



中华人民共和国国家标准

GB/T 41907—2022

肠激酶活性检测方法

Assay method of enterokinase activity

2022-10-12 发布

2022-10-12 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 试剂或材料	1
5 仪器设备	2
6 试验步骤	2
7 结果计算	2
8 质量控制	2

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 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/SWG 11)提出并归口。

本文件起草单位：雷谷(厦门)生物医药有限公司、通用生物系统(安徽)有限公司、苏州坤琪生物科技有限公司、夏禾(深圳)生物技术有限公司、厦门银祥集团有限公司、厦门中集信检测技术有限公司、廊坊诺道中科医学检验实验室有限公司、福建南生科技有限公司、上海鹰姿生命科技有限公司、苏州海狸生物医学工程有限公司、安琪酵母股份有限公司、山东大学、福建农林大学、复旦大学、上海楚豫生物科技有限公司、中国计量科学研究院计量与分析科学研究所、深圳华大生命科学研究院。

本文件主要起草人：黄发灿、郑登忠、雍金贵、赵毅、张志刚、江锋、胖铁良、朱力、钟江、姚鹃、刘斌、陈秀兰、任辉、邢志刚、赵超、全灿、曾峰、章文蔚、董宇亮、席凤、程磊。

引 言

肠激酶(EC 3.4.21.9)是十二指肠细胞分泌的一种可以在较宽 pH 范围(4.5~9.5)和较宽温度范围内切割含有 4 个天冬氨酸的赖氨酸羧基端肽键(天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸)的蛋白质水解酶。制定肠激酶活性检测方法的国家标准,用以推动该类工具酶的产业化,对于肠激酶的生产和使用具有重要意义。

肠激酶活性检测方法

1 范围

本文件描述了肠激酶活性检测方法的试剂或材料、仪器设备、试验步骤、结果计算和质量控制。
本文件适用于肠激酶活性的检测。

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

肠激酶 enterokinase

十二指肠细胞分泌的一种可以切割含有 4 个天冬氨酸的赖氨酸羧基端肽键(天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸)的蛋白质水解酶。

3.2

肠激酶活性单位(U) activity unit of enterokinase

37 °C, 16 h 内将 0.5 mg 的硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27), 95% 降解为 NP-27 所需要的酶量为 1 个肠激酶活性单位(U)。

4 试剂或材料

除非另有规定,本方法所用的试剂应为分析纯试剂,所有试剂溶液宜大体积配制、小体积分装后经高压灭菌后使用,不宜高压灭菌的试剂应用 0.22 μm 过滤器过滤除菌;水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27)。

4.2 盐酸(HCl):量取盐酸(12 mol/L)适量,加入等体积的纯化水,配制成浓度为 6 mol/L。

4.3 氯化钠(NaCl):固体。

4.4 氯化钙(CaCl₂):固体。

4.5 反应缓冲液:50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0(22 °C), 1 mmol/L CaCl₂, 0.1% Tween-20。

4.6 硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27)溶液:称取硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27)约 25 mg,用反应缓冲液溶解并定容至 25 mL,配制成每毫升含 1 mg 硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27)的溶液,紫外分光光度法检测蛋白浓度后再稀释成每毫升含 0.1 mg 蛋白的溶液。

4.7 肠激酶溶液:称取肠激酶适量,用反应缓冲液溶解并配制成每毫升含 1 mg 蛋白的溶液,再稀释成每毫升含 0.1 mg 蛋白的溶液。

4.8 2×SDS 凝胶加样缓冲液：量取或称取 10 mL 1 mol/L Tris-HCl, pH6.8, 10 mL β-巯基乙醇, 4 g SDS, 0.2 g 溴酚蓝, 20 mL 甘油, 加水定容至 100 mL。

5 仪器设备

紫外分光光度计、恒温培养箱、电泳仪、电泳槽、电子分析天平(感量:0.000 1 g)。

6 试验步骤

6.1 酶切反应

取离心管 8 支, 各加入硫氧还蛋白-NP-27(Thioredoxin-NP-27)溶液 40 μL, 再依次分别加入肠激酶溶液 0 μL、2 μL、3 μL、4 μL、5 μL、6 μL、7 μL、8 μL, 再依次分别加入反应缓冲液 10 μL、8 μL、7 μL、6 μL、5 μL、4 μL、3 μL、2 μL, 置于 37 °C ± 0.5 °C 水浴中, 反应 16 h 后, 各加入 50 μL 的 2×SDS 凝胶加样缓冲液终止酶切反应, 分别取各反应液 20 μL, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

6.2 电泳

12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 电压 90 V~120 V, 当溴酚蓝线到达凝胶板底部时停止电泳, 取出凝胶进行染色 30 min, 并过夜脱色至无底色。当融合蛋白电泳条带看不见时, 表明此时的肠激酶量恰好能将该融合蛋白样品完全酶切, 并以此反应体系作为依据计算酶活性。

7 结果计算

供试品中肠激酶活性按公式(1)计算：

$$S = \frac{2c_1V_1}{c_2V_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- S —— 肠激酶活性, 单位为肠激酶活性单位每毫克蛋白或固含物(U/mg)；
- c₁ —— Thioredoxin-NP-27 浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL)；
- V₁ —— Thioredoxin-NP-27 加入量, 单位为微升(μL)；
- c₂ —— 肠激酶浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL)；
- V₂ —— 肠激酶加入量, 单位为微升(μL)。

8 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%。