

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

测序酶酶活及杂质检验方法

Assay method of sequencing enzymes activity and impurity

（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

深圳市标准化协会 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。

本文件由常州新一产生命科技有限公司提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：常州新一产生命科技有限公司、深圳华大基因科技有限公司、深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司、中国计量科学研究院、深圳华大基因生物医学工程有限公司。

本文件主要起草人：韩鸿雁、李冰娜、叶焱、陈庚文、张永卓、董莲华、薛志超、林梁。

测序酶酶活及杂质检验方法

1 范围

本文件描述了测序酶酶活及杂质检测方法的试剂或材料、试验步骤。
本文件适用于测序酶酶活及杂质的检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

测序酶 sequencing enzyme

用于高通量测序过程中的关键酶。

注：测序酶通常是对B家族DNA聚合酶进行蛋白改造得到，具有较弱的外切酶活性，对可逆阻断的dNTPs具有较高的聚合活性。在测序过程中，以待测序链为模板在引物链中每次引入一个正确的可逆阻断dNTP并产生相应的识别信号。

3.2

测序酶活性单位 activity unit of Sequencing enzyme

以3'端结合有引物的单链DNA做底物，在pH 7.90的1×测序酶反应缓冲液中，60℃条件下反应10min，掺入2nmol dNTP到底物链所需的酶量定义为一个活性单位。

3.3

杂质 impurity

影响底物的核酸内切酶。

4 缩略语

NC：阴性对照（negative control）

5 试剂或材料

5.1 水

分子生物等级水，无核酸酶。

5.2 聚合酶底物

两条长度不等的单链DNA，经过变性后，通过18nt的互补区退火杂交到一起，形成的全长为63碱基，3'端带有18个碱基退火引物的DNA。退火引物的3'端带有-OH，可作为聚合酶聚合延伸的起点。

5.3 10×测序酶反应缓冲液

100mM Tris-HCl (pH 7.9 @ 25 °C)，100mM MgCl₂，10mM DTT，500mM NaCl，工作终浓度为1X。

5.4 其他试剂

经过资质机构认可的厂家或供应商采购的试剂，包括10mM dNTP、0.5M EDTA、Qubit dsDNA HS Assay kit、pUC19 (1μg/μL)、Proteinase K (20mg/mL)、溴酚黄、DNA Marker III、1X TAE缓冲液、SYBR® Safe DNA Gel Stain。

5.5 耗材

1. 5mL微量离心管、PCR八联管、0.5mL PCR透明薄壁管、0.2mL PCR(薄壁)管。

5.6 仪器设备

移液器、小型掌上离心机、微量振荡器、PCR仪(或水浴锅)、Qubit仪、电泳仪。

6 试验步骤

6.1 酶活性检测

6.1.1 准备工作

6.1.1.1 用75%乙醇擦拭台面、移液器等。

6.1.1.2 PCR仪或水浴锅60℃预热,使用PCR进行热反应时,热盖温度设置65℃。

6.1.1.3 计时器设置倒计时10分钟,备用。

6.1.2 配制反应体系

将聚合酶底物、dNTP Mix、10×测序酶反应缓冲液、无核酶水按表1配制成酶反应体系,置于冰上备用。每个待检测样品设置3个实验组,3个阴性对照。

表1 反应体系配制

组分	单个反应体系(μL)
聚合酶底物(10uM)	6
dNTP Mix (10mM each)	3
10×测序酶反应缓冲液	2.5
无核酶水	10.5

6.1.3 待测样品稀释

将待测样品使用50%甘油进行稀释,稀释倍数根据待测样品浓度确定,样品稀释后浓度在0.05~0.15mg/mL。

6.1.4 酶促反应

6.1.4.1 在5.1.2中的实验组反应管中加入3μL稀释后的酶液,在阴性对照管中加入3μL无核酶水,混匀后,立即放置于已经预热的PCR仪或水浴锅中,计时器计时10分钟。

6.1.4.2 反应结束后,加入0.5M EDTA终止反应。

6.1.5 浓度检测

使用Qubit dsDNA HS Assay kit对聚合产物进行浓度测定。

6.1.6 酶活性计算

$$U = \frac{(\overline{C_T} - \overline{C_{NC}}) \times 30 \times D_f}{650 \times 2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

U ——单位体积酶活性,单位U/μL, KU/mL;

$\overline{C_T}$ ——实验组产物浓度的平均值,单位ng/μL,实验组内CV≤5%;

$\overline{C_{NC}}$ ——阴性对照组底物浓度的平均值,浓度范围在13~18ng/μL,实验组内CV≤5%;

$\overline{C_T} - \overline{C_{NC}}$ ——聚合产物的浓度,浓度范围在0~30ng/μL;

30 ——酶促反应的总体积,单位μL;

D_f ——稀释倍数;

650 ——1对碱基的平均分子量,单位道尔顿g/mol;

2 ——单位酶活1U为掺入2nmol dNTP到底物链所需的酶量；

6.2 核酸内切酶检测

5.2.1 配制反应体系

6.2.1.1 按表 2 配制核酸内切酶检测反应体系。

表 2 核酸内切酶检测反应体系

组分	测试组反应体系（μL）	NC 反应体系（μL）
pUC19（1μg/μL）	0.5	0.5
10×测序酶反应缓冲液	2.5	2.5
测序酶	5	0
无核酶水	17	22

- 6.2.1.2 混匀，瞬时离心后，将含待测样品的反应体系置于 PCR 中，37℃反应 4 小时。
- 6.2.1.3 反应结束后，向各反应管中加入 3 μL 20mg/mL 的 Proteinase K，震荡混匀，瞬时离心后，置于 PCR 仪中 58℃反应 30 分钟，终止反应。
- 6.2.2 电泳检测
- 6.2.2.1 待测物中加入溴酚黄，漩涡振荡离心。
- 6.2.2.2 对测试组样品和 NC 样品进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。
- 6.2.2.3 电泳电压：5V/cm~10V/cm，当溴酚黄条带迁移至距胶下缘约 0.5cm 可停止电泳。将凝胶置于 1×SYBR safe 染液中，摇床混匀染色 30 分钟，染色完成后用 1×TAE 冲洗一遍，然后置于凝胶成像系统中观察和拍照。
- 6.2.3 结果判断
- 目视测试组与NC条带无明显差异，则判定样品中无核酸内切酶；若测试组与NC条带不一致，则判定样品中含有核酸内切酶。