

# T/CITS

团 体 标 准

T/CITS 653—2025

## 蛋白试剂纯度分级

Purity grading of protein reagents

2025 - 11 - 05 发布

2025 - 11 - 05 实施

## 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 纯度等级及分级指标 .....	1
4.1 纯度等级 .....	1
4.2 分级指标和标准 .....	2
5 试验方法 .....	2
5.1 杂蛋白含量 .....	2
5.2 形式正确的目标蛋白含量 .....	2
5.3 内毒素水平 .....	2
5.4 微生物污染源 .....	2
5.5 宿主蛋白残留和酶残留 .....	3
5.6 宿主 DNA 残留 .....	3
5.7 金属元素 (Ni) 残留 .....	3
5.8 乙腈残留 .....	3
5.9 蛋白 A 残留 .....	3
附录 A (规范性) 高效尺寸排阻色谱-多角度静态光散射法 (SEC-MALS 法) .....	4
A.1 原理 .....	4
A.2 仪器设备 .....	4
A.3 试剂 .....	4
A.4 分析条件 .....	4
A.5 操作步骤 .....	5
附录 B (规范性) 无菌检测方法 .....	5
B.1 仪器设备 .....	6
B.2 试剂耗材 .....	6
B.3 阳性对照菌液 .....	6
B.4 物品传递规则 .....	6
B.5 供试品检查 .....	6
B.6 阴性对照 .....	6
B.7 阳性对照 .....	6
B.8 培养及结果观察 .....	7
B.9 实验有效性判断 .....	7
B.10 实验结果判断 .....	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。

本文件由北京义翘神州科技股份有限公司提出。

本文件由中国检验检测学会归口。

本文件起草单位：北京义翘神州科技股份有限公司、北京索莱宝科技有限公司、喀斯玛（北京）科技有限公司、上海碧云天生物技术有限公司、南开大学、北京百普赛斯生物科技股份有限公司、亲和（武汉）生命科技有限责任公司、江苏凯基生物技术股份有限公司、上海银海圣生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陈宇宁、王旭曼、詹志强、马玉岭、王芳、李红林、李珊珊、张晓丹、陈幸苗、周浩、苗景赞、占园、禾立春、孙益军、江泉。

## 引 言

蛋白是具有多种生物学功能（催化、免疫识别、信号传递等）的生物大分子，是生命科学研究、检测疾病标志物和开发靶向治疗策略的重要工具，也是生物医药研发的基石。蛋白试剂是通过提取或重组表达的方法获得的可代表天然蛋白生物学性质的大分子试剂，在基础研究、临床诊断、药物开发和工业应用等方面发挥着关键作用，为科学研究和生物医药领域的创新提供了重要工具。现阶段，蛋白试剂主要通过生物体组织提取或重组DNA技术由宿主细胞异源表达制备，并通过色谱层析技术纯化得到。蛋白试剂的质量控制（质控）涉及多个方面，包括稳定性、纯度、活性、污染控制和储存运输等，是确保其稳定性、重复性和可靠性的重要环节。由于蛋白试剂性质的多样性以及来源的复杂性，在生产、储存和使用过程中，蛋白试剂的质控面临诸多挑战，需要通用性和代表性的质控标准来考核蛋白试剂的品质。

蛋白纯度（Protein Purity）指的是蛋白试剂样品中目标蛋白的比例，即目标蛋白相对于总蛋白的含量。蛋白纯度对生命科学研究、生物技术和生物医药等领域至关重要，主要体现在（1）确保实验结果的准确性；（2）保障生物制品的安全性和有效性；（3）提高结构研究的成功率和结构准确性；（4）保障工业和诊断应用的准确性等。在标定过程中，亦可反映出一些其他杂质（如核酸、内毒素、金属元素等）的含量，从而进一步明确蛋白试剂适合的使用场景。

目前行业中没有关于蛋白试剂纯度分级的统一标准，不同的供应商和实验室可能会使用不同的分级标准，直接影响实验结果的准确性和临床应用的一致性。建立一个统一的纯度分级标准有助于推动蛋白生产过程的标准化，确保不同批次的蛋白试剂具有一致的质量，减少批间差异，增强蛋白试剂的市场竞争力，保障研究成果的准确性。在本文件的起草过程中，我们综合考虑了当前的科研需求、生产工艺、质量控制技术以及国际相关标准，确保标准的科学性、实用性和前瞻性。我们期望通过本文件的实施，能够为蛋白试剂的纯度评价提供明确指导，为生物医学的进步贡献力量。

# 蛋白试剂纯度分级

## 1 范围

本文件界定了蛋白试剂的术语和定义，规定了蛋白试剂的纯度等级和分级指标，并描述了分级指标的试验方法。

本文件适用于研发和生产阶段的蛋白试剂的纯度分级。

本文件不适用于抗体药物或治疗用蛋白药物的纯度分级。

## 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 5009.268—2025 食品安全国家标准 食品中多元素的测定  
《中华人民共和国药典》（2025版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**蛋白试剂** protein reagents

通过应用重组表达技术制备或由天然体系经过提取和纯化等步骤制备的具有生物学活性的蛋白质。

注：此类试剂可应用于生物药研发、细胞免疫治疗及诊断试剂的研发生产等，但不能直接应用于人体。

### 3.2

**蛋白分子量** molecular weight of protein

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接形成的多肽链，其分子量是所有氨基酸质量的总和减去肽键形成过程中失去的水分子质量。

注：蛋白质的分子量通常以道尔顿（Dalton, Da）或千道尔顿（kDa）为单位表示，参考《生物化学原理》，第四版，第三章。

### 3.3

**蛋白形态** protein formation

蛋白质在天然状态下的存在形式，蛋白的形态/结构决定蛋白的正确功能。

注：蛋白在天然状态下可以多种形式存在，如单体、同源二聚体、异源二聚体、三聚体和多聚体等。

### 3.4

**杂蛋白** protein contaminants

纯化后产品中除目标蛋白的其他蛋白。

### 3.5

**纯度** purity

蛋白试剂中具有正确分子量和/或正确形式的目标蛋白质的含量。

注：主要反映了产品中目标蛋白与其他杂蛋白的相对量关系。根据检测方法，也可反映出产品中是否存在其他与蛋白活性无关的杂质，如核酸、内毒素、金属元素等的残留水平。

## 4 纯度等级及分级指标

### 4.1 纯度等级

本文件中所涉及蛋白试剂的纯度按照具有正确形式的目标蛋白含量分为以下级别：

a) 初纯品：经过某种纯化方法从天然组织中提取或细胞培养体系中提纯，通过电泳法染色（如考马斯亮蓝法染色或银染）鉴定，除目的蛋白条带以外，含有一定量杂质蛋白；

- b) 中纯品：经一步或多步提纯，通过电泳法染色（如考马斯亮蓝法染色或银染）鉴定，目标蛋白纯度比初纯品高，但仍然含有少量杂质蛋白；
- c) 电泳高纯品：经过多步骤纯化，通过电泳法染色（如考马斯亮蓝法染色或银染）鉴定，分子量正确的目标蛋白组分含量高；
- d) 色谱高纯品：经过多步骤纯化，经过电泳法染色（如考马斯亮蓝法染色或银染）鉴定和高效液相色谱法鉴定，分子量和形式正确目标蛋白组分占比高（形式正确目标蛋白指具有正确折叠结构和聚集形式的完整蛋白）；
- e) 超纯品：经过多步骤纯化，经过电泳法染色（如考马斯亮蓝法染色或银染）鉴定和高效液相色谱法鉴定，蛋白分子量和形式正确的目标组分占比高，该纯度级别中部分蛋白试剂满足低内毒素水平（如低于 10 EU/mg 或 1 EU/mg）指标；
- f) 特级纯：蛋白纯度最高等级，蛋白分子量和形式正确的目标组分纯度高，杂蛋白和其他类型的杂质含量极低。

#### 4.2 分级指标和标准

蛋白试剂的分级指标应符合表1要求。

表 1 蛋白试剂分级指标和标准

项目	分级					
	初纯品	中纯品	电泳高纯品	色谱高纯品	超纯品	特级纯
杂蛋白含量/%	>30	<20	<10	<10	<5	<5
形式正确目标蛋白含量/%	-	-	-	>90	>95	>95
内毒素水平/(EU/mg)	-	-	-	-	<10（部分适用）	<10
微生物污染源	-	-	-	-	无菌	无菌，无支原体污染
宿主蛋白（HCP）残留/ （μg/mg）	-	-	-	-	-	<0.5
宿主DNA（HCD）残留 /(pg/mg)	-	-	-	-	-	<100
金属元素（Ni）残留/(μg/g)	-	-	-	-	-	<1
蛋白A残留	-	-	-	-	-	阴性
乙腈残留/(μg/g)	-	-	-	-	-	<4
酶残留	-	-	-	-	-	阴性

### 5 试验方法

#### 5.1 杂蛋白含量

杂蛋白含量通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE法）进行标定，方法按照《中华人民共和国药典》（2025年版）通则<0541>“电泳法-第五法”。

#### 5.2 形式正确的目标蛋白含量

形式正确目标蛋白含量通过高效尺寸排阻色谱法（SEC-HPLC法）或者高效尺寸排阻色谱-多角度静态光散射法（SEC-MALS法）进行检测。高效尺寸排阻色谱法（SEC-HPLC法）的检测方法按照《中华人民共和国药典》（2025年版）通则<0512>“高效液相色谱法”。高效尺寸排阻色谱-多角度静态光散射法（SEC-MALS法）详见附录A。

#### 5.3 内毒素水平

内毒素水平检测方法按照《中华人民共和国药典》（2025版）通则<1143>“细菌内毒素检查法-凝胶法”。

#### 5.4 微生物污染源

微生物污染源分为无菌检测和支原体检测。无菌检测按照附录B的方法开展。支原体检测方法按照《中华人民共和国药典》（2025版）通则<3301>“支原体检测法”。

### 5.5 宿主蛋白残留和酶残留

酶残留主要检测用于除去蛋白标签的蛋白水解酶纯化后的残留含量,针对此类酶均已开发酶联免疫检测试剂盒,故宿主蛋白残留和酶残留量按照《中华人民共和国药典》(2025版)通则<3429>“免疫化学法-标记免疫化学法-第一法 酶联免疫吸附法”进行检测。宿主蛋白检测均使用商品化检测试剂盒完成,标准品为试剂盒自带内参标准品。

### 5.6 宿主 DNA 残留

宿主DNA残留量按照《中华人民共和国药典》(2025版)通则<1001>“聚合酶链式反应法”进行检测。

### 5.7 金属元素(Ni)残留

金属元素(Ni)残留量按照GB 5009.268—2025第一法或《中华人民共和国药典》(2025版)通则<0412>“电感耦合等离子体质谱法”进行检测。

### 5.8 乙腈残留

乙腈残留量按照《中华人民共和国药典》(2025版)通则<0521>“气相色谱法”进行检测。

### 5.9 蛋白 A 残留

蛋白A残留量按照《中华人民共和国药典》(2025版)通则<3429>“酶联免疫法”进行检测。

## 附录 A (规范性)

### 高效尺寸排阻色谱-多角度静态光散射法 (SEC-MALS 法)

#### A.1 原理

高效尺寸排阻色谱-多角度静态光散射法 (SEC-MALS法) 是一种用于精确测定蛋白质分子量和聚集形式的分析方法, 特别适用于对分子量分布有要求的蛋白质试剂的纯度分析。与传统的分子量测定方法相比, SEC-MALS法提供了更高的分辨率和准确度, 能够更加精确地量化目标蛋白的分子量和聚集形式。此方法的原理参考《中华人民共和国药典》(2025年版三部) 通则<3122>和《中华人民共和国药典》(2025年版三部) 通则<0514>。

#### A.2 仪器设备

A.2.1 HPLC系统。

A.2.2 MALS多角度光散射检测器 (含示差折光检测器)。

A.2.3 亲水硅胶高效分子排阻色谱柱。

A.2.4 高效液相色谱保护柱。

A.2.5 电子天平。

A.2.6 磁力搅拌器。

A.2.7 离心机。

A.2.8 pH计。

A.2.9 真空抽滤装置。

#### A.3 试剂

A.3.1 SEC-MALS流动相 (200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM Arginine, 1% 异丙醇, pH= 6.5)

称取 23.996 g 磷酸二氢钠及 17.42 g 精氨酸于 1 000 mL 烧杯内, 约 950 mL 超纯水溶解, 用超纯水定容至 1 000 mL, 浓盐酸调pH为 6.5。用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后, 加入 10 mL 的异丙醇 (色谱级), 摇匀, 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存放置, 保存时间不可超过 2 天。

A.3.2 磷酸盐保存液

称取 14.20 g 磷酸氢二钠和 14.20 g 硫酸钠于 1 000 mL 烧杯内, 约 490 mL 超纯水溶解, 浓磷酸调pH至 6.7 后定容至 1 000 mL。用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后, 摇匀, 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存放置。

A.3.3 清洗液 (10%异丙醇水溶液)

取 50 mL 异丙醇 (色谱级), 加超纯水定容至 500 mL, 混匀。

A.3.4 储存液 (20%甲醇水溶液)

取 100 mL 甲醇 (色谱级), 加超纯水定容至 500 mL, 混匀。

A.3.5 标准品 (2mg/mL BSA溶液)

称取 20 mg 的BSA粉末, 溶解在 20 mL 的SEC-MALS流动相中, 混匀。

#### A.4 分析条件

分析条件见表A.1。

表 A.1 分析条件

流动相	SEC-MALS流动相
保存液	磷酸盐保存液
流速	0.5 mL/min
柱温	25 °C
分析时长	30 min
检测波长	UV 280 nm
示差温度	35 °C
激光温度	25 °C
进样量	100 µg~200 µg

## A.5 操作步骤

### A.5.1 样品准备

将样品充分混匀后放到低温离心机中,在 4 °C 下使用大于 9 000 rpm 转速条件高速离心 10 min。

### A.5.2 设备准备

开启HPLC和MALS设备,开启工作站软件,将管线内缓冲液置换成为SEC-MALS流动相,排尽管线中气泡后,安装色谱柱并打开示差折光检测器冲洗阀。

### A.5.3 平衡色谱柱

待静态光检测器的信号噪音值稳定在十万分之五以下后,关闭示差折光检测器冲洗阀,打开二极管阵列检测器(DAD)和示差折光检测器,平衡 20 min 后待紫外(UV)及示差基线平稳后(若 20 min 后UV及示差基线未平稳,应继续平衡,待基线平稳)进样分析。

### A.5.4 进样分析

根据测试样品的浓度确定进样体积。进样量 100 µg~200 µg,当计算进样体积超过 100 µL时,以 100 µL 体积进样。分析样品前,应进样 2 针BSA,确保系统适用性,分析结束后应进样 1 针BSA,确保系统稳定性。

### A.5.5 结束操作

分析结束后,将SEC-MALS流动相换为磷酸盐保存液以 0.5 mL/min 的流速保存柱子 40 min,卸柱并正确放置。将磷酸盐保存液换成清洗液,以 0.5 mL/min 的流速清洗管道 40 min(约 20 个柱体积),后使用纯水以 0.5 mL/min 的流速清洗管道 40 min。将纯水换成 25%甲醇水溶液,以 0.5 mL/min 的流速保持 40 min 后停止设备运行。

### A.5.6 数据处理

基线:选择第11个角度90°方向的激光信号(LS 11-90°)进行设备基线校准,并调整示差紫外比(dRI/UV)的信号;调整基线端点,保证基线水平。

峰积分:选择积分区域,输入示差折光增量或紫外消光系数进行标定。

数据导出:以图片或其他数据格式导出数据。

### A.5.7 结果分析

三针标准品的系统适用性实验(SST)结果必须符合重现性;三针标准品的纯度及分子量相对标准偏差(RSD)小于 2%;三针标准品的分子量与真实值相差小于 5%;满足以上即为有效测试,对测试样品曲线按“积分参数”进行积分,只积聚集体、纯度以及片段。制剂组份产生的峰信号不进行积分计算。

## 附录 B (规范性) 无菌检测方法

## B.1 仪器设备

B.1.1 立式高压蒸汽灭菌器。

B.1.2 集菌仪。

B.1.3 培养箱。

B.1.4 生物安全柜。

B.1.5 超净工作台。

## B.2 试剂耗材

### B.2.1 稀释液

0.1 %蛋白胨水溶液、无菌氯化钠—蛋白胨缓冲液 (pH= 6.5) 和 0.9 %无菌氯化钠溶液。

### B.2.2 培养基

商品化的胰酪大豆胨液体培养基、硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨琼脂培养基。

### B.2.3 实验耗材

无菌移液管、无菌试管、集菌培养器、剪刀、电动移液器和无菌平皿等。

## B.3 阳性对照菌液

### B.3.1 选择标准

阳性对照试验的菌液选择标准如下：

- 无抑菌作用及抗革兰阳性菌为主的供试品，以金黄色葡萄球菌为对照菌；
- 抗革兰阴性菌为主的供试品以大肠埃希菌为对照菌；
- 抗厌氧菌为主的供试品，以生孢梭菌为对照菌；
- 抗真菌为主的供试品，以白色念珠菌为对照菌。

### B.3.2 菌液制备

根据菌株说明将工作菌株用 1.3 mL 或者 2.6 mL 菌株复溶液溶解，备用。

## B.4 物品传递规则

实验人员按实验需求准备好样品、耗材等实验所需物品后，先将物品进行表面清洁和使用 75 %乙醇消毒，后放入洁净层流罩风淋 10 min。随后，将物品转移至传递窗内，开启传递窗紫外灯进行至少 30 min 的表面消毒。

## B.5 供试品检查

取供试品用全封闭的集菌培养器直接过滤，或混合至含适量稀释液的无菌容器中再过滤至三个滤器中，用适宜的冲洗液进行冲洗 1 次。向集菌培养器的其中 2 份滤器分别加入 100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基，另 1 份滤器加入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基。

## B.6 阴性对照

做供试品无菌检查时，取相应溶剂和稀释液、冲洗液同法操作，作为阴性对照。阴性对照应无菌生长。

## B.7 阳性对照

根据方法适用性试验结果选择阳性对照试验的菌株（见B.3.1），取每种培养基规定接种的供试品总量，采用薄膜过滤法过滤，冲洗，在最后一次的冲洗液中加入 100  $\mu$ L 的菌液，加菌量不大于 100 CFU/mL，过滤。置规定温度培养，培养时间不超过 5 天，应生长良好。

阳性对照接菌量计算方法：取胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA平皿），加入 100  $\mu\text{L}$  菌液，涂布棒涂抹均匀，倒置放置在 35  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 3 天~5 天，逐日观察并记录平板上菌落数。每种菌涂两个平板，接菌量按平均值计算，所有试验菌应进行接菌量计数。

#### B.8 培养及结果观察

将上述接种供试品后的培养基容器分别按各培养基规定的温度培养不少于 14 天（将接种供试品的硫乙醇酸盐流体培养基集菌培养器分成两等份，其中一份硫乙醇酸盐流体培养基置于 30  $^{\circ}\text{C}$ ~35  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养，另一份硫乙醇酸盐流体培养基同胰酪大豆胨液体培养基一起置于 20  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养）。培养期间应定期观察并记录是否有菌生长。如在加入供试品后或在培养过程中，培养基出现浑浊，培养 14 天后，不能从外观上判断有无微生物生长，可取该培养液不少于 1 mL 转种至同种新鲜培养基中，将原始培养物和新接种的培养基继续培养不少于 4 天，观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。

#### B.9 实验有效性判断

当阳性对照管生长良好，阴性对照管无菌生长时，实验有效。当出现阳性对照管生长状态不好或（和）阴性对照管有菌生长时，实验无效。

#### B.10 实验结果判断

在有效实验中，若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，判供试品符合规定；若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，判供试品不符合规定。

---