

GB/T XXXX—20XX 《葡萄糖氧化酶活性检测方法》

国家标准编制说明

1 任务来源

为规范工具酶的生产和使用，推动工具酶的产业化，2022年初全国工具酶标准化工作组（SAC/SWG11）申请《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准的立项。2023年12月1日国家标准委正式立项，项目编号为20231641-T-469，并下达《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准制定任务。

2 工作简况

2022年南生科技（厦门）分析检测中心有限公司组织相关单位的标准化工程师、研发技术人员共同开展《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准的预研。

2023年10月《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准正式立项后，南生科技（厦门）分析检测中心有限公司牵头组建了由南生科技（厦门）分析检测中心有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、厦门银祥集团有限公司、深圳市新产业生物医学工程股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、廊坊诺道中科医学检验实验室有限公司、天津博菲德科技有限公司、广州市进德生物科技有限公司、山西大禹生物工程股份有限公司、河北省微生物研究所有限公司、武汉瀚海新酶生物科技有限公司、深圳市海拓华擎生物科技有限公司、厦门华夏学院等单位组成的标准起草小组。

标准起草小组成员搜集整理了国内外各大公司所生产的工具酶及其不同应用研究的技术资料，并进行了国内、外相关标准的查询。在前期工作的基础上，2023年初形成了《葡萄糖氧化酶活性检测方法》征求意见稿。该征求意见稿发送给全国工具酶标准化工作组全体成员征求意见，并同时发送给生产、科研、院校等征求意见。在广泛征求意见的基础上，标准起草小组根据征求到的意见，分工对各项意见及标准中

的技术指标进行了进一步的实验验证，补充完善了《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准草案，形成标准送审讨论稿。

2023年11月，在全国工具酶标准化工作组（SAC/SWG11）2023年年会暨第十三次工作会议上，对《葡萄糖氧化酶活性检测方法》标准送审稿及编制说明送审稿进行了审议和表决，2023年审定会审查会参会委员及代表17人，未参会委员5人，委员专家出席率77.27%，超过2/3出席，参会委员17人全票通过本标准审查，超过3/4通过。

3 标准编制人员说明

《葡萄糖氧化酶活性检测方法》国家标准由南生科技（厦门）分析检测中心有限公司牵头起草，南生科技（厦门）分析检测中心有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、厦门银祥集团有限公司、深圳市新产业生物医学工程股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、廊坊诺道中科医学检验实验室有限公司、天津博菲德科技有限公司、广州市进德生物科技有限公司、山西大禹生物工程股份有限公司、河北省微生物研究所有限公司、武汉瀚海新酶生物科技有限公司、深圳市海拓华擎生物科技有限公司、厦门华夏学院等单位参与起草工作，并参与相关检测方法的验证。主要成员：黄发灿、郑登忠、沈涛、张志刚、杜凯、胖铁良、李民友、张广民、王鹏远、徐丽、马清河、孟旭辉、何毅、郑恬焯、黄恩铭、钟江、陈秀兰、朱力、姚鹃、傅玲琳、刘斌、张永有、杨忠华。

送审稿修订为：

本标准起草单位：南生科技（厦门）分析检测中心有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、厦门银祥集团有限公司、深圳市新产业生物医学工程股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、廊坊诺道中科医学检验实验室有限公司、天津博菲德科技有限公司、广州市进德生物科技有限公司、山西大禹生物工程股份有限公司、河北省微生物研究所有限公司、武汉瀚海新酶生物科技有限公司、深圳市海拓华擎生物科技有限公司、厦门

华夏学院。

本标准主要起草人：黄发灿、郑登忠、沈涛、张志刚、杜凯、胖铁良、李民友、张广民、王鹏远、徐丽、马清河、孟旭辉、何毅、郑恬烨、黄恩铭、钟江、陈秀兰、朱力、姚鹃、傅玲琳、刘斌、张永有、杨忠华。

4 标准编制的目的与意义

随着国内外工具酶技术发展及市场竞争激烈，但国内外尚未有与葡萄糖氧化酶活性检测方法相关的任何标准可遵循依照，因此制定本标准是非常必要的，该标准可以让国内生产企业做到有章可循、有标可依，规范生产与销售的市场。该标准适宜操作，描述清晰，编制说明中有充分的数据和试验支持，真实可信。建议提交申报终稿，并推荐通过审核。

5 标准编制原则

本标准编写格式按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的格式要求进行编写。

本标准编制的主要原则是先进性、科学性、实用性。标准起草小组力争本标准能反映我国工具酶生产及使用行业的最新水平。制定标准时尽可能地做到简化、统一、协调、优化；既考虑其先进性，也考虑其实用性、可行性；既符合国内外发展的需要，也结合国内目前的实际状况。

通过标准检索查询，发现目前没有直接对葡萄糖氧化酶活性检测方法进行规定的标准，其它国家包括美、英、德等发达国家都没有系统的制订专门用于规定葡萄糖氧化酶活性检测方法的相关标准。由于目前国内外尚未有葡萄糖氧化酶活性检测方法相关的任何标准可供参考，因此，本标准主要是依据收集到的市场上国内外各大生产或销售公司中工具酶的技术指标及性能参数制订。

6 标准编制的主要内容及依据

6.1 标准基本构架

本标准主要内容包括：术语、定义、原理和检测方法。

6.2 适用范围的确定依据

本标准旨在规范葡萄糖氧化酶酶活测定，提高葡萄糖氧化酶酶活测定过程的规范性、检测结果的准确性、数据的可靠性等。所以将本标准适用范围涵盖了工具酶从科研、生产和应用全过程中的酶活测定。

6.3 术语与定义确定的依据

根据全国工具酶标准化工作组对葡萄糖氧化酶活性检测方法国家标准的定义，同时参考国内外对葡萄糖氧化酶活性以及各公司各自产品酶活的建立和引用。我们对葡萄糖氧化酶活性进行定义以及对葡萄糖氧化酶活性检测方法进行规范。

6.3.1 葡萄糖氧化酶定义

能够在有氧气的条件下专一性催化 β -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和 H_2O_2 的脱氢酶。

6.3.2 葡萄糖氧化酶活力单位

在 pH5.1, 35℃ 的条件下，每分钟能把 $1.0 \mu\text{mol}$ 的 β -D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸和 H_2O_2 的酶量为一个活力单位。

6.4 检测方法

6.4.1 葡萄糖氧化酶活性的检测

6.4.1.1 试剂或材料

本方法所用试剂均为分析纯，除特殊说明外，实验用水均为 GB/T 6882 规定的二级水。

6.4.1.1.1 50 mM 醋酸钠缓冲液 (pH5.1)

称取 0.82 g 无水乙酸钠，溶于纯水中，在 35℃ 下用 1 M HCL 调 pH5.1，定容至 200 mL。

6.4.1.1.2 0.21mM 邻联茴香胺

精密称取 50 mg 邻联茴香胺二盐酸盐，用 7.5 mL 纯水溶解。取 1 mL 用 50 mM 乙酸钠缓冲液 pH5.1 稀释定容至 100 mL。

6.4.1.1.3 10% β -D(+)-葡萄糖溶液

精密称取 1 g β -D(+)-葡萄糖，用纯水溶解并定容至 10 mL。

6.4.1.1.4 0.17 mM 邻联茴香胺-1.72%葡萄糖溶液

取 24 mL 0.21 mM 邻联茴香胺，5 mL 10% β -D(+)-葡萄糖溶液，混匀并在 35°C 恒温待用。现配现用。

6.4.1.1.5 辣根过氧化物酶溶液

取辣根过氧化物酶适量，用冰预冷纯水配制并稀释成 60 Purpurogallin units/ml 溶液。

6.4.1.1.6 供试品溶液

精密称量供试品固体或溶液适量，用冰预冷的 50mM 乙酸钠缓冲液 pH5.1 溶解并稀释至 0.4-0.8 units/ml 的酶活浓度。

6.4.1.2 仪器设备

紫外-可见分光光度计、pH 计、微量进样器、恒温水浴锅、电子天平、磁力搅拌器、台式离心机。

6.4.1.3 试验步骤

6.4.1.3.1 底物溶液

按表1配制底物工作溶液，35°C水浴5 min。

表1 底物工作溶液的配制表

试剂	供试品 (mL)	对照品 (mL)
0.17 mM 邻联茴香胺-1.72%葡萄糖溶液	2.9	2.9
辣根过氧化物酶溶液	0.1	0.1

6.4.1.3.2 酶促反应 (35°C)

用紫外分光光度计监测底物工作溶液 $A_{500\text{nm}}$ 恒定后,按表2加样,并在 $A_{500\text{nm}}$ 测吸光度值,每分钟读数一次,共5分钟,取相邻两数读数差值 $\Delta A_{500\text{nm}}/\text{min}$ 的最大值(差值应在0.1-0.5之间,如不在此范围应调整供试品稀释度)。

表2 酶促反应加样表

试剂	供试品 (mL)	对照品 (mL)
供试品溶液	0.1	—
50 mM 乙酸钠缓冲液 pH5.1	—	0.1

6.4.1.3.3 酶活计算

$$U / \text{mL} = \frac{(\text{供试品} \Delta A_{500\text{nm}} / \text{min} - \text{对照品} \Delta A_{500\text{nm}} / \text{min}) \times 3.1 \times \text{df}}{7.5 \times 0.1} \quad \text{-----} \quad (1)$$

式中:

3.1—— 酶促反应液总体积,单位为毫升(mL);

df——稀释倍数;

7.5—— $A_{500\text{nm}}$ 处邻联茴香胺的消光系数;

0.1—— 供试品加样量,单位为毫升(mL)。

$$U/\text{mg} = \frac{U/\text{mL 供试品}}{\text{mg/mL 供试品}} \quad \text{-----} \quad (2)$$

7 与现行法规、标准的关系

本标准与现行法规、标准无冲突。

8 实施标准的要求和建议

标准的使用者应同时遵守本标准的规范性引用文件。

9 标准属性

建议本标准为推荐性国家标准。