**ICS** 65.020.20

**CCS** B 38

**团体标准**

T/FDSA XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|       |

生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法

Detection of RNase residues in biological products - Nucleic acid fluorescence substrate method

|  |
| --- |
| （征求意见稿） |
|  |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国食品药品企业质量安全促进会  发布

目 次

[前言 II](#_Toc173403567)

[1 范围 1](#_Toc173403568)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc173403569)

[3 术语和定义 1](#_Toc173403570)

[4 原理 1](#_Toc173403574)

[5 试剂和材料 1](#_Toc173403575)

[6 仪器和设备 2](#_Toc173403580)

[7 分析步骤 2](#_Toc173403585)

[8 结果分析 3](#_Toc173403589)

[8.1 定性分析 3](#_Toc173403590)

[8.2 定量分析 3](#_Toc173403591)

[8.3 定量限 3](#_Toc173403592)

[8.4 重复性 3](#_Toc173403593)

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。

请注意本文件中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。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会提出并归口。

本文件起草单位：武汉瀚海新酶生物科技有限公司、国家药品监督管理局疫苗及生物制品质量监测与评价重点实验室、中生复诺健生物科技（上海）有限公司、江苏申基生物科技有限公司、苏州艾博生物科技有限公司、北京引正基因科技有限公司、深圳市晋百慧生物有限公司、惠正奇医药（广州）有限公司、广州正达医药科技有限公司、百奥泰生物制药股份有限公司、深圳深信生物科技有限公司。

本文件主要起草人：杨广宇、耿玉杰、李梁、严壮、陆家海、叶宇翔、武飞飞、竺添、沈明云、顾文艺、于磊、黄贤明、梅雄、李文华。

生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法

范围

本标准规定了使用核酸荧光底物法测定生物制品中核糖核酸酶残留量检测的方法。

本标准适用于使用核酸荧光底物法测定生物制品中核糖核酸酶残留量检测。

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对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

术语和定义

核糖核酸酶　ribonuclease，RNase

水解核糖核酸（RNA）中磷酸二酯键，生成寡核苷酸或单核苷酸的核酸酶

核糖核酸酶 A　 ribonuclease A，RNase A

水解单链或双链RNA，产生具有5’-磷酸末端的单核苷酸或寡核苷酸的核酸内切酶。

核糖核酸酶 A活力单位 activity unit of ribonuclease A

以酵母RNA为底物，在37°C和pH 5.0条件下，1min内使反应液在260 nm处的吸光度增加1.0所需的酶量。

注：一个酶活单位以U表示。

原理

试样与核酸荧光底物一起孵育，试样中残留的RNase催化核酸荧光底物分解，降解产物在对应波长的激发下会发出荧光，通过荧光检测器检测，外标法定量，测定RNase的含量。

试剂和材料

水

符合GB/T 6882规定的二级水。

0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(Tris-HCl)缓冲液，pH7.6

精密称取12.12g Tris-base，缓慢加入HCl调pH至7.6（25℃），混匀后定容至1000mL。高温高压灭菌，根据每次测试量分装，于-20℃放置储存。

0.01mol/L 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶液(Tris-EDTA)缓冲液，pH8.0

精密称取0.61g Tris-base，0.19g EDTA-2Na·2H2O，溶于水中，缓慢加入NaOH或HCl调pH至8.0（25℃），混匀后定容至1000mL。高温高压灭菌，根据每次测试量分装，于-20℃放置储存。

核酸荧光底物

人工合成的RNA，带有荧光基团和淬灭基团，其中荧光基团的激发和发射波长为Ex/Em=535nm/575nm。干粉形式的核酸荧光底物于-20℃避光储存。

仪器和设备

实验室常规设备及以下各项：

* + 1. 多功能酶标仪或定量PCR仪，配对应波长的荧光检测器；
		2. 电子天平：精度0.01g或0.0001g；
		3. pH计：精度为0.01；
		4. 恒温水浴锅：精度0.1℃。

分析步骤

环境要求

所有试验操作均应在洁净的无外源RNase环境中进行。

所有试验操作均应使用洁净的无外源RNase耗材。

试验溶液的制备

核酸荧光底物溶液

将干粉状核酸荧光底物用Tris-EDTA缓冲液溶解，并稀释至100μmol/L高浓度底物溶液，根据每次测试量分装，于-20℃避光储存。测试前取出100μmol/L高浓度溶液恢复至室温，并用Tris-EDTA缓冲液稀释至2μmol/L低浓度底物溶液，稀释后的低浓度底物溶液现配现用。

样本稀释溶液

将0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(Tris-HCl)缓冲液，pH7.6用水稀释10倍。稀释后的样本稀释溶液现配现用。

固体样品待测液制备

根据标称，称取固体待测样品适量，溶于样本稀释溶液中，调节溶液RNase活力在10-9~10-8 U/μL，调整后的待测液需当天及时检测，且避免冻融。

液体样品待测液制备

根据标称，用样本稀释溶液调节待测液体样品的RNase活力在10-9~10-8U/μL，调整后的待测液需当天及时检测，且避免冻融。

标准品溶液制备

以RNase A （50U/μL），为标准品，用样本稀释溶液稀释至1.25×10-8U/μL、6.25×10-9U/μL、3.13×10-9U/μL、1.56×10-9U/μL。稀释后的标准品溶液需当天及时检测，且避免冻融。

酶促反应（37℃）

按表1加入酶促反应液至96孔板中，每个供试品、标准品和对照品平行两孔，振荡混匀后，立即置于酶标仪或定量PCR仪中，在合适的增益值下，测定Ex/Em=535nm/575nm处的相对荧光信号值RFUt（t=0~30），1~1.5分钟读数一次，共计30分钟。

表1　酶促反应配制表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂 | 供试品/μL | 标准品/μL | 对照品 |
| 0.1mol/L Tris-HCl溶液 | 10 | 10 | 10 |
| 2μmol/L核酸荧光底物溶液 | 10 | 10 | 10 |
| 供试品 | 80 | / | / |
| 标准品 | / | 80 | / |
| 样本稀释液 | / | / | 80 |
| 总体积 | 100 | 100 | 100 |

结果分析

定性分析

样品中RNase残留量定性分析因子*X*按式（1）计算：

$X=\frac{RFU30}{RFU0}$ …………………………（1）

式中：

X ——样品中RNase残留量定性分析因子

RFU30 ——样品在酶促反应30分钟时的相对荧光信号值

RFU0 ——样品在酶促反应0分钟时的相对荧光信号值

当X≥2时，则考虑供试品含有RNase残留。

注：若供试品中RNase残留量较多或含有干扰物质时，可能会出现RFU0 (供试品)＞RFU0 (标准品)，且X＜2，此时应将供试品用样本稀释液进行预稀释，再进行检测。

定量分析

样品在30分钟内的相对荧光信号变化值∆RFU按式（2）计算：

$∆RFU=RFU30-RFU0$ …………………………（2）

式中：

∆RFU ——样品在30分钟内的相对荧光信号变化值

RFU30 ——样品在酶促反应30分钟时的相对荧光信号值

RFU0 ——样品在酶促反应0分钟时的相对荧光信号值

以∆RFU（对照品）、∆RFU（标准品）为纵坐标，对照品（作为0点）、标准品活性为横坐标，进行线性拟合，求出拟合方程y=ax+b，相关性系数r应大于等于0.99。

将∆RFU（供试品）作为y带入拟合方程，求出x，乘以样本预稀释倍数后，即为供试品的RNase残留活性（以RNase A活力单位计）。

定量限

本方法的定量限为1.56×10-9U/μL。

精密度

在重复条件下，获得的两次独立测定结果的绝对偏差不大于这两个测定值的算术平均值的10%。

准确度

本方法测试的样本稀释溶液加标浓度为3.13×10-9U/μL时，平均加标回收率为70%~130%，测试的样本稀释溶液加标浓度为6.25×10-9U/μL时，平均加标回收率为80%~120%。

参 考 文 献

[1] Bender A T, Sullivan B P, Lillis L, et al. Enzymatic and chemical-based methods to inactivate endogenous blood ribonucleases for nucleic acid diagnostics[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(8): 1030-1040.

[2] Tong C, Zhao C, Liu B, et al. Sensitive detection of RNase a activity and collaborative drug screening based on rGO and fluorescence probe[J]. Analytical chemistry, 2018, 90(4): 2655-2661.