



中华人民共和国国家标准

GB/T 44829—2024

Pf Ago 核酸内切酶活性检测方法

Assay method of *Pf* Ago endonuclease activity

2024-10-26 发布

2024-10-26 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 试验步骤 2

7 质量控制 7

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：交弘生物科技(上海)有限公司、菲鹏生物股份有限公司、南生(厦门)分析检测有限公司、夏禾(深圳)生物技术有限公司、厦门银祥集团有限公司、深圳市新产业生物医学工程股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、廊坊诺道中科医学检验实验室有限公司、交弘生物工程(上海)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、上海交通大学、复旦大学、山东大学、苏州大学、厦门大学、福建农林大学、厦门华夏学院。

本文件主要起草人：冯雁、李忠磊、黄发灿、郑登忠、孟媛、张志刚、杜凯、徐丽、胖铁良、赵毅、陈礼师、郭延巍、刘倩、潘威、叶星宇、孙鹏、钟江、陈秀兰、方正伟、于海岳、余欣、邓永江、朱力、张永有、刘斌、赵超、郑恬焯、黄恩铭、皱忠爱、潘排凤、黄海燕、苏静梅。

引 言

PfAgo 核酸内切酶能够在 5'磷酸化的 DNA 引导链(大于 15 nt)的引导下剪切与 DNA 引导链互补的靶标 DNA,剪切位点一般在 DNA 引导链 5'端开始的第 10 个和第 11 个碱基相对应的靶标 DNA 碱基之间。*PfAgo* 核酸内切酶的剪切功能不受靶标 DNA 和剪切位点相邻碱基序列的限制,对靶标 DNA 底物的活性较高,对靶标 RNA 底物也有一定活性。制定 *PfAgo* 核酸内切酶活性检测方法的国家标准,用以推动其产业化,对该类工具酶的生产和使用具有重要意义。

PfAgo 核酸内切酶活性检测方法

1 范围

本文件描述了 *PfAgo* 核酸内切酶活性的检测方法。
本文件适用于 *PfAgo* 核酸内切酶活性的检测。

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 191—2008 包装储运图示标志

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

***PfAgo* 核酸内切酶** *PfAgo endonuclease*

依托 DNA 引导链(guide DNA, gDNA)序列与靶标 DNA(target DNA, tDNA)序列碱基互补配对,继而特异识别并剪切靶标 DNA 的核酸内切酶。

3.2

***PfAgo* 核酸内切酶活性单位** activity unit of *PfAgo endonuclease*

在 25 μ L 反应体积中,95 $^{\circ}$ C 条件下,每分钟剪切 0.1 nmol 靶标 DNA 所需的酶量为一个活性单位(U)。

4 原理

依托 DNA 引导链序列与靶标 DNA 序列碱基互补配对,*PfAgo* 核酸内切酶能够在 5' 磷酸化的 DNA 引导链 (大于 15 nt) 的引导下剪切与 DNA 引导链互补的靶标 DNA,剪切位点常发生在 DNA 引导链与靶标 DNA 互补序列的靶标 DNA 第 10 位和第 11 位碱基之间的磷酸二酯键处。

5 试剂或材料

5.1 水

符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5.2 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)

称取 Tris 12.114 g,加入 80 mL 超纯水中,充分混匀后用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 8.0 ± 0.05 ,加入超纯水定容至 100.0 mL,并用 0.22 μ m 微孔滤膜对其过滤,2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 储存,有效期为 24 个月。