



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 胶原蛋白酶活性及纯度检测方法

Assay method of collagenase activity and purity

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2024-10-6)

- XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前 言 .....	II
引 言 .....	III
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 实验步骤 .....	2
7 质量控制 .....	4

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：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/SWG11）提出并归口。

本文件起草单位：山东大学、华灿（厦门）生物医药有限公司、安徽盛美诺生物技术有限公司、惠州安博臣科技有限公司、深圳杉海创新技术有限公司、广东丸美生物技术股份有限公司、深圳市红瑞生物科技有限公司、夏禾（广州）光电生物科技有限公司、纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司、武汉新华杨生物股份有限公司、华惠海洋多糖生物技术（深圳）有限公司、武汉宏韧生物医药股份有限公司、北京健平金星生物医药有限公司、河南赛诺特生物技术有限公司、海南华研胶原科技股份有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司、深圳粒影生物科技有限公司、杭州纽龙生物科技有限公司、杭州纽龙日尚生物制品有限公司、福建赛福安全技术服务有限公司、夏禾（杭州）生物技术有限公司、福建南生科技有限公司、夏禾（深圳）生物技术有限公司、北京索莱宝科技有限公司、南生（厦门）分析检测有限公司、大田华灿生物科技有限公司、复旦大学、苏州大学、福建农林大学、上海交通大学、浙江农商大学、厦门大学。

本文件主要起草人：陈秀兰、王琰、黄发灿、刘晶琦、巫伟真、张嘉恒、冷军、江运秋、徐丽、孙云起、赖利先、张杨、邹检平、李三华、赵子方、翟源心、葛建敬、钱永常、来灿钢、黄秀娟、潘威、王振元、徐菲、王永明、李长得、郑登忠、郭延巍、赵超、钟江、朱力、冯雁、姚鹃、邢志刚、杨忠华、傅玲琳、刘斌、郑恬焯、黄恩铭、丁重辉、张永有、李超。

## 引 言

胶原蛋白酶（collagenase, EC3.4.24.3）是指在生理条件下能水解胶原蛋白三螺旋区域肽键的蛋白酶，包括动物源胶原蛋白酶和微生物源胶原蛋白酶。微生物源胶原蛋白酶来源于梭菌和弧菌，属M9家族的金属蛋白酶，其结构、催化机制和底物特异性类似。微生物源胶原蛋白酶已被广泛应用于生命科学研究中动物组织细胞解离、胶原蛋白降解、临床伤口清创、疤痕消除及食品工业胶原蛋白肽制备等。制定胶原蛋白酶活性及纯度检测方法的国家标准，用以促进生产和使用，对推动该类工具酶的产业化具有重要意义。

# 胶原蛋白酶活性及纯度检测方法

## 1 范围

本文件描述了微生物来源胶原蛋白酶活性及纯度的检测方法。  
本文件适用于微生物来源胶原蛋白酶活性及纯度的检测。

## 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实验方法。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 胶原蛋白酶 collagenase

在生理条件下水解胶原蛋白三螺旋区域肽键的蛋白酶。

### 3.2 胶原蛋白酶活力单位 activity unit of collagenase

以N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰基]-亮氨酸-甘氨酸-脯氨酸-丙氨酸(FALGPA)为底物，在 pH 7.5、25℃ 以及钙离子存在的条件下，每分钟降解1 μmol底物所需的酶量为1个活性单位。

## 4 原理

### 4.1 酶活性检测原理

FALGPA 是一种类似于胶原蛋白一级结构的合成多肽，可以被所有已知的胶原蛋白酶水解。胶原蛋白酶通过特异性水解FALGPA序列中的亮氨酸和甘氨酸之间的肽键，引起底物在 345 nm处的吸光值(OD<sub>345</sub>)下降，因此被广泛用于检测胶原蛋白酶的活性。

### 4.2 酶纯度检测原理

凝胶过滤层析法是根据蛋白质分子大小不同分离蛋白混合物的有效方法。由于凝胶过滤层析过程中不同大小的蛋白质在层析柱中的出峰位置不同，因此可通过积分峰面积确定目的蛋白的占比。

## 5 试剂或材料

### 5.1 水

符合GB/T 6682规定的二级水。

## 5.2 酶解缓冲液

称取 0.61 g 三羟甲基氨基甲烷（分析纯）、2.34 g 氯化钠（分析纯）、0.11 g 无水氯化钙（分析纯），溶于水中，用浓盐酸（分析纯）调至 pH 7.5，定容至 100 mL。

## 5.3 FALGPA 溶液

称取FALGPA粉末（≥97%纯度）9.54 mg完全溶解于10 mL酶解缓冲液至终浓度为2 μmol/mL，作为制备标准曲线的母液。准确称取FALGPA粉末4.77 mg完全溶解于10 mL酶解缓冲液至终浓度为1 μmol/mL，作为测定胶原蛋白酶活性的底物溶液。

## 5.4 供试品酶液制备

液体供试品准确量取，用酶解缓冲液稀释至合适浓度；固体供试品准确称取后溶于预冷的酶解缓冲液，制备合适浓度的酶液。

## 5.5 仪器设备

微孔板读板机（SpectraMax Plus 384）、96孔紫外可透微孔板、pH计、移液器、分析天平（万分之一）、AKTA purifier 10 快速蛋白液相色谱（fast protein liquid chromatography, FPLC）、GE Superdex 200 Increase10/300 GL 凝胶过滤层析柱。

# 6 实验步骤

## 6.1 酶活性检测

### 6.1.1 FALGPA 标准曲线制作

利用酶解缓冲液将标准曲线母液（即2 μmol/mL的FALGPA溶液）稀释不同倍数（表1）。用移液器吸取不同浓度的FALGPA溶液100 μL至96孔紫外可透微孔板，利用微孔板读板机测定吸光值OD<sub>345</sub>。以OD<sub>345</sub>对FALGPA浓度作图，通过拟合得到标准曲线。

表1 标准曲线中FALGPA的浓度梯度

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FALGPA终浓度（μmol/mL）	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2

### 6.1.2 酶促反应（25℃）

供试品利用酶解缓冲液稀释至合适浓度备用。利用移液器吸取 95 μL 底物溶液（即 1 μmol/mL 的 FALGPA 溶液）至 96 孔紫外可透微孔板中的对照组和实验组（表 2），并在可恒温微孔板读板机中平衡至 25℃。恒温结束后，向对照组加入 5 μL 酶解缓冲液，向实验组加入 5 μL 合适浓度的供试品酶液（表 2）。利用微孔板读板机的连续读数模式检测反应体系在 25℃下第 0、1、2、3 min 内在 345 nm 处的吸光值 OD<sub>345</sub>，确保 4 个数据点均在标准曲线的线性范围内，底物消耗量在 20%以内，总反应时间为 3 min。

表2 酶促反应配制表

试剂	对照组（μL）	实验组1（μL）	实验组2（μL）	实验组3（μL）
底物溶液	95	95	95	95

供试品	-	5	5	5
缓冲液	5	-	-	-
总体积	100	100	100	100

### 6.1.3 酶活计算

#### 6.1.3.1 单位体积中酶活性单位按公式（1）计算：

$$U_v = \frac{[(X_{EA} - X_{EB}) - (X_{CB} - X_{CA})] \times 0.1 \times df}{3 \times 0.005} \quad \text{-----(1)}$$

式中：

$U_v$  - 胶原蛋白酶活性（每单位体积），单位为酶活力单位每毫升（U/mL）；

$X_{EB}$  - 根据标准曲线计算求得实验组反应前 OD<sub>345</sub> 所对应的 FALGPA 浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）；

$X_{EA}$  - 根据标准曲线计算求得实验组反应后 OD<sub>345</sub> 所对应的 FALGPA 浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）；

$X_{CB}$  - 根据标准曲线计算求得对照组反应前 OD<sub>345</sub> 所对应的 FALGPA 浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）；

$X_{CA}$  - 根据标准曲线计算求得对照组反应后 OD<sub>345</sub> 所对应的 FALGPA 浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）；

0.1 - 酶促反应液总体积（mL）；

0.005 - 酶促反应液中供试品的加样量（mL）；

$df$  - 稀释倍数。

以平行样的平均值为最终的酶活性测定值，计算结果保留两位有效数字。

#### 6.1.3.2 单位质量中酶活性单位按公式（2）计算：

$$U_m = \frac{U_v}{C} \quad \text{-----(2)}$$

式中：

$U_m$  - 胶原蛋白酶活性（每单位重量），单位为酶活性单位每毫克（U/mg）；

$U_v$  - 胶原蛋白酶活性（每单位体积），单位为酶活性单位每毫升（U/mL）；

$C$  - 供试品浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）。

## 6.2 纯度检测

### 6.2.1 凝胶过滤层析缓冲液

称取 1.21 g 三羟甲基氨基甲烷以及 5.84 g 氯化钠溶于水中，用浓盐酸调至 pH 8.0，定容至 1000 mL。

### 6.2.2 供试品溶液

液体供试品利用预冷的凝胶过滤层析缓冲液稀释至 1 mg/mL。固体供试品准确称取 1 mg，溶于 1 mL 预冷的凝胶过滤层析缓冲液。所有样品过 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜备用。

### 6.2.3 蛋白 Marker 溶液

准备 Thyroglobulin ( $M_r$  669 kDa)、Ferritin ( $M_r$  440 kDa)、Conalbumin ( $M_r$  75 kDa)、Ovalbumin ( $M_r$  44 kDa)、Carbonic Anhydrase ( $M_r$  29 kDa)、Aldolase ( $M_r$  15.8 kDa)、Ribonuclease ( $M_r$  13.7 kDa)、Aprotinin ( $M_r$  6.5 kDa) 等不同分子量大小的蛋白 Marker ( $\geq 98\%$  纯度)。称取 1 mg 每种蛋白 Marker，溶于 1 mL 预冷的凝胶过滤层析缓冲液。所有样品过 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜备用。

### 6.2.4 凝胶过滤层析柱的准备

将GE Superdex 200 Increase10/300 GL预装柱连接于快速蛋白液相色谱系统（FPLC）上，以0.3 mL/min的流速将柱子平衡到凝胶过滤层析缓冲液中，平衡至少36 mL。注意在整个层析过程中系统的压力在预装柱所承受的耐压范围之内（<1.5 MPa）。

### 6.2.5 蛋白质 Marker 凝胶过滤层析

利用FPLC的自动进样系统将不同分子量的蛋白Marker溶液上样至平衡好的层析柱。利用ÄKTA purifier 10 FPLC系统配备的UNICORN 5.11软件对层析过程中蛋白质在280 nm处的紫外吸收值进行记录，获得不同分子质量的蛋白质Marker在凝胶过滤层析过程中的峰图曲线，以确定不同分子量蛋白Marker在层析过程中的出峰位置。

### 6.2.6 供试品溶液凝胶过滤层析

准确量取供试品溶液1 mL，利用FPLC的自动进样系统将供试品溶液上样至平衡好的层析柱。利用ÄKTA purifier 10 FPLC系统配备的UNICORN 5.11软件对层析过程中蛋白质在280 nm处的紫外吸收值进行记录，获得供试品在凝胶过滤层析过程中的峰图曲线。根据供试品中胶原蛋白酶的理论分子量并参考不同分子量蛋白Marker的出峰位置，确定供试品中胶原蛋白酶的出峰位置以及峰图曲线。

### 6.2.7 供试品中胶原蛋白酶的纯度计算

利用UNICORN 5.11软件的Evaluation工具对供试品紫外吸收峰图进行峰面积归一化分析。利用Evaluation工具栏的峰积分（Peak integrate）功能对供试品的紫外吸收峰图曲线进行自动积分，获得不同组分的峰面积。

供试品中胶原蛋白酶的纯度按公式（3）计算：

$$P = \frac{A_c}{A_T} \times 100\% \text{-----(3)}$$

式中：

$P$  - 供试品中胶原蛋白酶的纯度；

$A_c$  - 胶原蛋白酶峰面积；

$A_T$  - 总峰面积。

## 7 质量控制

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的10%。