



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

体外诊断试剂原材料 核酸检测用酶 质量 评价方法

Raw materials for IVD reagent-Enzymes of nucleic acid testing-Quality evaluation
method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

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

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

体外诊断试剂原材料 核酸检测用酶 质量评价方法

1 范围

本文件描述了体外诊断试剂原材料中核酸检测用酶的质量评价方法。

本文件适用于对体外诊断试剂用原材料中核酸检测用酶的质量评价。

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 包装储运图示标志

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示） 第2部分：专业用体外诊断试剂
中华人民共和国药典 第三部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

Taq DNA 聚合酶

一种耐热DNA聚合酶，含有从*Thermus aquaticus*细菌克隆的全长Taq DNA聚合酶基因，催化DNA复制。

逆转录酶

以RNA为模板指导三磷酸脱氧核苷酸合成互补链DNA（cDNA）的酶。

尿嘧啶 DNA 糖基化酶

可催化水解含有dU的DNA单链或双链的尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架的N-糖苷键，释放游离尿嘧啶，由此产生的无碱基位点很容易被水解断裂。

核酸外切酶

在核酸水解酶中，是具有从分子链的末端顺次水解磷酸二酯键而生成单核苷酸作用的酶。

核酸内切酶

在核酸水解酶中，为可水解分子链内部磷酸二酯键生成寡核苷酸的酶。

核糖核酸酶

指能水解RNA磷酸二酯键的酶称核糖核酸酶。

4 质量评价要求

外观

肉眼观察应为澄清透明液体，无沉淀、浑浊和其他固体杂质。

酶活

规定Taq DNA 聚合酶、逆转录酶、尿嘧啶DNA糖基化酶、核酸外切酶、核酸内切酶和RNA酶的具体要求。

纯度

规定纯度要求。

4.1.1 杂质

规定宿主核酸残留要求，不含核酸内切酶、核酸外切酶和RNase。

4.1.2 功能性评价

使用企业参考品进行功能性检测，满足企业制定的检验规程要求。

4.1.3 原理

Taq DNA 聚合酶、逆转录酶和尿嘧啶DNA糖基化酶：使用PicoGreen染料对目的片段进行扩增，检测荧光信号增加强度。

核酸内切酶：pUC19质粒为环状超螺旋结构，核酸内切酶能破坏超螺旋结构，两者电泳谱带不一致。

核酸外切酶：核酸外切酶能够从多核苷酸链的末端开始按序催化水解磷酸二酯键，降解核苷酸，产生单核苷酸，以单链和双链的DNA为底物，若样品中存在核酸外切酶，电泳谱带会发生变化。

RNase：以荧光标记的RNA探针为底物，当待测样品中含RNase时，RNase降解底物RNA，荧光基团和淬灭基团分离产生荧光信号，通过荧光分析仪检测荧光信号的强弱可反映待测样品中的RNase残留情况。

5 评价方法

外观

在自然光下以正常视力或矫正视力目视检查。

酶活

5.1.1 实验步骤

反应体系的配制和分装。

在EP管中按照下列表的比例配制反应体系，配制完成后在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

表1. Taq DNA聚合酶酶活检测配制表

组分	体积
----	----

ddH ₂ O	至25μl
10×Taq缓冲液	5
dNTP	0.2 mM
M13模板/引物复合物	100 ng

将表1的反应液分装到96孔板中，分别加入25μl各浓度梯度的Taq DNA聚合酶，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

注：仪器设备、试剂、试剂溶液配制见附录A。

表2. Taq DNA聚合酶抗体酶活检测配制表

组分	体积
ddH ₂ O	至42μl
10×Taq缓冲液	5
M13模板/引物复合物	100 ng
dNTP	0.2 mM
Taq DNA聚合酶	100 mU

将表2的反应液分装到96孔板中，分别加入8μl各浓度梯度的Taq DNA聚合酶抗体，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

注：仪器设备、试剂、试剂溶液配制见附录B。

表3. 逆转录酶酶活检测配制表

组分	体积
ddH ₂ O	至30μl
5×逆转录缓冲液	12
PolyA/Oligo dT复合物	100 ng
dTTP	0.1 mM

将表3的反应液分装到96孔板中，分别加入30μl各浓度梯度的逆转录酶，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

注：仪器设备、试剂、试剂溶液配制见附录C。

表4. 尿嘧啶DNA糖基化酶酶活检测配制表

组分	体积
ddH ₂ O	至15μl
10×Taq缓冲液	2
UDNA	150 ng

将表4的反应液分装到96孔板中，分别加入5μl各浓度梯度的UDG酶，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

注：仪器设备、试剂、试剂溶液配制见附录D。

表5. RNase抑制剂活性检测配制表

组分	体积	备注
无RNA酶ddH ₂ O	至20μl	反应液
5×逆转录缓冲液	4	
RNaseA	0.25 ng	
RNase抑制剂浓度梯度	5 μl	单独加样
RNase probe	0.2 μM	单独加样

将表5的反应液分装到96孔板中，分别加入5 μ l各浓度梯度的RNase抑制剂，再加入RNase probe，贴好封口膜，在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

注：仪器设备、试剂、试剂溶液配制见附录E。

5.1.2 运行程序

72 $^{\circ}$ C孵育30 min，向反应产物中加入100 μ l PicoGreen染色液；用荧光酶标仪检测，激发波长为480 nm，发射波长为520 nm。

5.1.3 数据分析

以聚合酶活性单位(mU)的log值为横坐标，荧光强度为纵坐标，用GraphPad Prism5做非线性回归曲线。计算曲线的半最大效应浓度(EC50)，待测品的活性=标准品的EC50/待测样品的EC50 \times 标称活性。

5.1.4 纯度

按照《中华人民共和国药典》2020版通则0541“电泳法”的“SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法”测定，分离胶的胶浓度为12%，供试品加水制成浓度为1 mg/ml-2 mg/ml的溶液，点样10 μ l，考马斯亮蓝R250染色，经扫描仪扫描，纯度应符合企业规定要求。

核酸内切酶检测

5.1.5 反应体系的配制和分装

在EP管中按照下表的比例配制反应体系，配制完成后在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

表6. 核酸内切酶检测配制表

组分	体积
pUC19质粒DNA(300 ng/ μ l)	1
10 \times Taq缓冲液	1 μ l
ddH ₂ O	To 8 μ l

将上表6反应液分装到8联排中，分别加入2 μ l待测酶液，无RNA酶双蒸水对照盖好管盖，后涡旋混匀仪上混匀10s，掌上离心机上离心10s。

5.1.6 运行程序

37 $^{\circ}$ C孵育4 h，1%琼脂糖凝胶，电泳电压140-160V，当溴酚蓝线达到凝胶胶板2/3时停止电泳，取出凝胶置于凝胶成像仪上观察和拍照。

5.1.7 结果判定

以合格批次或其他厂家的标准酶为对照管，若测试管和对照管的电泳谱带一致，则判定样品中不含核酸内切酶；若不一致，则判定样品中含有核酸内切酶。

核酸外切酶检测

5.1.8 反应体系的配制和分装

在EP管中按照下表的比例配制反应体系，配制完成后在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

表7. 核酸外切酶检测配制表

组分	体积
ssDNA (50 μ M)	0.5 μ l
dsDNA (50 μ M)	0.5 μ l
10 \times Taq缓冲液	1 μ l
ddH ₂ O	To 8 μ l

将上表7反应液分装到8联排中，分别加入2 μ l待测酶液，无RNA酶双蒸水对照盖好管盖，在涡旋混匀仪上混匀10s，掌上离心机上离心10s。

5.1.9 运行程序

37 $^{\circ}$ C孵育4 h，12%尿素变性PAGE胶，电泳电压150V，40 min，取出凝胶用GelRed染色液染色后置于凝胶成像仪上观察和拍照。

5.1.10 结果判定

以合格批次或其他厂家的标准酶为对照管，若测试管和对照管的电泳谱带一致，则判定样品中不含核酸外切酶；若不一致，则判定样品中含有核酸外切酶。

RNase 检测

5.1.11 反应体系的配制和分装

在EP管中按照下表的比例配制反应体系，配制完成后在涡旋混匀仪上混匀10s,掌上离心机上离心10s。

表8. RNase检测配制表

组分	体积
无RNA酶双蒸水	至95 μ l
5 \times 逆转录缓冲液	20 μ l
RNase probe	0.2 μ M

将表8反应液分装到8联排中，分别加入5 μ l待测样品，无RNA酶双蒸水对照和阳性0.1 U/ml RNase A，盖好管盖，在涡旋混匀仪上混匀10s，掌上离心机上离心10s。

5.1.12 运行程序

37 $^{\circ}$ C孵育1 h，取90 μ l反应产物在酶标板（黑色）中进行荧光检测，激发波长为480 nm，发射波长为520 nm。

5.1.13 数据分析

计算待测品、阳性对照（RNaseA）与阴性对照（无RNA酶双蒸水）的荧光值比值，阳性对照荧光值应与阴性对照的比值为20-100实验有效。待测样品与阴性对照的比值 \geq 2视为检测出RNase残留。

5.1.14 宿主核酸残留

按照《中华人民共和国药典》2020版通则3407“外源性DNA残留量测定法”的定量PCR法进行测定，样品加标回收率应满足企业规定要求。

5.1.15 功能性评价

用质控合格的酶作为对照品，将对照品和测试品同时使用诊断试剂盒中配套试剂进行配制，做产品性能检测，使用企业参考品进行性能检测，检测结果符合企业规定要求。

6 包装、运输和贮存

包装

包装储运图示标志应符合GB/T 191的规定。包装容器应保证密封性良好，完整，无泄露，无破损。

运输

原料应按制造商的要求运输。在运输过程中，应防潮，防止重物堆压，避免阳光直射和雨雪浸淋，防止与酸碱物质接触，防止内外包装破损。

贮存

原料应在制造商规定条件下保存。

附 录 A
(规范性)
Taq DNA 聚合酶酶活检测

A.1 仪器设备

移液器、掌上离心机、微孔板离心机、涡旋混匀仪、PCR 仪、荧光分析仪。

A.2 试剂

M13 单链DNA: M13 mp18单链DNA

M13引物: 5' -AGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAACAACTAAAGGAATTGCG-3'

dNTP: 包括dATP, dGTP, dCTP, dTTP

PicoGreen染料

A.3 试剂溶液配制

1×TE溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (25℃)

10×Taq 缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.8 (25℃)

PicoGreen染色液: 按100 μL 1×TE+0.5 μL picogreen 体系配制工作液

Taq酶稀释缓冲液: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% Tween® 20

M13模板/引物复合物: 将M13mp18单链DNA同M13引物按摩尔比1:1混合, 在退火缓冲液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl) 中, 70℃加热5分钟后, 缓慢降至室温, 使模板引物退火。

Taq DNA聚合酶溶液梯度稀释: 根据标称的酶活, 使用Taq酶稀释缓冲液对Taq DNA聚合酶进行适当稀释, 如100 U/μl的酶溶液, 按照最大稀释倍数10倍, 最小移液体积5 μl的原则进行稀释, 稀释得到0-200 mU/μl的12个2倍稀释浓度梯度的酶液。

附录 B

(规范性)

Taq DNA 聚合酶抗体酶活检测

B.1 仪器设备

移液器、掌上离心机、微孔板离心机、涡旋混匀仪、PCR仪、荧光分析仪

B.2 试剂

M13 单链DNA: M13 mp18单链DNA

M13引物: 5'-AGCGGAGTGAGAATAGAAAAGGAACAACCTAAAGGAATTGCG-3'

dNTP: 包括dATP, dGTP, dCTP, dTTP

PicoGreen染料

B.3 试剂溶液配制

1×TE溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (25°C)

10×Taq 缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.8 (25°C)

PicoGreen染色液: 按100μL 1×TE+0.5μL Picogreen 体系配制工作液

Taq酶稀释缓冲液: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20

M13模板/引物复合物: 将M13mp18单链DNA同M13引物按摩尔比1:1混合, 在退火缓冲液(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl)中, 70°C加热5分钟后, 缓慢降至室温, 使模板引物退火。

Taq DNA聚合酶抗体溶液梯度稀释: 根据标称的酶活, 使用Taq酶稀释缓冲液对Taq DNA聚合酶抗体进行适当稀释, 如100 U/μl的抗体溶液, 按照最大稀释倍数10倍, 最小移液体积5 μl的原则进行稀释, 稀释得到0-25 mU/μl的12个2倍稀释浓度梯度的抗体溶液。

附 录 C
(规范性)
逆转录酶酶活检测

C.1 仪器设备

移液器、掌上离心机、微孔板离心机、涡旋混匀仪、PCR仪、荧光分析仪

C.2 试剂

PolyA : Poly (A) RNA

Oligo dT 18: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

PicoGreen染料 (Vazyme)

C.3 试剂溶液配制

1×TE溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (25°C)

5×逆转录缓冲液: 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8.3 (25°C)

PicoGreen染色液: 按100μL 1×TE+0.5μL picogreen 体系配制工作液

逆转录酶稀释缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.01% NP-40, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 20% 甘油, pH 7.5 (25°C)

PolyA/Oligo dT复合物: 将PolyA RNA同Oligo dT18按摩尔比1:1混合, 室温孵育1 h。

逆转录酶溶液梯度稀释: 根据标称的酶活, 使用逆转录酶稀释缓冲液对逆转录酶进行适当稀释, 如800 U/μl的逆转录酶溶液, 按照最大稀释倍数10倍, 最小移液体积5 μl的原则进行稀释, 稀释得到0-800 mU/μl的12个2倍稀释浓度梯度的酶溶液。

附 录 D
(规范性)
尿嘧啶 DNA 糖基化酶酶活检测

D.1 仪器设备

移液器、掌上离心机、微孔板离心机、涡旋混匀仪、PCR仪、荧光分析仪

D.2 试剂

D.2.1 UDNA-F : TCTTCGTTTCATCTATCGGATCGCCACACTC

D.2.2 UDNA-R : GATGACGCATCCTCACGATAATATCCGG

D.2.3 dUTP mix: 包括dATP, dGTP, dCTP, dUTP各10 mM

D.2.4 PicoGreen染料

D.3 试剂溶液配制

1×TE溶液: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (25°C)

10×Taq 缓冲液: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.8 (25°C)

PicoGreen染色液: 按100μL 1×TE+0.5μL picogreen 体系配制工作液

UDG酶稀释缓冲液: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% Tween® 20

UDNA制备

反应体系

试剂	体积 (μl)
DDW	to 50
10×Taq缓冲液	5
dUTP mix	1
UDNA-F (10μM)	2
UDNA-R (10μM)	2
Lamda DNA (1ng/μl)	1
Taq DNA聚合酶 (5U/μl)	2.5

反应程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 35cycles; 72°C 7 min

UDNA纯化和检测: 用DNA Clean Beads磁珠 (Vazyme)对PCR产物进行纯化, 纯化后的产物用Qubit测定浓度, 分装后于-20°C保存。

UDG酶溶液梯度稀释: 根据标称的酶活, 使用UDG酶稀释缓冲液对UDG酶进行适当稀释, 如50 U/μl的酶溶液, 按照最大稀释倍数10倍, 最小移液体积5 μl的原则进行稀释, 稀释得到0-100 mU/μl的12个2倍稀释浓度梯度的酶液。

参 考 文 献

- [1] YY/T 1579-2018 体外诊断医疗器械 体外诊断试剂稳定性评价
- [2] 2019新型冠状病毒抗原/抗体检测试剂注册技术审评要点（试行）