

GB/T XXXX—20XX《己糖激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《己糖激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 20251008-T-469，同时开始《己糖激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 年华灿（厦门）生物医药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《己糖激酶活性及纯度检测方法》国家标准的预研。

2024 年《己糖激酶活性检测方法》国家标准通过立项后，华灿（厦门）生物医药有限公司牵头组建了由华灿（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，2024 年 8

月形成了《己糖激酶活性检测方法》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《己糖激酶活性检测方法》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《己糖激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，并对己糖激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

《己糖激酶活性及纯度检测方法》国家标准由华灿（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、广东丸美生物科技股份有限公司、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、福建赛福安全技术有限公司、湖南尚成生物科技有限公司、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、大田华灿生物科技有限公司、海南华研胶原蛋白科技股份有限公司、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：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。

送审稿修订为：

本标准起草单位：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。

本标准主要起草人：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。

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，但国内外尚未有与己糖激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己糖激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己糖激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己糖激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

本标准旨在规范己糖激酶活性测定，提高己糖激酶活性测定过程的规范性、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己糖激酶活性检测方法国家标准的定义，同时参考国内外对己糖激酶活性以及各公司各自产品酶活的建立和引用。我们对己糖激酶活性进行定义以及对己糖激酶活性检测方法进行规范。

6.3.1 己糖激酶定义

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。

6.3.2 己糖激酶活力单位

在 pH 7.6，温度 25℃条件下，在以葡萄糖为底物的己糖激酶催化下，每分钟生

成 $1\ \mu\text{mol}$ NADPH 所需的酶量为一个活力单位。

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 试剂 A: 50 mM 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 M NaOH 调 pH7.6，定容至 500 mL。

6.4.1.2 试剂 B: 555 mM 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。

6.4.1.3 试剂 C: 19 mM 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。新鲜配制。

6.4.1.4 试剂 D: 100 mM 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。

6.4.1.5 试剂 E: 14 mM 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。新鲜配制。

6.4.1.6 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（ $\geq 95\%$ 纯度）适量，用试剂 A 溶解并稀释至 125 U/mL 的酶溶液。

6.4.1.7 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。

6.4.2 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，25℃水浴恒温，并用 UV-1800PC 紫外-可见分光光度计检测 A340nm 直至恒定。

表 1 底物工作溶液的配制表

试剂	供试品（mL）	对照品（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

6.4.3.2 酶促反应

用 UV-1800PC 紫外-可见分光光度计监测底物工作溶液 A340nm 恒定后，按表 2 加样，并在 A340nm 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 ΔA340nm/min 的最大值。

表 2 酶促反应加样表

试剂	供试品（mL）	对照品（mL）
纯水	—	0.05
试剂 G（供试品）	0.05	—

6.4.3.3 结果计算

6.4.3.3.1 单位体积中酶活性按公式（1）计算：

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

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。

6.4.3.3.2 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 试剂 A：50 mM 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 M NaOH 调 pH7.6，定容至 500 mL。

6.5.1.2 试剂 B：555 mM 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。

6.5.1.3 试剂 C：19 mM 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。新鲜配制。

6.5.1.4 试剂 D：100 mM 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。

6.5.1.5 试剂 E：14 mM 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。新鲜配制。

6.5.1.6 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（ $\geq 95\%$ 纯度）适量，用试剂 A 溶解并稀释至 125 U/mL 的酶溶液。

6.5.1.7 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。

6.5.2 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，25℃水浴恒温，并用 UV-1800PC 紫外-可见分光光度计检测监测 A_{340nm} 直至恒定。

表 3 底物工作溶液的配制表

试剂	供试品（mL）	对照品（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

6.5.3.2 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_{340nm} 恒定后，按表 4 加样，并在 A_{340nm} 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

$\Delta A_{340\text{nm}/\text{min}}$ 的最大值。

表 4 酶促反应加样表

试剂	供试品 (mL)	对照品 (mL)
纯水	—	0.05
试剂 G (供试品)	0.05	—

共计检测三次，第一次检测测得相邻两个 A_{340} 吸光度值的最大差值为 0.0394，见图 1 试验编号 1-1 至 1-5 的 A_{340} 吸光度值；第二次检测测得相邻两个 A_{340} 吸光度值的最大差值为 0.038，见图 1 试验编号 2-1 至 2-5 的 A_{340} 吸光度值；第三次检测测得相邻两个 A_{340} 吸光度值的最大差值为 0.036，见图 1 试验编号 3-1 至 3-5 的 A_{340} 吸光度值。

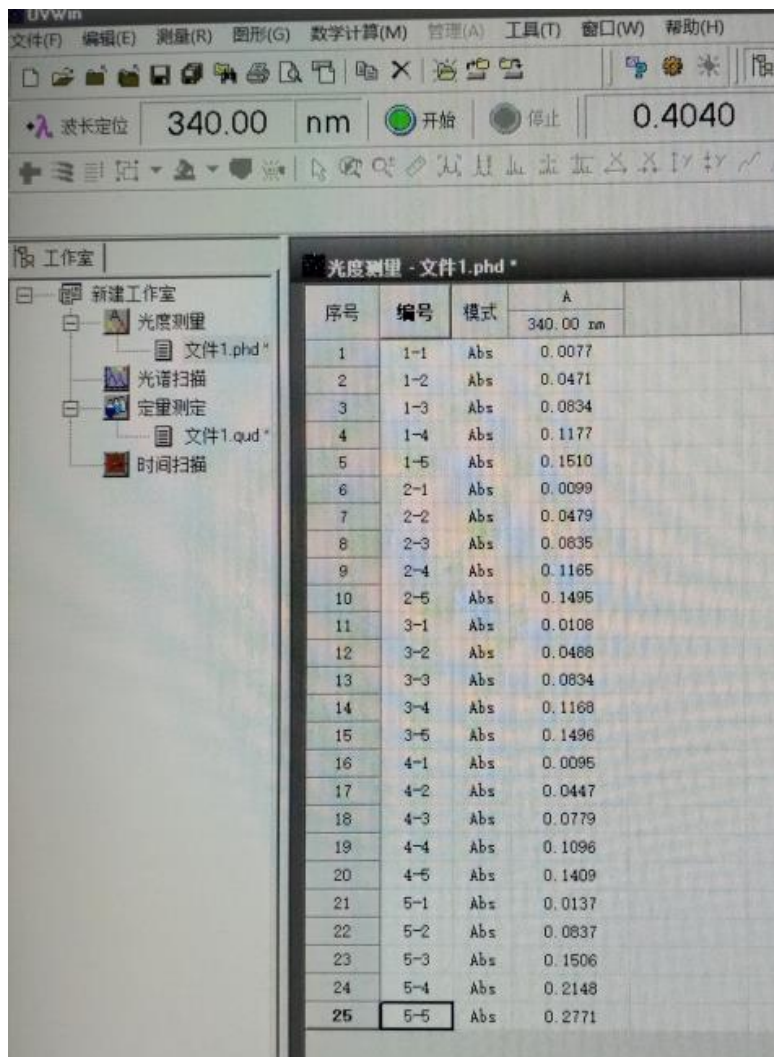


图 1 三次检测的 $A_{340\text{nm}/\text{min}}$ 吸光度值

6.5.3.3 计算结果

取三次平均值, $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ 供试品的最大差值为0.0378, 按照公式(1)计算出单位体积供试品溶液中酶活性为62.5 U/mL, 即单位体积供试品溶液中己糖激酶活性为62.5 U/mL。

供试品溶液己糖激酶的浓度为1 mg/mL, 按照公式(2)计算出单位质量供试品中己糖激酶的活性62.5 U/mg, 即单位质量供试品中己糖激酶活性为62.5 U/mg。

6.5.4 验证试验结论

采用夏禾(深圳)生物技术有限公司生产的己糖激酶(批号: 250301, 酶活: 160 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163 U/mg和155 U/mg, 二次检测结果酶活性绝对差值分别为8 U/mg, 均未超过算术平均值159 U/mg的10%, 也未超过供试品标识量160 U/mg的10%, 符合质量控制标准要求。

依据《己糖激酶活性检测方法》国家标准中的试验步骤, 夏禾(杭州)生物技术有限公司、福建南生科技有限公司等单位分别对己糖激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, 可以在葡萄糖测定, 以及血糖和尿糖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。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。