
《组织工程医疗产品 动物源性生物材料DNA残留量测定法：

荧光染色法》

行业标准编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

本标准项目经国家药品监督管理局批准（药监综械注〔2021〕69号，械注〔2021〕230号），项目名称：《组织工程医疗产品 动物源性生物材料 DNA 残留量测定法：荧光染色法》，项目编号：N2021004-T-zjy。本标准项目归口单位：全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会。主要起草单位：中国食品药品检定研究院、四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心）、冠昊生物科技股份有限公司。

（二）工作过程

本标准的编制工作从2020年8月开始，经标准复审后，在原标准（YY/T 0606.25-2014 组织工程医疗产品 第25部分：动物源性生物材料DNA残留量测定法：荧光染色法）的基础上对部分技术内容提出修订计划，并获得2021年行业标准立项。2021年2月，秘书处组织召开起草小组标准工作讨论会（网络会），逐条讨论修订内容，完善标准草案（工作组讨论稿），确定验证方案，并初步确定标准的工作进度安排。2021年3~5月，起草小组对主要修订技术内容开展验证工作，并及时召开验证工作讨论会（网络会），调整验证方案，进一步完善

标准草案。2021年5月由秘书处组织委员召开标准草案研讨会。2021年5~7月,起草小组根据部分修订技术内容的验证结果,进一步修改和完善标准草案,形成征求意见稿,于2021年8月1日开始向全体委员和全社会进行广泛征求意见。同时,向相关监管部门(国家药品监督管理局医疗器械注册司和监管司、医疗器械技术审评中心、食品药品审核查验中心、药品评价中心)定向征求意见。截止时间为2021年9月30日。

二、标准修订主要依据

(一) 本标准编制原则

本标准按照 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。坚持适用性和有效性为准则,并结合当前行业发展现状与特点,提高标准贯彻实施的实用性和可操作性。

(二) 本标准修订的主要依据

在原标准 YY/T 0606.25-2014 的基础上,参考《中华人民共和国药典》2020 版关于生物制品外源性 DNA 残留量测定法的内容,结合在实施过程中发现的问题,对部分实验方案设计进行修订。根据验证结果,对标准的部分相关内容作出修订。

修订的主要技术内容包括:

- 1) 选择“动物细胞 DNA”替代“细菌 DNA”;
- 2) 确立最小称样量和优化 DNA 释放体系;
- 3) 采用“纯化加标回收率实验”替代“同步回收率实验”;

-
- 4) 修改 DNA 纯化步骤示例;
 - 5) 增加残留 DNA 断片大小的测定实验。

其他编辑性修改详见标准草案。

三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）验证分析

针对修订的主要技术内容开展验证。本次验证采用的 DNA 纯化试剂盒包括核酸提取试剂盒（品牌：Thermo）、磁珠法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（品牌：TIANGEN）和宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）（品牌：湖州申科）。验证的主要技术内容如下：

1、考察全长和断片化 DNA 的适用性

1) **验证目的：**考察全长 DNA 和断片化 DNA 分别作为对照品的适用性。

2) **验证方案：**残留 DNA 定量检测方案包括：蛋白酶 K 消化、DNA 纯化和荧光染色法 DNA 测定。选择轻中度脱细胞真皮基质（牛）作为供试品 I。分别制备不同浓度的全长和断片化 Lambda DNA 对照品，作为回收率样品与标准曲线样品。本次验证采用磁珠法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（品牌：TIANGEN）作为 DNA 纯化试剂盒。

3) **验证结果：**结果见表 1，表 2。

动物源性生物材料大多为断片化 DNA，采用断片化 DNA 对照品作为对照品更加合理。然而，验证结果表明：1) 全长和断片化两种 DNA 对照品的纯化回收率相近；2) 基于两种对照品的标准曲线计算

得到的同一供试品的 DNA 残留量不存在显著差别；3) 断片化 DNA 对照品一般通过超声粉碎得到，电泳条带呈现弥散状。小片段容易降解，不宜长时间保存，且受物理因素作用导致可能存在单链断片。因此，建议采用全长 DNA 对照品作为本标准的对照品。

表 1. 2 种样品回收率检测数据对比表

回收率样品 (ng)	12.5	25	50	100	200	400
全长 DNA 对照品回收率 (%)	56	74	73	59	74	78
断片化 DNA 对照品回收率 (%)	61	60	52	55	63	75

表 2. 2 种样品标准曲线的检测数据对比表

标曲样品类型	供试品 I 的 DNA 残留量 (ng/mg)			平均值 (ng/mg)
	平行样-1	平行样-2	平行样-3	
全长 DNA 对照品	229.56	252.27	213.83	231.89
断片化 DNA 对照品	235.19	235.40	235.40	235.33

4) 结论：采用全长 DNA 对照品作为本标准的对照品是合理的。

2、考察和验证动物细胞 DNA 和细菌 DNA 的差异性

1) 验证目的：比较动物细胞 DNA 和细菌 DNA 分别作为标准曲线样品的差异性。

2) 验证方案：分别选择全长 Lamda DNA 和全长牛肾细胞 DNA 作为标准曲线样品。采用 Picogreen 荧光染料与 2 种样品分别反应后，检测样品的荧光结合强度值，并绘制标准曲线。

3) 验证结果：结果见图 1，图 2。相同浓度的全长“动物细胞 DNA”与全长“Lamda DNA”，分别与荧光染料 Picogreen 反应的荧光

结合强度值相近。动物细胞 DNA 和细菌 DNA 分别作为标准曲线样品不存在明显差异。但是动物源性生物材料的残留 DNA 来源于动物细胞，而 Lamda DNA 来源于细菌，因此，选择动物细胞 DNA 作为标准曲线样品。

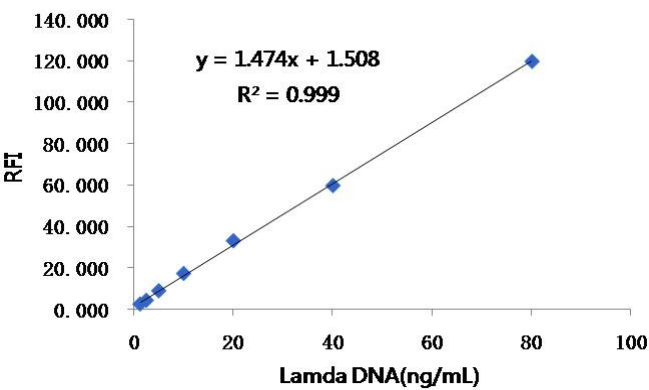


图 1. 以 Lamda DNA 作为标准曲线样品的标准曲线图

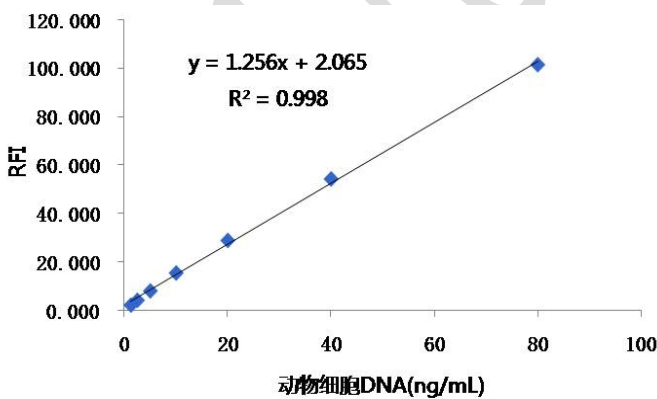


图 2. 以动物细胞 DNA 作为标准曲线样品的标准曲线图

4) 结论：选择动物细胞 DNA 作为标准曲线样品是合理的。

3、考察最小称样量和优化 DNA 释放体系（蛋白酶消化体系）

1) 验证目的：为了提高标准的可实施性，考察供试品的最小称样量和优化 DNA 释放体系（蛋白酶消化体系）。

2) 验证方案：残留 DNA 定量检测方案包括：蛋白酶 K 消化、DNA 纯化和荧光染色法 DNA 测定。选择轻中度脱细胞真皮基质(牛)作为供试品 I。a)考察不同取样量（1 mg~20 mg）供试品的 DNA 残

留量结果的差异。b)称取 5 mg 的供试品，经消化和纯化后，比较经不同次数洗脱后的供试品 DNA 残留量的差异。本次验证采用的 DNA 纯化试剂盒为核酸提取试剂盒（品牌：Thermo）。

3) 验证结果：结果见表 3，表 4。供试品取样量为 1 mg~20 mg 时，供试品 DNA 残留量变异系数小于 10%。考虑到样品称重的准确性与可操作性，可设置供试品取样量为 5 mg~10 mg。可根据供试品的 DNA 残留量，调整供试品取样量。

当供试品取样量为 5mg 时，3 次溶出时比 1 次溶出时的供试品 DNA 残留量检测结果约高 40%。

表 3. 不同取样量的供试品 I 的 DNA 残留量检测结果

样品分组	1mg	2mg	5mg	20mg
样品DNA残留量 (ng/mg)	224.15	202.81	242.14	223.06
样品 DNA 平均残留量(ng/mg)	223.04			
变异系数 CV (%)	7.21			

注：1mg 组与 2mg 组均称重至少 5mg 供试品，经充分消化后，再取设定质量的供试品。

表 4. 不同洗脱次数的供试品 I 的 DNA 残留量结果比较

样品取样量	3 次溶出 150 μ L	1 次溶出 50 μ L	3 次溶出比 1 次溶出增加百分比
5mg	242.14ng/mg	172.72ng/mg	40%

4) 结论：a) 设置供试品取样量为 5 mg~10 mg，可根据供试品的 DNA 残留量，调整供试品取样量；b) 溶出次数与洗脱体积可参考试剂盒说明书及验证结果；c) 当供试品 DNA 残留量为痕量时，建议只溶出 1 次，洗脱体积至少 50 μ L。

4、考察和验证“纯化加标回收率实验”替代“同步回收率实验”

的可行性

1) **验证目的：**为了减少实验操作，保证检测数据科学可信，考察和验证“纯化加标回收率实验”替代“同步回收率实验”的可行性；验证方法整体的可行性。

2) **验证方案：**残留 DNA 定量检测方案包括：蛋白酶 K 消化、DNA 纯化和荧光染色法 DNA 测定(具体实验过程可参考标准草案)。

a)选择轻中度脱细胞真皮基质（牛）作为供试品 I，在与待测供试品等量的另一份供试品中分别添加牛肾细胞 DNA 对照品 100 ng，200 ng 与 400 ng，比较不同剂量的“纯化加标回收样品”的纯化加标回收率以及校正前后的供试品 DNA 残留量。

b)选择口腔修复膜作为供试品 II，在与待测供试品等量的另一份供试品中添加牛肾细胞 DNA 对照品 100 ng，比较不同 DNA 纯化试剂盒处理后的纯化加标回收率以及校正前后的供试品 DNA 残留量。

本次验证采用的 DNA 纯化试剂盒为磁珠法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（品牌：TIANGEN）和宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）（品牌：湖州申科）。

3) **验证结果：**结果见表 5，表 6。本方法中设计不同剂量的“纯化加标回收样品”，纯化加标回收率均在 70 %~130 %（见表 5）。经纯化加标回收率校正计算得到的供试品测试结果（见表 5）与经回收率曲线方程校正（见表 2）计算得到供试品测试结果的变异小于 10 %。3 家单位验证结果表明，经过纯化加标回收率校正后，同一供试品 DNA 残留量结果的变异系数小于 10 %（见表 6）。

另外，采用核酸提取试剂盒（品牌：Thermo）与磁珠法组织 DNA 提取试剂盒（品牌：OMEGA）的验证结果表明，这 2 种 DNA 纯化试剂盒不能满足纯化加标回收率在 70 %~130 %。

表 5. 供试品 I 纯化加标回收试验结果

分组	供试品组	加标组 (100 ng)	加标组 (200 ng)	加标组(400 ng)
DNA 含量 (ng)	191.55	271.74	343.92	500.44
减去供试品组 DNA 含量 (ng)	/	80.19	152.37	308.89
加标理论值 (ng)	/	100	200	400
纯化加标回收率 (%)	/	80.19	76.18	77.22
经纯化加标回收率校正后供试品 DNA 含量 (ng/mg)	/	238.87	251.44	248.05

表 6. 供试品 II 纯化加标回收试验结果

验证单位	A	B	C
供试品DNA残留量 (ng/mg)	130.76	154.32	123.35
纯化加标回收率 (%)	82.83	87.80	76.42
校正后供试品 DNA 残留量 (ng/mg)	157.86	175.76	161.41
校正后供试品 DNA 平均残留量 (ng/mg)	165.01		
变异系数 CV (%)	5.74		

4) 结论：纯化加标回收率实验替代同步回收率实验是可行的，纯化加标回收率可设置为 70 %~130 %，修订后的方法整体上是可行的。

5、验证增加测定残留 DNA 断片大小的可行性

1) 验证目的：脱细胞基质的残留 DNA 通常是片段化的，并以不同

的大小出现，对细胞外基质脱细胞过程的风险评估具有一定的意义。
考察凝胶电泳实验分析纯化后的供试品 DNA 断片大小的可行性。

2) **验证方案：**选择不同 DNA 含量的供试品 DNA 纯化液作为待测样品。选择 1.5%琼脂糖凝胶，分子量为 50 bp~500 bp 的 DNA Marker，进行凝胶电泳实验。

3) **验证结果：**结果见图 3。

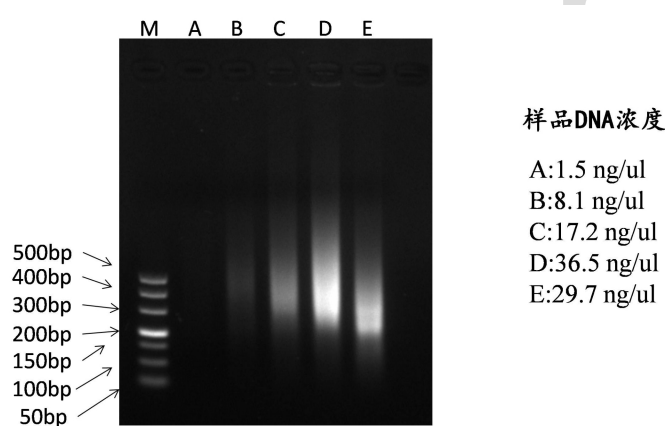


图 3. 纯化后 DNA 凝胶电泳图

结果表明，1) 当供试品 DNA 残留量较高时，凝胶电泳实验可以分析残留 DNA 的断片大小；2) DNA Marker 的分子量可调整为 50 bp~2000 bp。

对于 DNA 残留量较低的供试品，可选择其他经过验证的方法进行残留 DNA 的断片大小分析（如全自动毛细管电泳仪）。

4) **结论：**凝胶电泳实验分析残留 DNA 的断片大小是可行的。

(二) 技术经济评估

1、本标准已基本覆盖动物源性生物材料中 DNA 残留量的测定，具有适宜的技术规范及指导作用。

2、本标准目的是对动物源性生物材料及其衍生物的终产品或中间

产品、用于组织工程医疗产品基质或支架的动物源性支架材料、人源脱细胞基质材料的 DNA 残留量检测方法进行规范，结合当前行业现状与发展的需求，符合当前国内外法规要求，标准能够切实可行地贯彻实施。

3、本标准贯彻后能够规范产品要求，对促进行业发展有积极的作用，可产生显著的社会经济效益。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比的情况。

国外目前没有针对动物源性生物材料的 DNA 残留量检测相关标准。国内有行业标准 YY/T 0606.25-2014，本标准是对 YY/T 0606.25-2014 的修订。为规范动物源性生物材料产品的研发、生产及质量控制，修订本标准。本修订版本已经提出国际标准立项，初步获得成员国投票通过。

五、与有关的现行法令、法规和强制性国家标准、行业标准的关系。

本标准按照《中华人民共和国标准化法》和相关法规的要求进行编写，符合相关法律、法规。与现有的强制性国家标准、行业标准不冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在起草过程中无重大分歧。

七、作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

本标准规定了动物源性生物材料中 DNA 残留量的测定方法，建议

本标准按推荐性标准实施。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

标准发布后 6 个月内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向监管部门、技术审评部门、检验机构、生产企业等使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准在发布之日起 6 个月后实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会
组织工程医疗器械产品分技术委员会

2021 年 7 月