

国家标准《脲水合酶纯度和活性的测定》 (征求意见稿)

编制说明

《脲水合酶纯度和活性的测定》标准起草组

2024 年 12 月

目 录

（一）工作简况	4
1、任务来源	4
2、标准编制过程和主要工作过程	4
（二）国家标准编制原则和确定国家标准主要内容	6
1、标准编制原则	6
2、确定国家标准主要内容的论据	7
3、主要技术差异	7
4、国内外研究概况及本标准解决的主要问题.....	7
（三）主要试验（或验证）情况	9
1、蛋白质含量的检测	9
2、胰水合酶纯度测定	9
2.1、稀释倍数确定	9
2.2、浓缩胶的选择	9
2.3、SDS-PAGE 电泳.....	9
3、胰水合酶活性测定	12
3.1 试剂或材料	12
3.2 酶反应实验	13
3.3 液相色谱条件.....	14
3.4 酶活性计算	14
4、结果分析	14
4.1 研究对象	14
4.2 胰水合酶纯度测定	15
4.3 胰水合酶活性的测定	17
（四）标准中涉及专利的情况	26
（五）预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况	26
（六）采用国际标准和国外先进标准的程度、以及与国际、国外同类标准水平的对比 情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比	27
（七）在标准体系的位置，与现行相关法律、法规及标准，特别是强制性标准的协调 性	27
（八）重大分歧意见的处理经过和依据	27
（九）标准性质的建议	27

（十）贯彻国家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）	27
（十一）废止现行有关标准的建议	28
（十二）其他应予说明的事项。	28

（一）工作简况

1、任务来源

本项目根据全国生化检测标准化技术委员会于 2023 年 12 月 29 日下达的 2023 年第二批推荐性国家标准计划（国标委发 {2023} 37 号）、2023 年第三批推荐性国家标准计划（国标委发 {2023} 58 号）、2023 年国家标准复审修订计划（国标委发 {2023} 64 号），本项目计划编号为 20231637-T-469，名称为腓水合酶纯度和活性的测定。

本标准由全国生化检测技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由深圳市第二人民医院、江南大学、深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司、中国测试技术研究院等单位联合起草。

2、标准编制过程和主要工作过程

（1）2022 年 03 月至 11 月，标准起草单位组织相关技术人员对《腓水合酶纯度和活力的检测 高效液相色谱法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外 近百余篇标准、文献，了解了国内外相关技术动态，酶标准制修订情况，并且明确了工作思路和进程安排。

（2）2022 年 12 月，标准起草单位在收到全国生化检测标准化技术委员会项目征集通知后，经专家讨论，确定标准名称为《腓水合酶纯度和活性的测定》，提交了项目立项申请的建议书以及国家标准草案工作组讨论稿。

（3）2023 年 01 月至 05 月，经过至少 2 次起草单位组内的答辩和修订，形成了更完善的本项目建议书以及国家标准草案。

（4）2023 年 12 月，收到全国生化检测标准化技术委员会文件《关于下达 2023 年推荐性国家标准计划的通知》（生检标[2023] 41 号），《腓水合酶纯度和活性的测定》标准项目立项，计划编号：20231637-T-469。

（5）2024 年 01 月至 08 月，全国生化检测标准化技术委员会就《腓水合酶纯度和活性的测定》标准向同行征求意见。共收集到至少 5 家行业单位征求意见，收到 33 份有意见或建议。起草小组已按照专家意见建议进行修改完善。起草小组已按照专家意见建议进行修改完善。详见“国家标准反馈意见汇总表一—《腓水合酶纯度和活性的测定》标准征求意见稿。”

(6) 2024 年 08 月 31 日，在深圳好日子皇冠假日酒店七楼夏威夷厅召开了“全国生化检测标准化技术委员会生物酶类试剂工作组年度会议”，就《脲水合酶纯度和活性的测定》标准（征求意见稿）向在场参会的多位涉及检测鉴定及使用该产品的相关行业专家征求意见。与会专家提出了宝贵意见建议，起草单位已按照与会专家的意见建议进行修改完善。

(7) 2024 年 09 月至 12 月，标准起草小组完成了《脲水合酶纯度和活性的测定》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《脲水合酶纯度和活性的测定》标准（征求意见稿）和编制说明。

(8) 年 月至 月，全国生化检测标准化技术委员会就《脲水合酶纯度和活性的测定》标准的征求意见稿和编制说明，在标准制修订系统中征求意见。共收集 位委员专家回函，其中收到 份有意见或建议的单位回函。起草小组已按照专家意见建议进行修改完善。详见“国家标准反馈意见汇总表—《脲水合酶纯度和活性的测定》标准征求意见稿。”

(9) 年 月至 月，全国生化检测标准化技术委员会就《脲水合酶纯度和活性的测定》标准进行了线上预审查，主要修改意见如下：

(10) 年 月至 月，标准起草小组根据专家意见，对《脲水合酶纯度和活性的测定》标准（征求意见稿）和编制说明进行修改和完善，形成送审稿，报全国生化检测标准化技术委员会行审定。

(11) 年 月 日至 月 日，全国生化检测标准化技术委员会就《脲水合酶纯度和活性的测定》标准送审稿组织函审。

本 TC 全体委员人数为 人，参与投票 人，投票同意本标准通过审查 人，达到 3/4 通过。全体委员中，有 人为起草组成员。

(11) 年 月 日至 月 日，标准起草组针对函审专家提出的意见建议进行了汇总整理，主要是单位、格式等一般编辑性的建议，已按专家意见建议修改。有几条技术性意见修改情况如下：

(12) 年 月 日， 会后起草小组对标准文本进行了进一步修改和完善。形成了报批稿。报全国生化检测标准化技术委员会。

（二）国家标准编制原则和确定国家标准主要内容

1、标准编制原则

本标准的起草是在对国内外资料分析、研究及整理的基础上，并按照标准的制定及《国家标准管理办法》的程序与基本要求进行。本编制说明按 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编写规则》的要求为指导，对标准内容进行规范。

（1）实用性原则

根据市场应用和行业技术的实际情况出发，坚持先进性与实用性相结合、统一性与灵活性相结合的原则，以标准化为引领最大限度的促进我国胍水合酶生产、建立胍水合酶质量判定标准等方面的提高与发展。本标准对胍水合酶的纯度和活性检测进行规范统一，为胍水合酶产品的评价提供技术依据。

（2）协调性原则

本标准与现行法律法规、标准协调一致。

（3）科学性原则

根据样品检测结果和实际需求，在确定本标准所用的仪器、工具以及相关的纯度和活性的评估方法等内容时，综合考虑行业的需求、科学研究需要和用户的利益，寻求最大经济社会效益、充分体现了标准在技术上的先进性和经济上的合理性。使标准内容更加完善、全面，且易于实施和应用。

（4）先进性原则

根据国情，标准制订坚持面向市场、服务产业的原则。结合我国胍水合酶领域的实际现状，并以引领和促进胍水合酶质量水平的提升为目标而制定，提高标准的综合水平。使标准要适应市场需求，满足行业发展，为科研开发、企业的生产、质量检验提供技术指导，同时有助于引导本行业采用标准进行规范化生产，具有一定的先进性。

2、确定国家标准主要内容的论据

（1）标准编写遵循 GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

（2）标准编写内容参考的相关标准，包括：GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

（3）本标准的主要规定了基于腈水合酶纯度和活性测定的方法要求。本标准为首次制定的国家标准。

本标准全文分为 10 章和 2 个附录，标准的主要内容如表 1 所示：

表 1 本标准的主要内容

章条	名称
1	范围
2	规范性引用文件
3	术语和定义
4	缩略语
5	原理
6	试剂或耗材
7	仪器设备
8	样品制备
9	分析步骤
10	结果分析
附录 A	试剂配制
附录 B	丙烯酰胺的标准品色谱图

3、主要技术差异

本标准为新制度标准，无主要技术差异。

4、国内外研究概况及本标准解决的主要问题

目前，国内外对于腈水合酶活的检测手段各异，导致最终的结果不具备可比性，酶活的测量判定没有标准和依据，无法通联通用。迫切需要建立一个腈

水合酶的酶活测量规范，为各个研究机构、企业等提供酶活检测的参考依据。

通常来说，酶纯度的检测方法主要包括色谱法、质谱法及电泳法（SDS-PAGE）。色谱法具有灵敏度高、分离效果好，分析速度快等优点，但需要对样本进行适当的前处理。此外，还需要根据待测酶的物理化学性质选择合适的色谱柱才能实现目标酶的纯度测定。而质谱法具有高灵敏度、高分辨率和高准确性，可以检测到痕量蛋白质，并实现蛋白质的分子质量、结构及修饰等信息。但质谱法涉及仪器要求较高，需要专业的设备和操作技术。此外，质谱法分析过程较为复杂，需要对样品进行前处理才能保证蛋白的离子化。分析结果易受样品的复杂性和纯度的影响。SDS-PAGE 的原理是蛋白样品经过电泳后可以在胶中形成不同大小的带，通过比较样品带的数目和强度，可以大致鉴定蛋白的纯度。相比于色谱和质谱法，SDS-PAGE 所用的器具和仪器成本较低，已经在各个实验室普遍使用。因此，SDS-PAGE 被认为是最常用的一种酶或蛋白纯度鉴定方法。酶活性测定法是利用酶具有专一高效的催化化学反应的性质，通过测定响应产物浓度变化来反映样品中待测酶的活性。酶活性一般采用紫外分光光度法、荧光法以及色谱法进行测定。脲水合酶（NHase；EC 4.2.1.84）可以在温和的条件下催化脲类物质生成相应的酰胺。目前，常见的酰胺类化合物的检测方法包括气相色谱法（GC）、气相色谱质谱法（GC-MS）、液相色谱法（LC）及液相色谱串联质谱法（LC-MS）。经调研，针对酰胺类化合物，美国 EPA Method 8032A 和 EPA Method 8316 分别采用了 GC 和 LC 方法进行测定，而德国 DIN 38413-6 则推荐利用 LC-MS 进行测定。事实上，欧洲国家大都利用 LC 方法进行酰胺类化合物的检测。而我国国家环保部制定《环境空气和废气 酰胺类化合物的测定 液相色谱法》，规定了测定环境空气和固定污染源废气中酰胺类化合物的液相色谱法。由此，可见 LC 方法是酰胺类化合物检测的主流技术。鉴于以上技术背景，本标准计划以 SDS-PAGE 方法测定脲水合酶的纯度，以 LC 法测定酰胺类化合物的浓度变化来反映脲水合酶的活性。

本文件为规范和有效开展脲水合酶纯度或活性检测的技术导则，规定脲水合酶的纯度和活性检测的过程中各环节应遵循的主要原则。本标准明确所用的仪器、工具以及相关的纯度和活性的评估方法等内容。

（三）主要试验（或验证）情况

本标准涉及的主要试验（或验证）数据如下：

1、蛋白质含量的检测

Bradford 分光光度法是目前测定蛋白质含量的首选方法。该方法利用考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合的特性以及在一定范围内与蛋白质含量呈现线性关系的特征检测蛋白含量。鉴于此，本标准中脲水合酶的含量测定采用 Bradford 分光光度法。按照 SN/T 3926 进行测定。

2、脲水合酶纯度测定

结合蛋白质含量的测定结果，计算脲水合酶在待测样本总蛋白中所占的百分比。

2.1、稀释倍数确定

本次实验将样品按 1 mg/mL 溶解后再进行原倍稀释、2 倍稀释、5 倍稀释、10 倍稀释。通过根据试验结果分析不同稀释梯度范围内电泳条带的清晰程度，选择最为合适的稀释倍数确定为国家标准方法中使用的倍数。

2.2、浓缩胶的选择

由于脲水合酶分子量大小介于 10-50 kDa，根据实验选择 12% 凝胶分离蛋白，得到清洗且分离度高的条带。

2.3、SDS-PAGE 电泳

2.3.1 试剂准备

（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 μ m 微孔滤膜过滤除菌和杂质后储于棕色瓶，4 $^{\circ}$ 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。

（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。

(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。

(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。

(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。

(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。

(7) 5 倍十二烷基磺酸钠-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 μ L 分装后, 4 $^{\circ}$ 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。

(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, 加水定容至 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, 加水定容至 500 mL, 室温保存。

(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。

(10) 制胶

	5%浓缩胶 (mL)	12%分离胶 (mL)
30% Acr-Bis	0.75	4.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	0	2.5
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	0.78	0
10% APS	0.06	0.1
10% SDS	0.06	0.1
水	4.44	3.4
四甲基乙二胺 (TEMED)	0.006	0.005

2.3.2 SDS-PAGE 电泳

(1) 凝胶设置为浓缩胶 5%，分离胶 12% 的浓度制胶。制作样品时，先将脲水合酶样品稀释至 1mg/mL，然后进行 2 倍稀释、5 倍稀释、10 倍稀释，分别各取 10 μ L 加入 40 μ L 的 5 \times 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。

(2) 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。

(3) 当指示剂溴酚蓝运动至蛋白胶最下端时，电泳终止。

(4) 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。

(5) 电泳结果分析计算：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。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，计算样品中脲水合酶占的比例（%），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：

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

式中：

P：待测脲水合酶相对纯度

R：待测样品脲水合酶所占的比例；

C：待测脲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。

3、脲水合酶活性测定

3.1 试剂或材料

（1）0.1mol/L K_2HPO_4 （MW=174.18 g/mol）

称取 17.4 g 溶于 1000mL 水中；

（2）0.1mol/L KH_2PO_4 （MW=136.09 g/mol）

称取 13.6 g 溶于 1000mL 水中；

（3）10mM 磷酸钾缓冲溶液（pH=7.4）

分别移取 0.1mol/L K_2HPO_4 和 0.1mol/L KH_2PO_4 各 100mL，加蒸馏水定容至 1000 mL，使用 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 调 pH 值至 7.4，储存于 4℃。

（4）0.1 M 烟酰胺（MW=122.125 g/mol）

称取 1.221 g 烟酰胺溶于 100 mL 的 10 mM 的 PBS 溶液。

（5）烟酰胺标准品

移取一定体积的 0.1 M 烟酰胺溶液，分别利用 10 mM PBS 缓冲液配制 0.5、1、2、5、10 mM 浓度的烟酰胺标准溶液。

（6）丙烯酰胺（MW=71.08 g/mol）

称取 0.7108 g 丙烯酰胺溶于 100 mL 的 10 mM 的 PBS 溶液。

(7) 丙烯酰胺标准品

移取一定体积的 0.1 M 丙烯酰胺溶液，分别利用 10 mM PBS 缓冲液配制 0.5、1、2、5、10 mM 浓度的烟酰胺标准溶液。

(8) 0.1M 烟腈（3-氰基吡啶，MW=104.11g/mol）

称取 1.041 g 烟腈溶于 100mL 的 10mM 的 PBS 溶液。

(9) 0.1M 丙烯腈（MW=53.06g/mol）

移取 665 μ L 丙烯腈溶液（99%），利用 10 mM PBS 缓冲液定容至 100mL。

(10) 0.1M 磷酸（MW=97.994g/mol）

移取 684 μ L 市售磷酸溶液，利用蒸馏水定容至 100 mL。

(11) 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。

3.2 酶反应实验

为便于筛选得到最适宜的催化效果，根据蛋白的定量结果将待测的腈水合酶浓度分别稀释为 0.5 mg/mL 和 0.05 mg/mL。经调研得知，腈水合酶催化反应可在温和条件下高效进行，且大多文献报道腈水合酶反应是在 25 $^{\circ}$ C 条件，酶催化反应 10 min。因此本标准中采用相同的催化反应条件。

3.2.1 酶催化丙烯腈为丙烯酰胺

取 10 μ L 待测腈水合酶至 1.5 mL 离心管中，置于 25 $^{\circ}$ C 金属浴上。向离心管中加入 490 μ L 底物 0.1 M 丙烯腈溶液，充分涡旋混匀，25 $^{\circ}$ C 下反应 10 min，然后加入 0.1 M 磷酸溶液终止反应。将反应液 12000 rpm 离心 5 min，移取上清液并过 0.22 μ m 有机系微孔滤膜。同时配制浓度分别为 0.5、1、2、5 和 10 mM 的丙烯酰胺溶液作为标样。吸取 10 μ L 各浓度的标准品和反应液（根据色谱类型的不同，可适当调整进样体积），分别装载入 HPLC 样本室中，定量检测酶催化生成产物的浓度。

3.2.2 酶催化烟腈为烟酰胺

取 10 μL 待测腈水合酶至 1.5 mL 离心管中，置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上。向离心管中加入 490 μL 底物烟腈溶液，充分涡旋混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min，然后加入 500 μL 100%乙腈溶液终止反应。将反应液 12000 rpm 离心 5 min，上清液用 100%乙腈溶液稀释适当倍数，过 0.22 μm 有机系微孔滤膜。同时配制浓度分别为 0.5、1、2、5 和 10 mM 的烟酰胺溶液作为标样。吸取 10 μL 各浓度的标准品和反应液（根据色谱类型的不同，可适当调整进样体积），分别装载入 HPLC 样本室中，定量检测酶催化生成产物的浓度。根据标样的浓度和峰面积绘制标准曲线，再根据样品的峰面积计算出反应体系中酰胺的生成量。

3.3 液相色谱条件

检测波长：215 nm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ，

流动相：水乙腈体积比为2:1，等度洗脱。

进样量：1 μL （根据色谱规格调整进样量）

流速：0.2 mL/min（根据色谱柱型号规格调整不同的流速）。

3.4 酶活性计算

定义为 25 $^{\circ}\text{C}$ 下，每分钟催化生成 1 μmol 酰胺所需要的酶量。计算公式如下：

$$\text{酶活性 (U/mg)} = Q / (t \times m)$$

式中：

Q 代表的是反应产生的酰胺类物质的量 (μmol)

t 代表的是反应时间 (min)

m 代表的是反应体系中酶的质量 (mg)

4、结果分析

4.1 研究对象

本研究对象分别来自无锡新恒辉材料有限公司（下述脲水合酶 1）和无锡新晨宇生物工程有限公司（下述脲水合酶 2）的脲水合酶和进口的脲水合酶。

4.2 脲水合酶纯度测定

由图 1-2 得知，脲水合酶的分子量均在 30 kDa.的位置，且仅有一条清洗的条带。说明纯度达到了电泳纯的要求。按照公式（1）计算脲水合酶的纯度：

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

式中：

P：待测脲水合酶相对纯度

R：待测样品脲水合酶所占的比例；

C：待测脲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。

经公式（1）计算得知，**脲水合酶 1** 的纯度为：89.8%，脲水合酶 2 的纯度为 96.3%。

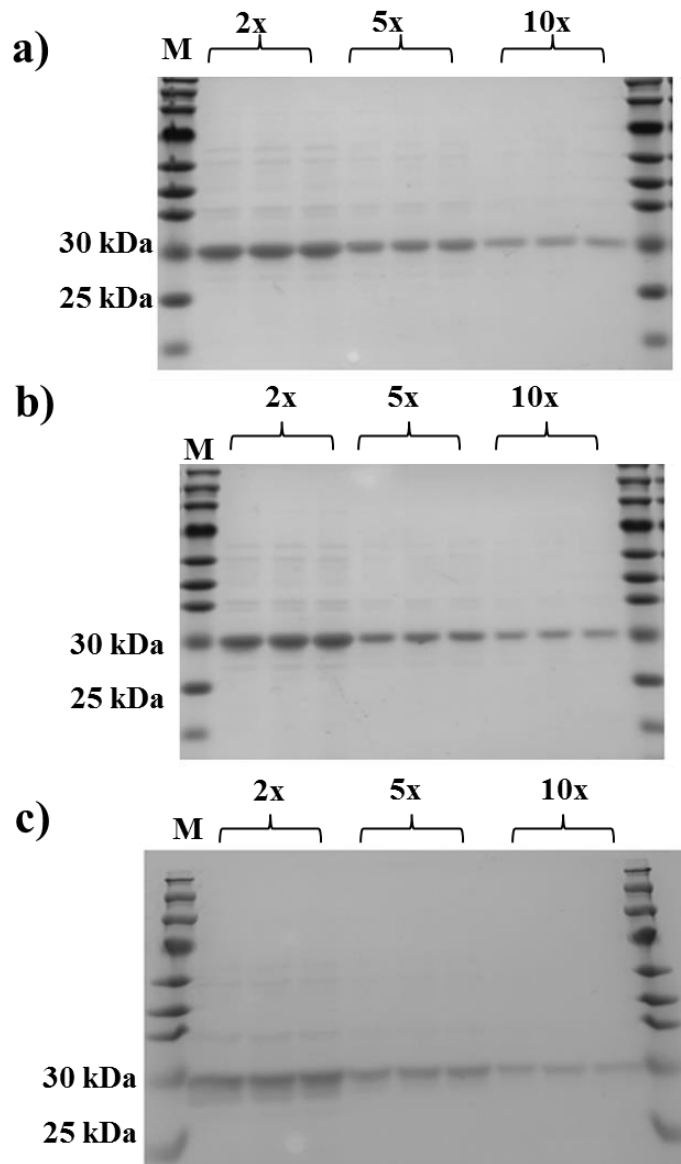


图 1 腓水合酶 1 稀释 2 倍、5 倍、10 倍的蛋白电泳胶带图，a) 深圳第二人民医院结果，b) 江南大学结果，c) 深圳市计量院结果

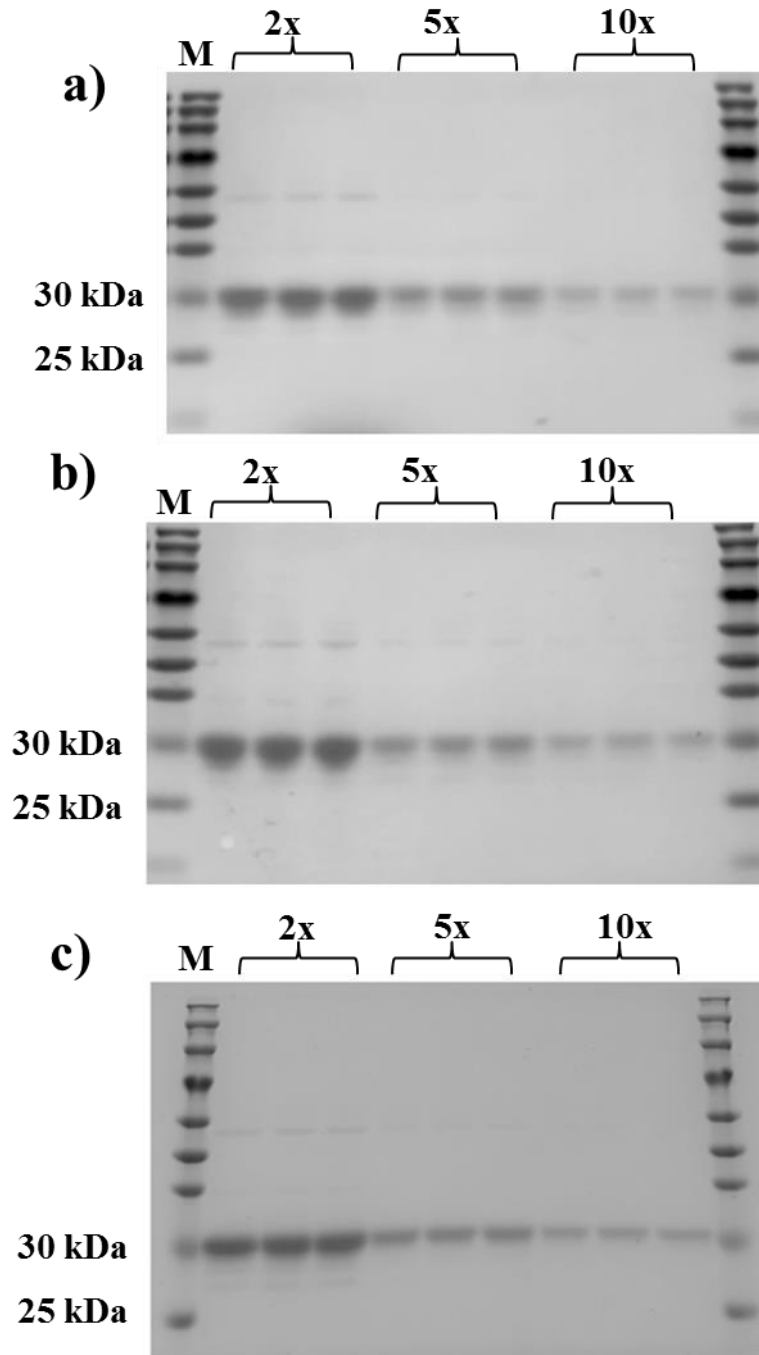


图 2 脲水合酶 2 稀释 2 倍、5 倍、10 倍的蛋白电泳胶带图，a) 深圳第二人民医院结果，b) 江南大学结果，c) 深圳市计量院结果

4.3 脲水合酶活性的测定

4.3.1 考察流速对反应底物的影响

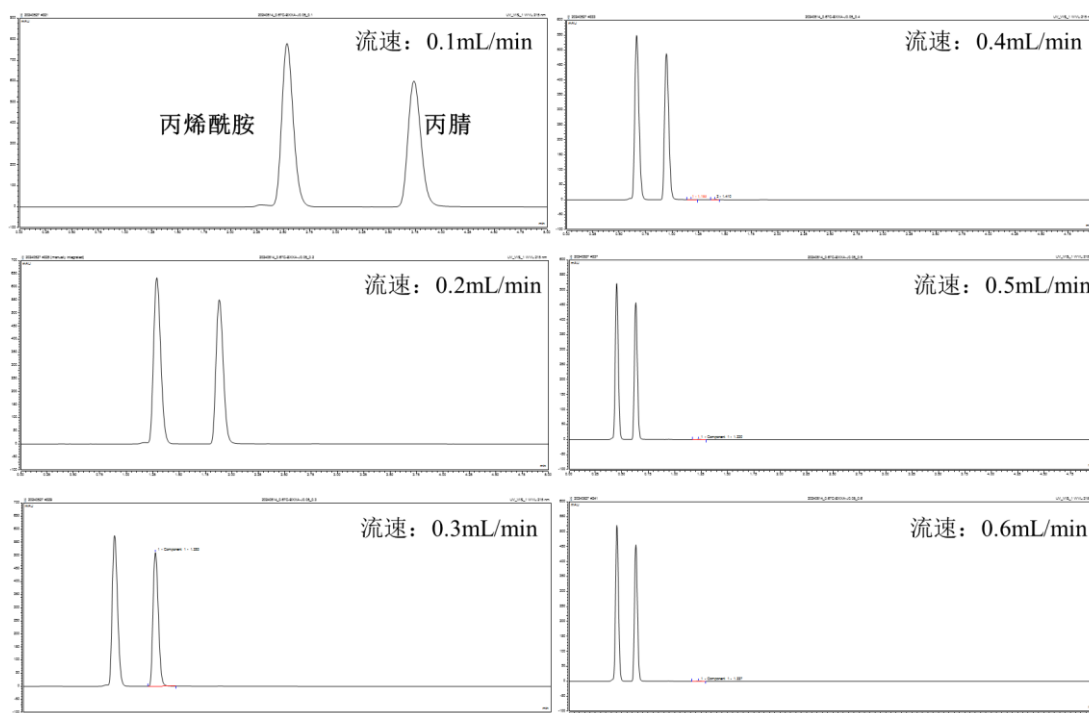


图 3 丙烯酰胺及丙烯腈保留时间随着流速变化的趋势图

以进口腈水合酶催化丙烯腈为例，利用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm 色谱柱研究了丙烯腈和丙烯酰胺保留时间随着流速的变化趋势。结果如图 3 所示，在 0.1-0.6 mL/min 范围内，均可采集到二者的信号。其中 0.2 mL/min 的流速为最佳。

4.3.2 酶浓度的选择

由图 4 得知，对烟腈来说，两个酶浓度条件下，0.05 mg/mL 国产酶的催化效果较低，而 0.5 mg/mL 的催化效果比较明显。进口酶在 0.05 mg/mL 和 0.5 mg/mL 浓度下均可以计算催化活性。当采用国产酶进行丙烯腈的催化反应时，相对比 0.05mg, 0.5 mg/mL 酶浓度时产生的丙烯酰胺产物的量最适中。而进口酶催化丙烯腈的最佳浓度为 0.05 mg/mL。鉴于丙烯酰胺在工业上有着更为广阔的用途，而 0.05-0.5 mg/mL 范围内，国产酶和进口酶均可获得良好的结果，因此本标准拟以国产酶和进口酶在催化丙烯腈为丙烯酰胺过程为研究对象，研究国产酶和进口酶的催化活性。

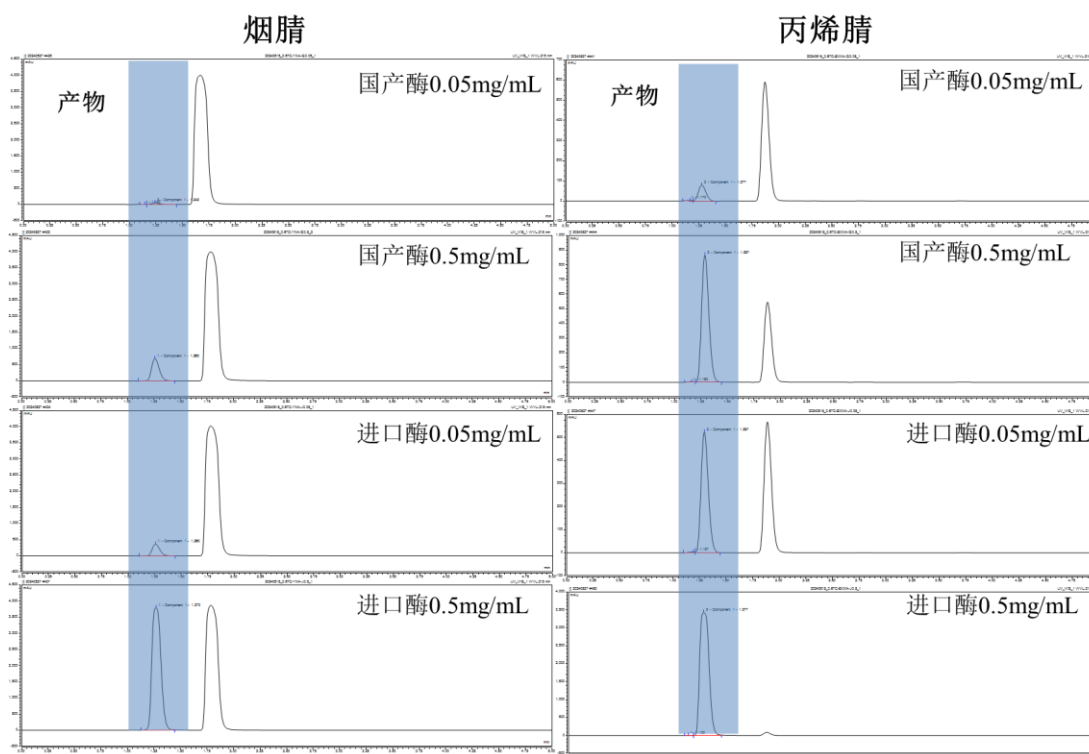


图 4 不同浓度条件下国产和进口腈水合酶催化烟腈和丙烯腈的效果

4.3.3 酶活性的计算

研究酶在不同实验室催化丙烯腈的结果对比：

A 实验条件：

(1) 深圳市第二人民医院实验条件：

色谱仪器：Vanquish Flex

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

波长：215 nm

流速：0.2 mL/min

进样体积：1 μL

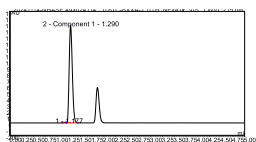


图 5 腈水合酶催化丙烯腈为丙烯酰胺的色谱图

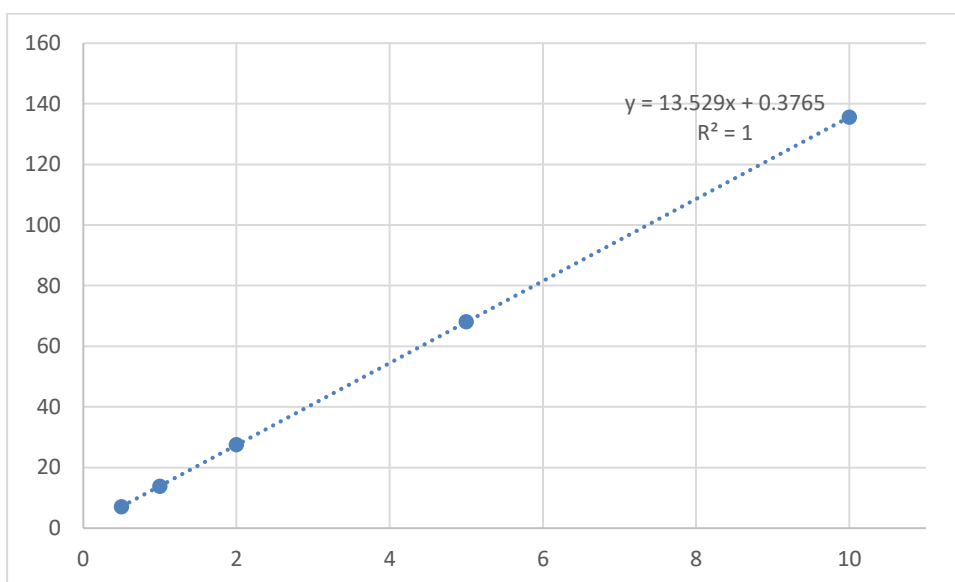


图 6 丙烯酰胺标准曲线线性回归图

丙烯酰胺标准曲线线性回归图 ($y=13.529x+0.3765$)，其中横坐标为丙烯酰胺浓度 (mM)，纵坐标为 mAU*min。

以深圳市第二人民医院实验条件进行方法学的考察：

(1) 线性范围和检出限

由图 6 得知，在 0.5-10 mM 范围内，线性相关系数 R^2 大于 0.999，证明所建立的方法在标准曲线范围内，线性范围良好。按照 3 倍信噪比计算检出限，本方法的检测限为：0.084 mM 符合色谱方法建立的要求。

(2) 重复性, 重现性及准确度:

分别配制两个浓度梯度 (2.35 mM 和 7.95 mM) 的丙烯酰胺溶液进行批内、批间及准确度验证, 结果如下表所示: 批内 CV% 小于 5.37%, 批间 CV% 均小于 10%, 两个浓度丙烯酰胺的准确度在 85%-115% 区间, 证明本方法在实际应用的可行性。

真实值	2.35 mM	准确度 (%)	真实值	7.95 mM	准确度 (%)
批次 1 检测 值	2.11	89.79	批次 1 检测值	7.66	96.35
	2.02	85.96		7.81	98.24
	2.28	97.02		7.81	98.24
	2.12	90.21		7.61	95.72
	2.34	99.57		7.80	98.11
	2.16	91.91		7.81	98.24
批内平均值	2.17	92.34		7.75	97.48
批内 SD	0.12	--		0.08	--
批内 CV%	5.37	--		1.07	--
批次 2 检测 值	2.50	106.38	批次 2 检测值	8.59	108.05
	2.55	108.51		8.44	106.16
	2.63	111.91		8.42	105.91
	2.54	108.09		8.58	107.92
	2.55	108.51		8.49	106.79
	2.62	111.49		8.40	105.66
批内平均值	2.56	108.94		8.49	106.79
批内 SD	0.05	--		0.07	--
批内 CV%	1.98	--		0.88	--
批次 3 检测 值	2.29	97.45	批次 3 检测值	8.19	103.02
	2.09	88.94		8.36	105.16
	2.31	98.30		8.37	105.28
	2.13	90.64		8.20	103.14
	2.26	96.17		8.31	104.53
	2.06	87.66		8.47	106.54
批内平均值	2.19	93.19	--	8.32	104.65

批内 SD	0.11	--	--	0.10	--
批内 CV%	5.04	--	--	1.18	--
总平均值	2.29	--	--	8.18	--
批间 SD	0.22	--	--	0.39	--
批间 CV%	9.7	--	--	4.71	--

(2) 江南大学实验条件:

色谱仪器: 日本日立公司 L-2000

色谱柱: HITACHI C18 reverse phase column

柱温: 40 °C

波长: 215 nm

流速: 0.6 mL/min

进样体积: 10 μ L

样品名: JB-0.05-1
进样次数: 1 of 1
样品注释:

样品瓶类型: UNK
进样量: 10.0 μ l

色谱类型: HPLC通道: 1

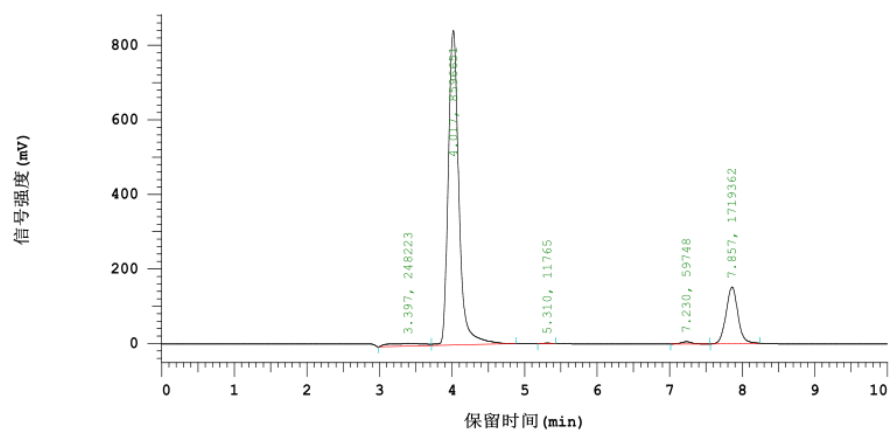


图 7 腈水合酶催化丙烯腈为丙烯酰胺的色谱图

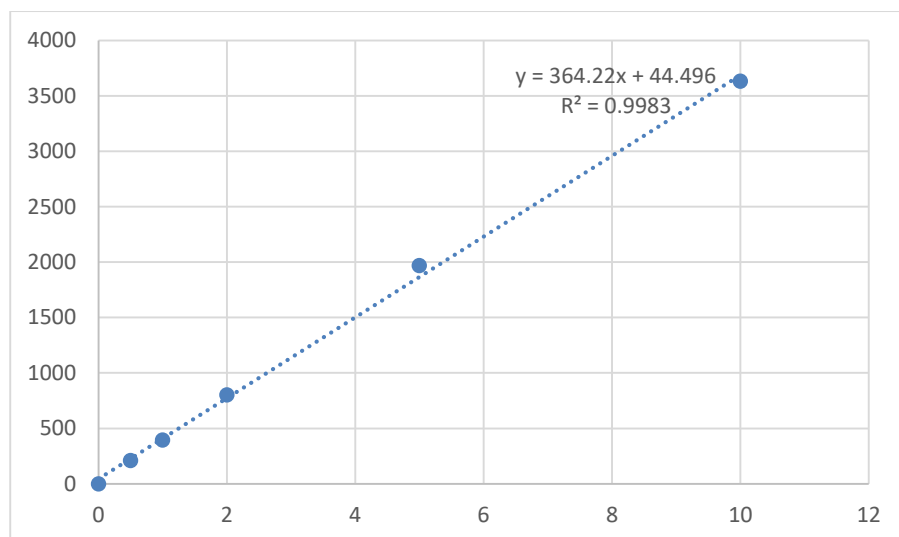


图 8 丙烯酰胺标准曲线线性回归图

丙烯酰胺标准曲线线性回归图（ $y=364.22x+44.496$ ），其中横坐标为丙烯酰胺浓度（mM），纵坐标为峰面积。

（3）深圳市计量院实验条件

色谱仪器：岛津 LC-20AT

色谱柱：Poroshell120 EC C18 2.7 μm ，3.0 \times 150 mm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

波长：215 nm

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

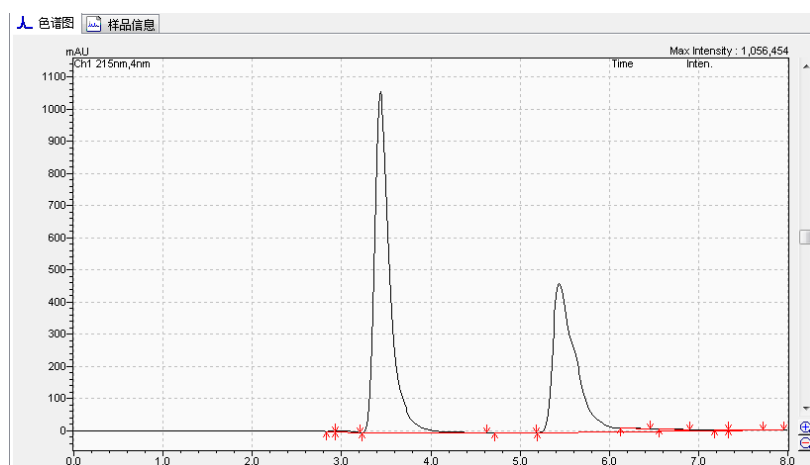


图 9 腈水合酶催化丙烯腈为丙烯酰胺的色谱图

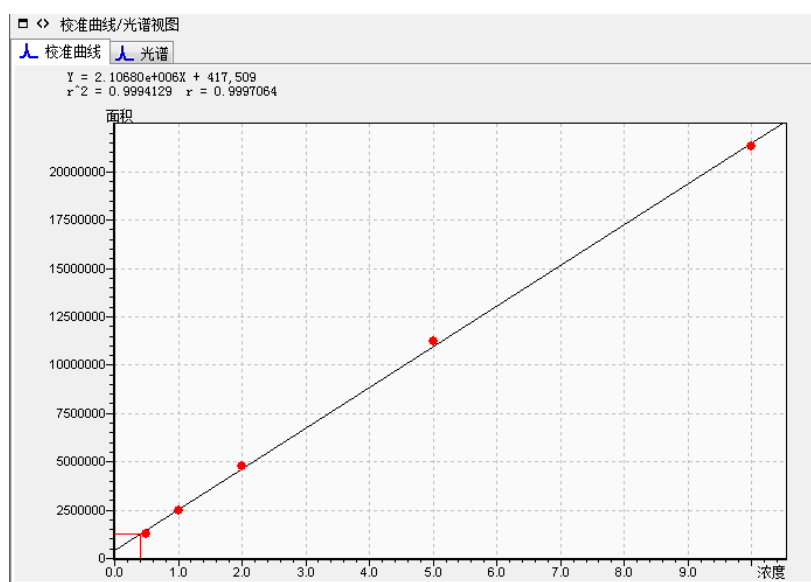


图 10 丙烯酰胺标准曲线线性回归图

丙烯酰胺标准曲线线性回归图（ $y=2.11E6x+417509$ ），其中横坐标为丙烯酰胺浓度（mM），纵坐标为峰面积。

B 酶活性结果

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

活性计算

定义为25 °C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：

$$EA \text{ (U/mg)} = x \times v1 / (t \times c \times v2) \tag{3}$$

按照公式（2）和公式（3）计算得三个实验室结果如下表所示：

脲水合酶 1

	深圳市第二人民医院	江南大学	深圳市计量院
平行 1	202.33	221.16	184.58
平行 2	202.73	221.43	207.72
平行 3	202.67	223.63	186.40
平行 4	202.12	228.85	180.84
平行 5	202.18	228.57	183.92
平行 6	204.28	229.94	190.18
平均值	202.72	225.60	188.94
偏差	0.80	3.98	9.70
CV	0.40%	1.76%	5.13%
总的平均值	205.75		
偏差	16.57		
总的 CV	8.05%		

脲水合酶 2

	深圳市第二人民医院	江南大学	深圳市计量院
平行 1	1065.52	1118.84	1064.20

平行 2	1005.37	1116.09	1166.40
平行 3	1007.69	1179.24	1035.40
平行 4	1012.58	1088.64	1056.40
平行 5	1010.57	1085.89	1023.00
平行 6	1004.14	1146.30	1094.40
平均值	1017.65	1122.50	1073.30
偏差	23.67	35.57	51.86
CV	2.33%	3.17%	4.83%
总的平均值	1071.15		
偏差	57.19		
CV	5.34%		

（四）标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利问题。

（五）预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

腈水合酶(nitrile hydratase, NHase, EC 4.2.1.84)是一种金属酶,能催化腈类物质转化为相应的酰胺类物质,能够在温和的条件下实现酰胺类化合物的生产。广泛应用于精细化工、医药化工、食品饲料护肤品、环境保护等行业中高附加值酰胺类化合物的生产。腈水合酶的生物催化生产酰胺类物质、生物代谢环境中腈从而保护环境,对改善人类生存环境和生活质量有重要意义。腈水合酶的分类方法有多种,依据 NHase 活性中心含有的不同金属离子可把 NHase 分为两类,分别为含非咕啉态钴离子的钴型腈水合酶(Co-NHase)和含非血红素铁离子的铁型腈水合酶(Fe-NHase)。由于不同原核生物或真核生物表达的 NHase 存在产率、产品纯度、活性、耐受性及稳定性的差异,往往会限制生产高价值酰胺类物质的应用。鉴于腈水合酶在酰胺类化合物合成中的重要作用,本标准有助于规范腈水合酶的纯度和活性测定,指导如何在降低成本的同时增加利润,满足工业应用需要,最终实现 NHase 更高、更环保的应用价值。

我国现行的法规和标准中，没有关于腓水合酶纯度和活性测定的标准，使得本行业检测不规范。本标准填补了腓水合酶纯度和活性测定指导文件、技术操作细节的缺失，并且为本行业对腓水合酶纯度和活性测定提供更为准确、快速、规范的法则来提升检测工作效率和降低检测成本。因此，本标准方法的实施及应用将会产生广泛的经济和社会效益。

（六）采用国际标准和国外先进标准的程度、以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比

国际暂无相关参照标准。国内已有核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶纯度的检测方法可为标准制定提供借鉴与参考。

（七）在标准体系的位置，与现行相关法律、法规及标准，特别是强制性标准的协调性

本标准与现行的相关法律、法规、规章与相关标准保持一致，本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

（八）重大分歧意见的处理经过和依据

标准编制过程中广泛征集了专家意见，所有意见均按照标准编制程序进行了采纳，不存在重大分歧意见。

（九）标准性质的建议

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

（十）贯彻国家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）

为了贯彻实施本国家标准，建议开展本国家标准应用技术的培训工作。

1) 首先应在实施前保证色谱仪的正常运行，使研究单位及检测机构等都能正常检测样本，这是保证新标准贯彻实施的基础。

2) 本次制定的标准，与研究院所、检测机构、生产企业等相关。对于标准使用过程中容易出现的疑问，起草单位有义务进行必要的解释。

3) 可以针对标准使用的不同对象, 如生产企业、质量监管等相关部门, 有侧重地进行标准的培训和宣贯, 以保证标准的有序贯彻执行。

4) 建议本标准批准发布及实施。

(十一) 废止现行有关标准的建议

无相关要求与建议。

(十二) 其他应予说明的事项。

无其他事项说明。