

国家标准《生物酶检测技术通则》  
(征求意见稿)

编制说明

《生物酶检测技术通则》标准起草组

2025 年 5 月

## 目录

|   |    |
|---|----|
| （一）工作简况 .....   | 3  |
| （二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、<br>检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后<br>技术内容的对比 ..... | 5  |
| （三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效<br>益 .....  | 13 |
| （四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关<br>数据对比情况 .....   | 33 |
| （五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明<br>未采用国际标准的原因 .....   | 33 |
| （六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系 .....  | 33 |
| （七）重大分歧意见的处理经过和依据 .....   | 33 |
| （八）涉及专利的有关说明 .....  | 33 |
| （九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议<br>.....   | 33 |
| （十）其他应予说明的事项 .....  | 33 |

## 国家标准《生物酶检测技术通则》编制说明

（一）工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

### 1、任务来源

本标准根据国标委公布的 2024 年第一批国家标准计划项目（国标委综合[2024]16 号），本项目计划编号为 20240229-T-469，名称为 生物酶检测技术通则。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由 中国测试技术研究院 联合起草。

### 2、目的和意义

当前生物酶已经在医疗、纺织、石油、食品和造纸等行业得到越来越广泛的应用。我国酶学及酶制品等产业起步晚，当前国内生物酶处于性能质量参差不齐的状态，特别是生化检测涉及的生物酶品种多且性能要求高，因而大部分依赖于进口。新冠疫情期间，生物酶在生化分析检测中的核心关键作用凸显，蛋白酶 K 等多种生物酶供货期大幅增加或者直接断供，生物酶成为制约生化检测行业及其相关产业发展的“卡脖子”关键，而解决“卡脖子”问题的最有效手段是发展高性能国产化生物酶。科技部设立的国家重点研发计划“绿色生物制造”重点专项中就有“工业酶创制与应用”专题。国内无生物酶检测技术通用的标准，因此阻碍了生物酶的发展，急需建立生物酶检测技术通则，可以解决国内无生物酶检测技术通则的问题，也可以解决核心原料检验技术受制于国际管控问题，生物酶检测技术通则工作将有利于提高生物酶及相关生物医药、洗涤清洁、饲料添加、食品工业、生物能源等领域全行业的质量水平，完善评价体系。

### 3、协作单位

### 4、标准编制过程和主要工作过程

（1）2022年6月至2022年10月，标准起草单位组织相关技术人员对《生物酶质量评价通则》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外50余篇标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

（2）2022年11月至2023年4月相关技术人员撰写了《生物酶质量评价通则》初稿。从酶活性测定评价方法、酶纯度测定评价方法、评价要求等来阐述。

（3）2023年4月28日召开了《生物酶质量评价通则》新提案研讨，经秘书长提议，全体专家一致通过，同意牛刚任专家组组长。标准起草工作组汇报了标准的编制过程、技

术路线说明、主要技术指标的确定等。专家组听取了标准起草工作组的工作汇报，对标准工作组讨论稿进行了讨论和质询，同时对标准可能存在的问题进行充分的交流和沟通。形成了具体意见（详见表 1）：1、起草工作组提供的材料基本齐全，内容完整。2、本标准符合国家标准 GB/T 1.1-2020 的编写规则。3、本标准适用于在科研、生产和应用过程中对生物酶的质量进行评价。标准规定了生物酶的质量评价指标（外观、活力、纯度、杂质、一致性、保质期、文件要求）评价方法，评价内容等。与会专家经过认真讨论，认为起草工作组还需按审查委员会提出的意见建议对标准进行修改完善，尽快提交秘书处。

表 1 委员会专家意见汇总表

| 序号 | 章条号 | 意见内容             | 修改建议及理由                      |
|----|-----|------------------|------------------------------|
| 1  | 4.3 | “活（性）力”统一参数      | 统一为“活力”，工业上称为“活力”            |
| 2  | 4.3 | “85%~115%”不合理    | 在货架期内，应不低于标示值。酶活力随着时间的延长或降低。 |
| 3  | 4.4 | “90%~110%”没有科学依据 | “生物酶的纯度应不低于标示值”。产品的纯度应有个确定值。 |
| 4  | 4.8 | “85%”不科学         | 去掉“85%”。保质期内实测酶活力不应低于标示值。    |
| 5  | /   | 工作要做深入           | 选取代表性试剂，开展相关指标评价工作。          |
| 6  | /   | 无安全性指标           | 增加安全性指标                      |

起草组根据上表专家意见对标准草案做了修改和完善，并增加了安全性指标：重金属、生物毒素、微生物，并将一致性改成批内、批间差异检测。

（4）2023 年 6 月 30 日，起草组参加国标委组织的立项答辩，经专家讨论后建议将起草组申请的三个标准提案《生物酶的定义、分类与命名》、《生物酶活力测定通则》和《生物酶质量评价通则》合为一个标准《生物酶检测技术通则》。

（5）2024 年4月收到全国生化检测标准化技术委员会[2024]5 号文件关于下达2024年第一批推荐性国家标准计划的通知》以及该标委会转发的国标委综合 [2024]16号《国家标准委关于下达2024年第一批国家标准制修订计划的通知》立项文件，计划编号：20240229-T-469。

（6）2024 年 4 月至 2025 年 3 月，根据立项题目《生物酶检测技术通则》，该标准重点在检测技术上，对应之前版本的质量检测指标，建立检测技术，重点是酶活力以及纯度检测技术，酶活力检测技术主要有光谱法、电化学方法、放射性标记法、质谱法及其联用技术和其他方法（等离子共振法、偶联测定法等）；光谱法主要分为吸光光度法、荧光光

谱法、浊度测定法、旋光测量法、发光测定法；电化学方法主要分为 pH 计（玻璃电极）、pH 稳定计、电位测定法；纯度检测有光谱法（光谱扫描法、光吸收比值法）、层析法（保留值法、基准物标定法）、电泳法（净电荷电泳、SDS-电泳、等电聚焦电泳、双向电泳、毛细管电泳）；杂质检测主要有化学法、光谱法、色谱法等；安全性检测中的重金属检测主要有原子吸收光谱法、原子荧光光谱法、电感耦合等离子体发射光谱法等；生物毒素检测主要有高效液相色谱法、质谱法、免疫法等；微生物检测参考食品微生物检测技术。并针对生物酶重要检测技术进行验证，如活力、纯度等，选取代表性生物酶如胰蛋白酶、尿激酶等进行验证。

（7）2025 年 4 月，起草小组对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《生物酶检测技术通则》标准的起草工作，与会专家就《生物酶检测技术通则》标准（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议：如哪类生物酶或者哪种生物酶适用于哪种检测技术；在附录列出生物酶的分类，删除安全性指标等。

（8）2025 年 4 月至 2025 年 5 月，标准起草小组根据专家意见进行了《生物酶检测技术通则》标准进行了修改和完善。完成了《生物酶检测技术通则》标准的编制说明，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《生物酶检测技术通则》标准（征求意见稿）和编制说明。

## 5、国家标准主要起草人及其所做的工作

（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

### 1、标准编制原则

1）本标准的编制依据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》。

2）本标准严格遵循现行相关法律法规和其他标准，确保在各个层面上与现有规范协调一致，形成有机统一的整体，避免出现任何冲突或矛盾。

3）在标准的编制过程中，严格按照 GB/T 1.1-2020 等系列标准的规定，对标准的结构编排、编写格式和内容表达方法等进行统一规范，确保标准具备高度的规范性，便于各方理解和执行。

### 2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

立项前为三个标准草案《生物酶的定义、分类与命名》、《生物酶活力测定通则》和《生物酶质量评价通则》，因此参考一些生物酶产品标准，主要都包含产品分类、一般要求、

质量指标以及检测方法，因此生物酶质量评价通则也采用这个框架。参考一些生物酶标准的质量指标，主要有外观、酶活力、比活力、纯度、杂质、安全性、批内、批间差异、保质期等，因此综合以上指标确定生物酶的质量评价指标为外观、酶活力、比活力、纯度、杂质、安全性、批内、批间差异、保质期，后面标准题目立项时定为《生物酶检测技术通则》，因此标准就根据质量评价的指标来对应检测技术来起草。

**表 2 酶产品标准**

| 类型   | 标准编号            | 标准名称            | 发布日期       | 实施日期       |
|------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| 国家标准 | GB/T 36755-2018 | BST DNA 聚合酶     | 2018-09-17 | 2019-04-01 |
| 国家标准 | GB/T 36757-2018 | M-MLV 反转录酶      | 2018-09-17 | 2019-04-01 |
| 国家标准 | GB/T 36389-2018 | T4 DNA 连接酶      | 2018-06-07 | 2019-01-01 |
| 国家标准 | GB/T 36390-2018 | 工具酶溶菌酶          | 2018-06-07 | 2019-01-01 |
| 国家标准 | GB/T 35542-2017 | Taq DNA 聚合酶     | 2017-12-29 | 2018-07-01 |
| 国家标准 | GB/T 35540-2017 | 限制性凝血酶          | 2017-12-29 | 2018-07-01 |
| 国家标准 | GB/T 35543-2017 | 核糖核酸酶 A         | 2017-12-29 | 2018-07-01 |
| 国家标准 | GB/T 35539-2017 | 限制性核酸内切酶 Bam HI | 2017-12-29 | 2018-07-01 |
| 国家标准 | GB/T 35541-2017 | pfu DNA 聚合酶     | 2017-12-29 | 2018-07-01 |
| 国家标准 | GB/T 34793-2017 | 蛋白酶 K           | 2017-11-01 | 2018-05-01 |

## 1 酶的活力和比活力

酶的活力和比活力是酶最关键的指标，不同酶的活力和比活力的检测技术不尽相同，按反应时间，可分为定时法（两点法）、连续监测法和平衡法（终点法），按测试仪器分为光谱法（吸光光度法、荧光光谱法、浊度测定法、旋光测定法、发光测定法）、电化学方法（pH 计（玻璃电极）、pH 稳定计、电位测定法）、放射性标记法（同位素测定法）、质谱法及其联用技术、其他方法（表面等离子体共振法、偶联测定法等）。

**表 3 酶活力的检测方法标准**

| 类型   | 标准编号            | 标准名称                                | 检测技术  |
|------|-----------------|-------------------------------------|-------|
| 国家标准 | GB/T 36756-2018 | 工具酶活性测定通用要求                         | /     |
| 国家标准 | GB/T 41906-2022 | 超氧化物歧化酶活力检测方法-分光光度法                 | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 41712-2022 | 脱氧核糖核酸酶 I 酶活及杂质检测方法                 | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 5521-2008  | 粮油检验 谷物及其制品中 $\alpha$ -淀粉酶活性的测定 比色法 | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 41907-2022 | 肠激酶活性检测方法                           | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 34776-2017 | T4 DNA 接酶酶活及杂质检测方法                  | 琼脂糖电泳 |
| 国家标准 | GB/T 34222-2017 | 核糖核酸酶活力检测方法                         | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 34801-2017 | 脱氧核糖核酸酶活力检测方法                       | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 33410-2016 | 生化试剂中蛋白酶 K 活性检测方法                   | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 34800-2017 | 蛋白酶 K 酶活力及杂质检测方法                    | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 30990-2014 | 溶菌酶活性检测方法                           | 分光光度法 |

|      |                 |                            |       |
|------|-----------------|----------------------------|-------|
| 国家标准 | GB/T 32131-2015 | 辣根过氧化物酶活性检测方法 比色法          | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 33409-2016 | $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测方法 分光光度法 | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 34795-2017 | 谷氨酰胺转氨酶活性检测方法              | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 34799-2017 | 几丁质酶活性检测方法                 | 分光光度法 |
| 行业标准 | NY-3799-2020    | 生乳及其制品中碱性磷酸酶活性的测定 发光       | 发光法   |
| 国家标准 | GB/T 8622-2006  | 饲料用大豆制品中尿素酶活性的测定           | 电化学方法 |

### 1.1 反应条件的选择要点

反应条件对酶活力测定结果影响很大，反应条件的选择要点：底物类型和浓度、反应温度、反应 pH 值、反应时间、缓冲液和离子强度以及其他因素。

#### 1.1.1 底物类型和浓度

底物选择的原则：

- (1) 对于专一性强的酶，选择特异性高的底物；
- (2) 对于专一性不强可使用多种底物的酶，所选用的底物必须有足够的特异性，通常选择米氏常数 $K_m$ 最小的底物。
- (3) 有足够的溶解度；
- (4) 稳定性好。

底物浓度的确定：米氏常数( $K_m$ 值)是用mol/L表示，对于单底物酶促反应，应选择底物浓度为 $K_m$ 的（10~20）倍。双底物酶促反应速度达到最大反应速度的程度一般要求为90%~95%。

#### 1.1.2 反应温度

不同的酶，其反应的最适温度可能截然不同。

目前，酶活性的测定温度尚未统一，国际临床化学联合会（IFCC）推荐测定酶活性浓度测定的反应温度为37℃。

对多数酶，其酶活最适宜温度在（37~40）℃，但有些生物机体的酶适应在相当高或相当低的温度下工作。多数哺乳动物来源的酶，其最适温度为37℃左右。

不论选用何种温度测酶，由于酶反应受温度影响很大，在测定时间内，反应体系的温度变化应控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 内。

#### 1.1.3 反应 pH 值

酶在最适pH范围内表现出活性，多数酶的最适pH在5~8之间。大于或小于最适pH，都会降低酶活性。主要表现在两个方面：①改变底物分子和酶分子的带电状态，从而影响酶和底物的结合；②过高或过低的pH都会影响酶的稳定性，进而使酶遭受不可逆破坏。

配制同一pH的缓冲液常常可使用多种化学试剂，此时不仅要考虑试剂的pKa值，以保证有足够的缓冲能力，还要考虑试剂本身是否具有抑制或激活酶催化活性的作用。

根据酶在不同pH条件下的活性绘制曲线，确定酶的最适反应pH值。

#### 1.1.4 反应时间

在一定的时间范围内，最终产物的生成量是与酶活力的大小成正比的。在其他反应条件确定的情况下，可以通过试验得到反应时间和产物浓度的结果图，以选择合适反应时间。

#### 1.1.5 缓冲液和离子强度

缓冲液要有足够的缓冲能力，以保持pH值的稳定。

在方法设计时，选完缓冲物后，还必须了解不同浓度缓冲液对酶活性的影响。一般而言，随缓冲液浓度增加，电解质干扰酶和底物结合，酶活性将逐步下降，所以选择缓冲液浓度时，常需在浓度较高以保持足够缓冲能力和浓度较低以免抑制酶活性两个相矛盾作用之间取得平衡。

对于生物缓冲液，如三羟甲基氨基甲烷、三乙醇胺受温度影响较大。在实际配制缓冲液时，应首先将配制溶液温度调节到规定温度，然后在pH计监测下加入相应的酸或碱溶液将pH调到要求范围。不控制温度，不用pH计盲目进行配制缓冲液是不可取的。

#### 1.1.6 其他因素

##### (1) 辅助因子

辅助因子是与酶蛋白疏松结合的小分子量的有机物质或者是一些金属离子，分为辅酶和辅基，在酶促反应中，主要参与电子、质子或基团的转运作用。

辅酶例为有机小分子，如辅酶I(NAD<sup>+</sup>)、辅酶II(NADP<sup>+</sup>)，其分子中含有烟酰胺，在反应中转运H<sup>+</sup>和电子。

辅基多为金属离子，如K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等。例如 Zn<sup>2+</sup>是羧基肽酶和醇脱氢酶的辅基，Mn<sup>2+</sup>是精氨酸酶的辅基。

##### (2) 激活剂与抑制剂

酶激活剂是指一些物质可以改变一个无活性酶前体（酶原），使之称为有活性的酶，或加快某种酶促反应的速率产生酶激活作用。例如Mg<sup>2+</sup>是肌酸激酶的激活剂，Cl<sup>-</sup>是淀粉酶的激活剂。因此在酶活性测定时，也要满足酶对激活剂的需要。

酶的活性受到大分子抑制剂或小分子抑制剂的抑制，从而影响酶活力，要减少它的出现。前者如胰脏的胰蛋白酶抑制剂（抑肽酶），后者如2, 3-二磷酸甘油酸，是磷酸变位酶的抑制剂。

值得注意的是，很少量的激活剂或抑制剂就会影响酶的活性，且有其特异性。激活剂和抑制剂不是绝对的，有些物质在低浓度时为某种酶的激活剂，而在高浓度时则为该酶的抑制剂。例如，氯化钠达到三分之一饱和度时就可抑制唾液淀粉酶的活性。

### （3） 样品与试剂比例

值得注意的是，酶活性的发挥与介质有关，经常发现改变样品与反应液总量的比例，测定结果并不会成正比例地改变，可能与激活剂、抑制剂、酶的解聚和聚合、酶的稳定性等因素有关。因此，样品与反应液总量的比例一旦选定，就不能随意更改。

分光光度法主要利用底物和产物在紫外线或可见光部分的光吸收度的不同，选择一适当的波长，测定反应过程中反应进行的情况。该方法可以连续地读出反应过程中光吸收地变化，已成为酶活力测定中一种重要地方法之一。几乎所有的氧化还原酶都可以用此法测定。

#### 1.2 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度法是目前最常用的光谱技术之一，主要利用底物和产物在紫外线或可见光部分的光吸收度的不同，选择一适当的波长，测定反应过程中反应进行的情况。该方法可以连续地读出反应过程中光吸收的变化，已成为酶活力测定中一种重要得方法之一。表3可见现有的国家标准中酶活性的检测方法几乎都用的此方法，该方法特别适用于含有不饱和键，尤其是含有共轭体系的化合物的分析和研究。是目前应用最广泛的酶活性测定手段，几乎所有的氧化还原酶都可以采用此法进行测定，水解酶的活性测定也可用分光光度法。如蛋白酶类（木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性/碱性/酸性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶）、溶菌酶、 $\alpha$ -淀粉酶（中温、耐高温）、纤维素酶、果胶酶、乳糖酶、谷氨酰胺转氨酶、单宁酶、麦芽糖淀粉酶、核酸酶、脱氨酶、纳豆粉、舍雷肽酶、漆酶、植酸酶、蔗糖酶，血清中肌酸激酶、乳酸脱氢酶、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶和 $\gamma$ -谷氨酰基转移酶的参考测量方法中，均采用紫外-可见分光光度法，紫外-可见吸光光度设备价格相对低廉，成本较低，操作简便，应用范围广泛，可检测到  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平的变化；该方法的缺点是灵敏度一般，特异性有限。

#### 1.3 荧光分光光度法

对于某些能够发射荧光的生物酶化合物，如三磷酸腺苷（ATP）、黄素核苷酸（FMN）、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NAD（P）H），可采用荧光分光光度法进行酶活性测试。荧光分光光度法的灵敏度通常要比紫外-可见分光光度法的灵敏度高若干个数量级，具有高灵敏度和高专一性的优点，如可用来测定端粒酶、人类 DNA 糖基化酶、多聚（ADP-核糖）聚合酶-1、N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等的活性。

1.4 色谱技术

底物或产物可以通过其物理性质的不同进行分离鉴定（如溶解性、分子大小、所带电荷等），其最常用的方法为色谱法。色谱法分为高效液相色谱法、离子交换色谱法、手性分离色谱法、凝胶过滤色谱法、气相色谱法等，这些方法均具有不同的使用条件。高效液相色谱法因其高效、快速、高灵敏度等特点在酶活性测定上应用最为广泛。

1.5 质谱技术

质谱技术用于生物酶活性的检测，是对游离酶活性的检测，当酶促反应终止后，采用质谱对产物或底物进行测定，是常用的质谱检测生物酶活性的方法；质谱法测定的样品可以是有机物，也可以是无机物，被分析的样品形态可以是气体、液体或是固体，具有高灵敏度、高通量和高选择性的优点，样品用量少，能够实现多组分的同时检测，但存在仪器昂贵、维护成本高的缺点，操作也相对复杂，对操作人员的技术水平要求较高，目前主要应用于临床样本的检测。

1.6 其他技术

如放射性标记法、表面等离子体共振法、表面增强拉曼光谱法等，但在酶活性测定上应用较少。

2 生物酶的纯度

生物酶的纯度，是从生物酶样品中确定目标生物酶和杂质的分析方法，任何一种生物酶从理论上说都含有二类组分，即酶和杂质。依据需要选择适用于生物酶纯度检测的方法，如光谱法、层析法、电泳法。

表 4 酶纯度相关的标准

| 类型   | 标准编号            | 标准名称                | 检测技术 |
|------|-----------------|---------------------|------|
| 国家标准 | GB/T 40174-2021 | 工具酶纯度的检测方法          |      |
| 国家标准 | GB/T 34223-2017 | 核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶纯度检测方法 |      |

2.1 光谱法

### 2.1.1 光谱扫描法

一种纯度的生物酶溶液在一定的波长范围内进行光谱扫描就会得到一个特征吸收光谱，可以根据扫描光谱的吸收曲线的形状，吸收峰的位置，数量和大小判断该生物酶的纯度。

用紫外吸收光谱测定生物酶的纯度，既方便又灵敏，测得结果可靠，是常用的纯度分析方法。

光谱分析的特点：主要是鉴别目标生物酶和杂质。

### 2.1.2 光吸收比值法

一种纯物质在紫外光区有其最大吸收峰，如核酸的最大吸收峰在260nm，蛋白类生物酶的最大吸收峰在280nm，同一溶液在这两种波长下测得的光吸收值是不同的，利用在280nm和260nm处测得的光吸收值之比，即可得到蛋白类生物酶的纯度，如纯核酸的标准光吸收比为 $A_{280}/A_{260}=0.5$ ，纯蛋白的标准光吸收比为 $A_{280}/A_{260}=1.8$ 。

特点：仅限于蛋白类生物酶溶液中含有核酸或核酸溶液中含有蛋白类生物酶的纯度测定。

## 2.2 层析法

一个纯的生物酶在稳定的层析条件下，得到的保留值只有一个，如果得到的层析峰多于一个就可以视为不纯。所以根据层析峰的数量判断物质的纯度。

层析法鉴定生物酶纯度的方法有

### 2.2.1 保留值法

在一定的层析条件下各种生物酶组分在层析柱内的保留值是一定的，通过测定生物酶的层析保留值（保留时间，保留体积）就能确定生物酶组分，从而可以判断生物酶的纯度。如：排阻层析根据生物酶不同的分子量可得到不同的保留体积，若流速恒定的条件下，其保留时间也是一定的。

### 2.2.2 基准物标定法

已知物内标法，在被鉴定物的样品中加入已知基准物，称内标物，通过层析分离，从得到的层析峰的增高或峰的位置来判断。

### 2.2.3 层析的模式

层析分析鉴定法的方法很多，但根据层析的分离机制来分，大致可分为以下几类。

根据生物酶质量和分子形状的层析分离模式

根据生物酶疏水基团多少和分子极性的差异的层析分离模式

根据生物酶带电荷多少和分子吸附基团的差异的层析分离模式

常用的分离模式有：排阻层析、疏水层析、吸附层析、高效液相。

#### 2.2.4 几种层析方法的比较

常见的层析方法见下表。

表5 常见的层析方法

| 方法   | 机理    | 关键技术 | 优点   | 缺点     |
|------|-------|------|------|--------|
| 排阻层析 | 分子量分离 | 层析介质 | 应用广泛 | 分析时间长  |
| 疏水层析 | 极性分离  | 缓冲溶液 | 分离度好 | 盐浓度较高  |
| 吸附层析 | 电荷分离  | 介质性质 | 通用性好 | 条件难控制  |
| 高效液相 | 极性分离  | 溶剂系统 | 灵敏度高 | 高纯有机试剂 |

### 2.3 电泳法

一个纯的生物酶在一定的电泳条件下得到的电泳图谱只有一个条带，如聚丙烯酰胺电泳（PAGE）。所以根据生物酶的电泳条带的数量判断生物酶纯度。

电泳鉴定生物酶纯度的方法有：净电荷电泳（PAGE）、SDS-电泳（SDS-PAGE）、等电聚焦电泳（IEF）、双向电泳（2D-PAGE）、毛细管电泳（CE），见下表。最常用的是SDS-电泳（SDS-PAGE）。

表6 常见的电泳方法

| 方法       | 机理    | 关键技术   | 优点      | 缺点    |
|----------|-------|--------|---------|-------|
| PAGE     | 电荷分离  | 蛋白质带电性 | 整分子分离   | 不知分子量 |
| SDS-PAGE | 质量分离  | 蛋白质解聚  | 单链分子分离  | 不是整分子 |
| IEF      | 等电点分离 | 两性点解质  | 等电点     | 不知分子量 |
| 2D-PAGE  | 电荷+质量 | 第一向分离  | 等电点+分子量 | 操作复杂  |
| CE       | 电荷或质量 | 防止热效应  | 综合分离    | 仪器昂贵  |

### 2.4 色谱法

用于生物酶纯度测定的色谱法主要是高效液相色谱法和分子排阻法。

## 3 生物酶的杂质

表 7 酶杂质相关的标准

| 类型   | 标准编号            | 标准名称               | 检测技术  |
|------|-----------------|--------------------|-------|
| 国家标准 | GB/T 34776-2017 | T4 DNA 接酶酶活及杂质检测方法 | 电泳法   |
| 国家标准 | GB/T 34800-2017 | 蛋白酶 K 酶活力及杂质检测方法   | 分光光度法 |
| 国家标准 | GB/T 41712-2022 | 脱氧核糖核酸酶I酶活及杂质检测方法  | 分光光度法 |

生物酶的杂质主要有工艺相关的杂质和产品相关的杂质（如降解产物等）。杂质是影响生物酶纯度的主要因素，如果生物酶中含有超过限量的杂质，就有可能影响生物酶的活性和稳定性；杂质增多也会影响生物酶的安全性。

生物酶中杂质的分析技术包括化学法、光谱法、色谱法等，须根据生物酶生产工艺及降解产物的特性采用不同的检测技术，对于生物酶中的已知杂质，应使用杂质对照品进行检测；如无法获得杂质对照品时，可用相对保留值进行定位；目前普遍采用的杂质检测方法主要为高效液相色谱法、气相色谱法和毛细管电泳法、质谱法等。

分子诊断用酶因其检测靶标为核酸分子，需要控制DNA内切酶、外切酶、非特异性核酸酶和/或RNase残留等杂质，通常采用酶与核酸底物孵育，琼脂糖凝胶电泳的方式检测，通过检测核酸底物的降解情况，判断核酸酶的残留情况。若为重组表达的生物酶还需要检测宿主细胞核酸(HCD)和宿主细胞蛋白（HCP）残留。宿主细胞核酸检测可采用DNA探针杂交法、荧光染色法或定量PCR法；宿主细胞蛋白可采用酶联免疫吸附法、质谱分析法、二维凝胶电泳法。

#### 4 批内、批间差异检测

批内差异检测是相同测量程序、相同操作者、相同测量系统、相同操作条件和相同地点，在短时间段内对一批内样品进行重复测量，至少进行10次重复测量。批间差异检测相同测量程序、相同操作者、相同测量系统、相同操作条件和相同地点，3个不同批号的生物酶制品，每个批号重复测量3次，计算均值，同时按以下公式计算相对极差，则为生物酶制品的批间差异。

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

#### 1 主要试验（或验证）

##### 1.1 生物酶活力检测

##### 1.1.1 紫外-可见分光光度法

##### 1.1.1.1 以胰蛋白酶为例，研究胰蛋白酶活性检测技术。

##### （1）试剂

表 8 主要试剂列表

| 序号 | 试剂名称             | 纯度   |
|----|------------------|------|
| 1  | N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 | ≥97% |
| 2  | 磷酸二氢钾            | 分析纯  |
| 3  | 磷酸氢二钠            | 分析纯  |
| 4  | 盐酸               | 分析纯  |

**(2) 溶液**

## ① 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.6)

磷酸二氢钾 9.12 g

RO 水定容至 1000 mL

磷酸氢二钠 9.51 g

RO 水定容至 1000 mL

取磷酸二氢钾溶液 130 mL 与磷酸氢二钠溶液 870 mL，混合均匀，调节 pH 至 7.6。

## ② 胰蛋白酶底物原液

N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 85.7mg

RO 水定容至 100 mL

## ③ 胰蛋白酶底物溶液

胰蛋白酶底物原液 10 mL

0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.6) 定容至 100mL

RO 水调零，使用磷酸盐缓冲液或底物原液调节溶液吸光度在 0.575~0.585 之间。吸光度小于 0.575 应逐滴添加底物原液以确保在吸光度范围内，吸光度大于 0.585 应逐步添加约 0.5 mL~1 mL 磷酸盐缓冲液以确保在吸光度范围内，配制好的底物工作液需现配现用，并在 2 h 内使用，超时需重新配制。

## ④ 供试品溶液

胰蛋白酶 10 mg

0.001 mol/L HCl 定容至 100 mL，再稀释成每 1 mL 中含 50~60 胰蛋白酶单位的工作酶溶液，现用现配。

**(3) 仪器**

表 9 主要测定仪器(分光光度计)和主要辅助仪器列表

| 名称         | 要求         |
|------------|------------|
| 电子天平       | 精度 0.00001 |
| 紫外-可见分光光度计 | ±0.1℃      |

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 恒温水浴  | ±0.5℃             |
| pH 计  | ±0.1              |
| 移液器   | 200uL、1000 uL、5mL |
| 点式温度计 | ±0.1℃             |

#### (4) 测定条件

表 10 胰蛋白酶活性测定条件

| 参数      | 指标                |
|---------|-------------------|
| 温度      | 25℃ ± 0.1℃        |
| 波长      | 253 nm ± 1nm      |
| 光径      | 10.00 mm ± 0.1 mm |
| 测定时间    | ≥ 180 s           |
| 读数(测定点) | ≥ 6               |

#### (5) 测定步骤

①监测比色杯内温度，达到要求时开始准备试剂和分析溶液。

②将底物工作液和酶溶液在25℃ ± 0.5℃平衡。

③取光程为1 cm的带盖石英比色皿，用5 mL移液器加入底物溶液（恒温于25.0℃ ± 0.5℃）3.0 mL放入分光光度计比色池，用点式温度计测量比色皿内温度，待温度恒定至25.0℃ ± 0.1℃时，用200 μL移液器加入0.001 mol/L盐酸溶液200 μL，搅拌混匀，作为空白、调零。

④另用5 mL移液器加底物溶液（恒温于25.0℃ ± 0.5℃）3.0 mL于比色皿，放入分光光度计比色池，用点式温度计测量比色皿内温度，待温度恒定至25.0℃ ± 0.1℃时，用200 μL移液器量取工作酶液（恒温于25.0℃ ± 0.5℃）200 μL，搅拌混匀，在253 nm的波长处，立即计时，每隔30 s读取吸光度，共5 min。记录每个时间点下的吸光度值，每30 s吸光度的改变均值应在0.017~0.018之间，取不少于3 min（T ≥ 3）的吸光度值按以下公式进行计算。

$$P = \frac{A_1 - A_2}{0.003TW}$$

式中：P 为每 1mg 供试品中含胰蛋白酶的活性，单位；

A1 为直线上终止的吸光度；

A2 为直线上开始的吸光度；

T 为 A1 至 A2 读数的时间，分钟；

W 为测定液中含供试品的量，mg；

0.003 为在上述条件下，吸光度每分钟改变 0.003，即相当于 1 个胰蛋白酶单位 U。

#### (3) 方法研究

对胰蛋白酶活性测定方法线性范围、准确度、精密度、专属性、耐用性等关键参数进行了研究，结果表明此方法可作为胰蛋白酶活性测定方法的标准方法。

①方法线性

本研究胰蛋白酶活性测定方法中胰蛋白酶工作浓度为50 U/mL-60 U/mL，因此将标准曲线的线性范围设置为25 U/mL~250 U/mL进行考察。取胰蛋白酶溶液，用0.001 mol/L HCl依次稀释至25 U/mL、55 U/mL、100 U/mL、150 U/mL、200 U/mL、250 U/mL，按照上述测定方法重复测定活性3次，绘制不同酶浓度与吸光度变化平均值的关系图并计算线性回归方程及相关系数。

胰蛋白酶6个浓度梯度下的吸光度变化平均值（Δ平均值）与酶浓度的关系如图1所示，吸光度变化值及活性数据如表5所示，不同酶浓度与吸光度变化平均值的线性回归方程为 $y = 0.0003x - 0.0008$ ， $r = 0.9948$ ，结果显示建立方法的线性良好；根据各浓度下测出的活性可知，本方法在25 U/mL~250 U/mL范围内测出的活性相对标准偏差为3.44 %，表明在此范围测出的活性较为准确。

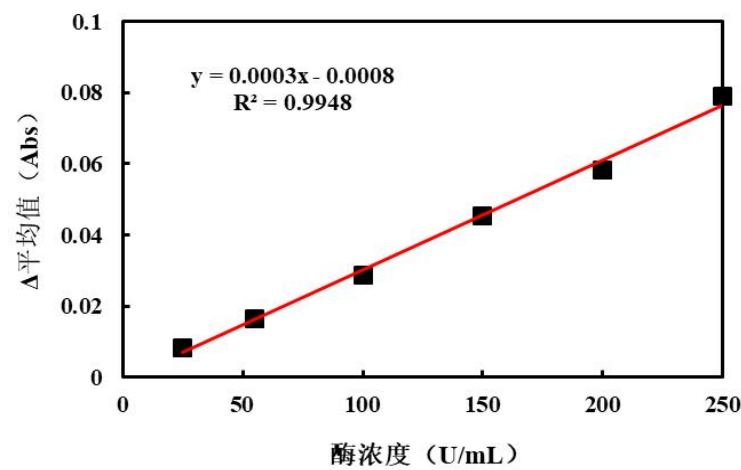


图 1 不同酶浓度与吸光度变化平均值的线性图

表 11 不同酶浓度下测得的吸光度变化值及活性

| 浓度 (U/mL) | 吸光度变化值 | 吸光度变化<br>平均值 | 活 性<br>(U/mL) | 平 均 活 性<br>(U/mL) |
|-----------|--------|--------------|---------------|-------------------|
| 25        | 0.0074 | 0.0082       | 24.7          | 27.8              |
|           | 0.0085 |              | 28.3          |                   |
|           | 0.0079 |              | 30.5          |                   |
| 55        | 0.0173 | 0.0165       | 55.0          | 54.5              |
|           | 0.0158 |              | 53.8          |                   |
|           | 0.0157 |              | 54.8          |                   |
| 100       | 0.0212 | 0.0287       | 95.2          | 95.7              |
|           | 0.0213 |              | 95.2          |                   |
|           | 0.0214 |              | 96.7          |                   |

|     |        |        |       |       |
|-----|--------|--------|-------|-------|
| 150 | 0.0448 | 0.0452 | 149.2 | 150.7 |
|     | 0.0450 |        | 150.0 |       |
|     | 0.0458 |        | 152.5 |       |
|     | 0.0597 |        | 198.9 |       |
| 200 | 0.0577 | 0.058  | 192.2 | 193.7 |
|     | 0.0570 |        | 190.0 |       |
|     | 0.0775 |        | 258.3 |       |
|     | 0.0805 |        | 268.3 |       |
| 250 | 0.0790 | 0.079  | 263.3 |       |

## ②方法准确度

将55 U/mL视为100%浓度，考察高（1.2:1）、中（1:1）、低（0.8:1）浓度的准确度。用0.001 mol/L HCl将胰蛋白酶稀释至66 U/mL、55 U/mL、44 U/ mL 3个浓度梯度，依次测定活性，重复3次后按一下公式计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{测定活性}}{\text{Trypsin BRP 活性}} \times 100\%$$

高（1.2:1）、中（1:1）、低（0.8:1）胰蛋白酶浓度下的试验数据如表6所示，结果显示平均回收率为99.94%，满足《中国药典》2020版中三部通则9101分析方法验证指导原则及 AOAC 《Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals》中要求的“98%-101%”，表明此方法准确度较好。

表 12 准确度试验结果

| 浓度(U/mL) | 活性 (U/mL) | 平均活性 (U/mL) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) |
|----------|-----------|-------------|---------|-----------|
| 66       | 65.7      | 66.0        | 100.00  |           |
|          | 66.7      |             |         |           |
|          | 65.7      |             |         |           |
| 55       | 55.0      | 54.5        | 99.15   | 99.94     |
|          | 53.8      |             |         |           |
|          | 54.8      |             |         |           |
|          | 43.8      |             |         |           |
| 44       | 43.0      | 44.3        | 100.68  |           |
|          | 46.2      |             |         |           |

## ③方法重复性

依法测定胰蛋白酶活性，重复测定6次，计算6次测定值的相对标准偏差。

6次重复性试验结果如表7所示，结果显示重复性试验的相对标准偏差为1.76%，表明此方法重复性良好。

表 13 重复性试验结果

| 重复次数 | 活性 (U/mg) | 平均活性 (U/mg) | RSD (%) |
|------|-----------|-------------|---------|
|------|-----------|-------------|---------|

|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 1 | 3086 |      |      |
| 2 | 3020 |      |      |
| 3 | 3073 |      |      |
| 4 | 2993 | 3017 | 1.76 |
| 5 | 2956 |      |      |
| 6 | 2974 |      |      |

#### ④方法再现性

换一个操作人员，换一台设备采用相同方法测定胰蛋白酶活性6次，计算6次测定值的相对标准偏差。

6次再现性试验结果如表8所示，结果显示再现试验的相对标准偏差为1.76%，表明此方法再现性良好。

表 14 再现性试验结果

| 重复次数 | 活性 (U/mg) | 平均活性 (U/mg) | RSD (%) |
|------|-----------|-------------|---------|
| 1    | 3254      |             |         |
| 2    | 3098      |             |         |
| 3    | 3225      |             |         |
| 4    | 3168      | 3207        | 1.86    |
| 5    | 3215      |             |         |
| 6    | 3279      |             |         |

#### ⑤方法专属性和抗干扰性

糜蛋白酶是与胰蛋白酶作用、用途相似的酶，能迅速分解蛋白质，而且是胰蛋白酶提取过程中容易残留的杂质，因此将建立的胰蛋白酶活性测定方法中的胰蛋白酶换成糜蛋白酶，考察该方法的专属性，试验表明，糜蛋白酶不能与底物溶液反应。

考察该法中稀释液的干扰，取0.001 mol/L盐酸溶液200  $\mu$ L，加底物溶液（恒温于25.0  $^{\circ}$ C  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C）3.0 mL，立即计时，在253 nm的波长处，每隔30s读取吸光度，共5 min，将吸光度值代入公式，计算活性。

经试验测定，5 min内吸光度值没有发生变化，说明0.001 mol/L盐酸溶液并不能与底物溶液反应，因此稀释液对胰蛋白酶活性测定无影响。

#### ⑥方法耐用性

胰蛋白酶溶液在不同厂家的设备上测定活性，重复测定3次，计算相对标准偏差。不同设备测定的活性数据如表9所示，相对标准偏差为4.13%，表明该方法的耐用性良好，不同厂家的仪器均适用。

表 15 不同设备试验结果

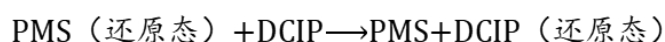
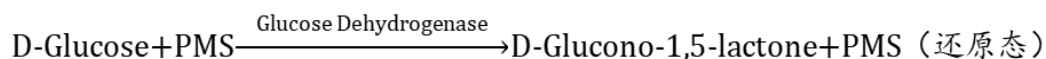
| 设备名称   | 活性 (U/mg) | 平均活性 (U/mg) | RSD (%) |
|--------|-----------|-------------|---------|
| 谱析-单光束 | 3201      | 3171        | 4.13    |

|        |      |      |
|--------|------|------|
|        | 3147 |      |
|        | 3165 |      |
|        | 3329 |      |
| 谱析-双光束 | 3456 | 3420 |
|        | 3476 |      |
|        | 3133 |      |
| 岛津-双光束 | 3038 | 3112 |
|        | 3165 |      |

### 1.1.1.2 以葡萄糖脱氢酶为例，研究葡萄糖脱氢酶为的酶活性检测技术

#### (1) 实验原理

葡萄糖脱氢酶（GDH）以D-葡萄糖（D-Glucose）为底物，将D-葡萄糖氧化，同时还原吩嗪硫酸甲酯（Phenazine methosulfate, PMS），还原态的PMS和蓝色氧化态的2,6-二氯靛酚钠（Sodium 2,6-dichloroindophenolate hydrate, DCIP）进一步氧化还原反应后生成无色还原态的DCIP，此过程中DCIP的颜色由蓝色转为无色，氧化态DCIP可以在600 nm的波长处进行检测，从而来获得GDH的活性。



#### (2) 试剂和材料

①试剂 I：50 mM PIPES-NaOH 缓冲液 pH 6.50

称取 1.510 g PIPES 粉末，溶于 60 mL 水中，添加 1.0 mL 10% Triton X-100，并用 5mol/L NaOH 调节 pH 至 6.50±0.05@25 °C，定容至 100 mL。

②试剂 II：1 M 葡萄糖溶液

称取 18.016 g D-葡萄糖（D-Glucose），溶于 80 mL 水中，定容至 100 mL。

③试剂 III：24 mM PMS

称取 73.5 mg 吩嗪硫酸甲酯（PMS），溶于 8 mL 水中，定容至 10 mL。（注意避光，建议配制完成后 6 小时内使用完毕）

④试剂 IV：2 mM DCIP

称取 6.5 mg 2,6-二氯靛酚钠盐（DCIP），溶于 8 mL 水中，定容至 10 mL。（注意避光，建议配制完成后 6 小时内使用完毕）

⑤酶稀释液：0.1 M 磷酸钾缓冲液 pH 6.00，含 0.1% BSA

称取 2.405 g 磷酸氢二钾 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 11.730 g 磷酸二氢钾（K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>），溶于 800 mL 水中，再加入 1.000 g BSA，定容至 1 L。

## ⑥供试品

称取适量葡萄糖脱氢酶，使用酶稀释液溶解并配制成每毫升含 1 mg 蛋白的溶液。

### (3) 仪器设备

酶标仪、恒温培养箱、pH 计（精确度 0.01）、电子分析天平（感量：0.0001 g）。

### (4) 实验步骤

#### ① 样品稀释

##### a) 待测样品

将 1 mg/mL 的供试品用冰预冷的酶稀释液在冰上进一步稀释约 4000-8000 倍（稀释至 0.05-0.20 U/mL），作为待测样品。

##### b) 空白对照

酶稀释液，与待测样品加入相同体积进行测定作为空白对照。

#### ② 反应缓冲液配制

配制反应缓冲液（注意避光，冰上配制，现配现用）：

试剂I：1025 μL

试剂II：295 μL

试剂 III：100 μL

试剂 IV：50 μL

#### ③ 检测

a)取 300 μL 反应缓冲液加入到 96 孔透明酶标板的一个孔中，37 °C温浴 5 min；

b) 反应孔中再加入 10 μL 待测酶液，迅速混合均匀，37 °C温浴，测定 600 nm 处吸光值，计算 1 min 内吸光值的变化率 $\Delta A_s$ ；

c) 以空白对照代替待测样品，其余步骤相同，在 600 nm 处测定 37 °C下的吸光值，计算 1 min 内吸光值变化 $\Delta A_b$ 。

#### ④ 结果计算

供试品中葡萄糖脱氢酶活性按照公式（1）计算：

$$S = \frac{\Delta A \times 0.31 \times df}{16.8 \times 0.01 \times l} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

S —葡萄糖脱氢酶活性，单位为酶活性单位每毫升（U/mL）；

$\Delta A$  —酶促反应进行每分钟的吸光值变化， $\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$ ；

0.31 —反应试剂的总体积，单位为毫升（mL）；

df —稀释倍数；

16.8 —2,6-二氯酚钠盐在 600 nm 处的微摩尔消光系数，单位为平方厘米每微摩尔（ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ）；

0.01 —参与反应酶液的体系，单位为毫升（mL）；

I—光程长度，通常为 1 cm。

计算结果保留两位有效数字。

### （5）验证结果

表16 验证结果

| 项目   | 可接受标准                                | 验证结果                             | 结论 |
|------|--------------------------------------|----------------------------------|----|
| 线性范围 | 在 0.05-0.20 U/mL 范围内，测得活性 RSD 在 10%内 | 在 0.05-0.20 U/mL 范围内，测得活性 RSD=9% | 合格 |
| 准确性  | 实际测量值与标称值差异在 10%内                    | 实际测量值与标称值差异在 10%内                | 合格 |
| 精密度  | 重复性 $\text{RSD} \leq 10\%$           | 重复性 RSD 在 10%内                   | 合格 |

#### ① 线性范围

在0.05-0.20 U/mL范围内，测得葡萄糖脱氢酶的活性RSD在10%内，符合要求。

表17 线性范围验证结果

| 样品名称   | 稀释酶活梯度    | 测得酶活性<br>(U/mL) | 平均酶活性<br>(U/mL) | RSD (%) |
|--------|-----------|-----------------|-----------------|---------|
| 葡萄糖脱氢酶 | 0.20 U/mL | 14567.17        | 14782.48        | 2       |
|        | 0.10 U/mL | 14604.10        |                 |         |
|        | 0.05 U/mL | 15176.16        |                 |         |

#### ② 准确度

收集了市场上不同厂家的葡萄糖脱氢酶，按照本方法对其酶活性进行了测定，所得结果如下表所示。结果表明，所有的葡萄糖脱氢酶均能测出活性，表明该方法具有较强的适用性。因为不同厂家检测条件不尽相同，各厂家生产的葡萄糖脱氢酶的酶学特性存在差异，因此标称活性与本检测结果也会存在差异。这也进一步说明建立统一的葡萄糖脱氢酶活性测定方法具有重要意义。

表18 准确度验证结果

| 样品名称     | 厂家 | 标称酶活性 (U/mL) | 测得酶活性 (U/mL) | 测得酶活性/标称酶活性 (%) |
|----------|----|--------------|--------------|-----------------|
| 葡萄糖脱氢酶 A | v  | 20000        | 21994.59     | 110             |
| 葡萄糖脱氢酶 B | h  | 5000         | 4510.92      | 90              |
| 葡萄糖脱氢酶 C | x  | 20274        | 14506.61     | 72              |
| 葡萄糖脱氢酶 D | d  | 10000        | 10735.06     | 107             |

### ③精密度

取同一样品，相同条件下连续测定3次，结果如下表所示，RSD≤10%，重复性满足要求。

表19 精密度（重复性）验证结果

| 样品名称     | 酶活性 1 (U/mL) | 酶活性 2 (U/mL) | 酶活性 3 (U/mL) | 平均酶活性 (U/mL) | RSD (%) |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| 葡萄糖脱氢酶 A | 20104.83     | 21938.47     | 23940.46     | 21994.59     | 9       |
| 葡萄糖脱氢酶 B | 4390.77      | 4760.36      | 4381.63      | 4510.92      | 5       |
| 葡萄糖脱氢酶 C | 14371.60     | 14835.57     | 14312.66     | 14506.61     | 2       |
| 葡萄糖脱氢酶 D | 10442.66     | 11101.74     | 10660.77     | 10735.06     | 3       |

### ④总结

葡萄糖脱氢酶性能验证结果显示，本方法可以在0.05-0.20 U/mL范围内准确测定葡萄糖脱氢酶的活性，检测样品的准确度和精密度好，RSD≤10%。

#### 1.1.2 荧光分光光度法

##### 1.1.2.1 测定原理

CUNG，尿嘧啶-DNA 糖基化酶。可催化水解含有dU的DNA双链的尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架的N-糖苷键，释放游离尿嘧啶。制备一段已知序列的UDNA为底物，将10×Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup>)、待测定的 CUNG，加入同一个PCR管中，组成PCR反应体系，25℃反应30min，50℃10min。CUNG会水解UDNA，酶量越高UDNA含量越低。Picogreen是一种双链DNA荧光染料，当Picogreen与DNA结合，在激发波长约485nm，发射波长约538nm处可检测到荧光，且荧光值与DNA量在一定范围内成正比。此法通过拟合荧光值与CUNG酶量的S曲线方程，计算待测 CUNG的酶活。

##### 1.1.2.2 实验过程

###### (1) 仪器设备

移液器、掌上离心机、微孔板离心机、涡旋混匀仪、PCR仪、荧光分析仪

## (2) 试剂

① UDNA-F : TCTTCGTTTCATCTATCGGATCGCCACACTC

② UDNA-R : GATGACGCATCCTCACGATAATATCCGG

③ dUTP mix: 包括 dATP, dGTP, dCTP, dUTP 各 10 mM

④ PicoGreen 染料

## (3) 试剂溶液配制

① 1×TE 溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (25°C)

② 10×Taq 缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.8 (25°C)

③ PicoGreen 染色液: 按 100μL 1×TE+0.5μL picogreen 体系配制工作液

④ UDG 酶稀释缓冲液: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween®

20

⑤ UDNA 制备

表20 反应体系

| 试剂                  | 体积 (μl) |
|---------------------|---------|
| DDW                 | to 50   |
| 10×Taq 缓冲液          | 5       |
| dUTP mix            | 1       |
| UDNA-F (10μM)       | 2       |
| UDNA-R (10μM)       | 2       |
| Lamda DNA(1ng/μl)   | 1       |
| Taq DNA 聚合酶 (5U/μl) | 2.5     |

## 反应程序

94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 35cycles; 72°C 7 min

## UDNA 纯化和检测

用 DNA Clean Beads 磁珠 (Vazyme)对 PCR产物进行纯化,纯化后的产物用Qubit测定浓度,分装后于-20°C保存。

⑥ UDG 酶溶液梯度稀释

根据标称的酶活,使用UDG酶稀释缓冲液对UDG酶进行适当稀释,如50 U/μl的酶溶液,按照最大稀释倍数10倍,最小移液体积5 μl的原则进行稀释,稀释得到0-100 mU/μl的12 个2倍稀释浓度梯度的酶液。

## (4) 实验步骤

① 反应体系的配制和分装

- a) 在EP管中按照下表的比例配制反应体系，配制完成后在涡旋混匀仪上混匀10s掌上离心机上离心 10s:

表21 反应体系

| 组分                  | 体积 $\mu\text{l}$   |
|---------------------|--------------------|
| DDW                 | 至 15 $\mu\text{l}$ |
| 10 $\times$ Taq 缓冲液 | 2                  |
| UDNA                | 150 ng             |

- b) 将 a) 的反应液分装到 96 孔板中，分别加入 5 $\mu\text{l}$  各浓度梯度的 UDG 酶，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀 10s，掌上离心机上离心10s:

③ 运行程序

25°C 30 min

③ Picogreen 荧光检测

向反应产物中加入 100 $\mu\text{l}$  PicoGreen 染色液;用荧光酶标仪检测,激发波长为 480 nm,发射波长为 520 nm。

(5) 数据分析

以聚合酶活性单位(mU)的 log值为横坐标，荧光强度为纵坐标，用 GraphPad Prism5 做非线性回归曲线。计算曲线的半最大效应浓度(EC50)，待测品的活性= 标准品的 EC50/待测样品的 EC50 $\times$ 标称活性

1.1.2.3 验证结果

表22 验证结果

| 项目   | 可接受标准  | 验证结果   | 结论 |
|------|--|--|----|
| 精密度  | 重复性: 测定 3 次的的数据 $CV \leq 10.0\%$ 中间精密度: 三个分析人员           | 重复性: 一个人测定 3 次的的数据 $CV$ 为4.39%。<br>中间精密度: 三个分析人员 | 合格 |
| 线性范围 | 1.线性验证: 曲线上下平台至少2个点, 指数增长长期至少 3个点。<br>2. $R^2 \geq 0.99$ | 1.S曲线的上平台和下平台有3个点, 指数增长长期有3个点<br>2. $R^2 > 0.99$ | 合格 |

1、线性范围

在0.017-100 mU/ $\mu\text{L}$ 范围内，测定酶浓度与双链DNA荧光值的关系，拟合非线性回归曲线， $R^2 > 0.99$ 。

见下表

表23 线性范围验证结果

| 荧光值             |        |        |        |
|-----------------|--------|--------|--------|
| 酶浓度 mU/ $\mu$ L | 实验1    | 实验2    | 实验3    |
| 100             | 56     | 63     | 55     |
| 45.45454545     | 59     | 71     | 61     |
| 20.66115702     | 75     | 91     | 78     |
| 9.391435011     | 123    | 151    | 133    |
| 4.268834096     | 268    | 298    | 256    |
| 1.940379135     | 441    | 501    | 444    |
| 0.881990516     | 654    | 759    | 661    |
| 0.40090478      | 829    | 973    | 864    |
| 0.182229445     | 1030   | 1108   | 988    |
| 0.082831566     | 1076   | 1155   | 1068   |
| 0.037650712     | 1117   | 1205   | 1086   |
| 0.01711396      | 1132   | 1229   | 1090   |
| 上平台点数           | 3      | 3      | 3      |
| 下平台点数           | 3      | 3      | 3      |
| 指数增长期           | 6      | 6      | 6      |
| ES50            | 1.122  | 1.287  | 1.211  |
| R <sup>2</sup>  | 0.9982 | 0.9986 | 0.9994 |

## 2、重复性

取同一样品，相同条件下连续测定 3 次，结果下表所示，CV $\leq$ 10%，重复性满足要求。

表24 重复性验证结果

| 样品名称 | 酶活 (U/L) |        |        |        | SD   | CV%  |
|------|----------|--------|--------|--------|------|------|
|      | 实验1      | 实验 2   | 实验 3   | 平均值    |      |      |
| CUNG | 140.9    | 132.36 | 129.58 | 134.28 | 5.90 | 4.39 |

## 3、中间精密度 不同实验员，测定同一样品，RSD $\leq$ 10%，中间精密度满足要求。

表25 中间精密度验证结果

| 样品名称 | 酶活 (U/L) |      |      |     | CV% |
|------|----------|------|------|-----|-----|
|      | 实验1      | 实验 2 | 实验 3 | 平均值 |     |

|      |       |        |        |        |      |
|------|-------|--------|--------|--------|------|
| CUNG | 140.9 | 129.58 | 129.95 | 133.48 | 4.82 |
|------|-------|--------|--------|--------|------|

#### 4、总结

CUNG酶活力检测方法验证结果显示，本方法检测样品的准确度和精密度好，  
CV≤10%。

### 1.2 生物酶纯度检测

#### 1.2.1 高效液相色谱法

##### 以胰蛋白酶为例，进行HPLC纯度分析

色谱条件：十八烷基硅烷键合多孔硅胶填充色谱柱（ODS柱），柱直径4.6 mm，长25 cm；粒度3 μm，孔径20 nm，柱温：40 °C。以1 mL磷酸（85%）用水定容到1000 mL为流动相A液，以1 mL磷酸（85%）用乙腈定容到1000 mL为流动相B液，梯度洗脱（如表4-2所示），流速为1.0 mL/min，检测波长为280 nm。

具体方法：（1）供试品胰蛋白酶溶液的制备：取14 mg胰蛋白酶，用0.01 mol/L盐酸溶液、0.02 mol/L氯化钙溶液（pH值2.0±0.2）配制成70 mg/mL±10 mg/mL，转移至HPLC进样瓶中；（2）标准品的制备：取70 mg/mL±10 mg/mL胰蛋白酶标准品溶液100 μL，混匀，转移至HPLC进样瓶中；（3）测定：取标准品溶液和供试品溶液各1 μL，分别注入高效液相色谱仪，记录色谱图。面积归一化法计算胰蛋白酶纯度，积分时间为25 min，扣除空白对照。α-胰蛋白酶如有前肩峰采用垂直积分，β-胰蛋白酶如有拖尾峰采用切线积分。

表 26 梯度表

| 时间（min） | 流动相 A（%） | 流动相 B（%） |
|---------|----------|----------|
| 0       | 75       | 25       |
| 25      | 55       | 45       |
| 30      | 10       | 90       |
| 34      | 10       | 90       |
| 35      | 75       | 25       |
| 45      | 75       | 25       |

按照面积归一化法计算重组胰蛋白酶纯度，结果如图1、图2、图3所示，结果显示空白溶液未出峰，标准品溶液中β-胰蛋白酶峰面积为93.5，分离度为2.20，α-胰蛋白酶峰面积为6.4%，分离度为7.38；胰蛋白酶样品溶液中β-胰蛋白酶峰面积为91.0%，分离度为1.37，α-胰蛋白酶峰面积为8.9%，分离度为6.26。检测结果均符合药典规定的“β-胰蛋白酶不低于70%，α-胰蛋白酶不高于20%，主峰的保留时间为12~17分钟，α-胰蛋白酶和β-胰蛋白酶的分离度应不小于1”。

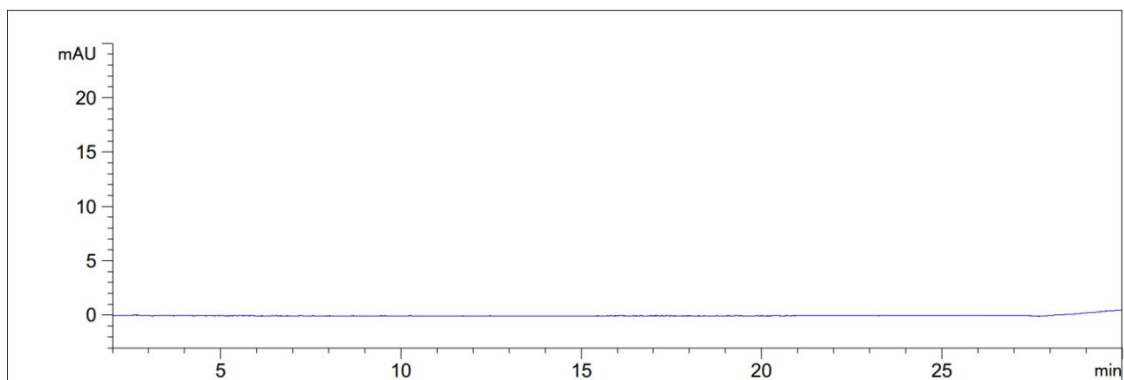


图 1 空白溶液 HPLC 检测图谱

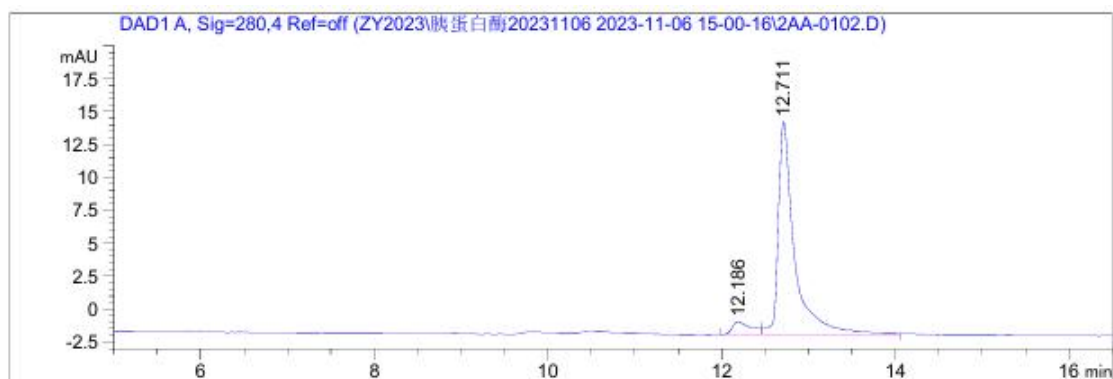


图 2 标准品溶液 HPLC 检测图谱

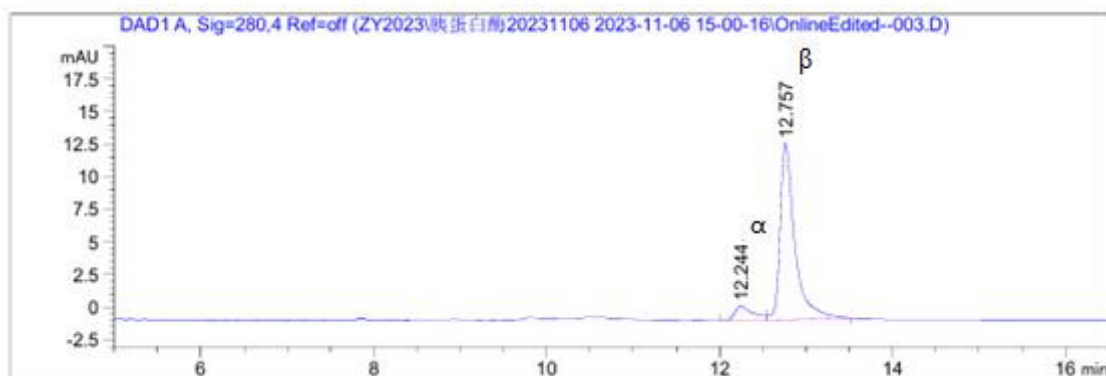


图 3 重组胰蛋白酶 E 的 HPLC 检测图谱

## 酶 HPLC 纯度分析

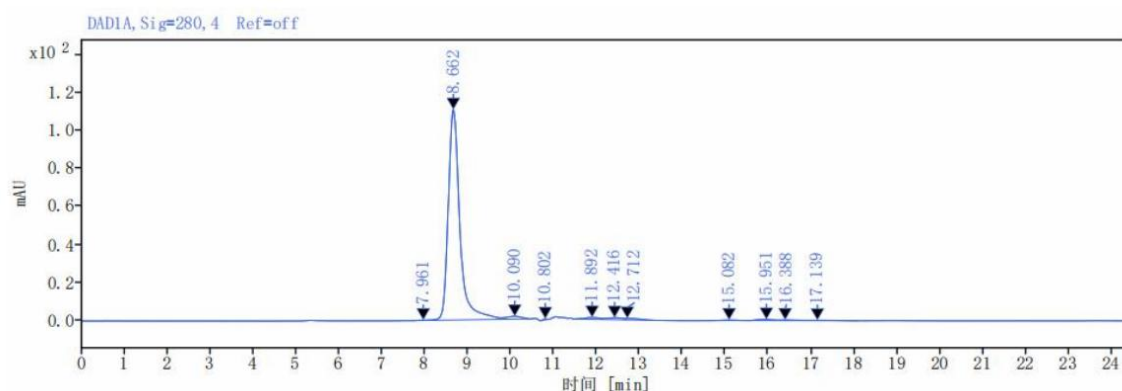


图 4 酶的 HPLC 检测图谱

可得酶的HPLC 纯度 $\geq 93\%$

### 1.2.2 SDS-PAGE电泳法

#### 1.2.2.1 SDS-PAGE电泳法测尿激酶纯度

称取样品10 mg，加入纯水溶解，稀释制成2 mg/mL的溶液，加入等体积的缓冲液[取浓缩胶缓冲液（F液）2.5mL、20%十二烷基硫酸钠溶液2.5mL、0.1%溴酚蓝溶液1.0 mL与87%甘油溶液3.5 mL，加水至10 mL]，置水浴中3分钟，放冷，作为测试溶液，取10 uL，加至样品孔，照电泳法（通则0541第五法 考马斯亮蓝染色法）测定，按下式计算高分子量尿激酶相对含量（%）。

$$\text{高分子量尿激酶相对含量(\%)} = \frac{\text{高分子量尿激酶的峰面积}}{\text{高、低分子量尿激酶的峰面积之和}} \times 100\%$$

PAGE 结果见图 5 所示，采用 BIO-RAD GS-900 型光密度仪进行扫描，结果如下图 6 所示。计算结果得高分子量尿激酶含量为 93.3%。

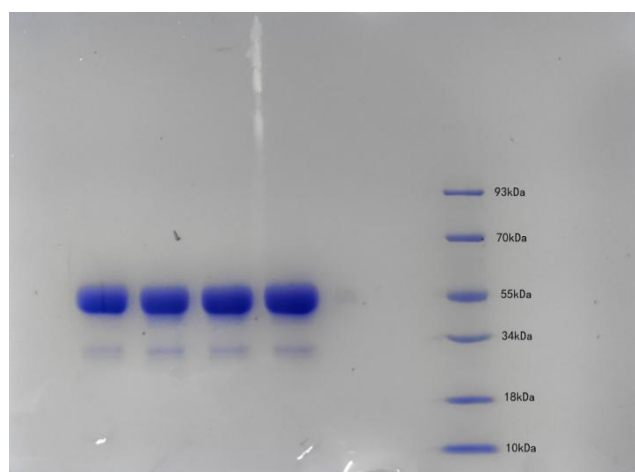


图 5 尿激酶原料SDS-PAGE图

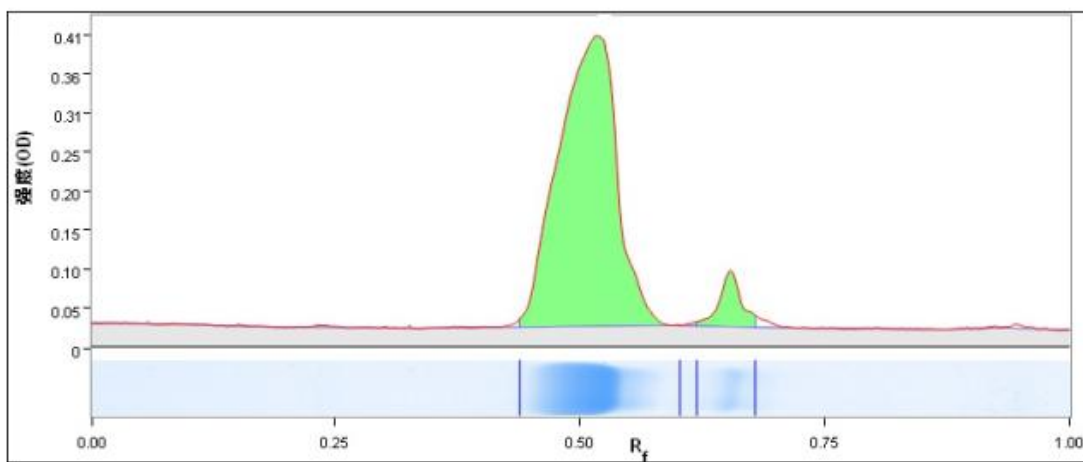


图 6 尿激酶分子量组分比扫描图

#### 1.2.2.2 SDS-PAGE电泳法测生物酶纯度

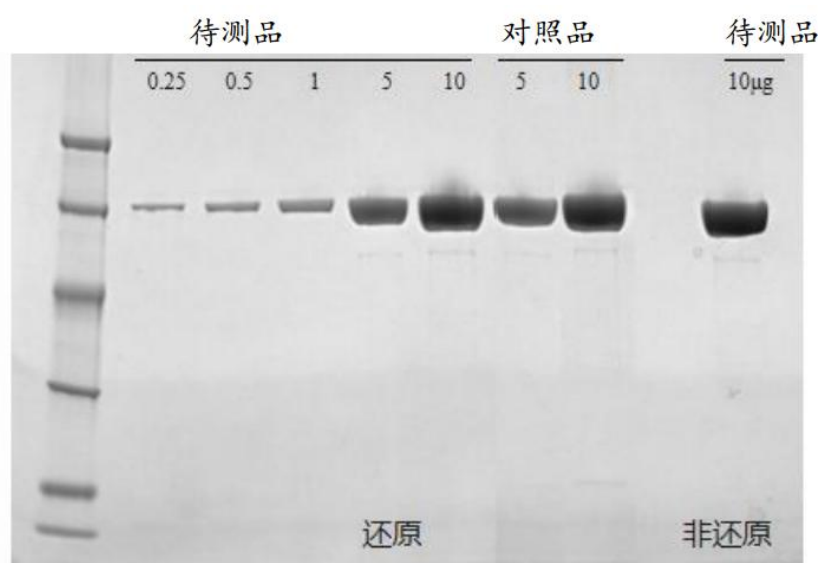


图7 A酶SDS-PAGE图

在 10 $\mu$ g 处杂带量约为 0.1  $\mu$ g, A酶纯度 $\geq$  95 %

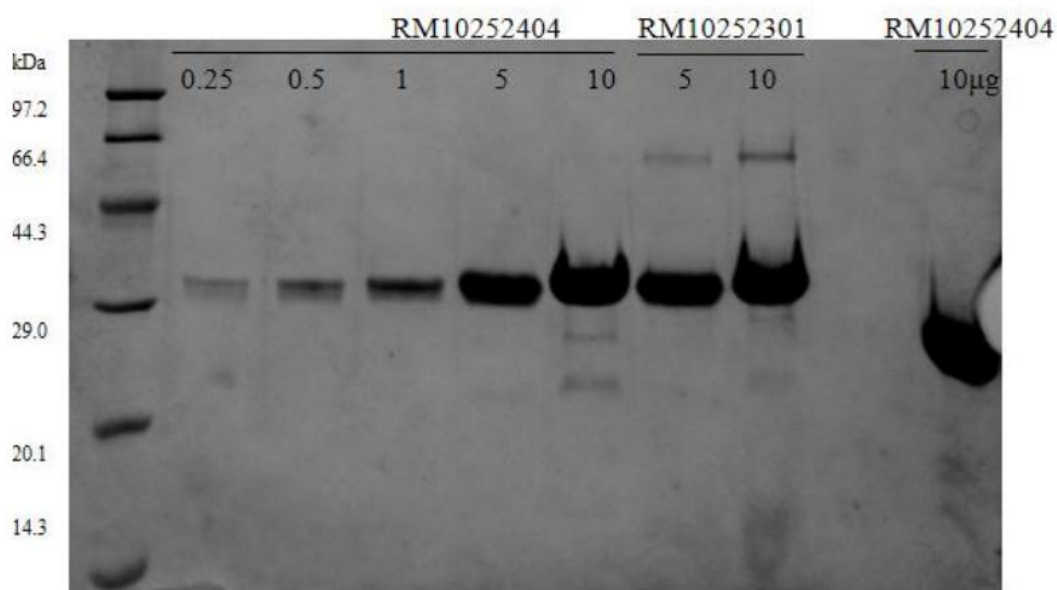


图8 B酶SDS-PAGE图

在 10 $\mu$ g 处杂带量约为 0.4  $\mu$ g, B酶纯度 $\geq$  95 %。

### 1.2.3 分子排阻法

以尿激酶为列，采用分子排阻法测定尿激酶的纯度：

采用Bio Core SEC300色谱柱（7.8 mm $\times$ 300 mm），以20 mM/L磷酸盐缓冲液（取1.562 g磷酸氢二钠、1.080 g磷酸二氢钠、8.775 g氯化钠，加入900 mL水溶解调节pH至6.9）为流动相，流速0.7 mL/min，检测波长280 nm，样品浓度1 mg/mL，进样量50  $\mu$ L。

色谱图见下图所示。高、低分子量面积分别为93%、7%。

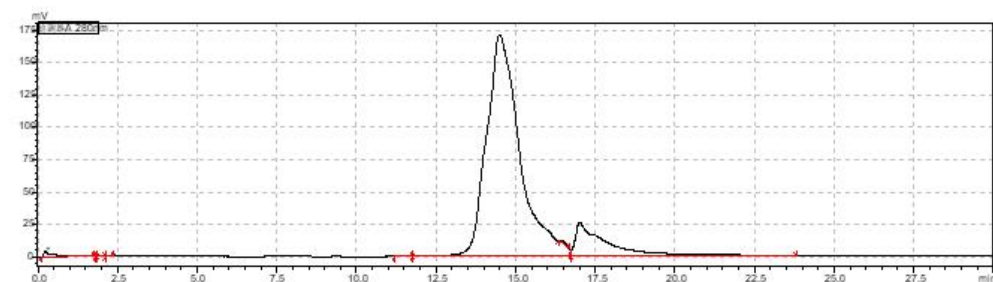
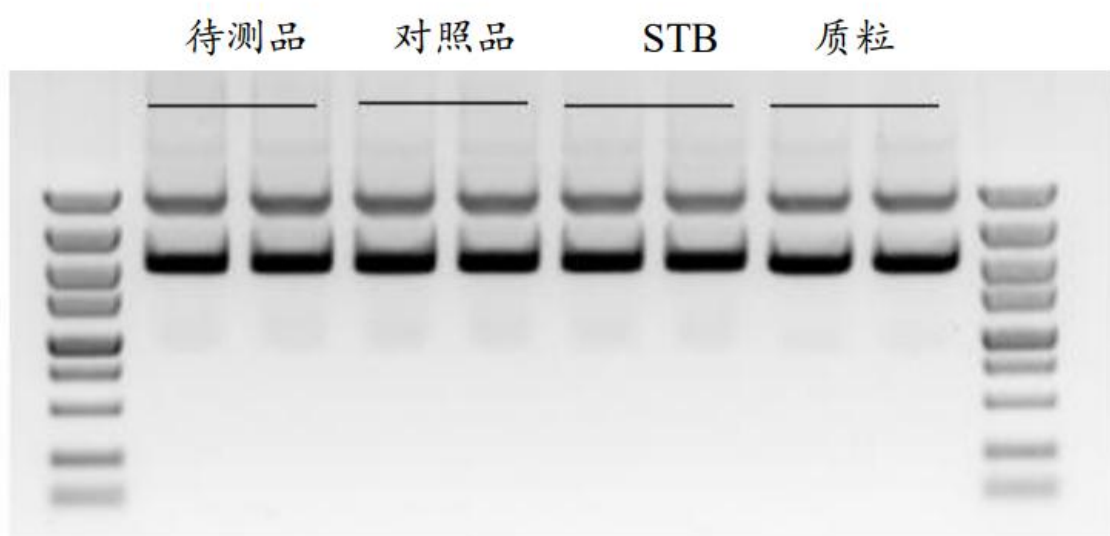


图 9 尿激酶原料体积排阻色谱图

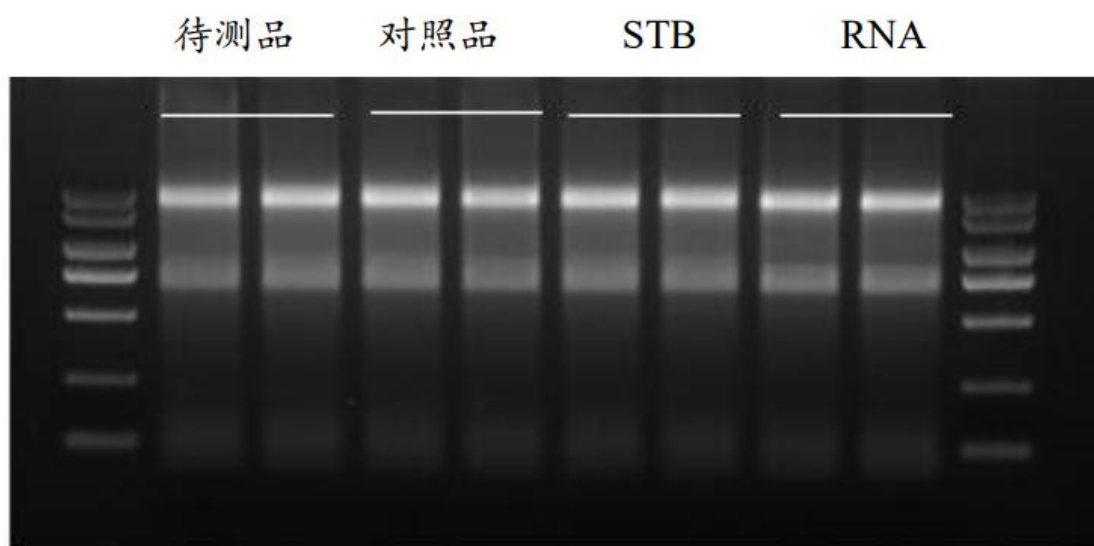
## 1.3 生物酶杂质检测

### 1.3.1 杂质（内切酶）残留检测：



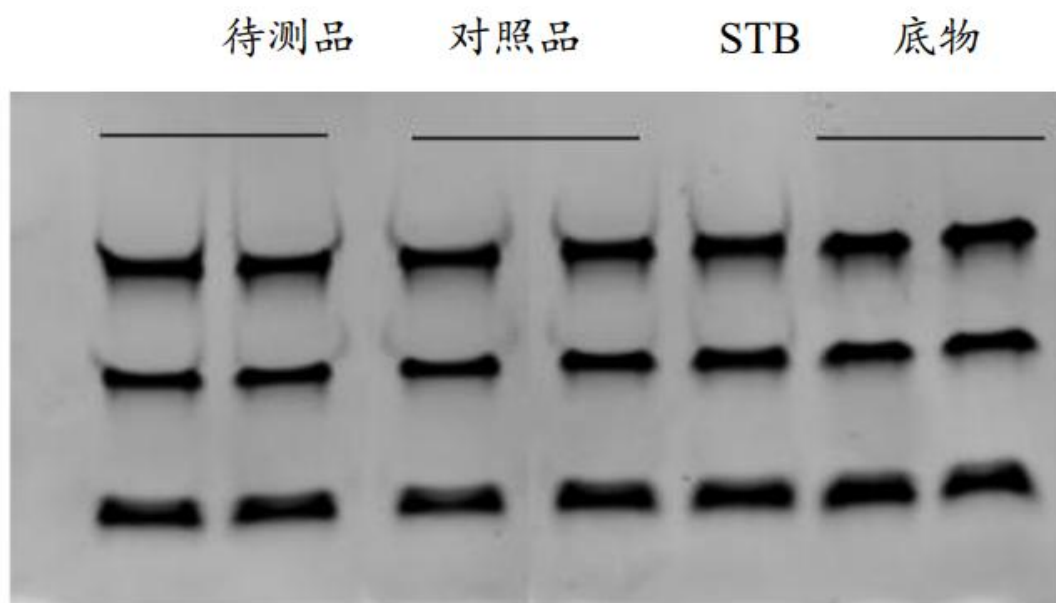
在 80U 未检测出有内切酶残留，合格

### 1.3.2 杂质（RNase 残留）检测：



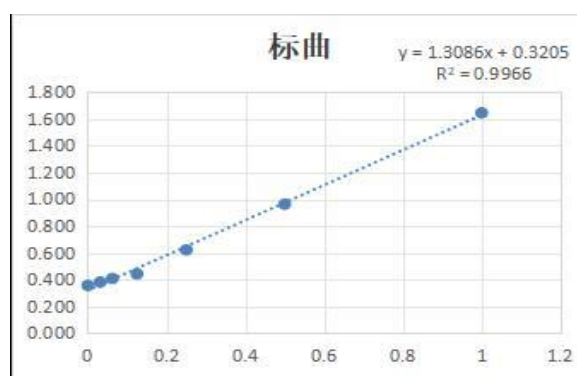
80U 未检测出有 RNase 残留，合格

### 1.3.3 杂质（外切酶）残留检测：



### 1.3.4 内毒素残留检验

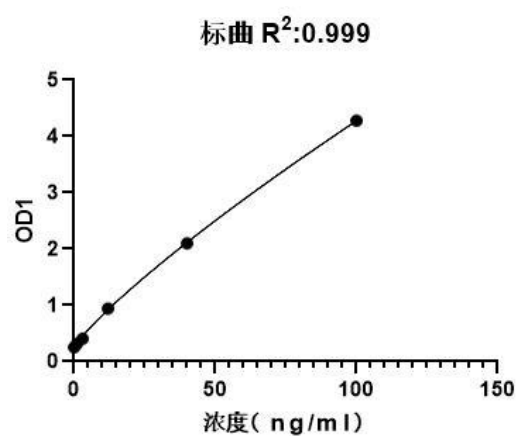
(1) 标准曲线:



(2) 样品检测结果: 内毒素含量 (EU/KU): 3.612

### 1.3.5 宿主蛋白残留检验

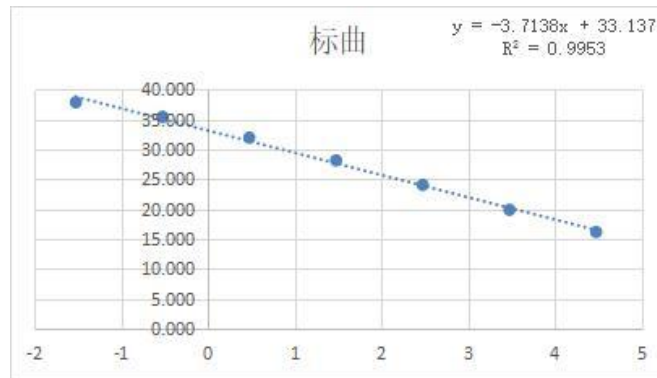
(1) 标准曲线:



(2) 样品检测结果: 待测样品宿主蛋白残留量 (%): 0.0038

### 1.3.6 宿主核酸残留检验

#### (1) 标准曲线:



(2) 检测结果: 核酸残留约 0.022pg/μg 蛋白, 约 0.001ng/KU 蛋白

## 2、经济与社会效益

国内外都无生物酶检测技术通则, 建立生物酶检测技术通则, 可以降低行业成本, 提升效率, 推动产业升级与市场扩张, 提升产品质量与国际竞争力。推动生物经济高质量发展的基础设施。其经济价值体现在降本增效、产业升级和全球竞争赋能, 而社会价值则覆盖健康保障、环保治理与国际合作。推进我国生物酶制品产业的发展。

(四) 与国际、国外同类标准技术内容的对比情况, 或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无

(五) 以国际标准为基础的起草情况, 以及是否合规引用或者采用国际国外标准, 并说明未采用国际标准的原因

无

(六) 与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行法律、法规和强制性标准没有冲突。

(七) 重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程中没有重大意见分歧。

(八) 涉及专利的有关说明

无

(九) 实施国家标准的要求, 以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议

无

(十) 其他应予说明的事项

无

标准起草组

2025 年 5 月