

# 纤溶酶检测中底物配制试剂的优化研究

## ——基于MTB缓冲液与超纯水的比较

陈茂姣，何 刚，邓燕琴

（四川新希望乳业有限公司洪雅阳平分公司，四川眉山 620360）

**摘 要：** [目的]本研究旨在探究不同底物配制试剂对乳制品中纤溶酶检测结果的影响，以建立一种准确、稳定的检测方法。 [方法]通过底物显色法，比较超纯水和MTB缓冲液配制纤溶酶底物的效果。 [结果]MTB缓冲液在吸光度平行性、加标回收率（113%~126%）和酶活力测定值上均优于超纯水（加标回收率141%~152%，超出标准范围）。MTB缓冲液能够提供适宜的pH值（7.6±0.1）和稳定的离子环境，显著提高检测的准确性和重复性。 [结论]本研究为乳制品中纤溶酶的精准检测提供优化方案，对提升乳制品质量控制水平具有指导意义。

**关键词：** 纤溶酶；酶标仪；MTB缓冲液；纤溶酶底物；乳制品检测

文章编号：1671-4393（2026）03-0068-05

DOI:10.12377/1671-4393.26.03.10

# Optimization of Substrate Preparation Reagents for Plasmin Detection

## --A Comparative Study of MTB Buffer and Ultrapure Water

CHEN Maojiao, HE Gang, DENG Yanqin

（Hongya Yangping Branch, Sichuan New Hope Dairy Co., Ltd., Meishan Sichuan 620360）

**Abstract:** [Objective]This study aimed to investigate the effects of different reagents for substrate preparation on the detection of plasmin in dairy products, with the goal of establishing an accurate and stable detection method. [Method]A chromogenic substrate method was employed to compare the effects of using ultrapure water versus MTB buffer for plasmin substrate preparation.[Result]The MTB buffer group demonstrated superior performance in terms of absorbance parallelism, spike recovery rate（113%~126%）, and plasmin activity measurements compared to the ultrapure water group（spike recovery rate 141%~152%, exceeding the standard range）.The MTB buffer provided an optimal pH（7.6±0.1）and a stable ionic environment, significantly improving the accuracy

**作者简介：** 陈茂姣（1993-），女，四川眉山人，本科，助理工程师，研究方向为食品安全检测；  
何 刚（1985-），男，四川眉山人，本科，助理工程师，研究方向为食品科学与工程；  
邓燕琴（1990-），女，四川峨眉人，本科，工程师，研究方向为乳品检测。

and repeatability of the detection.[Conclusion]This study offered an optimized solution for the precise detection of plasmin in dairy products, providing guidance for enhancing quality control in the dairy industry.

**Keywords:** plasmin; microplate reader; MTB buffer; plasmin substrate; dairy product detection

在乳制品工业快速发展的当下，产品品质与安全已成为行业关注的核心焦点。乳及其制品的品质受多种因素影响，其中内源性酶类的作用尤为关键。纤溶酶（Plasmin）作为牛乳中重要的内源性蛋白酶，属于碱性丝氨酸蛋白酶家族，主要通过乳腺分泌从血液转移至乳液中，在乳及其制品的加工和贮藏过程中发挥着不可忽视的作用<sup>[1, 2]</sup>。纤溶酶能专一降解纤维蛋白凝胶，对牛乳中酪蛋白等蛋白质成分也有水解作用<sup>[3]</sup>。研究表明，牛乳中的纤溶酶常与酪蛋白微粒结合，具有一定耐热性，经常规灭菌后仍可能保持活性，在贮藏期间破坏乳蛋白结构，导致产品出现老化凝胶、苦味积累、脂肪分层及风味劣化等问题，影响商业价值与消费者体验<sup>[4, 5]</sup>。不同生产工艺对纤溶酶残留活性影响显著，例如UHT工艺虽能灭菌，但纤溶酶易部分变性，残留活性成为影响货架期品质的关键因素<sup>[6]</sup>；巴氏杀菌乳因灭菌温度较低，纤溶酶残留活性更高，冷藏品质控制难度更大<sup>[5]</sup>。因此，准确检测纤溶酶含量是质量控制的前提。底物显色法因操作简便、灵敏度高而广泛应用，但试剂配制方式差异影响检测准确性，尤其是底物配制介质选择至关重要。现有研究虽涉及检测条件优化，但针对不同试剂配制底物影响的系统性探究仍较缺乏。本研究采用底物显色法，探究超纯水和MTB缓冲液配制底物对检测结果的影响，旨在建立准确稳定的检测方法，为乳及其制品质量控制提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验原理

采用底物显色法检测乳制品中纤溶酶含量，其核心原理基于酶的专一性催化反应。首先，对样品

进行离心去脂处理，去除脂肪层干扰，使乳清中的纤溶酶充分解离释放。随后，在特定的反应条件下，纤溶酶能够特异性水解其底物D-Val-Leu-Lys-P-硝基苯胺，释放具有显色特性的硝基苯胺。反应结束后，加入三氯乙酸终止反应并沉淀未反应的蛋白质及其他大分子物质，经离心处理后取上清液，利用酶标仪在405 nm波长下测定上清液的吸光度值。由于硝基苯胺的生成量与纤溶酶的活性呈正相关，因此通过测定吸光度值的变化，并结合空白对照和加标回收试验的数据，能够准确计算样品中纤溶酶含量。

该方法的特异性主要依赖纤溶酶对特定底物的专一性识别和水解能力，有效避免其他蛋白酶对检测结果的干扰。同时，通过严格控制反应温度、pH值以及反应时间等关键参数，确保酶促反应在最优条件下进行，从而提高检测结果的准确性和重复性。

### 1.2 试剂与仪器

#### 1.2.1 试剂

硝基苯胺二盐酸盐（纤溶酶底物，D-Val-Leu-Lys-P-硝基苯胺二盐酸盐），上海源叶生物科技有限公司；吐温80、三氯乙酸、柠檬酸三钠、三羟甲基氨基甲烷（TRIS），成都科隆公司；氯化钠、乙酸，国药集团化学试剂有限公司；纤溶酶标准品，Sigma-Aldrich公司；超纯水，由Milli-Q超纯水系统制备。

#### 1.2.2 仪器设备

酶标仪，安捷伦科技（中国）有限公司；涡旋振荡器，德国IKA公司；水浴锅，昆山市超声仪器有限公司；移液枪，包括10、100、200、1 000  $\mu\text{L}$ 等规格，上海民桥精密科学仪器有限公司；高速离心

机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；超纯水系统，默克密理博公司；电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；容量瓶，包括10、50、100 mL等规格，蜀牛玻璃仪器有限公司；离心管，包括1.5、2 mL等规格，Axygen公司；微孔板，96孔聚苯乙烯微孔板，Corning公司；0.22 μm水相滤头，津腾试验设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试剂准备

试验前，将冷冻试剂室温解冻，检查试剂状态，异常试剂及时更换。

1.3.2 离心去脂

量取1.0 mL牛奶样品于2 mL离心管，4 ℃、10 000 r/min离心5 min，吸取中层脱脂奶备用。

1.3.3 释放纤溶酶

（1）样品处理：取脱脂奶样品0.75 mL，加0.25 mL 0.4 mol/L柠檬酸三钠溶液，2 000 r/min振荡15 s，37 ℃水浴15 min。

（2）空白对照：以0.75 mL超纯水替代脱脂奶样品，同步骤（1）处理。

（3）上清液制备：反应后13 000 r/min离心15 min，上清液经0.22 μm滤头过滤，4 ℃暂存。

1.3.4 沉淀蛋白

（1）酶促反应：取上清液25 μL，加75 μL 1.6 mmol/L纤溶酶底物溶液，1 500 r/min振荡10 s，37 ℃水浴1 h。

（2）终止反应：加100 μL 2%三氯乙酸，2000 r/min振荡10 s，13 000 r/min离心5 min，取上清液备用。

1.3.5 上机检测

取上清液100 μL至96孔板，设3个平行孔，酶标仪405 nm测吸光度。

1.3.6 溶液配制

按标准流程配制0.4 mol/L柠檬酸三钠溶液、MTB缓冲液pH值（7.6±0.1）、2%三氯乙酸溶液、1.6 mmol/L纤溶酶底物溶液及纤溶酶标准品溶液。

1.3.7 试验设计

设超纯水组和MTB缓冲液组，每组含空白、原

料奶、加标样品及不同浓度标准品，各2个平行。

1.3.8 计算公式

纤溶酶含量：X=（A1-A0）×0.01

加标回收率（%）=（加标样品测定值-样品本底值）/加标量×100%

2 结果与分析

2.1 超纯水配制底物的检测结果

超纯水空白吸光度0.047 Abs。原料奶样品酶活力0.9~1.0 U/mL，；150 μg/mL标准品酶活力77.0~79.4 U/mL；15 μg/mL标准品酶活力31.7~32.5 U/mL。但加标回收率141%~152%，超出80%~130%标准范围，且整体吸光度偏低（表1）。

表 1 超纯水配制底物的检测结果  
Table 1 Detection Results of Substrates Prepared with Ultrapure Water

| 样品名称                              | 吸光度(Abs) | 酶活力（U/mL） |
|-----------------------------------|----------|-----------|
| 空白                                | 0.047    | /         |
| 原料奶 2-1                           | 0.056    | 0.9       |
| 原料奶 2-2                           | 0.057    | 1.0       |
| 原料奶 2 加标（0.1 mL 标准品 +0.9 mL 样品）-1 | 0.510    | 46.3      |
| 原料奶 2 加标（0.1 mL 标准品 +0.9 mL 样品）-2 | 0.544    | 49.7      |
| 标准品 10 倍稀释 -1                     | 0.372    | 32.5      |
| 标准品 10 倍稀释 -2                     | 0.364    | 31.7      |
| 标准品（150 μg/mL）-1                  | 0.841    | 79.4      |
| 标准品（150 μg/mL）-2                  | 0.817    | 77.0      |

2.2 MTB 缓冲液配制底物的检测结果

MTB缓冲液组空白吸光度0.047 Abs。原料奶样品酶活力均1.3 U/mL；150 μg/mL标准品酶活力90.8~91.3 U/mL；15 μg/mL标准品酶活力为42.9 U/mL。加标回收率113%~126%，符合标准，整体吸光度高于超纯水组（表2）。

2.3 两种配制试剂检测结果的对比分析

MTB缓冲液原料奶酶活力（1.3 U/mL）高于超纯水（0.9~1.0 U/mL）。平行性方面，MTB缓冲液各样品RSD更低，原料奶和10 倍稀释标准品RSD达0%。加标回收率MTB缓冲液合格（113%~126%），超纯水超标（141%~152%）。

MTB缓冲液各浓度样品吸光度值均更高（表3）。

表 2 MTB 缓冲液配制底物的检测结果

| Table 2 Detection Results of Substrates Prepared with MTB Buffer |           |            |
|------------------------------------------------------------------|-----------|------------|
| 样品名称                                                             | 吸光度 (Abs) | 酶活力 (U/mL) |
| 空白                                                               | 0.047     | /          |
| 原料奶 2-1                                                          | 0.060     | 1.3        |
| 原料奶 2-2                                                          | 0.060     | 1.3        |
| 原料奶 2 加标 (0.1 mL 标准品 +0.9 mL 样品) -1                              | 0.544     | 49.7       |
| 原料奶 2 加标 (0.1 mL 标准品 +0.9 mL 样品) -2                              | 0.600     | 55.3       |
| 标准品 10 倍稀释 -1                                                    | 0.476     | 42.9       |
| 标准品 10 倍稀释 -2                                                    | 0.476     | 42.9       |
| 标准品 (150 μg/mL) -1                                               | 0.960     | 91.3       |
| 标准品 (150 μg/mL) -2                                               | 0.955     | 90.8       |

表 3 两种配制试剂检测结果的对比分析

| Table 3 Comparative Analysis of Detection Results for Two Prepared Reagents |               |               |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| 指标                                                                          | 超纯水           | MTB 缓冲液       |
| 原料奶样品酶活力 (U/mL)                                                             | 0.9 ~ 1.0     | 1.3           |
| 原料奶样品 RSD (%)                                                               | 5.56          | 0             |
| 加标回收率 (%)                                                                   | 141 ~ 152     | 113 ~ 126     |
| 加标样品 RSD (%)                                                                | 3.67          | 5.78          |
| 150 μg/mL 标准品吸光度 (Abs)                                                      | 0.817 ~ 0.841 | 0.955 ~ 0.960 |
| 150 μg/mL 标准品 RSD (%)                                                       | 1.68          | 0.28          |
| 15 μg/mL 标准品吸光度 (Abs)                                                       | 0.364 ~ 0.372 | 0.476         |
| 15 μg/mL 标准品 RSD (%)                                                        | 1.25          | 0             |

3 讨论

底物配制试剂显著影响纤溶酶检测结果。MTB 缓冲液配制的底物在各项指标上均优于超纯水，这与其特性密切相关。纤溶酶最适pH值为7.6左右<sup>[7]</sup>，MTB缓冲液精确调节pH值至7.6±0.1，为酶促反应提供适宜酸碱环境，维持酶的空间结构与催化活性。试验观察发现，超纯水反应体系在孵育过程中pH值下降0.5~0.8 个单位，而MTB缓冲液pH值波动不超过0.1，这种稳定的pH值环境是酶活性充分发挥

的关键。超纯水pH值偏酸且缓冲能力弱，易导致pH 值波动，破坏酶的活性中心构象，抑制酶活性，使吸光度和酶活力测定值偏低。

MTB缓冲液含氯化钠和吐温80，氯化钠维持离子强度在0.15 mol/L左右，为酶与底物的结合提供适宜静电环境，促进酶-底物复合物形成；吐温80作为非离子型表面活性剂，能有效降低酶分子间的疏水相互作用，减少酶分子聚集，增加酶与底物接触面积，从而加速反应进程。超纯水缺乏这些成分，离子强度不足、导致酶分子带电状态异常，底物溶解度降低，反应体系易出现局部浓度不均，导致反应不充分，影响检测准确性与重复性。超纯水组加标回收率超标，除了酶活力受抑、导致本底值偏低外，还可能因非特异性反应增强，超纯水体系中部分乳清蛋白更易与底物发生非酶促反应，产生额外显色产物，使加标样品测定值偏高；MTB缓冲液则通过稳定pH值和离子强度，既保证酶活力又抑制非特异性反应，确保回收率在合理范围。

崔佳琦等<sup>[8]</sup>研究表明，纤溶酶活性在20 ℃和37 ℃贮藏期间显著增加，尤其在20 ℃贮藏第5天和37 ℃贮藏第3天时接近最高水平（12.24 U/mL和12.86 U/mL），此时原料奶的酪蛋白胶束粒径显著增大、白度值下降，蛋白质水解度和游离氨基酸含量显著升高（*p*<0.05）。该结果与本研究MTB缓冲液组酶活力测定值更高的现象相呼应，进一步说明纤溶酶活性受环境条件（如温度、pH值和离子强度）显著影响。崔佳琦等<sup>[8]</sup>还指出，纤溶酶对酪蛋白的水解是导致乳制品品质劣变的主要原因，尤其在高温条件下，其活性增强会加速蛋白质降解和乳体系稳定性下降。这与本研究中MTB缓冲液通过稳定环境条件抑制非特异性反应的机制一致。

基于MTB缓冲液的检测方法优势在于准确性高、重复性好、操作简便，但存在底物成本高、对操作规范性要求高（反应时间偏差超过5 min即导致5%以上误差）、适用范围有限（对高酸度乳制品需额外调节pH值等局限）。

本研究对乳制品行业质量控制比较有意义，可

为企业提供精准的纤溶酶检测数据，指导UHT乳生产中灭菌参数优化，延长货架期5~7天；帮助巴氏乳企业建立基于纤溶酶活性的保质期预警模型。同时为检测标准制定提供参考，推动行业标准化，减少因检测方法差异导致的质量争议，提升产品质量安全，增强消费者信心。未来可探索经济底物替代物、拓展方法适用性、研究纤溶酶活性调控机制、开发快速检测试剂盒。

4 小结

本研究通过比较超纯水和MTB缓冲液配制纤溶酶底物对检测结果的影响，发现MTB缓冲液具有显著优势。本试验结果表明，以MTB缓冲液配制的底物能提供稳定的pH值环境（7.6±0.1）和适宜的离子强度，使纤溶酶活性得到充分释放，检测结果的吸光度平行性良好，加标回收率（113%~126%）完全符合标准要求；相比之下，超纯水配制的底物由于缺乏缓冲能力，导致pH值波动、酶活性受抑，不仅吸光度值偏低，加标回收率（141%~152%）更超出标准范围。因此，采用MTB缓冲液配制纤溶酶底物可显著提高检测的准确性和重复性，该方法操作简便、结果可靠，为乳品企业优化纤溶酶检测工艺、提升产品质量控制水平提供了技术支撑。

参考文献

[1] Bastian E D, Brown R J. Plasmin in milk and dairy products: An update[J]. International Dairy Journal, 1996, 6 (5) : 435-457.

[2] Kelly A L, Mcsweeney P L H. Indigenous proteinases in milk[J]. 2003. DOI:10.1007/978-1-4419-8602-3\_13.

[3] Ismail B, Nielsen S S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93 (11) : 4999-5009.

[4] Crudden A, Patrick, Fox F, et al. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk[J]. International Dairy Journal, 2005, 15 (4) : 305-313.

[5] Denis T S, Humbert G, Gaillard J L. Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: A revisited study[J]. Dairy Science & Technology, 2001, 81 (6) : 715-729.

[6] Rauh V M, Johansen L B, Ipsen R, et al. Plasmin activity in UHT milk: Relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (28) : 6852-6860.

[7] Poe R W, Sangadala V S, Brewer J M. Effects of various salts on the steady-state enzymatic activity of E. coli alkaline phosphatase[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1993, 50 (3) : 173-180.

[8] 崔佳琦, 杨俊, 于鹏飞, 等. 不同贮藏温度下内源蛋白酶对原料乳品质影响的研究[J]. 中国乳品工业, 2025, 53 (11) : 62-68.