁺菌的细胞壁使细菌溶解,菌液在可见光范围内的吸光度降低。酶的活力表示为在特定条件下单位时间内转化底物的速度。本标准根据该原理,以溶壁微球菌为底物,用分光光度法,以450 nm波长处菌液单位时间内吸光度降低程度为依据,测定溶菌酶的活力。

5.2 仪器

5.2.1 紫外-可见分光光度计(波长范围190 nm~900 nm,波长确定性±0.3 nm,波长重复精度±0.1 nm)。

5.2.2 电子分析天平(感量0.1 mg,1 mg)。

5.2.3 摇床(控温范围0℃~100℃,转速振幅:0 r/min~300 r/min)。

5.2.4 pH计(精密度±0.01)。

5.2.5 离心机(最大离心力2 325g,具10 mL离心管)。

5.2.6 高压灭菌锅。

5.2.7 超低温冰箱。

5.3 试剂与材料

5.3.1 氯化钠,分析纯。

5.3.2 甘油(丙三醇),分析纯。

5.3.3 磷酸氢二钠,分析纯。

5.3.4 磷酸二氢钠,分析纯。

5.3.5 牛肉膏,生化试剂。

5.3.6 蛋白胨,生化试剂。

5.3.7 酵母提取物,生化试剂。

5.3.8 琼脂,生化试剂。

5.3.9 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus* Fleming)。

5.4 试剂配制与培养基制备

5.4.1 0.9%氯化钠溶液:称取氯化钠 0.9 g,溶解于蒸馏水中,定容至 100 mL,121 °C 高压灭菌 30 min。

5.4.2 20%甘油(丙三醇)溶液:称取甘油 20.0 g,溶解于蒸馏水中,定容至 100 mL,121 °C 高压灭菌 30 min。

5.4.3 0.2 mol/L pH6.2 磷酸盐缓冲液:称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.63 g,用蒸馏水溶解定容至 1 000 mL;称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)33.00 g,蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。取 Na_2HPO_4 溶液 18.5 mL 与 NaH_2PO_4 溶液 81.5 mL 混合,混匀即可。

5.4.4 固体培养基:牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g 溶解于 100 mL 水中,各组分溶解后,加入琼脂 2.0 g,持续搅拌至琼脂完全溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠调整 pH 至 7.2~7.4,并用水定容至 100 mL,分装在试管里,每管液量为 15 mL~20 mL,加棉花塞,121 °C 高压灭菌 30 min 后,倒入培养皿中加盖,冷却至室温。

5.4.5 液体 LB 培养基:蛋白胨 1.0 g、酵母提取物 0.5 g、氯化钠 1.0 g 溶解于 100 mL 水中,用 1 mol/L 氢氧化钠调整 pH 至 7.2~7.4,分装在试管里,121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

5.5 分析步骤

5.5.1 菌液的制备

将溶壁微球菌(5.3.9)先接种于灭菌的固体培养基(5.4.4)中活化和扩大培养,再接种于灭菌的液体 LB 培养基(5.4.5)中,37 °C 摇床培养至菌体增殖,培养 9 h~10 h,将培养液 1 310 g 离心 10 min,收集沉淀的菌体。该菌体加入 3 倍体积灭菌的 0.9%氯化钠溶液(5.4.1)悬浮,1 310 g 离心 10 min,收集沉淀的菌体,重复 4 次~5 次。再用 20%甘油溶液(5.4.2)将菌体制成黏稠状,置于一 60 °C 保存,半年内使用。

使用前,用磷酸盐缓冲液(5.4.3)溶解溶壁微球菌,调至 OD_{450} 吸光度值范围在 1.2~1.4,2 °C~8 °C 放置。

5.5.2 鸡蛋蛋清溶液的制备

鸡蛋蛋清用 4 层纱布过滤。取过滤试样 1 mL,用磷酸盐缓冲液(5.4.3)定容至 100 mL,1 310 g 离心 5 min 除去不溶物。

5.5.3 试样测定

按 4.5 的方法,在 281 nm 波长处测定鸡蛋蛋清溶液的吸光度,并计算蛋清溶液中的溶菌酶浓度 c 。鸡蛋蛋清溶液、菌液于 25 °C 水浴中保温,在 450 nm 波长处测定酶活力,试样测定反应体系见表 1。

表 1 试样测定反应体系

加入物	测定液/mL	空白液/mL
鸡蛋蛋清溶液	0.2	0.0
菌液	1.0	0.0
磷酸盐缓冲液(pH6.2)	0.0	1.2

用空白液调零,加 0.2 mL 鸡蛋蛋清溶液到 10 mm 石英比色皿中,从加入 1.0 mL 菌液开始计时,记录在 450 nm 波长处反应 15 s 和 75 s 时的读数为 A_1 、 A_2 。按每分钟 OD_{450} 值下降 0.001 为一个活力单位(U)的定义,鸡蛋蛋清中溶菌酶的活力按式(2)计算:

$$E_A = \frac{\Delta E_{450}}{0.001 \times E_w} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

E_A ——鸡蛋蛋清中溶菌酶活力,单位为单位每毫克(U/mg);

ΔE_{450} ——在两时间点测定的吸光度 A_1 、 A_2 之差;

E_w ——0.2 mL 鸡蛋蛋清溶液中含有溶菌酶的质量,单位为毫克(mg)。

0.2 mL 鸡蛋蛋清溶液中溶菌酶的质量 E_w 与试样溶液中溶菌酶的浓度 c 之间的关系按式(3)计算:

$$E_w = \frac{0.2 \times c}{1\ 000} \quad \dots\dots\dots(3)$$

5.6 重复性

在相同条件下获得的三次独立测试结果的变异系数 $CV \leq 10\%$ 。