**核糖核酸酶活力检测方法**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

# 一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《二О一五年国家标准制修订项目》，项目编号“20154059-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2016年完成。本标准起草工作组由中国标准化研究院、浙江工商大学、河北农业大学等单位共同组成。

# 二、标准制定的背景及意义

核酸分解的第一步是水解核苷酸之间的磷酸二酯键，在高等动植物中都有作用于磷酸二酯键的核酸酶，其本质是蛋白质。不同来源的核酸酶，其专一性、作用方式都有所不同。有些核酸酶只能作用于RNA，称为核糖核酸酶（RNase），有些核酸酶只能作用于DNA，称为脱氧核糖核酸酶（DNase），核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶统称为核酸酶（Nuclease）。

核糖核酸酶是一类广泛存在于动植物体内的核酸水解酶，从20世纪60年代以来一直作为一种模型蛋白被普遍用于分子生物学研究。RNase家族包括RNase A、RNase B、RNase C、RNase H、S-RNase、RNase P、RNase T等，主要生理功能是控制细胞内RNA的种类与数量分布，除参与核糖核酸转录后的剪切、修饰和降解等过程外，还与某些植物的自交不亲和性、器官发生、宿主的防御机制、控制肿瘤血管生成、杀灭肿瘤细胞及抑制病毒复制等有关。核糖核酸酶A一般被认为是核糖核酸酶的典型代表，分子量约为13.64 kDa，通过X射线衍射和质谱分析结果表明，它的空间结构呈肾形分布，见图1。

由于核糖核酸酶具有重要的生理学作用，引起了国内外广泛的关注。目前已经商业化生产和销售，但是作为核糖核酸酶的重要质量指标之一的酶的活力，根据文献调研显示相应的测定方法目前仍然没有形成统一的检测和分析标准，各生产和销售厂商对其活力的质量控制各自定义，同一种酶选用不同的活力测定方法结果显示大小差异显著。这实际上已经成为核糖核酸酶产品可持续发展的瓶颈问题，给消费者造成了极大的不便。鉴于此，开展核糖核酸酶活力检测方法标准的制定，具有重要的现实意义，可有助于规范市场上此类产品的乱象，切实保障消费者的使用。经济全球化浪潮使标准竞争上升到了战略地位，特别是进入21世纪以后，生物技术和生物产品发展迅速，发达国家纷纷制定包括核酸酶等在内的各自的标准化发展战略，以应对因经济全球化对自身带来的影响。此外，此类标准的制定也同样满足《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006-2020年）》中明确把实施技术标准战略作为我国科技发展的两大战略之一的目标，有助于保障国家科学发展、社会和谐。



**图1 牛胰腺核糖核酸酶A空间结构**

# 三、标准制定原则及主要内容

**（一）标准编制原则**

标准的制定过程中采用文献调查法、专家座谈法、凝胶电泳方法等多种研究方法，方法科学先进、过程周密严谨、数据真实可信、结果明确。

本标准是为相关组织核糖核酸酶活力检测提供技术支撑，考虑到生产、监管等不同需求，在方法选择上，主要基于现状、现有成熟的技术以及结果及验证基础确定的，因此实用性较强。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《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、标准编写内容参考了与核糖核酸酶活力检测相关文献，标准参照了GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》第1部分 总则与定义和GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度》第2部分 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法。

**（三）本标准的主要内容**

本标准主要包括以下7个部分：

1. 范围；
2. 术语和定义；
3. 原理；
4. 仪器设备及器具；
5. 主要试剂；
6. 分析步骤；
7. 结果分析等。

# 四、主要工作过程

1、组成标准起草小组

根据国家制修订有关程序和要求，2015年10月下旬，中国标准化研究院主持在北京召开了《核糖核酸酶活力检测》国家标准制定研讨会。会上，组成了标准起草工作组，进一步明确了任务要求，根据研究内容详细安排了工作进度，并成立了标准起草工作小组。会议研究讨论了《核糖核酸酶活力检测》初稿，对起草小组在标准起草过程中的一些思考及难点问题进行了深刻讨论，各单位代表结合各自的优势和特长就标准内容及方法选择进行了讨论，为核糖核酸酶活力的测定奠定了必要的基础。

2、开展相关调研情况

核糖核酸酶活力检测标准属于生物产业领域的标准，是支撑生产方、第三方组织开展产品评价的技术依据。起草工作小组首先针对生产和检测开展了大量的调研工作。从满足实际检测需要出发，开展了国内外相关资料的收集和确认工作，资料的检索和信息的收集过程中，分析比较了大量的国内外文献方法，在符合标准化工作规划和标准化计划要求的基础上，初步形成了检测方法的制定思路, 期间参与人员也进行了多次交流和讨论。

3、标准起草完善过程

在广泛调查研究的基础上，标准起草单位组织相关技术人员对核糖核酸酶活力检测标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外核糖核酸酶活力的标准、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，分析了通过前期的实验摸索、反复论证，确定了本标准方法设定的一系列重要参数：其中包括底物浓度，酶活最适测定范围等指标参数，开展了实际样品的检测。然后依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《核糖核酸酶活力检测》标准开展了起草工作。于2016年3月中旬，起草工作小组完成了《核糖核酸酶活力检测》国家标准（草案）。2016年6月，在北京组织有关单位和专家分别召开了标准草案讨论会，重点对核糖核酸酶活力检测和流程提出了完善建议。同时对方法进行了验证，针对验证所出现的问题，在2016年11月11组织专家对标准逐字逐句进行了讨论完善，形成了《核糖核酸酶活力检测》国家标准征求意见稿。

# 五、国内外研究概况

目前国内外对于核糖核酸酶活力的检测方法主要有单相酶扩散法和紫外-可见分光光度法两种。其中单相酶扩散法其原理是当荧光染料溴化乙锭（Ethidium Bromide, EB）与RNA结合后可以形成一种荧光络合物，在紫外光照射下发出较强的荧光。在含有EB与RNA的琼脂板上打孔加样，孔中的RNase逐渐向周围扩散，水解琼脂板中的RNA形成水解环，在紫外透射仪下可见为不发荧光的暗环。在一定条件下水解环的大小与RNase的活力成正比。实验结果证明该方法重复性好，受外界环境影响小，但检测时间长，并且使用的EB染料具有较大的污染和安全隐患。研究表明，核糖核酸酶适用于紫外分光光度法检测其活力，核酸的最大吸收波长在260 nm，核酸降解后，由于碱基外露，碱基中电子的相互作用更有利于紫外吸收，因此吸光度会增加，即产生增色效应。通过在波长260 nm处吸光度A260nm值的改变来鉴定核酸酶的作用，可进一步对核酸酶的酶活力进行定量研究。故本标准采用紫外-可见分光光度吸收法，该方法不但重复性较好，而且反应时间短，并且没有污染，安全环保。

# 六、关键试验内容和技术指标说明

**6.1 分析方法及其条件的选择与优化**

**6.1.1 分析方法的选择**

根据文献调研和报道，核糖核酸酶适用于紫外分光光度法检测其活力，核糖核酸的最大吸收波长在260 nm，核糖核酸降解后，降解产物的吸光度会相应的增加，即产生增色效应。通过吸光度A260 nm值的改变来测定分析核糖核酸酶的活力作用，进而对核糖核酸酶的酶活力进行研究。

**6.1.2 反应条件的选择**

核糖核酸酶可以水解RNA上嘧啶残基的3′端和相邻核苷酸形成的磷酸二酯键，根据前期试验结果，本方法设定反应温度范围为25-75℃、反应时间范围为1-15分钟、反应pH值为3.0-7.0等，通过酶活力的测定分析确定最终体系的反应温度、反应时间和pH值。

**6.1.3 酶活力定义**

核糖核酸酶活力：以浓度为0.15 mg/mL的1.5 ml酵母RNA为底物，在50 ℃且pH 5.0的条件下，1分钟内使反应液在260 nm处吸光度增加0.001所需要的酶量为一个活性单位（U）。

**6.2 方法的建立**

**6.2.1 结果分析与计算**

按照式（1）计算：

 C（U/mg）=△A260×1000×稀释倍数 （1）

其中式中：

C——核糖核酸酶活力。

△A260——检测管与空白对照管在260 nm处测定得到的吸收值差。

1000——吸光度原值与活力规定中规定吸光度0.001的换算系数。

**6.3 方法特异性**

**6.3.1 标准曲线的制定**

由于RNA的分子量不固定，没有一个统一的恒定分子量，另外脱氧核糖核酸酶催化底物生成的物质也存在不确定性，所以无法参考常规酶活力的检测方法，即无法通过计算脱氧核糖核酸酶催化底物RNA生成的量来表示酶的活力，因此没有制定相应的标准曲线。

**6.3.2 仪器设备及器具**

恒温水浴槽。

紫外-可见分光光度计：吸光度精确至0.001。

pH计：精确至0.01。

1 cm 比色皿。

电子天平：精度为0.0001 g。

电子天平：精度为0.01 g。

**6.3.****3 溶液配置**

本方法所用试剂均为分析纯，除特殊说明外，实验用水为GB/T 6882规定的二级水。

（1）0.1 mol/L NaAc/HAc缓冲液，pH 5.0

称取8.20 g NaAc溶于水中，缓慢加入HAc调pH至5.0，混匀后定容至1000 mL。

（2）酵母核糖核酸

来源于圆酵母（Torula Yeast），含量≥98%。

**6.3.4 吸光值测定方法**

同一样本取4只离心管，设置空白对照管1只，检测管3只，其中空白管中依次加入酵母RNA溶液1.5 mL、水0.5 mL与NaAc/HAc缓冲液1.0 mL；检测管中依次加入酵母核糖核酸（RNA）溶液1.5 mL、待测酶液0.5 mL以及NaAc/HAc缓冲液1.0 mL。每个待测酶液设定三个重复即3个检测管，50 ℃恒温水浴反应时间为15 min，底物浓度、反应时间、反应温度等根据优化过程中的实际实验情况确定。

**6.3.5 结果记录与计算**

记录各个稀释倍数下各样品管在260 nm紫外光的吸收值A260，并计算与空白管的差值△A260。

**6.4 实验结论**

**6.4.1 底物浓度的确定**

酶促反应的底物浓度非常重要。低浓度的底物由于提供的底物不足，酶活力测定值偏小，并且由于吸光度值吸光度变化过小，往往是千分位上的变化，测定不准确。加大底物浓度，能提供足够的反应底物，催化反应速度增加，酶活力测定值也增大，但如果底物浓度过大，酶促反应将过于迅速，导致相对标准偏差增大，因此必须选择合适的底物浓度。不同RNA底物浓度所测得的核糖核酸酶活力值和相对标准偏差参见表1。由表中可见，该反应中核糖核酸酶催化的底物为酵母核糖核酸（RNA），底物浓度在0.070 mg/mL-0.175 mg/mL之间时，核糖核酸酶活力测得值随底物浓度的增加而显著增加。但超过0.15 mg/mL时，变化不显著，而且当底物浓度为0.15 mg/mL时，RSD最小为0.8%，因此底物浓度0.15 mg/mL时为最优浓度。后续的核糖核酸酶活力检测采用的底物酵母核糖核酸RNA浓度为0.15 mg/mL。

**表1 底物浓度对酶活力测定的影响（n=3）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 底物浓度（mg/mL） | 酶活力（U/mL） | RSD（%） |
| 0.075 | 78 | 2.1 |
| 0.100 | 96 | 1.3 |
| 0.125 | 108 | 0.9 |
| 0.150 | 132 | 0.8 |
| 0.175 | 138 | 1.5 |
| 0.200 | 144 | 2.2 |

**6.4.2 待测液酶活范围的确定**

核糖核酸酶活力的大小与多种因素有关，待测液酶的浓度也是其中重要的因素。由于酶促反应底物浓度是一定的，所以加入的待测酶溶液的酶活力浓度需要选择在比色的线性阶段。不同酶浓度对核糖核酸酶吸光度差值测定的影响参见图2，由图2显示结果可知，不同核糖核酸酶酶浓度对酶吸光度差值具有一定的影响，随着酶浓度的增加，核糖核酸酶的活力逐渐增强，当待测酶溶液的酶浓度在0.4-0.7 mg/mL之间有良好的线性关系，但是在0.4-0.5 mg/mL之间由于吸光值差值较低，相对标准偏差较大，因此建议测定时待测液的核糖核酸酶浓度确定为0.7 mg/mL。



**图2 不同酶浓度对酶吸光度差值测定的影响**

**6.4.3 反应温度的确定**

核糖核酸酶等酶的催化作用受温度的影响很大，一方面与一般化学反应一样，提高温度可以增加酶促反应的速度。通常温度每升高10 ℃，反应速度加快一倍左右，最后反应速度达到最大值。另一方面酶的化学本质是蛋白质，温度过高可引起蛋白质变性，导致酶的失活。因此，反应速度达到最大值以后，随着温度的升高，反应速度反而逐渐下降，以至完全停止反应。反应速度达到最大值时的温度称为某种酶作用的最适温度。高于或低于最适温度时，反应速度逐渐降低。但是，一种酶的最适温度不是完全固定的，它与作用的时间长短有关，反应时间增长时，最适温度向数值较低的方向移动。

通常测定酶的活性时，在酶反应的最适温度下进行。为了维持反应过程中温度的恒定，一般利用恒温水浴等恒温装置。酶对温度的稳定性与其存在形式有关。已经证明大多数酶在干燥的固体状态下比较稳定，能在室温下保存数月以至一年。溶液中的酶，一般不如固体的酶稳定，而且容易为微生物污染，通常很难长期保存而不丧失其活性，在高温的情况下，更不稳定。

不同反应温度对核糖核酸酶吸光度差值的影响参见图3，由图3可见不同反应温度对于核糖核酸酶的活力具有不同程度的影响，在反应温度25℃到75℃的范围内，酶活力呈现先升高后降低的趋势，差异显著性分析表明，45℃和55℃条件下酶活力差异不显著，结合国内外相关文献资料，本实验中确定核糖核酸酶活力的测定温度为50℃。



**图3 不同反应温度对酶吸光度差值测定的影响**

**6.4.4 反应时间的确定**



**图4 不同反应时间对酶吸光度差值测定的影响**

研究表明，即使在适宜的条件下酶的催化效率也不是一成不变的，酶在工作一段时间后会发生钝化现象，即催化能力下降、丧失。不同反应时间对核糖核酸酶吸光度差值的影响参见图4，由图4可见，随着反应时间的延长，酶活力呈现先升高然后进入平稳期、再升高最后下降的趋势，数据统计分析表明，酶体系反应15分钟的酶活力与反应1分钟、3分钟、5分钟和10分钟比较，均具有显著的差异，但是反应10分钟与1分钟、3分钟和5分钟的条件下，酶活力差异不显著，此外，酶活力在15分钟与20分钟和25分钟比较，差异不显著，并且有下降趋势，因此，综合考虑分析本实验中的结果，标准中确定核糖核酸酶活力测定反应时间为15分钟。

**6.4.5 反应pH值的确定**

反应体系pH值对于核糖核酸酶等酶的活力影响很大，其中相关机制很复杂，目前主要有下列几个方面。一是当pH过小（过酸）或者过大（过碱）都能使酶蛋白变性而失活；二是pH的改变能影响酶活性中心上必须基团的解离程度，同时也可以影响底物和辅酶的解离程度，从而影响酶分子对底物分子的结合和催化，只有在特定的pH下，酶、底物和辅酶的解离状态最适宜它们相互结合并发生催化作用，从而使酶反应速度达到最大值。因此，一般来讲酶的最适pH不是一个常数，它的大小与底物的种类和浓度、缓冲液的性质和浓度、介质的离子浓度、温度、反应时间等有关。



**图5 不同反应pH值对酶吸光度差值测定的影响**

 不同反应pH值对核糖核酸酶吸光度差值测定的影响参见图5。由图5可见，不同反应体系pH值对酶活力具有不同程度的影响，随着pH值的增加，酶活力呈现先下降再升高的趋势，尽管pH 7.0的条件下，核糖核酸酶活力高于pH 5.0条件下的活力，但是根据数据统计学分析，核糖核酸酶活力在pH 5.0和pH 7.0的条件下差异并不显著。因实验中选择的NaAc/HAc缓冲液pH 5.0，所以结合实验的可操作性、催化效率和失活速率，核糖核酸酶活力测定标准中确定酶活力测定体系的pH值为5.0。

# 七、验证情况及结果分析

采用本方法对市售公司核糖核酸酶产品A、B进行了活力检测，其结果如下。根据试验结果产品A、B的酶活分别为150 U/mg和161 U/mg。

# 八、标准属性的建议

本标准属于管理服务标准，建议作为推荐性标准批准发布。