



中华人民共和国国家标准

GB/T 33409—2016

β -半乳糖苷酶活性检测方法 分光光度法

Determination of the activity of beta-galactosidase—Spectrophotometric method

2016-12-30 发布

2017-07-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:深圳市计量质量检测研究院、中国测试技术研究院。

本标准主要起草人:张世伟、周李华、赖心田、陈血建、唐栋、洪晓明、王珍妮、杨国武。

β-半乳糖苷酶活性检测方法 分光光度法

1 范围

本标准规定了乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)、脆壁酵母 (*Saccharomyces fragilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 发酵生产的 β-半乳糖苷酶活性检测方法。

本标准适用于生化试剂、工业酶制剂中 β-半乳糖苷酶活性的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

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文件。

3.1

β-半乳糖苷酶活性单位 beta-galactosidase activity unit

在规定的反应条件下,每分钟催化转化一个微摩尔邻硝基苯-β-D-半乳糖苷的酶量。

4 原理

β-半乳糖苷酶能迅速催化邻硝基苯-β-D-半乳糖苷生成邻硝基苯酚和半乳糖,通过吸光度值的变化得出邻硝基苯酚的生成量计算出酶活。

5 仪器设备及器具

5.1 pH 计:精确至 0.01 pH。

5.2 分析天平:感量 0.000 1 g。

5.3 紫外-可见分光光度计:波长准确度±1 nm,吸光度值精确至 0.001。

5.4 1 cm 石英比色皿。

5.5 恒温水浴槽:控温精度±0.5 °C。

6 试剂

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

6.1 反应缓冲液

6.1.1 pH 6.5 磷酸盐缓冲液,适用于乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母、脆壁酵母来源的 β -半乳糖苷酶

称取 8.8 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、8.0 g 三水磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、0.25 g 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和 18.6 mg 二水 EDTA($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶解在 900 mL 的水中,使用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液,调节 pH 至 6.50 ± 0.05 ,用去离子水定容至 1 000 mL,摇匀。

6.1.2 pH 7.3 磷酸盐缓冲液,适用于大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶

称取 3.8 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、16.4 g 三水磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、0.25 g 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和 18.6 mg 二水 EDTA 溶解在 900 mL 的水中,使用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液,调节 pH 至 7.30 ± 0.05 ,用去离子水定容至 1 000 mL,摇匀。

6.1.3 pH 4.5 磷酸盐缓冲液,适用于黑曲霉、米曲霉来源的 β -半乳糖苷酶

称取 22.5 g 三水磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、11.2 g 一水合柠檬酸(Citric acid monohydrate)溶解在 900 mL 的水中,使用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液,调节 pH 至 4.50 ± 0.05 ,用去离子水定容至 1 000 mL,摇匀。

6.2 ONPG 底物溶液

将 250.0 mg 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG)溶解在约 80 mL 相应的反应缓冲液中,用反应缓冲液定容至 100 mL,摇匀,需在使用前 2 h 内制备。

6.3 碳酸钠溶液

将 50 g 碳酸钠(Na_2CO_3)和 37.2 g 二水 EDTA($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶解在大约 900 mL 的去离子水中,用去离子水定容至 1 000 mL,摇匀。

6.4 邻硝基苯酚标准储备液

称取 139.0 mg 的邻硝基苯酚(*o*-nitrophenol),用 10 mL 96% 的乙醇溶解后,用去离子水定容至 1 000 mL,摇匀。

7 分析步骤

7.1 标准曲线的绘制

分别移取邻硝基苯酚储备液 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL 和 14 mL 到 100 mL 的容量瓶中,分别加入 25 mL 的碳酸钠溶液,再用反应缓冲液定容至刻度,摇匀,溶液邻硝基苯酚的浓度分别是 0.02 mmol/L、0.04 mmol/L、0.06 mmol/L、0.08 mmol/L、0.10 mmol/L、0.12 mmol/L 和 0.14 mmol/L。使用 1 cm 的石英比色皿,用去离子水作空白,在 420 nm 处测定每个稀释液的吸光度。以邻硝基苯酚物质的量为横坐标,以稀释液的吸光度为纵坐标做标准曲线,得出回归方程。相关系数应在 0.999 0 以上时方可使用,否则需重做。

7.2 试验液的制备

7.2.1 固体样品待测酶液制备

称取酶粉 0.1 g(精确至 0.000 1 g),用相应的反应缓冲液溶解后,定容至 10 mL,使得最后的溶液中含有 0.035 U/mL~0.120 U/mL 的酶活力。

7.2.2 液体样品待测酶液制备

将液体酶样适当稀释,使得最后的溶液中含有 0.035 U/mL~ 0.120 U/mL 的酶活力。

7.3 测定

取 1.0 mL 待测酶液加入 10 mL 的具塞比色管中,于 37.0 °C±0.5 °C 恒温水浴槽中平衡 15 min,接着快速加入 5.0 mL ONPG 底物溶液(使用前需要在 37.0 °C±0.5 °C 平衡),加盖颠倒混匀。在 37.0 °C±0.5 °C 恒温条件下,精确反应 10 min 后,迅速加入 2.0 mL 碳酸钠溶液,晃动混合,静置。将添加 ONPG 底物和碳酸钠溶液的顺序颠倒,其余步骤与样品处理方式相同,作为空白对照。在 30 min 内,用 1 cm 的石英比色皿,在 420 nm 处测定样品试验液和空白液的吸光度。样品试验液和空白液的吸光度之差即 ΔA ,将 ΔA 带入标准曲线线性回归方程计算试验液中邻硝基苯酚的浓度(米曲霉和黑曲霉来源的 β -半乳糖苷酶活性测定时,试剂的平衡和反应温度均为 55.0 °C±0.5 °C,其余测定步骤同上)。

8 计算

8.1 结果计算

8.1.1 液体样品

按式(1)计算:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{c \times 8 \times D}{1 \times 10} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c —— 试验液中邻硝基苯酚的浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L),从标准曲线中得出;

8 —— 反应试剂的总体积,单位为毫升(mL);

D —— 稀释倍数;

1 —— 参与反应酶液的体积,单位为毫升(mL);

10 —— 反应时间,单位为分钟(min)。

计算结果保留 3 位有效数字。

8.1.2 固体样品

按式(2)计算:

$$\text{酶活力(U/g)} = \frac{c \times 8 \times D}{1 \times 10} \times \frac{V}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

c —— 测定液中邻硝基苯酚的浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L),从标准曲线中得出;

8 —— 反应试剂的总体积,单位为毫升(mL);

D —— 稀释倍数;

1 —— 参与反应酶液的体积,单位为毫升(mL);

10 —— 反应时间,单位为分钟(min);

V —— 溶解酶粉的液体体积,单位为毫升(mL);

m —— 称取酶粉的质量,单位为克(g)。

计算结果保留 3 位有效数字。

8.2 质量控制

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
β-半乳糖苷酶活性检测方法 分光光度法
GB/T 33409—2016

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

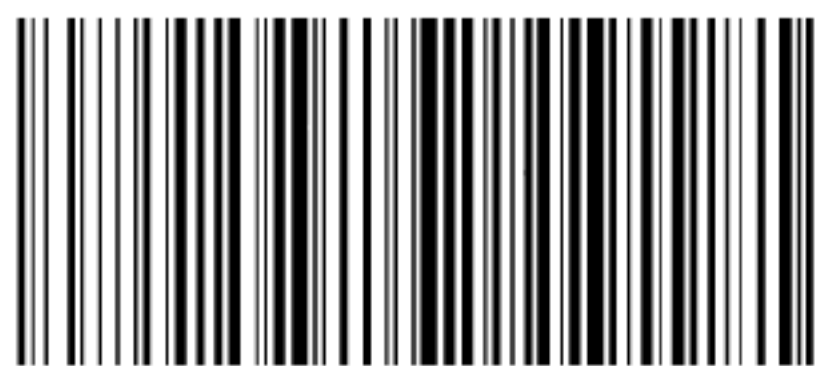
服务热线: 400-168-0010

2017年1月第一版

*

书号: 155066·1-55860

版权专有 侵权必究



GB/T 33409-2016