



中华人民共和国国家标准

GB/T 41799—2022

限制性核酸内切酶杂质检测方法

Assay method of restriction endonuclease impurity

2022-10-12 发布

2023-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂或材料	1
6 仪器设备	2
7 试验步骤	2
附录 A（规范性） 琼脂糖凝胶电泳	4

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国工具酶标准化工作组(SAC/SWG 11)提出并归口。

本文件起草单位：福建南生科技有限公司、通用生物(安徽)股份有限公司、夏禾(深圳)生物技术有限公司、厦门银祥集团有限公司、苏州坤琪生物科技有限公司、厦门中集信检测技术有限公司、上海鹰姿生命科技有限公司、雷谷(厦门)生物医药有限公司、北京化工大学、山东大学、安琪酵母股份有限公司、复旦大学、武汉科技大学、北京中天标科标准化技术研究院有限公司、厦门艾德生物医药科技股份有限公司。

本文件主要起草人：黄发灿、雍金贵、郑登忠、张志刚、陈劲春、陈秀兰、江锋、赵毅、钟江、朱力、姚娟、杨忠华、李超、许文来、王永成。

引 言

限制性核酸内切酶是一类识别双链 DNA 中特定核苷酸序列的 DNA 水解酶,以内切方式水解 DNA,产生 5'-PO₃ 和 3'-OH 末端。限制性核酸内切酶的作用底物是脱氧核糖核酸(DNA),其他核酸内切酶或核酸外切酶的污染会导致底物的降解或消失,降低其他核酸内切酶或核酸外切酶的污染是限制性核酸内切酶最重要的质量保证。制定限制性核酸内切酶杂质检测方法国家标准,用以推动该类工具酶的产业化,对于限制性核酸内切酶的生产和使用具有重要的意义。

限制性核酸内切酶杂质检测方法

1 范围

本文件描述了限制性核酸内切酶中污染其他核酸内切酶或核酸外切酶等杂质的检测方法。
本文件适用于限制性核酸内切酶杂质的检测。

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

限制性核酸内切酶 restriction endonuclease

以内切方式水解 DNA,产生 5'-PO₃ 和 3'-OH 末端,识别双链 DNA 中特定核苷酸序列的 DNA 水解酶。

3.2

杂质 impurity

影响核酸底物存在的其他核酸内切酶和核酸外切酶。

4 原理

由于 ΦX174 DNA 无 *Bam*H I 酶切位点,λDNA 有 5 个 *Bam*H I 酶切位点,完全酶解后产生 6 条谱带,它们的大小及核苷酸顺序均为已知。样品中无其他核酸内切酶污染,酶解产物在电泳板上形成的谱带与酶解时间过长、用酶过多无关。

由于 *Bam*H I 切开 DNA 双链产生一对黏性末端,其各有 5 个碱基失去互补碱基形成突出单链,其易受核酸外切酶作用丢失若干个碱基乃至形成平末端;如果将此 DNA 连接后再用 *Bam*H I 酶切,结果是无法切开。如果该位点是在外显子区或编码区,即意味其对应的氨基酸序列发生变化,乃至某些生物性状发生改变。例如质粒 pBR322 所含 *Bam*H I 识别位点是在其抗四环素基因上,如果使用被核酸外切酶污染的样品 *Bam*H I 过量长时程切割 pBR322,然后再连接闭环后重新转化受体菌,该菌在含四环素培养基上无法生长,而没有这样酶切的 pBR322 转化菌能够生长。又如质粒 pUC19 所含 *Bam*H I 位点居于编码 LacZ 的 α 互补肽上,若发生前述状况,就会导致该肽链的氨基酸序列变化,最终在含 IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基上由原本是蓝斑变成白斑。如果白斑数目占到总菌斑数的 10% 以上,就判定该样品已有核酸外切酶污染。

5 试剂或材料

5.1 λ 噬菌体脱氧核糖核酸(λDNA)。