

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

己糖激酶活性及纯度检测方法

Assay method of hexokinase 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

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：华灿（厦门）生物医药有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、南京诺唯赞生物科技股份有限公司、夏禾（广州）光电生物科技股份有限公司、广东丸美生物技术股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、华惠海洋多糖生物技术（深圳）有限公司、武汉宏韧生物医药股份有限公司、深圳迎凯生物科技股份有限公司、北京健平金星生物医药有限公司、申亚生物科技股份有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司、美康生物科技股份有限公司、福建赛福安全技术服务有限公司、湖南尚成生物科技股份有限公司、北京利德曼生化股份有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、南生（厦门）分析检测有限公司、福建南生科技有限公司、上海鹰姿生命科学有限公司、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、复旦大学、山东大学、上海交通大学、苏州大学、厦门大学、福建农林大学、浙江工商大学、浙江师范大学。

本文件主要起草人：郑登忠、黄发灿、王翠、郭延巍、孙云起、潘威、徐丽、王双旭、张杨、张震、邹检平、刘洪艳、储筠、刘敬喜、王欣、朱洪浩、李冉、胡月、赵子方、郑恬烨、黄恩铭、冯雁、钟江、陈秀兰、朱力、姚鹃、傅玲琳、刘斌、张永有、赵超、杨忠华、邢志刚、潘排风、黄海燕。

引 言

己糖激酶(hexokinase, HK)是以己糖为特异性底物的六碳糖磷酸化酶,催化己糖的磷酸化反应,应用于血糖和尿糖的检测及其检测试纸的制备。制定己糖激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。

己糖激酶活性及纯度检测方法

1 范围

本文件描述了重组己糖激酶活性的检测方法。

本文件适用于重组己糖激酶活性的检测。

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

己糖激酶 hexokinase

以 ATP 作为磷酸根来源，催化 C6 位的 D-己糖磷酸化的一种转移酶。

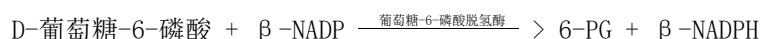
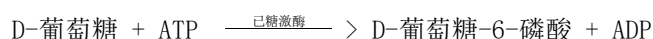
3.2

己糖激酶活性单位 activity unit of hexokinase

在 pH 7.6，温度 25℃ 条件下，以葡萄糖为底物的己糖激酶催化下，每分钟生成 1 μmol NADPH 所需的酶量为一个活性单位。

4 原理

葡萄糖和 ATP 在己糖激酶的催化下发生磷酸化反应，生成 ADP 和葡萄糖-6-磷酸，后者再脱氢使 NADP 还原为 NADPH。NADPH 在波长 340nm 处有特异吸收峰，通过测定 340nm 处吸光度的增高速率可计算出该酶的活性单位。



5 试剂或材料

5.1 水

符合GB/T 6882规定的二级水。

5.2 试剂 A：50 mmol/L 三羟乙基胺缓冲液，pH7.6

称取4.64 g三羟乙基胺盐酸盐（分析纯），用400 mL水溶解，在25℃下用1 mol/L NaOH调pH7.6，定容至500 mL。

5.3 试剂 B：555 mmol/L D-葡萄糖溶液

称取 1 g D-(+)-葡萄糖（分析纯），用试剂 A 溶解，并定容至 10 mL。

5.4 试剂 C：19 mmol/L 5'-三磷酸腺苷溶液（ATP 溶液）

称取 1 g 5'-三磷酸腺苷（分析纯），用水溶解并定容至 10 mL。临用现配。

5.5 试剂 D：100 mmol/L 氯化镁溶液

称取 18.56 g 六水合氯化镁（分析纯），用水溶解并定容至 500 mL。

5.6 试剂 E：14 mmol/L β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐溶液（NADP 溶液）

称取0.107 g β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐（分析纯），用冰预冷的水溶解并定容至 10 mL。临用现配。

5.7 试剂 F：葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液

称取 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（≥95%纯度）适量，用试剂 A 溶解并稀释至 125 U/mL 的酶溶液。

5.8 试剂 G：重组己糖激酶溶液（供试品）

称取重组己糖激酶固体或量取其液体适量，用冰预冷的水配制并稀释成 0.5-1.0 U/mL 的酶溶液。

6 试验步骤

6.1 酶活性检测

6.1.1 底物溶液

按表 1 配制底物试验溶液，25℃水浴恒温，并用紫外-可见分光光度计监测 A_{340nm} 直至恒定。

表 1 底物试验溶液的配制表

试剂	试验组（mL）	对照组（mL）
试剂 A	1.00	1.00
试剂 B	1.00	1.00

试剂 C	0.10	0.10
试剂 D	0.20	0.20
试剂 E	0.20	0.20
试剂 F	0.02	0.02

6.1.2 酶促反应

用紫外-可见分光光度计监测底物试验溶液 $A_{340\text{nm}}$ 恒定后, 按表 2 加样, 并在 $A_{340\text{nm}}$ 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 $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ 的平均值。

表 2 酶促反应加样表

试剂	试验组 (mL)	对照组 (mL)
纯水	—	0.05
试剂 G (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:

$$U_v = \frac{(\text{试验组}\Delta A_{340} - \text{对照组}\Delta A_{340}) \times 2.57 \times df}{6.22 \times 0.05} \text{-----}(1)$$

式中:

U_v ---单位体积酶活性, 单位为酶活性单位每毫升;

2.57---反应体系总体积 (mL), 单位为毫升;

df---稀释系数;

6.22--- β -NADPH 的在 340nm 处的毫摩尔消光系数;

0.05---所用的酶体积 (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 ---单位体积酶活性, 单位为酶活性单位每毫升;

C —— 单位体积酶质量，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%。
