

中华人民共和国国家标准

GB/T 30990—2014

溶菌酶活性检测方法

Determination of the activity of lysozyme

2014-07-24 发布

2015-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
溶菌酶活性检测方法
GB/T 30990—2014

*

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.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 7 千字
2014年12月第一版 2014年12月第一次印刷

*

书号: 155066·1-50531 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

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、珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:赖晓芳、谭和平、林霖、孙登峰、赖心田、兰全学、杨国武、李意、李浙、潘兰芳、杨泽、莫秋华。

溶菌酶活性检测方法

1 范围

本标准规定了溶菌酶活性检测方法。

本标准适用于生化试剂、不同工业产品及其原料中溶菌酶活性的测定。

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

溶菌酶 lysozyme

一种葡萄糖苷酶,通过其肽链中的 Glu35 和 Asp52 残基构成的活性部位催化水解细菌细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸的 C1 与 N-乙酰氨基葡萄糖的 C4 之间的 β -糖苷键,从而迅速溶解细菌细胞壁中的多糖成分。

注:又名球蛋白 G、胞壁质酶、N-乙酰胞壁质聚糖水解酶。

3.2

溶菌酶活性 lysozyme activity

在 25 °C, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.2)中,以溶壁微球菌为底物,于 450 nm 处每分钟使吸光度值下降 0.001 时所需的酶量。活性单位为 U/mg 或 U/g 或 U/mL。

4 原理

本检测方法以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)为反应底物,使用溶菌酶催化水解其细胞壁,细菌因失去细胞壁的保护无法维持细胞内渗透压平衡而裂解死亡,导致菌悬液的浊度降低,通过紫外-可见分光光度计测定在 450 nm 处的吸光光度值的变化并换算出样品酶活性单位。

5 仪器设备及器具

5.1 生物安全柜。

5.2 灭菌锅。

5.3 摇床:(37±1) °C。

5.4 恒温培养箱:(37±1) °C。

5.5 离心机:可达 12 000 g/min。

GB/T 30990—2014

- 5.6 pH计:精确至0.01 pH。
- 5.7 电子天平:分度为0.001 g。
- 5.8 恒温水浴锅:(25±1) °C。
- 5.9 紫外-可见分光光度计:吸光度值精确至0.001。
- 5.10 石英比色皿:1 cm。
- 5.11 微量移液器:100 μL ~1 000 μL。

6 试剂

6.1 总则

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6882规定的三级水。

6.2 磷酸盐缓冲液(pH 6.2)

二水合磷酸二氢钠 11.71 g,十二水合磷酸氢二钠 7.85 g,定容至1 L。

6.3 0.1 mol/L 氢氧化钠

称0.4 g氢氧化钠充分溶解于50 mL去离子水,定容至100 mL,高压蒸汽灭菌(121 °C,20 min),4 °C保存备用,用时恢复至室温。

6.4 液体LB培养基

胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,加适量去离子水充分溶解,采用0.1 mol/L氢氧化钠(6.3)调节pH至7.4,并定容至1 L。高压蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。4 °C保存备用,用时恢复至室温。

6.5 LB琼脂斜面

胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,琼脂粉 20 g,加适量去离子水充分溶解,采用0.1 mol/L氢氧化钠(6.3)调节pH至7.4,并定容至1 L。高压蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。采用无菌试管,分装制成琼脂斜面,4 °C保存备用,用时恢复至室温。

6.6 LB琼脂平板

胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,琼脂粉 20 g,加适量去离子水充分溶解,采用0.1 mol/L氢氧化钠(6.3)调节pH至7.4,并定容至1 L。高压蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。采用无菌平皿,分装制成琼脂平板,4 °C保存备用,用时恢复至室温。

7 分析步骤

7.1 反应底物制备

注:若市售溶壁微球菌冻干粉经验证与经上述制备的反应底物等效,则可直接使用。

7.1.1 菌株复苏

以无菌操作方式,取0.5 mL液体LB培养基(6.4),滴入装有溶壁微球菌标准菌株(*Micrococcus lysodeikticus* Fleming,CGMCC 1.634)冻干粉的安瓿瓶中,轻轻振荡,使冻干菌体溶解呈悬浮状。将菌体悬浮液移植入LB琼脂斜面(6.5),37 °C培养箱,培养18 h~24 h。4 °C保存备用。

7.1.2 菌株扩大培养

以无菌操作方式,挑取适量菌体至 LB 琼脂平板(6.6)中划线纯化,在 (37 ± 1) ℃培养箱中培养24 h,并观察单菌落形态。选取湿润,凸起,边缘光滑,呈黄色的菌落,于 LB 琼脂平板(6.6)中再次划线纯化,在 (37 ± 1) ℃培养箱中培养 24 h。平板于 4℃保存,一个月内使用。

挑取二次划线纯化的 LB 琼脂平板(6.6)中的单菌落于 50 mL 液体 LB 培养基(6.4)中混匀,于 (37 ± 1) ℃恒温摇床中,110 r/min 摇菌 18 h 后于 4℃保存,用时恢复至室温,一周内使用。

取 500 μ L 菌液至 50 mL 液体 LB 培养基(6.4)中混匀,于 (37 ± 1) ℃恒温摇床中,110 r/min 摇菌 18 h 后用于制备菌悬液。

7.1.3 菌悬液制备

将菌液(7.1.2)离心(12 000 g, 5 min)收集菌体,采用磷酸盐缓冲液(6.2)洗涤菌体至无培养基状态。

开机(5.9),调波长至 450 nm,于 (25 ± 1) ℃室温预热,将一定量菌体悬浮于按 6.2 配制的磷酸盐缓冲液中,调节菌体浓度,使 450 nm 处吸光度值为 1.300。

7.2 测定

7.2.1 试样制备

7.2.1.1 前处理

工业产品及其原料应充分溶解,除去不溶物后再进行量取;鸡蛋样品应采用蛋清分离器取其蛋清后再进行称重。

7.2.1.2 生化试剂

准确称取 1 mg(精确至 0.001 g)固体酶粉或量取 1 mL(精确至 0.01 mL)液体酶液,于适量磷酸盐缓冲液中,用磷酸盐缓冲液(6.2)稀释,使其 1 min 内吸光度值变化量处于 0.025~0.125,且 1 min 时读值不应小于 1.000。同一试样进行平行试验测定。

7.2.1.3 工业产品及原料

准确称取 1 g(精确至 0.01 g)样品,于适量磷酸盐缓冲液(6.2)使其充分溶解并定容至 100 mL,使其 1 min 内吸光度值变化量处于 0.025~0.125,且 1 min 时读值不应小于 1.000。同一试样进行平行试验测定。

7.2.2 检测

于 (25 ± 1) ℃的室温或恒温水浴锅中,于反应管中加入 2.5 mL 菌悬液(7.1.3),加入 0.5 mL 酶液,反应 1 min 时记录 450 nm 处的读数 A_1 ,反应 2 min 时记录 450 nm 处的读数 A_2 。通过公式换算得出对应的酶活性。每个样品做两个平行。

8 结果

8.1 结果计算

用式(1)计算酶活性:

GB/T 30990—2014

$$I = \frac{|A_1 - A_2|}{0.001 \times E_w} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

I —— 酶活性；

$|A_1 - A_2|$ —— 450 nm 处每分钟吸光度的变化；

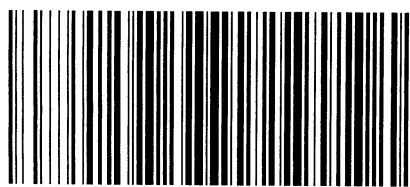
E_w —— 0.5 mL 检测用酶液中含有原始酶液的质量(mg 或 g)或体积(mL)；

0.001 —— 以每分钟使 450 nm 处吸光度值下降 0.001 为一个活性单位。

注：生化试剂中，固体样品活性单位为 U/mg，液体样品活性单位为 U/mL；工业产品及原料活性单位为 U/g。

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应超过算数平均值的 10%。



GB/T 30990-2014

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-50531

定价: 14.00 元