



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法

Assay method of calf intestinal alkaline phosphatase activity and purity

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2024-10-18)

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 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

目 次

前 言	II
引 言	III
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 试剂或材料	1
6 试验步骤	2
7 质量控制	3

前 言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国工具酶标准化工作组（SAC/SWG11）提出并归口。

本文件起草单位：南生（厦门）分析检测有限公司、申亚生物科技股份有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、北京索莱宝科技有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、夏禾（广州）光电生物技术有限公司、武汉新华杨生物股份有限公司、杭州博岳生物技术有限公司、广州万孚生物技术股份有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司、北京利德曼生化股份有限公司、华灿（厦门）生物医药有限公司、福建南生科技有限公司、大田华灿生物科技有限公司、海南华研胶原科技股份有限公司、山东大学、苏州大学、上海交通大学、复旦大学、浙江工商大学、浙江师范大学、厦门大学、福建农林大学。

本文件主要起草人：黄发灿、刘洪艳、黄恩铭、马玉岭、郑登忠、徐丽、李因来、孙雅玲、凡孝菊、李冉、郭延巍、潘威、王芳、胡月、赵子方、傅玲琳、钟江、陈秀兰、朱力、姚鹃、杨忠华、刘斌、张永有、赵超、冯雁、邢志刚、黄思涛、郑恬烨、潘排风、黄海燕、王翠、沈涛。

引 言

小牛肠碱性磷酸酶是一种能够将蛋白或核酸底物去磷酸化并水解释放 5'末端或 3'末端磷酸基团的酶，用于抗体或抗原的标记。制定小牛肠碱性磷酸酶活性检测方法的国家标准，用以促进生产和使用，对推动该类工具酶的产业化具有重要意义。

小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法

1 范围

本文件描述了重组小牛肠碱性磷酸酶活性的检测方法。
本文件适用于重组小牛肠碱性磷酸酶活性的检测。

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实验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

小牛肠碱性磷酸酶 calf intestinal alkaline phosphatase
一种能够催化蛋白或核酸底物去磷酸化的酶。

3.2

小牛肠碱性磷酸酶活性单位 activity unit of calf intestinal alkaline phosphatase

在 pH9.8 的二乙醇胺（Diethanolamine, DEA）缓冲液中，37℃ 条件下，每分钟水解对硝基苯磷酸酯（p-nitrophenyl phosphate, PNPP）显色底物产生 1μmol 对硝基苯酚（p-nitrophenol, PNP）所需的酶量定义为一个活性单位。

4 原理

以对硝基苯磷酸酯（p-nitrophenyl phosphate, PNPP）为底物，二乙醇胺为磷酸酰基的受体，在碱性条件下，小牛肠碱性磷酸酶催化 PNPP 水解产生游离的黄色对硝基苯酚（p-nitrophenol, PNP），该黄色物质在波长 405nm 处有特异吸收峰，通过测定 405nm 处吸光度的增加速率计算出该酶的活性单位。

5 试剂或材料

5.1 水

符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5.2 1 mol/L 氯化镁溶液

称取 37.11g 的六水合氯化镁（分析纯），用水溶解，并定容至 100 mL。

5.3 1 mol/L 二乙醇胺/0.5 mmol/L 氯化镁缓冲液，pH9.8（稀释液）

称取 52.57 g 二乙醇胺（分析纯），加入适量水溶解，在 37℃ 下用 6 M 盐酸调 pH9.8，加 0.25 mL 的 1 M 氯化镁溶液，混匀并定容至 500 mL。新鲜制备，避光。

5.4 0.67 mol/L 对硝基苯磷酸酯溶液（PNPP 溶液）

称取 247 mg 对硝基苯磷酸酯（分析纯），用水溶解并定容至 1 mL。新鲜制备，避光。

5.5 重组小牛肠碱性磷酸酶溶液（供试品）

取重组小牛肠碱性磷酸酶适量，用冰预冷的稀释液溶解，并稀释成约 0.15 U/mL 碱性磷酸酶的溶液。

6 试验步骤

6.1 酶活性检测

6.1.1 底物溶液

按表 1 配制底物工作溶液，37℃ 水浴恒温。

表 1 底物工作溶液的配制表

试剂	试验组（mL）	对照组（mL）
1 mol/L 二乙醇胺/0.5 mmol/L 氯化镁缓冲液，pH9.8（稀释液）	2.90	2.95
0.67 mol/L 对硝基苯磷酸酯溶液（PNPP 溶液）	0.05	0.05

6.1.2 酶促反应

用紫外-可见分光光度计监测底物工作溶液 $A_{405\text{nm}}$ 恒定后，按表 2 加样，并在 $A_{405\text{nm}}$ 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 $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ 的平均值。

表 2 酶促反应加样表

试剂	试验组（mL）	对照组（mL）
重组小牛肠碱性磷酸酶溶液（供试品）	0.05	—

6.1.3 结果计算

6.1.3.1 单位体积酶活性按公式（1）计算：

$$U_v = \frac{(\text{试验组}\Delta A_{405} - \text{对照组}\Delta A_{405}) \times V_F \times df}{18.5 \times V_E} \text{-----(1)}$$

式中：

U_v ——单位体积酶活性，单位为酶活性单位每毫升；

V_F ——分析容量（mL），单位为毫升；

df ——稀释倍数；

18.5 ——405nm 处对硝基酚的毫摩尔分子消光系数；

V_E ——使用的酶体积（mL），单位为毫升。

6.1.3.2 单位质量酶活性按公式（2）计算：

$$U_m = \frac{U_v}{C} \text{-----(2)}$$

式中：

U_m ——单位质量酶活性，单位为酶活性单位每毫克；

U_v ——每毫升体积里酶活性，单位为酶活性单位每毫升；

C ——每毫升体积里酶质量，单位为毫克每毫升。

6.2 酶纯度检测

酶纯度检测方法依照GB/T 40174-2021。

7 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术平均值的10%。