



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

生物酶检测技术通则

General Principles for detection technology of Bio-enzyme

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(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。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – 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。

本文件由××××提出。

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：中国测试技术研究院生物研究所

本文件主要起草人：

生物酶检测技术通则

1 范围

本文件规定了生物酶的术语和定义、检测技术的一般要求等。
本文件适用于科研、生产和应用过程中生物酶的检测。

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

生物酶 Bio-enzyme

具有催化特定生物或化学反应功能的生物分子及其衍生物。

3.2

生物酶活力 Bio-enzyme activity

生物酶活性

指生物酶催化某一特定反应的能力，通常用单位时间内底物减少或产物生成的速率表示。

3.3

生物酶比活力 Bio-enzyme specific activity

每个质量单位所含活性单位的数目，一般用U/g或U/mg表示。

3.4

生物酶纯度 purity of Bio-enzyme

目标生物酶在样品总蛋白质或固含物中所占的质量百分比。

4 一般要求

4.1 环境

4.1.1 实验室设施及环境应符合分析系统要求。

4.1.2 所有试验操作应在洁净的无酶环境下进行。

4.2 试剂和材料

4.2.1 所用的水应符合 GB/T 6682 规定的二级水要求，除非有特殊说明，如所配试剂需保存较长时间，则应使用无菌水（不含任何添加剂）。

4.2.2 试剂，应按照不同生物酶检测的要求，选择符合规定纯度的试剂。关键试剂的选择，对分析结

果会产生影响，因此应确保质量。如在方法验证或样品分析过程中，关键试剂批次发生改变，应确认测定结果未受其影响，确保不同批次结果的一致性。

4.2.3 缓冲溶液，应按照相关要求进行配制，并说明缓冲溶液的保存条件和储存期。

4.3 仪器与设备

4.3.1 方法中所用的各种分析仪器，需定期检定或校准。

4.3.2 所用定量容器，如移液管（器）、容量瓶、滴定管等，应符合规定并定期进行校准。

4.3.3 任何接触样品、试剂或反应混合物的仪器或器皿表面必须经清洗干净，测定酶活力时需去除干扰酶活力测定的物质，如少量的酸、金属、去垢剂或其他化合物等。

4.4 测定要求

4.4.1 每次试验时，应同时测试两个平行样，当平行样的测试数值的相对标准偏差超过 10%时，检测结果无效，应重新检测，同时应进行对照试验。

4.4.2 取样应具有代表性，取样量应根据检测用量和留样量计算，一般情况下，取样量=2 倍检测量+留样量（留样量一般为 3 倍检测用量）。

5 检测技术

5.1 检测技术选择

5.1.1 在选择检测技术时，应了解该技术原理、类型以及灵敏度等。

5.1.2 选择检测技术应依据预期目的、生物酶特性和处理因素。

5.1.3 选择的技术应经过验证或确认。

5.2 活力检测技术

酶活力的测定通过检测酶在最适条件下催化特定底物反应在一定时间内其产物的生成量或底物的消耗量实现，根据产物或底物的物理或化学特性来选择其具体的检测技术，包括光谱技术、电化学技术、色谱技术等。

5.2.1 光谱技术

5.2.1.1 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，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，紫外-可见分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；该方法的缺点是灵敏度一般，特异性有限。

5.2.1.2 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。

5.2.2 电化学技术

在以下两种情况下,可采用电化学方法进行生物酶活性的测定:一种情况是在酶促反应过程中伴随着氧化还原反应的发生,可以通过电极来测定氧化还原对之间电位的变化,从而计算出底物消耗量或产物的生成量。该方法适用于氧化酶、脱氢酶、过氧化物酶、加氧酶、水解酶、酯酶、淀粉酶等多种酶的活性测定。另一种情况是当需要测量的反应体系中发生pH变化时,可采用pH稳定计(或自动电位滴定仪)进行测定,脂肪酶和胆碱酯酶的活性可用此法进行测定,与其他方法相比,电化学分析方法具有稳定性好、特异性强、操作简单、便携、仪器价格低等优点,但由于一般的酶促反应具有确定的pH,相对于光谱法而言,电化学方法应用范围有限。

5.2.3 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。色谱法有高效液相色谱法、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。

5.2.4 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。

5.2.5 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。

5.2.6 反应条件的选择要点

5.2.6.1 底物选择的原则

- a) 对于专一性强的酶,选择特异性高的底物;
- b) 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。
- c) 有足够的溶解度;
- d) 稳定性好。

5.2.6.2 反应温度

选择酶的最适温度,在测定时间内,反应体系的温度变化宜控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 内。

5.2.6.3 反应 pH 值

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。

5.2.6.4 反应时间

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。

5.3 纯度检测技术

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（光谱扫描法、光吸收比值法）、层析法、电泳法（SDS-PAGE、等电聚焦电泳和毛细管电泳等）、色谱法（高效液相色谱法、分子排阻法）等。

5.3.1 生物酶溶液若在一定波长有特征吸收光谱的可用光谱扫描法来测定该生物酶的纯度，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。

5.3.2 光吸收比值法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。

5.3.3 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，所以可以根据层析峰的数量判断生物酶的纯度。

5.3.4 SDS-PAGE 技术是测定生物酶纯度应用最广泛的技术，但缺点是测得的结果不太精确。

5.3.5 若需要对生物酶的纯度精确定量可选用色谱法如高效液相色谱法、分子排阻法等。

5.4 杂质检测技术

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。

5.5 批内、批间差异检测

5.5.1 批内差异检测

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，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。

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{(n-1)\bar{x}} 100\% \quad (1)$$

式中：

RSD ——批内差异，%

x_i ——第*i*次测量的结果；

\bar{x} ——*n* 次测量的平均值

n——总的测量次数（不小于10）

5.5.2 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，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，则为生物酶的批间差异。

$$R = \frac{(\bar{x}_{max} - \bar{x}_{min})}{\bar{x}_t} \times 100\%$$

式中：

R —— 批间差异（相对极差）；

\bar{x}_{max} —— 3个批号中最大测量结果；

\bar{x}_{min} —— 3个批号中最小测量结果；

\bar{x}_t —— 3个批号测量结果的均值。

6 方法验证

测定方法需经过验证，验证至少包括线性范围、准确度、精密度。准确度和精密度可采用以下方式进行评估：

——如有国家标准物质或质控品，可采用加标回收率实验进行方法准确度评估。如没有国家标准物质或质控品，可采用实验室比对的方式评估方法精密度。

——新建方法可与现有方法进行结果比对，来评估新建方法的准确度。

7 实验记录与报告

7.1 实验过程中，应即时、客观地记录观察过程中的现象、结果和数据等信息。

7.2 实验室应按照标准规定的要求、准确、客观地报告检验结果。报告内容至少包括但并不限于以下内容：

- a) 样品的接收时间；
- b) 样品的具体描述、状态、标识；
- c) 储存条件；
- d) 检测时间；
- e) 检测方法；
- f) 检测结果；
- g) 检测人；
- h) 其他必要的说明。

8 危害废弃物处理

废弃物的处理应严格按照相应的分类要求处理，以避免对人和环境造成污染。

附 录 A
(资料性)
生物酶的分类

- 1 按来源分类
 - 1.1 植物类
 - 1.2 动物类
 - 1.3 微生物类
- 2 按不同组成分类
可分为蛋白类生物酶和核酸类生物酶。
 - 2.1 蛋白类生物酶
 - 2.1.1 氧化还原生物酶
 - 2.1.2 转移生物酶
 - 2.1.3 水解生物酶
 - 2.1.4 裂解生物酶
 - 2.1.5 异构生物酶
 - 2.1.6 连接生物酶或合成生物酶
 - 2.1.7 转移生物酶或易位生物酶
 - 2.2 核酸类生物酶
 - 2.2.1 分子内催化R酶
 - 2.2.2 自我剪切酶
 - 2.2.3 自我剪接酶
 - 2.2.4 分子间催化R酶
 - 2.2.5 RNA剪切酶
 - 2.2.6 DNA剪切酶
 - 2.2.7 多肽剪切酶
 - 2.2.8 多糖剪接酶
 - 2.2.9 氨基酸酯剪切酶
 - 2.2.10 多功能酶
- 3 按酶蛋白分子的特点分类
 - 3.1 单体酶
 - 3.2 寡聚酶
 - 3.3 多酶复合体
 - 3.4 多酶融合体
- 4 按酶的存在状态分类
 - 4.1 胞内酶
 - 4.2 胞外酶
- 5 按酶所耐受的极端环境条件分类
 - 5.1 嗜热酶
 - 5.2 嗜冷酶
 - 5.3 嗜盐酶
 - 5.4 嗜碱酶

- 5.5 嗜酸酶
 - 5.6 嗜压酶
 - 5.7 耐有机溶剂酶
 - 5.8 抗代谢物酶
 - 5.9 耐重金属酶
 - 6 按作用底物分类
 - 6.1 蛋白酶类
 - 6.2 核酸酶类
 - 6.3 脂肪酶类
 - 6.4 碳水化合物酶类
 - 6.5 其他酶类
 - 7 按酶的剂型分类
 - 7.1 液体型
 - 7.2 粉剂型
 - 7.3 颗粒型
 - 8 按工艺特点分类
 - 8.1 化学酶工程（初级酶工程）
 - 8.1.1 固定化酶
 - 8.1.2 化学修饰酶
 - 8.1.3 抗体酶
 - 8.1.4 模拟酶
 - 8.2 生物酶工程（高级酶工程）
 - 8.2.1 克隆酶
 - 8.2.2 突变酶
 - 8.2.3 新酶
-