

《NADH氧化酶活力的测定 分光光度法》中国产学研合作促进会团体标准编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

NADH氧化酶（NOX）（E.C.1.6.--）是一类重要的氧化还原酶，可催化还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）的氧化，将分子氧还原至过氧化氢或水。NADH氧化酶广泛分布于各种具有不同亲源关系的物种当中，如人类、脊椎动物、植物、细菌以及古细菌中，对维持生物的正常生理功能有重要作用。NADH氧化酶在工业和医学领域具有重要的应用价值。在食品工业中，NADH氧化酶可通过减少导致腐败的微生物的生长来提高食品的保质期，也可用于奶酪和其他乳制品的生产，改善最终产品的风味和质地。在化学工业中，NADH氧化酶可作为氧化型辅酶再生的工具，用于手性醇、胺的生产。在医学领域，NADH氧化酶是一种潜在的抗菌剂，另外其具有抗氧化特性，在预防和治疗心血管疾病和癌症方面具有潜力。

NADH氧化酶的酶活力是其质量的重要指标之一，鉴于目前我国并无统一的NADH氧化酶活力测定的方法标准，产品的实际酶活力和包装标识的酶活力是否一致还缺乏相关的标准进行规范约束和验证，因此研制NADH氧化酶活力的测定标准将为NADH氧化酶的生产、流通及监管提供依据，促进我国NADH氧化酶相关的食品工业、化学工业和医学的健康发展，具有非常重要的现实意义。根据行业的现实需

求，中国标准化研究院于2024年3月提出《NADH氧化酶活力的测定 分光光度法》团体标准计划，并牵头承担标准起草任务。

2024年5月，经中国产学研合作促进会组织专家通过批准立项，立项名称为《NADH氧化酶活力的测定 分光光度法》。

（二）标准的起草单位及起草人

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

（三）主要工作过程

1. 预阶段

2024年3月至2024年5月标准起草单位组织相关技术人员对《NADH氧化酶活力的测定 分光光度法》标准项目进行了预研，对NADH氧化酶的活力测定条件进行了摸索，初步确立了NADH氧化酶活力的测定方法。标准起草组向中国产学研合作促进会提交了标准建议书与标准草案，进行申报立项。

2. 立项阶段

2024年5月，中国产学研合作促进会正式通过本团体标准的立项。

3. 起草阶段

针对该标准项目，正式成立了标准起草工作小组，明确了任务要求，安排了工作进度，根据单位参与的人员的专业、技能、人数将任务合理分配。依据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》对标准草案进一步完善的同时，开展技术指标的实验验证工作。

在此期间，通过线上和线下会议结合的形式开展了3次工作会议。会议就标准制定的相关问题进行了协商与研究，并对标准的框架及内容进行了认真研究和讨论。由此形成了最终的《NADH氧化酶活力的测定 分光光度法》团体标准征求意见稿和编制说明。

二、确定标准主要技术内容

（一）标准编制原则

坚持严要求、适宜性与可操作性相结合的原则。严要求即标准的编制严格遵循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》及相关法规的要求进行；适宜性既要充分考虑到本行业的发展现状与特点，又要有一个适宜的范围与程度，从而提高标准贯彻实施的可操作性。

（二）本标准主要技术内容

1. 主体内容

本标准的主体内容包括：范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂、仪器设备、试样制备和试验步骤、试验数据处理以及精密度。

2. 范围

本文件描述了测定NADH氧化酶活力的分光光度法。本文件适用于生化试剂、工业酶制剂中NADH氧化酶活力的测定。

3. 规范性引用文件

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

4. 术语和定义

对NADH氧化酶活力单位进行了定义，是在30℃、pH 7.0的条件下，每分钟产生1 μmol NADH所需的酶量为一个酶活力单位，单位为U。

5. 原理

NADH氧化酶催化底物NADH的氧化生成NAD⁺，NAD⁺在340 nm下无吸收，而NADH有吸收，其 $\epsilon_{340}=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，通过监测340 nm下吸光度的变化来测定NADH的消耗，计算酶活力。

6. NADH氧化酶活力测定方法的确立

由于酶活会受到反应底物浓度、pH、缓冲液以及温度的影响，因此选取不同底物浓度、不同pH、不同缓冲液、不同温度条件对NADH氧化酶的活力进行测定，以确定酶的活力测定的几项重要参数。

6.1 反应底物浓度的确定

在反应底物未饱和的条件下，酶活随着底物浓度的增加而增加，当底物浓度增加到一定程度后，酶活不再变化或者出现底物抑制作用而降低。NADH氧化酶在不同NADH浓度下的活性如图1所示。当NADH的浓度高于0.1 mM时，NADH氧化酶的活性不再随着底物浓度的增加而增加，已经达到饱和。因此，应选取高于0.1 mM的底物浓度用于酶活的测定，在本标准中选取0.13 mM为酶活力的底物测定浓度。

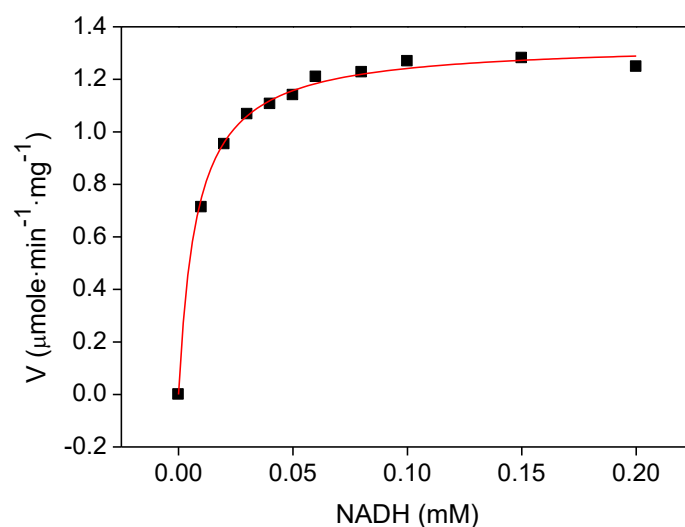


图1 NADH氧化酶的活性随底物浓度的变化

6.2 反应pH的确定

反应体系pH值对于NADH氧化酶等酶的活性影响很大，pH的改变能影响酶活性中心上必须基团的解离程度，同时也能影响底物的解离程度，从而影响酶分子对底物分子的结合和催化。而当pH过小（过酸）或者过大（过碱）都有可能使蛋白变性而失活。

不同pH对NADH氧化酶活性的影响如图2所示。虽然该NADH氧化酶的最适pH为酸性，但在中性条件下仍保持相当活性。考虑到不同来源的NADH氧化酶的最适pH差异较大，本标准选取大多数NADH氧化酶均具有活性的pH作为活力测定方法的pH，即为pH 7.0。

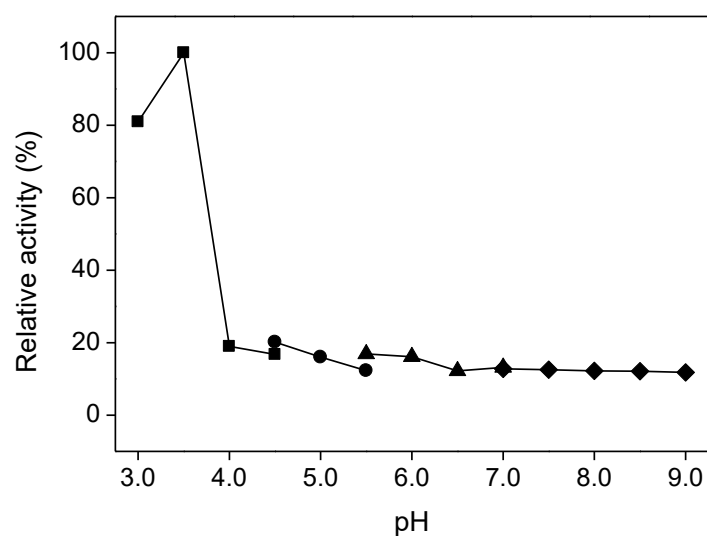


图2. NADH氧化酶在不同pH下的活性

6.3 反应缓冲液的确定

在相同pH的条件下，缓冲液的类型也会对酶活产生影响。在pH 7.0的条件下，NADH氧化酶在不同缓冲液中的酶活力如图3所示，其在三羟基甲基氨基甲烷（Tris）-HCl缓冲液中具有最高的活力，因此选择该缓冲液作为NADH氧化酶活力测定的缓冲液。

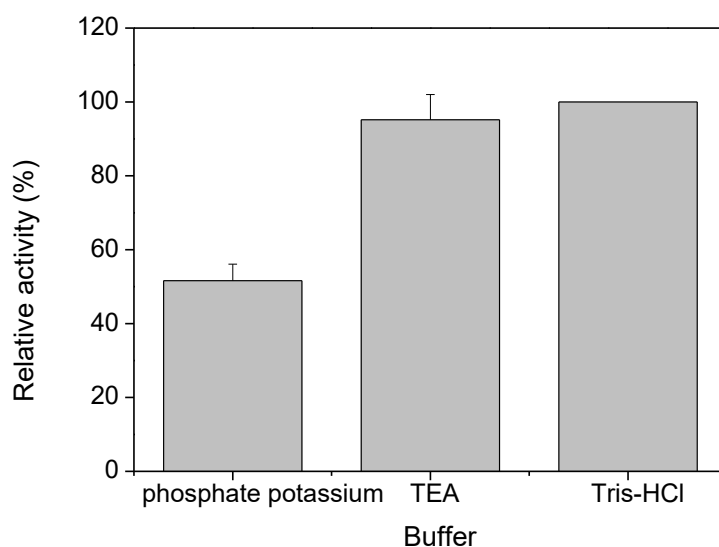


图3. NADH氧化酶在不同缓冲液中的活性

6.4 反应温度的确定

由于不同来源的NADH氧化酶的最适反应温度差异较大，考虑到方法的实用性，本标准选取了大多数NADH氧化酶均具有活性的温度作为活力测定方法的温度，即为30 °C。

7. 试剂

本标准给出了NADH氧化酶活力的测定方法中所使用的试剂的清单，包括NADH、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、Tris-HCl缓冲液以及NADH氧化酶的反应底物溶液。描述了试剂的主要特性，并给出了溶液的制备方法。

对于NADH氧化酶活力的测定，反应底物溶液含0.13 mmol/L NADH、0.1 mmol/L FAD以及50 mmol/L Tris，pH 7.0。

8. 仪器设备

本标准给出了NADH氧化酶活力的测定方法中所使用的仪器设备的清单，并描述了主要特性。仪器设备包括分析天平、pH计、紫外-可见分光光度计、石英比色皿以及移液器。

9. 试样制备和试验步骤

由于市售的NADH氧化酶包含液体样品和固体样品两种形态，因此在试样酶液的制备中分为液体样品待测酶液制备和固体样品待测酶液制备两部分。

酶活的测定步骤为：准确移取1000 μL反应底物溶液于石英比色皿中，置于分光光度计的温控比色皿槽内，待温度稳定于30 °C±1 °C后，迅速加入10 μL待测酶液，加盖颠倒混匀后立即放入分光光度计，

在340 nm下扫描1 min，保存吸光度曲线。通过线性回归方程计算斜率。

10. 试验数据处理

分为液体样品和固体样品两部分。

10.1 液体样品

试样中NADH氧化酶活力按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{(V_1 + V_2) \times k \times D}{\varepsilon \times V_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X_1 ——NADH氧化酶活力，单位为酶活力单位每毫升（U/mL）

V_1 ——反应底物溶液的体积，单位为微升（ μL ）；

V_2 ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（ μL ）；

k ——酶活力测定中吸光度曲线斜率，单位为吸光度每分钟（Abs/min）；

D ——稀释倍数；

ε ——吸光系数，单位为 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，计算结果保留三位有效数字。

10.2 固体样品

试样中NADH氧化酶活力按式（2）计算：

$$X_2 = \frac{(V_1 + V_2) \times k}{\varepsilon \times V_2} \times \frac{V_0}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X_2 ——NADH氧化酶活力，单位为酶活力单位每克（U/g）

V_1 ——反应底物溶液的体积，单位为微升（ μL ）；

V_2 ——酶活力测定中加入酶液的体积，单位为微升（ μL ）；

k ——酶活力测定中吸光度曲线斜率，单位为吸光度每分钟（Abs/min）；

ε ——吸光系数，单位为 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （取值为 $6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）；

V_0 ——溶解酶粉的液体体积，单位为毫升（mL）；

m ——称取酶粉的质量，质量为克（g）。

以三次平行测定结果的算数平均值作为最终的酶活力测定值，计算结果保留三位有效数字。

11. 精密度

取同一样品，相同条件下连续测定3次，结果如表1所示。NADH氧化酶活力的RSD为2.46%，说明重复性好。基于以上重复性结果，在标准文本中规定了精密度为：在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值10%。

表 1 重复性条件下的酶活测定数据

酶	酶活 1 (U/mg)	酶活 2 (U/mg)	酶活 3 (U/mg)	平均酶活 (U/mg)	RSD
NADH 氧化酶	1.20	1.26	1.24	1.23	2.46%

（三）本标准制定参考的主要依据

本标准制定过程中参考了以下相关标准：GB/T 33409-2016《β-半乳糖苷酶活力检测方法 分光光度法》、GB/T 34222-2017《核糖核酸酶活力检测方法》、GB/T 35538-2017《工业酶制剂测定技术导则》。

三、主要试验（验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

（一）主要试验（验证）的分析

起草组依据标准草案中拟定的NADH氧化酶活力检测方法开展了验证实验。收集了市场上两个不同厂家的NADH氧化酶，按照本标准的方法对其酶活进行了测定，测得的酶活分别为32 U/mg和40 U/mg，分别为其标称酶活的91%和114%，表明该方法具有较强的适用性。

（二）技术经济评估

本标准主要描述了NADH氧化酶活力的测定方法，这将填补我国在NADH氧化酶活力的测定方法标准的空白，为行业检测NADH氧化酶活力提供一个切实可行的参考依据和评判标准。本标准的贯彻实施将规范行业的技术应用，提升产品质量管理水平，将产生良好的社会效益与经济效益。

四、采用国际标准或国外文件的程度及水平的简要说明；

本标准在制定过程中未采用国际标准或国外文件。

五、重大分歧意见的处理经过和依据；

本标准在制定过程中无重大分歧性意见。

六、贯彻团体标准的要求和措施建议(包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容)；

（一）组织措施

在中国产学研合作促进会的组织协调下，以标准起草组成员为主，成立标准宣贯小组。

（二）技术措施

组织撰写标准宣贯材料，组织标准宣贯培训，争取标准颁布实施

后尽快在中国产学研合作促进会推广。

七、其他应予说明的事项。

无。

标准起草组

2024年7月