



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—20XX

腈水合酶纯度和活性的测定

Purity and enzymatic activity determination of Nitrile hydratase

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

202X – XX – XX 发布

202X – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

腈水合酶纯度和活性的测定

1 范围

本文件描述了腈水合酶纯度和活性测定的原理、酶活力单位定义、试剂或耗材、仪器设备、样品制备、试验步骤、结果计算。

本文件适用于催化丙烯腈为丙烯酰胺的腈水合酶纯度和活性的测定。

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试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

腈水合酶 nitrile hydratase, NHase

具有将腈类物质催化为酰胺类化合物的金属酶。

注1：大部分NHase由 α ， β 两个亚基构成，一般以 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体形式存在。

注2：NHase活性中心含有不同的金属离子，一般可分为铁型腈水合酶(Fe-NHase)和钴型腈水合酶(Co-NHase)。

3.2

腈水合酶纯度 NHase purity

腈水合酶纯度的量度是比活力，指每毫克酶蛋白中所含有的腈水合酶活力，即：

腈水合酶纯度=腈水合酶活力单位量(U)/蛋白质质量(mg)

3.3

腈水合酶活性 NHase activity

腈水合酶催化丙烯腈为丙烯酰胺的能力，主要以活力单位来表示。

3.4

腈水合酶活力单位 NHase activity units

表示腈水合酶量多少的单位。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Nhase：腈水合酶(nitrile hydratase)

SDS-PAGE: 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfonate polyacrylamide gel electrophoresis)

BSA: 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)

LC: 液相色谱 (liquid Chromatography)

Acr-Bis: 亚甲基双丙烯酰胺 (acrylamide-bisacrylamide)

Tris-HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride)

SDS: 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate)

APS: 过硫酸铵 (ammonium persulphate)

TEMED: 四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

5 原理

5.1 脲水合酶纯度十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法测定原理

基于不同蛋白的电荷数和分子量的差异,一定浓度的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 在一定范围时间内,可分离不同分子量的蛋白,经染色、脱色、成像及数据处理步骤,计算得脲水合酶的纯度。

5.2 脲水合酶活性测定原理

适当条件下,脲水合酶将丙烯脲等比催化生成丙烯酰胺。通过液相色谱外标法定量生成的丙烯酰胺,根据酶活性单位定义计算得脲水合酶的酶活。

6 试剂和材料

除非另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,试验用水为GB/T 6682规定的一级水。

- 6.1 30% (w/v) 亚甲基双丙烯酰胺溶液 (Acr-Bis) (附录 A 第 A.1)
- 6.2 1.0 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液 (Tris-HCl), pH 6.8 (附录 A 第 A.2)
- 6.3 1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液 (Tris-HCl), pH 8.8 (附录 A 第 A.3)
- 6.4 10% (w/v) 十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液 (附录 A 第 A.4)
- 6.5 10% (w/v) 过硫酸铵 (APS) 溶液 (附录 A 第 A.5)
- 6.6 10 倍 Tris-甘氨酸电极缓冲液 (见附录 A 第 A.6)
- 6.7 5×十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 加样缓冲液 (附录 A 第 A.7)
- 6.8 染色液 (附录 A 第 A.8)
- 6.9 脱色液 (附录 A 第 A.9)
- 6.10 1.0 mg/mL 牛血清白蛋白标准溶液 (附录 A 第 A.10)

- 6.11 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH=7.4) (附录 A 第 A.11)
- 6.12 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH=7.4) (附录 A 第 A.12)
- 6.13 100 mmol/L 丙烯腈 (附录 A 第 A.13)
- 6.14 色谱纯乙腈
- 6.15 100 mmol/L 丙烯酰胺(附录 A 第 A.14)
- 6.16 有机微孔滤膜: 孔径 0.45 μm
- 6.17 液相色谱流动相 (见附录 A 第 A.14)

7 仪器设备

- 7.1 电子天平: 感量为 0.01 g 和 0.0001 g
- 7.2 离心真空浓缩仪
- 7.3 金属浴
- 7.4 旋涡振荡器
- 7.5 紫外可见分光光度计
- 7.6 电泳仪
- 7.7 凝胶扫描装置
- 7.8 脱色摇床
- 7.9 移液器
- 7.10 液相色谱仪, 带有紫外可见光检测器 (variable wavelength detector) 或二极管阵列检测器 (diode array detector)
- 7.11 色谱柱, 应符合以下要求, 色谱柱得固定相为 C18。

8 样品制备

准确称取待测样品适量, 用 10 mmol/L PBS 溶液溶解配制成 1 mg/mL 的样品溶液。若待测样品为溶液, 用离心真空浓缩仪浓缩为冻干粉。

9 分析步骤

9.1 蛋白质含量测定

按照 SN/T 3926 进行测定。

9.2 胰水合酶纯度测定

9.2.1 电泳样品制备

分别精确移取 20 μL 的 1.0 mg/mL 待测样品和 5 μL 的 5 \times 电泳 (SDS-PAGE) 加样缓冲液于一个离心管中混合, 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 10 min 后, 冷却备用。

9.2.2 电泳分离胶和浓缩胶的配制

组装制胶装置, 按表 1 分别配置 5% 浓缩胶和 12% 分离胶溶液

表1 浓缩胶、分离胶配方

	5%浓缩胶 (μL)	12%分离胶 (μL)
30% Acr-Bis	750	4000
1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8)	0	2500
1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8)	780	0
10% APS	60	100
10% SDS	60	100
水	4440	3400
TEMED	6	5

9.2.3 电泳上样

上样量为 10 μL，每个样品设 3 个重复。

9.2.4 电泳

移液枪移取 10 μL 待测腈水合酶样品，加入 40 μL 的 5×上样缓冲液，然后放入沸水中煮 5-10 min，而后将样品点入凝胶加样孔中，待所有样品点样完成后，开始电泳。样品位于浓缩胶时，电压调至 80 V 的低电压，待样品进入分离胶后，电压调至 120 V。当指示剂溴酚蓝运动至蛋白胶最下端时，电泳终止。结束后通过考马斯亮蓝 R-250 染色 2-4 h。染色后，将凝胶从染液中取出，放入脱色液进行脱色，期间使用脱色摇床振荡脱色，直至背景蓝色完全取出，凝胶呈现透明，条带清晰可见，结束脱色。

9.3 腈水合酶活性测定

9.3.1 液相色谱参考条件

检测波长为 215 nm

柱温为 40 °C

流动相为水乙腈体积比为 2:1，等度洗脱

进样量：2 μL

流速：0.2 mL/min

9.3.2 酶催化丙烯腈为丙烯酰胺

精确移取 10 μL 浓度 0.5 mg/mL 待测腈水合酶至 1.5 mL 离心管中，置于 25 °C 金属浴上。向离心管中加入 490 μL 底物 100 mmol/L 丙烯腈，充分涡旋混匀，25 °C 下反应 10 min，然后加入 0.1 mol/L 磷酸溶液终止

反应。移取上清液并过0.45 μm有机系微孔滤膜。同时按照表2配制浓度分别为0.5、1、2、5和10 mmol/L的丙烯酰胺溶液作为标样分别装载入LC样本室中。

表2 液相色谱法标准溶液配制表

丙烯酰胺 标准溶液	浓度	10 mmol/L PBS	
母液	100 mmol/L	--	
S1	10 mmol/L	母液 100 μL	900 μL
S2	5 mmol/L	母液 50 μL	950 μL
S3	2 mmol/L	S1 200 μL	800 μL
S4	1 mmol/L	S1 100 μL	900 μL
S5	0.5 mmol/L	S1 50 μL	950 μL

10 结果分析

10.1 纯度计算

电泳脱色后，凝胶置于蛋白印记成像系统中成像，根据实际选择合适曝光度后拍照记录实验条带并利用电泳图像分析软件进行分析处理，计算样品中脬水合酶占的比例（%），样品3个重复结果的平均值与待测样品蛋白含量的乘积值即为待测样品的实际平均相对纯度（用百分比表示）按照公式（1）计算：

$$P=R\times C\times 100\%$$
 (1)

式中：

- P：待测脬水合酶相对纯度
- R：待测样品脬水合酶所占的比例；
- C：待测脬水合酶样品中蛋白含量。

样品三个重复结果的平均值与待测样品蛋白含量的乘积值即为待测样品相对纯度，结果用百分比表示（%），计算结果保留小数点后两位。

10.2 丙烯酰胺计算

根据丙烯酰胺标准溶液的浓度和对应的峰面积绘制标准工作曲线，反应体系中丙烯酰胺的量通过标准曲线公式（2）计算：

$$x=(y-b)/a \quad (2)$$

式中：

x：生成丙烯酰胺的浓度（mmol/L）

y：丙烯酰胺色谱积分面积

a：标准工作曲线的斜率

b：标准工作曲线的截距

其中，丙烯酰胺的标准品色谱图参见附图B.1。

10.3 活性计算

定义为25℃下，每分钟催化生成1 μmol酰胺所需要的酶量。计算公式（3）如下：

$$EA \text{ (U/mg)} = x \times v_1 / (t \times c \times v_2) \quad (3)$$

式中：

EA：酶活性（U/mg）

x：生成丙烯酰胺的浓度（μmol/mL）

v₁：催化生成丙烯酰胺的反应体系体积（mL）

t：反应时间（min）

c：反应加入待测脲水合酶的体积（mL）

v₂：反应中加入待测脲水合酶的浓度（mg/mL）

10.4 重复性

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术平均值的10%。

附录 A

(规范性)

试剂配制

A.1 30% (w/v) 亚甲基双丙烯酰胺溶液 (Acr-Bis)

取丙烯酰胺29.00 g, N, N'-甲叉双丙烯酰胺1.00 g, 加入60 mL水, 充分搅拌溶解, 定容到100 mL。用0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌和杂质后储于棕色瓶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。如有沉淀应过滤, 两个月后溶液应重新配制备用。

A.2 1.0 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液 (Tris-HCl), pH 6.8

取12.12 g三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶于80 mL的水中, 充分搅拌溶解, 用HCl调pH值为6.8, 定容至100 mL, 室温保存备用。

A.3 1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液 (Tris-HCl), pH 8.8

取18.17 g三羟甲基氨基甲烷溶于80 mL的水中, 充分搅拌溶解, 用HCl调pH值为8.8, 定容至100 mL, 室温保存备用。

A.4 10% (w/v) 十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液

取2.00 g十二烷基磺酸钠溶于约16 mL的水中, 超声溶解后定容至20 mL, 室温保存备用。

A.5 10% (w/v) 过硫酸铵 (APS) 溶液

取0.10 g过硫酸铵于1.5 mL离心管, 加1 mL水溶解, 现配现用。

A.6 10倍 Tris-甘氨酸电极缓冲液

取30.00 g Tris、144.00 g甘氨酸、10.00 g SDS溶于800 mL水中, 定容至1000 mL, 室温保存, 使用时稀释10倍。

A.7 5 \times 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 加样缓冲液

取1.25 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、SDS 0.50 g、2.5 mL甘油、25.0 mg溴酚蓝, 用水溶解定容至5 mL, 按照每管500 μL 分装后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。临用前每管加0.0780 g二硫苏糖醇 (DTT), 现配现用。

A.8 染色液

染色液 A: 考马斯亮蓝 G-250 0.10 g、乙醇 50 mL、85% (m/v) 磷酸 25 mL, 用水定容至 1000 mL, 保存备用。

染色液 B: 考马斯亮蓝 R-250 0.50 g、冰乙酸 25 mL、乙醇 250 mL, 用水定容至 500 mL, 室温保存

A.9 脱色液

取100 mL冰乙酸、400 mL甲醇, 用水定容至1 L, 室温保存。

A.10 1.0 mg/mL 牛血清白蛋白标准溶液

称取10.0 g 纯度 $\geq 98\%$ 的牛血清白蛋白，加水定容至20 mL，配制成浓度为1 mg/mL，-20 °C保存。

A. 11 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH=7.4)

称取 17.42 g K_2HPO_4 ，加水定容至 100 mL，得到 0.1 mol/L。称取 13.61 g KH_2PO_4 ，加蒸馏水定容至 100 mL。移取 80.2 mL 的 K_2HPO_4 和 19.8 mL 的 KH_2PO_4 混合即为 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液，储存于 4 °C。

A. 12 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液

取 100 mL 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液加水定容至 1 L，储存于 4 °C。

A. 13 200 mmol/L 3-氰基吡啶 (烟腈)

称取 2.08 g 烟腈固体，用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH=7.4) 溶解并定容至 100 mL。

A. 14 100 mmol/L 丙烯酰胺

称取0.7108 g丙烯酰胺溶于100 mL的10 mM的PBS溶液。

A. 15 液相色谱流动相

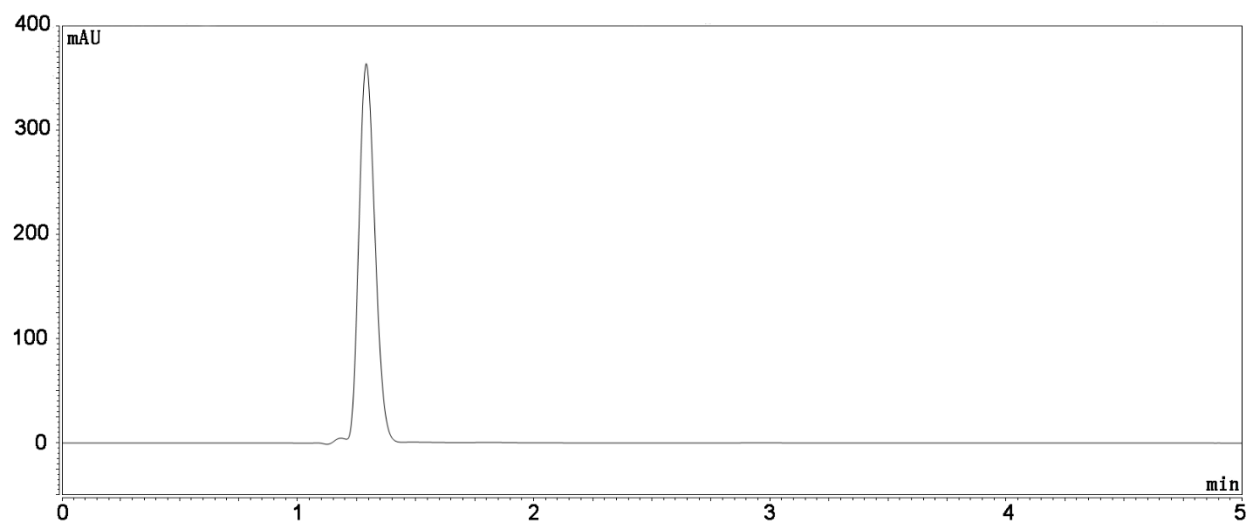
色谱级乙腈和超纯水按 1:2 (V/V) 混合配制。

附 录 B

(资料性)

丙烯酰胺的标准品色谱图

丙烯酰胺的标准品色谱图参见图B.1。



图B.1 2 mM丙烯酰胺标准品的液相色谱图