



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

葡萄糖氧化酶活性检测方法

Assay method of glucose oxidase activity

(工作组讨论稿)

(本稿完成日期：2023-11-16)

— 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。

本文件主要起草人：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、郑恬焯、黄恩铭、钟江、陈秀兰、朱力、姚鹃、傅玲琳、刘斌、张永有、杨忠华。

引 言

葡萄糖氧化酶是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,用于定量测定人体血清及尿液中葡萄糖含量的血糖和尿糖诊断,以及制备尿糖和血糖试纸。制定葡萄糖氧化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。

葡萄糖氧化酶活性检测方法

1 范围

本文件描述了葡萄糖氧化酶活性的检测方法。
本文件适用于葡萄糖氧化酶活性的检测。

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

葡萄糖氧化酶 glucose oxidase

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。

3.2

葡萄糖氧化酶活力单位 activity unit of glucose oxidase

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。

4 原理

在葡萄糖氧化酶的作用下，葡萄糖和氧反应，生成葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢和无色的还原型邻联茴香胺在过氧化物酶的作用下，生成水和红色的氧化型邻联茴香胺，该红色物质在波长500nm处有特异吸收峰，通过测定红色物质500nm处吸光度的增高速率可计算出该酶的活性。

5 试剂或材料

5.1 水

符合GB/T 6882规定的二级水。

5.2 50 mM 乙酸钠缓冲液

称取0.82 g无水乙酸钠，用150 mL纯水溶解，在35℃下用1 M盐酸调pH5.1，定容至200 mL。

5.3 0.21mM 邻联茴香胺

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。

5.4 10% β-D(+)-葡萄糖溶液

称取1 g β-D(+)-葡萄糖，用纯水溶解并定容至10 mL。

5.5 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℃恒温待用。现配现用。

5.6 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。

5.7 供试品溶液

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

6 试验步骤

6.1 底物溶液

按表1配制底物工作溶液，35℃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

6.2 酶促反应

用紫外分光光度计监测底物工作溶液 A_{500nm} 恒定后，按表2加样，并在 A_{500nm} 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 $\Delta A_{500nm}/min$ 的最大值。

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

6.3 结果计算

6.3.1 单位体积里酶活单位按公式（1）计算：

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

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_{500nm} 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）。

6.3.2 单位质量里酶活性单位按公式（2）计算：

$$U / mg = \frac{U/mL}{mg/mL} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

U/mL ——每毫升体积里酶活性单位，单位为单位每毫升；

mg/mL——每毫升体积里酶质量数，单位为毫克每毫升。

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%。