



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX
代替 YY/T 0606.25-2014

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

Tissue engineered medical products - Quantification of remnant DNA in biological materials utilizing animal tissues and their derivatives: Fluorescence method

建议该标准发布后 6 个月开始实施

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。

（征求意见稿）

2021 年 7 月

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前 言..... II

引 言..... IV

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语、定义..... 1

4 实验原理..... 2

5 样品、试剂和仪器..... 2

6 实验过程..... 3

7 结果计算..... 5

8 结果判定..... 6

9 实验报告..... 7

参 考 文 献..... 8

TC110SC3征求意见稿

前 言

本文件按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。。

本文件代替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》，与YY/T 0606.25-2014相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 删除标准名称中的“第25部分”和英文名称中的“Part: 25”（见首页, 2014版首页）；
- 删除前言中“YY/T 0606《组织工程医疗产品》已经或计划发布以下部分：”，以及后面的“第2~26部分、第2~10部分、第12~20部分、第24~26部分”及“本部分为YY/T 0606的第25部分”（见PI, 2014版PI）；
- 修改前言中“国家食品药品监督管理总局”为“国家药品监督管理局”（见PI, 2014版PI）；
- 修改前言中归口单位名称为：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（SAC/TC110/SC3）（见PI, 2014版PI）；
- 增加起草单位和起草人（见PI, 2014版PI）；
- 修改引言中药典的版本为：“2020年版三部通则 3407 外源性DNA残留量测定法；（见PII, 2014版PII）；
- 范围中增加了“本文件规定了动物源性生物材料中DNA残留量的测定方法”，删除了不属于范围内容的第2、3段（见P1, 2014版P1）；
- 规范性引用文件中增加了YY/T 0771.1和YY/T 0771.2（见P1, 2014版P1）；
- 修改术语3.1 的名称与定义；
- 增加术语3.6（见P1, 2014版P1）；
- 增加“4 实验原理” 其内容整合5.1 总则的内容, 后面的序号顺延（见P2, 2014版P2）；
- 5.1增加a）中对供试品灭菌和病毒灭活的要求、增加其它样品（b, c, d）的说明（见P2, 2014版P2）；
- 5.2.1 补充了蛋白酶K缓冲液的组成，增加了“注-”（见P3, 2014版P2）；
- 5.2.4 增加了一些其它需要用到的试剂，并删除了“注：DEPC水——”，增加了“注：为保证——”（见P3, 2014版P2）；
- 5.3 修改了条款名称，将亚条款序号改为a）、b）——（见P3, 2014版P2）；
- 6.1.1 注1中：删除“用无菌眼科剪——”；注2中：将“13 000 rpm/min”修改为“15 000 g”；注4中：修改了标准年号，注6移到了6.1.4 的注2，增加了对难以消化样品的处理措施（见P4, 2014版P3）；
- 6.1.1 把实验步骤的描述增加序号a）和b）（见P4, 2014版P3）；
- 6.1.2删除了“回收率样品及反应液的制备”，增加“加标回收样品及反应液的准备”（见P4, 2014版P3）；
- 增加了6.1.3 “阴性对照样品及反应液的准备”（见P4, 2014版P3）；
- 修改6.2.1举例试剂盒的名称及6.2.2操作步骤。
- 6.2.2 修改为“操作步骤如下：”，具体的操作步骤由亚条款号改为a）、b）、——（见P5, 2014版P4）；
- 增加了6.3纯化DNA的片段长度分析亚条款，其内容为原5.2.2.12 的注2（见P5, 2014版P4）；

——6.4将原亚条款编号修改为a)、b)、——和次级条款1)、2)、—— (见P5、P6, 2014版P4、P5) ;

——删除原6.3~6.8的内容,增加7.3(供试品纯化加标回收率计算),7.4(供试品DNA残留量计算)(见P6, 2014版P5) ;

——8 结果判定,修改原7.2和7.5的内容(见P6, 2014版P6) ;

——增加了“9 试验报告”(见PP6, 2014版P5) ;

——增加了几项“参考文献”条款(见P8, 2014版P6)。

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这些专利的责任。

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(SAC/TC110/SC3)归口。

本文件起草单位: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。

本文件主要起草人:

TC110SC3征求意见稿

引 言

由哺乳动物细胞外基质构成的生物源性支架材料被用于外科的创伤修复，肌腱、皮肤、心血管、胃肠及下尿道组织的重建。这些细胞外基质支架材料取材于人和动物的各种组织，如：猪的皮肤、角膜、小肠、尿道及膀胱，牛的皮肤等。由于细胞膜的表位抗原、细胞核酸（DNA）以及由损伤而来的小分子物质可能会引起人体广泛的免疫反应，因此动物源性基质材料的脱细胞过程被认为是非常重要的去除免疫原性工艺。尽管细胞外基质材料已经被广泛用于临床，但仍然存在由于残留DNA及残留蛋白质等所引起的炎症和免疫反应隐患。因此，动物源性生物材料中，残留DNA定量检测是控制产品质量的重要措施之一。

目前，国际上还没有对该类产品残留DNA的检测方法标准。国际标准化组织发布了动物源医疗器械系列标准（ISO 22442-1-2007），我国已于2008年等同转化为“动物源医疗器械”系列行业标准（YY/T 0771）。此系列标准包括第1部分“风险管理应用”；第2部分“来源、收集与处置的控制”；第3部分“病毒和传播性海绵状脑病（TSE）因子去除与灭活的确认”和第4部分“传播性海绵状脑病（TSE）因子的去除和/或灭活及其过程确认分析的原则”。我国于2009年出台了“动物源性医疗器械产品注册技术审查指导原则”，2017年发布了修订版。该指导原则中，在对动物源性医疗器械产品注册申报资料的要求中提到，注册申报资料在满足一般性要求的基础上，需要增加涉及控制病毒和/或传染性病原感染以及免疫原性风险方面有关的技术内容。其中要求提供对清除（或降低）动物源性材料免疫原性工艺过程的描述、质量控制指标与验证性实验数据或相关资料。对于动物源性材料带来的免疫原性风险的降低，一般采用在生产工艺中降低其免疫原性的方法，包括脱细胞、去除杂蛋白，以及使蛋白质变性等物理的和/或化学的处理步骤，移走或覆盖抗原决定簇。生产企业需对其降低材料免疫原性的有效性进行验证。其中验证手段之一就是检测残留DNA含量。基于生物制剂残留DNA检测方法主要包括DNA探针杂交法、荧光染色法及定量PCR方法（见《中华人民共和国药典》2020年版 三部，通则 3407 外源性DNA残留量测定法），其中荧光染色法操作简便、灵敏度高、再现性好，得到广泛使用。然而：a) 动物源性生物材料来源于动物组织（主要是基质组织），经脱细胞等工艺制备而成，大多为固体状态（有的为胶体或液体状态），不能直接采用上述方法检测；b) 基质组织中含有大量的结构蛋白质，影响荧光测定的结果。因此，生物制剂残留DNA检测方法不能直接用于动物源性生物材料残留DNA的定量检测。

本文件给出了适用于动物源性生物材料残留DNA的定量检测方法。

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

1 范围

本文件规定了动物源性生物材料中DNA残留量的测定方法。本文件适用于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，也可用于人源脱细胞基质材料。

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。

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第1部分 风险管理应用

YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第2部分 来源、收集与处置的控制
《中华人民共和国药典》

3 术语、定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞外基质 extracellular matrix (ECM)

由细胞产生并分泌到组织内细胞外空间，包括均质状态的基质（蛋白多糖和糖蛋白）和细丝状的胶原纤维，具有连接和支持细胞的作用，是细胞附着的基本框架和代谢场所，其形态和功能直接影响所构成的组织形态和功能。

3.2

支架 scaffold

促进替代、修复或再生组织的细胞或生物活性因子迁移、结合或输送的支持物、释放载体或基体。许多有机物（生物源性物质）、无机物及高分子物质都可以用作组织工程医疗产品的支架材料。

3.3

动物 animal

任何脊椎或无脊椎动物〔包括两栖动物、节肢动物（如甲壳纲动物）、鸟、珊瑚、鱼、爬行动物、软体动物和哺乳动物〕，不包括人（智人）。

3.4

衍生物 derivatives

通过制造工艺从动物源性材料中获得的物质。例如：透明质酸、胶原、明胶、单克隆抗体、壳聚糖、白蛋白等。

3.5

化学交联 chemical cross-linking

通过化学方法，如化学键的结合，使化合物呈现稳定状态。动物源性基质材料多采用脱细胞处理和/或结合化学交联方法，达到移走或覆盖抗原表位及DNA及损伤断裂的小分子物质，从而减少和控制由这些残留物质引起的免疫原性风险。

3.6

脱细胞 decellularization

从生物材料中破坏和/或去除细胞和细胞成分的过程，同时保持细胞外基质材料的关键结构和/或组成特性。

[来源于ASTM 3354-2019, 3.1.1]

4 实验原理

本文件设计了动物源性生物材料的残留DNA定量检测三步法，即：固体生物材料的蛋白酶K消化或/和组织匀浆处理、DNA纯化和荧光染色法DNA测定。

试验样品除供试品外，需同步设定加标回收实验样品（即在供试品中添加一定量的DNA对照品）。

一般情况下，核酸提取通常使用以下一种或多种方法：细胞裂解法、组织匀浆法、酶解法和超声波法。为了获得理想的纯化DNA，建议采用酶解或/和组织匀浆相结合的方法，这种组合方法特别适用于脱细胞ECM材料难以被消化的情况。为了避免被消化的脱细胞ECM组分对DNA检测的干扰，用核酸提取试剂盒对DNA进行纯化。本文件中，核酸染料（如Picogreen荧光染料）被用于双链DNA的定量检测。

5 样品、试剂和仪器

5.1 样品

- 供试品：脱细胞基质材料（最终成品或半成品）和原材料应按照 YY/T 0771.1 和 YY/T 0771.3 进行灭菌和病毒灭活，确保生物安全。
- DNA 标准曲线样品：采用动物细胞来源的 DNA 对照品建立标准曲线。
- DNA 纯化加标回收样品：在与待测供试品等量的另一份供试品中加入一定量的 DNA 对照品，用于加标回收率测定。
- 阴性对照样品：由 PBS 与 BSA 组成，用于排除 DNA 提取过程中的污染。

注1：对于由于生产工艺中采取了化学交联等工艺，终产品不易被酶类（蛋白酶K、胰酶等）消化的样品，宜使用化学交联等工艺前的中间产品。

注2：如果需要对化学交联后不易被酶类消化的终产品进行 DNA 残留量检测，可采用材料浸提液或者充分匀浆处理后进行后续实验。此时宜对处理条件作具体规定，并验证其材料中的 DNA 已得到充分释放和暴露。

5.2 试剂

5.2.1 蛋白酶K消化用试剂

蛋白酶K（-20℃保存，避免反复冻存和融化）；蛋白酶K缓冲液：100 mM Tris-HCl（pH 8.0），100 mM EDTA，10 mM CaCl₂，2% SDS。

注：可采用组织裂解用商品化试剂盒。

5.2.2 DNA 纯化用试剂

可选用市售核酸提取试剂盒。所使用试剂盒的DNA纯化加标回收率应满足70 %~130 %的要求。

5.2.3 荧光染色法检测试剂

本文件验证实验所用试剂盒为“Quant-IT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits”。

注：选用其它双链DNA荧光染料时，按试剂使用说明书配制。

5.2.4 其它试剂

- 对照品 DNA：推荐使用国家医药标准物质（动物细胞来源 DNA 对照品）；
- DEPC 水、PBS 溶液（无钙镁离子，pH 7.0~7.4）、BSA、20×TE（200 mM Tris-HCl，20 mM EDTA，pH 7.5）。

5.3 仪器与耗材

- a) 磁力架；
- b) 黑色 96 孔板；
- c) 荧光酶标仪；
- d) 低吸附 DNase-free 无菌离心管；
- e) 低吸附无菌吸头；
- f) 冷冻离心机；
- g) 真空干燥器；
- h) 震荡器；
- i) 漩涡混悬器；
- j) 高精度天平（0.00001 g）；
- k) 组织匀浆仪。

6 实验过程

6.1 样品消化/匀浆处理

6.1.1 供试品及反应液的准备

- a) 取供试品精确称重（如：5 mg~10 mg）并记录，放进 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内。取 3 份平行样作为供试品组，另取 3 份平行样作为纯化加标回收样品组。

不同样品的处理方式如下：

- 1) 干燥型样品：直接取供试品精确称重并记录，用于后续实验。
- 2) 湿润型样品：取供试品，置于 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内，15 000g 离心 10 min，去除液体部分，真空干燥至恒重后精确称重并记录，用于后续实验。
- 3) 胶体型样品：取供试品精确称重并记录，置于 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内，如果后续的 DNA 纯化时裂解液的加入能够使胶体型样品分解，则可省略蛋白酶 K 消化步骤，直接进行下一步实验。

- 4) 骨质类样品：对于骨植入物样品可参照 GA/T 383 的要求对供试品进行脱钙处理。待脱钙完全，组织变软后再进行蛋白酶 K 消化处理。
- 5) 测试样品不限于上述种类。液态状样品不需要蛋白酶 K 消化，可直接进行后续的 DNA 纯化实验。
- b) 将上述供试品剪成尽量小的碎片后，加蛋白酶 K 缓冲液（10 x Proteinase K buffer）20 μL ，蛋白酶 K（20 mg/mL）10 μL ，加 DEPC 水至最终反应体积为 200 μL （可根据样品的消化程度调整反应体系）。如果样品难以消化，则建议结合额外的匀浆步骤。

6.1.2 加标回收样品及反应液的准备

取另一份等量的供试品，经 6.1.1 处理后，添加一定量的 DNA 对照品，作为纯化加标回收样品；每份样品设 3 个平行样。

注：DNA 对照品加入量的设定宜根据待测样品 DNA 含量的大致范围（参照生产厂家的自检信息或预试验结果），DNA 对照品的加标量尽可能与待测供试品中的 DNA 含量相近，其差异一般不超过 ± 3 倍。

6.1.3 阴性对照样品及反应液的准备

使用 PBS（30 μL ）和 3% BSA（70 μL ）作为阴性对照，加蛋白酶 K 缓冲液（10 x Proteinase K buffer）20 μL ，蛋白酶 K（20 mg/mL）10 μL ，加 DEPC 水至最终反应体积为 200 μL 。每份样品设 3 个平行样。

注：在阴性对照样品中加入 3 % BSA，并进行蛋白酶 K 消化，目的是保证与供试品反应系统相同。

6.1.4 蛋白酶 K 消化

将上述供试品、纯化加标回收样品和阴性对照样品反应液分别混匀后置于 56℃ 水浴槽内消化，至待测样品完全消化，无肉眼可见颗粒样物为止（消化所需时间因样品不同而异）。

注 1：以上反应条件及反应体积可依据样品特点进行优化、调整。消化处理不限于使用蛋白酶 K 消化，消化条件需针对所选择的方法进行优化设计。

注 2：本实验所用的所有和样品直接接触的离心管、吸头、移液管等器材均宜保证不含 DNA 分解酶，以防止样本中残留 DNA 被分解。

6.2 DNA 纯化

6.2.1 依据所选择的方法及使用的试剂盒所附的操作方法进行 DNA 纯化。以下使用“宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）”给出 DNA 纯化步骤示例。

注：如果使用其他试剂盒需按说明书操作。

6.2.2 操作步骤如下：

- a) 取消化后的样品 200 μL ，快速离心 10 s，加入工作结合液 209 μL ，振荡混匀。
- b) 快速离心 10 s，加入 200 μL 异丙醇，30 μL 磁珠。
- c) 将装有全部混合物的离心管置于漩涡振荡器上振荡 5 min，快速离心 10 s，静置于磁力架。在磁力架上分离磁珠时，可以适当旋转离心管，使磁珠吸附更加集中。
- d) 待溶液澄清，磁珠完全分离后，轻轻打开管盖，小心移去上清。
- e) 加入 700 μL 洗涤液 A，振荡 10 s，然后快速离心 10 s，静置于磁力架。待溶液澄清，磁珠完全分离后，去除上清。
- f) 加入 700 μL 洗涤液 B，振荡 10 s，然后快速离心 10 s，静置于磁力架。待溶液澄清，磁珠完全分离后，去除上清。

- g) 再次快速离心 10 s, 静置于磁力架, 待磁珠完全分离后, 将残余液体去除干净。
- h) 打开管盖在室温下干燥 5 s~10 s, 除去残留乙醇。在干燥过程中注意观察, 勿让磁珠太干, 以免洗脱时磁珠不会完全溶解。
- i) 加入 50 μL 洗脱液, 用漩涡振荡器轻微震荡使磁珠和洗脱液混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 7 min, 水浴过程中每 2 min 震荡一次, 振荡混匀 2~3 次。
- j) 快速离心 10 s, 静置于磁力架, 待磁珠分离后, 转移上清液到新离心管中。
- k) 重复溶出 DNA: 加入 50 μL 溶出液, 重复 i) ~j), 共 2 次。将 3 次溶出液分别保存。

注 1: 如经验证, 单次 DNA 溶出量接近 3 次彻底溶出的总量, 则可只进行一次溶出。建议供试品 DNA 残留量为痕量时, 仅一次溶出, 最小溶出液体积宜不少于 50 μL 。

注 2: 纯化后的 DNA 样品宜立即使用或储存在适当的条件下 (-20°C 保存), 确保其在后续试验时的稳定性。应避免反复的冻存和融化。

6.3 纯化 DNA 的片段分析

取纯化后的 DNA 进行凝胶电泳实验, 用于检测 DNA 片段的大小。推荐琼脂糖凝胶浓度为 1.5 %, DNA Marker 分子量为 50 bp~2000 bp。

注 1: 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, 这对细胞外基质脱细胞过程的风险评估可能具有一定的意义。

注 2: 可以采用其他经过验证的方法 (如全自动毛细管电泳仪) 进行 DNA 片段分析。

6.4 DNA 含量测定 (荧光染色法)

- a) 使用 6.2.2 中 k) 的纯化 DNA 样品进行 DNA 含量测定。
- b) DNA 标准曲线样品的准备: 用 1 $\times$ TE 缓冲液将 DNA 标准品配成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。在光径 1 cm 的比色皿中, 测定 DNA 在 260 nm 的光吸收值, 对标准品来说, 当浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, A₂₆₀ 的 OD 值为 0.04。用 1 $\times$ TE 缓冲液将 DNA 标准品配成 0 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的标准品溶液各 400 μL 。取稀释好的标准品溶液每孔 125 μL 加入 96 孔黑色酶标板内, 每份样品设 3 个复孔。
- c) 待测样品的准备: 取纯化加标回收实验 DNA 纯化样品和供试品 DNA 纯化样品, 加入 1 $\times$ TE 缓冲液进行适当的稀释, 得到稀释液 400 μL , 取每孔 125 μL 加入到 96 孔黑色酶标板内, 每份样品设 3 个复孔。

注: 加标回收实验 DNA 纯化样品和供试品 DNA 纯化样品的稀释倍数可以调整, 宜尽可能保证其反应后荧光强度值在标准品溶液反应后荧光强度值范围内 (小于 80 ng/mL 反应后荧光强度值)。

- d) 分别于上述各样品中添加 PicoGreen 反应液 125 μL (与样品等体积混合), 震荡混匀后室温避光反应 5 min, 用荧光酶标仪测定。测定条件: 以 480 nm 为激发波长, 520 nm 为发射波长进行测定, 以所得数据作图分析并求得回归方程。以 1 $\times$ TE 缓冲液为样品测得的荧光强度值为本底, 测定和记录各测定孔的相对荧光强度值 (RFI)。

注 1: DNA 含量在 1.25 ng/mL~80 ng/mL 范围线性较好, 供试品 DNA 含量在该范围内可定量测定; 当 DNA 含量低于 1.25 ng/mL 时为限量测定, 表示为小于 1.25 ng/mL。

注 2: PicoGreen 反应液: 由 PicoGreen 原液以 1 $\times$ TE Buffer 稀释 200 倍配制。

注 3: 1 $\times$ TE Buffer: 由 20 $\times$ TE Buffer 以 DEPC 水稀释 20 倍稀释配制。

7 结果计算

7.1 数据处理

首先对标准品和待测样品进行5次重复测定，获得相对荧光强度值；取5次测定的RFI值平均数，并减去本底（只有TE，无DNA时测得的RFI值）。

7.2 标准曲线方程计算

利用标准品测定值（RFI值）为纵坐标（ y ），添加量（ng/mL）为横坐标（ x ），绘制标准曲线，获得回归方程：

$$x = (y-a)/b, R^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

x ——添加量，ng/mL；

y ——测定值，无单位；

a ——常数；

b ——常数；

R ——相关系数。

7.3 供试品纯化加标回收率计算

将加标回收DNA纯化样品减去供试品DNA纯化样品所测得的RFI值，再代入标准曲线回归方程的 y ，求得 x ，即为加标回收DNA对照品的实测值（ng/mL）。按公示（2）计算纯化加标回收率。

$$R = (C_{ERC} \times V_{reaction} \times V_{total}) / (V_{ERC-dilu} \times M_{ERC}) \dots\dots\dots (2)$$

式中：

R —— 纯化加标回收率，%；

C_{ERC} —— 加标回收DNA对照品实测值，ng/mL；

$V_{reaction}$ —— 测试前的反应体积，mL；

$V_{ERC-dilu}$ —— 检测取样量，mL；

V_{total} —— 纯化样品总量，mL；

M_{ERC} —— 加标回收DNA对照品的添加量，ng。

7.4 供试品 DNA 残留量计算

将供试品DNA纯化样品所测得的RFI值减去本底，再代入标准曲线回归方程的 y ，求得 x ，即供试品的实测值（ng/mL）。按公示（3）计算供试品DNA含量。

$$M_{test} = (C_{test} \times V_{reaction} \times V_{total}) / (V_{test-dilu} \times M_{test} \times R) \dots\dots\dots (3)$$

式中：

M_{test} —— 单位质量供试品的DNA含量，ng/mg；

C_{test} —— 供试品DNA实测值，ng/mL；

$V_{reaction}$ —— 测试前的反应体积，mL；

$V_{test-dilu}$ —— 检测取样量，mL；

V_{total} —— 纯化样品总量，mL；

M_{test} —— 供试品干重，mg；

R —— 纯化加标回收率，%。

8 结果判定

8.1 标准曲线方程的相关系数 R^2 应大于 0.99。

8.2 纯化加标回收率应为 70 %~130 %。

8.3 样品检测值如在标曲范围内，则检测值 CV 不大于 30 %；样品检测值如低于标曲最低浓度，则对检测值 CV 不作要求；加标样品检测值 CV 不大于 30 %。

8.4 以供试品单位质量(mg)的 DNA 含量为最终的 DNA 残留量。

8.5 如果最小稀释倍数条件下的荧光测定值低于最低检测限 1.25 ng/mL 的荧光值时应为限量测定，表示为小于 1.25 ng/mL。

8.6 若样品中 DNA 残留量低于最低检测限时，宜加大样品的取样量，同时相应地扩大蛋白酶 K 消化时的反应体积；如果在最大取样量的条件下仍不能满足上述条件，则只能报告最低检测限，此种情况在最终报告中应注明。

注 1：选用不同的 DNA 纯化方法时宜预先进行加标回收率验证。

注 2：宜充分考虑本文件中方法的适用性和灵敏度。如果供试品的残留 DNA 量很低，DNA 纯化后的含量低于本方法的检出限时，宜考虑使用其他方法（如定量 PCR 法、数字 PCR 法）。

9 实验报告

实验报告中应包含下列信息：

- 供试品名称、规格型号和批号，有效期（适用时）；
- 样品特性（如干燥型、胶体型等）；
- 所使用的试剂盒、试剂、耗材和仪器；
- 实验方法和实验步骤。

实验结果：

- 标准曲线；
- 供试品纯化加标回收率；
- 供试品单位重量（干重）的 DNA 含量。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验
- [2] GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品
- [3] GA/T 383-2014 中华人民共和国公共安全行业标准：法庭科学DNA实验室检验规范
- [4] 饶春明等，应用荧光法测定重组细胞因子中残余DNA含量.药物分析杂志,2005,25(12):1417-1419
- [5] Badylak SF, et al. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology* 2008, 20: 109-116
- [6] ISO 22442-1:2007, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives-Part 1: Application of risk management
- [7] ISO 22442-2:2007, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives-Part 2: Controls on sourcing, collection and handling
- [8] ISO 22442-3:2007, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives-Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents
- [9] Thomas W, et al. Quantification of DNA in biologic scaffold material. *Journal of Surgical Research* 2009, 152:135-139.
- [10] ASTM WK57514 Guide for Evaluating Extracellular Matrix Decellularization Processes (under-development).
- [11] Gilbert TW, Freund J and Badylak SF. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. *J Surg Res.* 2009, 152(1): 135-139.
- [12] Keane TJ, Londono R, Turner NJ and Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 2012, 33:1771-1781.
- [13] Seif-Naraghi SB, Singelyn JM, Salvatore MA, Osborn KG, Wang JJ, Sampat U, et al. Safety and Efficacy of an Injectable Extracellular Matrix Hydrogel for Treating Myocardial Infarction. *SciTransl Med.* 2013, 5(173).
- [14] Yasuda K, Ogawa Y, Yamane I, Nishikawa M, and Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. *J Leukocyte Biology.* 2006, 77:71-79.
- [15] Crapo PM, Gilbert TW, and Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011, 32(12): 3233-3243.
- [16] Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2018, 1577.
- [17] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010, 123:4195-4200.
- [18] Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons, Inc. 2017.
- [19] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissue and organs. *Biomaterials.* 2006,27:3675-83.