GB/T XXXX—20XX《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》 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，2024年初全国工具酶标准化工作组（SAC/SWG11）申报《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准并通过国标委立项（国标委发【2025】12号），项目计划号为20251005-T-469，同时开始《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准的研究制定任务。

2 工作简况

2023年南生（厦门）分析检测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《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准的预研。

2024年《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准通过立项后，南生（厦门）分析检测有限公司牵头组建了由南生（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）光电生物科技有限公司、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《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》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《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准草案，形成标准送审讨论稿。

2024年10月19-23日，在全国工具酶标准化工作组（SAC/SWG11）2024年年会暨第十四次工作会议上，对《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》标准送审稿及编制说明送审稿进行了审议和表决，2024年审定会审查会参会委员及代表20人，未参会委员4人，委员专家出席率83.33%，超过2/3出席，参会委员20人全票通过本标准审查，超过3/4通过。

根据专家审定会的审定意见，形成审定意见汇总表，并对小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法的审定稿及编制说明进行修改，形成报批稿。年月日，通过线上平台向全国公开征求意见，至年月日为止，没有收到反馈意见，完成公开征求意见。

3 标准编制人员说明

《小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法》国家标准由南生（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、广州万孚生物科技股份有限公司、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、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、郑恬焯、潘排风、黄海燕、王翠、沈涛。

送审稿修订为：

本标准起草单位：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）光电生物科技股份有限公司、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、广州万孚生物科技股份有限公司、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、大田华灿生物科技股份有限公司、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。

本标准主要起草人：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、姚鹏、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。

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，但国内外尚未有与小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度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小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度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小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法的相关标准。由于目前国内外尚未有小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度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

本标准旨在规范小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度测定，提高小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度测定过程的规范性、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性及纯度测定。

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小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法国家标准的定义，同时参考国内外对小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度以及各公司各自产品酶活性及纯度的建立和引用。我们对小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度进行定义以及对小牛肠碱性磷酸酶活性及纯度检测方法进行规范。

6.3.1 小牛肠碱性磷酸酶定义

一种能够将对应底物去磷酸化的酶。

6.3.2 小牛肠碱性磷酸酶活力单位

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 1 μ mol 对硝基苯酚（p-nitrophenol, PNP）所需的酶量定义为一个活性单位，也被称作一个 DEA

活性单位。

6.4 检测方法

6.4.1 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 6682 规定的二级水。

6.4.1.1 1 M 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。

6.4.1.2 1 M 二乙醇胺/0.5 mM 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。

6.4.1.3 0.67 M 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。

6.4.1.4 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 单位/mL 碱性磷酸酶的溶液。

6.4.2 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。

6.4.3 试验步骤

6.4.3.1 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	供试品 (mL)	对照品 (mL)
1 M 二乙醇胺/0.5 mM 氯化镁缓冲液，pH9.8（稀释液）	2.90	2.95

0.67 M 对硝基苯磷酸酯溶液 (PNPP 溶液)	0.05	0.05
----------------------------	------	------

6.4.3.2 酶促反应

用UV-1800PC紫外-可见分光光度计监测底物工作溶液A405nm恒定后,按表2加样,并在A_{405nm}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 $\Delta A_{405nm}/\text{min}$ 的最大值。

表2 酶促反应加样表

试剂	供试品 (mL)	对照品 (mL)
重组小牛肠碱性磷酸酶溶液 (供试品)	0.05	-

6.4.3.3 计算结果

6.4.3.3.1 单位体积中酶活性按公式 (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。

6.4.3.3.2 单位质量中酶活性按公式 (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。

6.5 验证试验

6.5.1 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 6682 规定的二级水。

6.5.1.1 1 M 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。

6.5.1.2 1 M 二乙醇胺/0.5 mM 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。

6.5.1.3 0.67 M 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。

6.5.1.4 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 单位/mL 碱性磷酸酶的溶液。

6.5.2 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。

6.5.3 试验步骤

6.5.3.1 底物溶液

按表3配制底物工作溶液，37℃水浴恒温。

表3 底物工作溶液的配制表

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

6.5.3.2 酶促反应

用UV-1800PC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4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 $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ 的最大值。

表4 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	-

共计检测三次，第一次检测测得相邻两个 A_{405} 吸光度值的最大差值为 0.0455，见图 1 试验编号 3-1 至 3-5 的 A_{405} 吸光度值；第二次检测测得相邻两个 A_{405} 吸光度值的最大差值为 0.0433，见图 1 试验编号 4-1 至 4-5 的 A_{405} 吸光度值；第三次检测测得相邻两个 A_{405} 吸光度值的最大差值为 0.0439，见图 1 试验编号 5-1 至 5-5 的 A_{405} 吸光度值。

光度测量 - 文件1.phd *			
序号	编号	模式	A
			405.00 nm
1	1-1	Abs	0.1903
2	1-2	Abs	0.7290
3	1-3	Abs	1.1905
4	1-4	Abs	1.5119
5	1-5	Abs	1.6746
6	2-1	Abs	0.0672
7	2-2	Abs	0.2065
8	2-3	Abs	0.3463
9	2-4	Abs	0.4855
10	2-5	Abs	0.6207
11	3-1	Abs	0.0641
12	3-2	Abs	0.1059
13	3-3	Abs	0.1514
14	3-4	Abs	0.1971
15	3-5	Abs	0.2425
16	4-1	Abs	0.0776
17	4-2	Abs	0.1172
18	4-3	Abs	0.1606
19	4-4	Abs	0.2039
20	4-5	Abs	0.2470
21	5-1	Abs	0.0901
22	5-2	Abs	0.1303
23	5-3	Abs	0.1742
24	5-4	Abs	0.2179
25	5-5	Abs	0.2610

图 1 三次检测的 $A_{405\text{nm}}/\text{min}$ 吸光度值

6.5.3.3 计算结果

取三次平均值， $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ 的最大差值为0.0442，按照公式(1)计算出单位体积供试品溶液中酶活性为430 U/mL，即单位体积供试品溶液中小牛肠碱性磷酸酶活性为430 U/mL。

供试品溶液小牛肠碱性磷酸酶的浓度为1 mg/mL，按照公式(2)计算出单位质量供试品中小牛肠碱性磷酸酶的活性430 U/mg，即单位质量供试品中小牛肠碱性磷酸酶活性为430 U/mg。

6.5.4 验证试验结论

采用夏禾（杭州）生物技术有限公司生产的小牛肠碱性磷酸酶（批号：240801，酶活：500 U/mg）作为供试品，独立重复试验检测二次结果，酶活性分别为483 U/mg和518 U/mg，二次检测结果酶活性绝对差值分别为35 U/mg，其算术平均值为500.50 U/mg，绝对差值占算术平均值7%，未超过10%，符合质量控制标准要求。

依据《小牛肠碱性磷酸酶活性检测方法》国家标准中的试验步骤，夏禾（深圳）生物技术有限公司、福建南生科技有限公司等单位分别对小牛肠碱性磷酸酶产品的酶活性进行检测验证。结果表明，检测结果符合要求，其偏差皆在质量控制标准范围之内，该标准检测方法可行，可以在免疫诊断检测中推广应用。

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。

10 其它应予说明的事项

建议本标准为你推荐性国家标准。目前国际上还没有统一的工具酶产品系列标准，市场上所销售的各种工具酶产品大部分来自美国 Merck、Sigma、NEB、Promega、欧洲 MBI、日本 TAKARA 等国际性大公司。目前我们研究和制定工具酶的标准主要是参照以上国际大公司工具酶产品的质量指标和检测方法，以方便我们的产品同国外的同类产品具有相同的比对和参照标准。由于工具酶是生命科学和生物医药研究的试剂原料，又是重要的诊断试剂原料，Merck、Sigma 等国际大公司对工具酶产品的各种检测方法十分保密，属于公司的核心技术和无形资产，国际上各大公司均严密控制工具酶生产技术、产品质量控制及检测方法，对具体的各种工具酶检测方法均不详细披露。所以，我们目前正在积极接轨国际标准化工作。今后，我们将紧密跟踪，加大工具酶标准研究力度，积极参与工具酶国际化的工作。