

ICS 07.080

CCS A40

团 体 标 准

T/ CAB

NADH 氧化酶活力的测定 分光光度法

Determination of the activity of NADH
oxidase — Spectrophotometric method

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国产学研合作促进会 发布



版权保护文件

版权所有归属于该标准的发布机构。除非有其他规定，否则未经许可，此发行物及其章节不得以其他形式或任何手段进行复制、再版或使用，包括电子版，影印件，或发布在互联网及内部网络等。使用许可可于发布机构获取。

目 次

前 言 111

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 原理..... 1

5 试剂..... 1

6 仪器设备..... 2

7 试样制备和试验步骤..... 2

 7.1 试样酶液的制备..... 2

 7.2 测定..... 2

8 试验数据处理..... 2

 8.1 液体样品..... 2

 8.2 固体样品..... 3

9 精密度..... 3

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国标准化研究院提出。

本文件由中国产学研合作促进会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

NADH 氧化酶活力的测定 分光光度法

1 范围

本文件描述了测定 NADH 氧化酶活力的分光光度法。

本文件适用于生化试剂、工业酶制剂中 NADH 氧化酶活力的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件。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

NADH 氧化酶活力单位 NADH oxidase activity unit

在30 °C、pH 7.0的条件下，每分钟氧化1 μmol NADH所需的酶量为一个酶活力单位，单位为U。

4 原理

NADH 氧化酶催化底物 NADH 的氧化生成 NAD^+ ， NAD^+ 在 340 nm 下无吸收，而 NADH 有吸收，其 $\epsilon_{340}=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，通过监测 340 nm 下吸光度的变化来测定 NADH 的消耗，计算酶活力。

5 试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）：CAS 号 606-68-8，纯度 $\geq 98\%$ 。

5.2 黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）：CAS 号 84366-81-4，纯度 $\geq 95\%$ 。

5.3 三羟基甲基氨基甲烷（Tris）-HCl 缓冲液：50 mmol/L，pH 7.0。

5.4 反应底物溶液：含 0.13 mmol/L NADH、0.1 mmol/L FAD 及 50 mmol/L Tris，pH 7.0。

使用分析天平准确称取9.2 mg NADH和8.3 mg FAD溶解在100 mL的Tris-HCl缓冲液（5.4）中，充分混匀，现用现配。

6 仪器设备

6.1 分析天平：感量为 0.001 mg。

6.2 pH 计：精度为 0.01。

6.3 紫外-可见分光光度计：带有温控比色皿槽，波长精度为 1 nm，吸光度值精度为 0.001。

6.4 石英比色皿：1 cm。

6.5 移液器：10 μL、1 000 μL。

7 试样制备和试验步骤

7.1 试样酶液的制备

7.1.1 液体样品待测酶液制备

使用移液器移取适量NADH氧化酶液体样品溶于水中进行稀释，使待测酶液活力控制在15 U/mL以下。

7.1.2 固体样品待测酶液制备

使用分析天平称取适量NADH氧化酶固体样品（精确至0.000 1 g）溶于水中，使待测酶液活力控制在15 U/mL以下。

7.2 测定

使用移液器准确移取1 000 μL反应底物溶液于石英比色皿中，置于分光光度计的温控比色皿槽内，待温度稳定于30 °C ±1 °C后，迅速用移液器加入10 μL待测酶液，加盖颠倒混匀后立即放入分光光度计，在340 nm下扫描1 min，保存吸光度曲线。通过线性回归方程计算斜率。每个待测酶液平行测定三次。

8 试验数据处理

8.1 液体样品

试样中NADH氧化酶活力按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{(V_1 + V_2) \times k \times D}{\varepsilon \times V_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X_1 ——NADH氧化酶活力，单位为酶活力单位每毫升（U/mL）；

V_1 ——反应底物溶液的体积，单位为微升（ μL ）；

V_2 ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（ μL ）；

k ——酶活力测定中吸光度曲线斜率，单位为吸光度每分钟（Abs/min）；

D ——稀释倍数；

ε ——吸光系数，单位为 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，计算结果保留三位有效数字。

8.2 固体样品

试样中NADH氧化酶活力按式（2）计算：

$$X_2 = \frac{(V_1 + V_2) \times k}{\varepsilon \times V_2} \times \frac{V_0}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X_2 ——NADH氧化酶活力，单位为酶活力单位每克（U/g）；

V_1 ——反应底物溶液的体积，单位为微升（ μL ）；

V_2 ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（ μL ）；

k ——酶活力测定中吸光度曲线斜率，单位为吸光度每分钟（Abs/min）；

ε ——吸光系数，单位为 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）；

V_0 ——溶解酶粉的液体体积，单位为毫升（mL）；

m ——称取酶粉的质量，质量为克（g）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算数平均值的10%。