



中华人民共和国国家标准

GB/T 37875—2019

核酸提取纯化试剂盒 质量评价技术规范

Technical specification for quality evaluation of nucleic
acid extraction and purification kits

2019-08-30 发布

2019-08-30 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、缩略语	1
3.1 术语和定义	1
3.2 缩略语	2
4 评价指标	3
4.1 产量	3
4.2 纯度	3
4.3 完整度	3
4.4 重复性	3
4.5 再现性	3
4.6 批间差异	3
4.7 细菌内毒素残留	3
5 评价方法	3
5.1 总则	3
5.2 产量	3
5.3 纯度	3
5.4 完整度	4
5.5 重复性	4
5.6 再现性	4
5.7 批间差异	4
5.8 细菌内毒素残留	5
6 质量评价报告	5
附录 A (资料性附录) 核酸提取产量、纯度、完整度和细菌内毒素残留的测定方法	6

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家标准物质研究中心提出并归口。

本标准起草单位：中国计量科学研究院、北京康为世纪生物科技有限公司。

本标准主要起草人：傅博强、王晶、段佳丽、王春香、陈敏璠、唐治玉、牛春艳、董莲华、高运华。

核酸提取纯化试剂盒 质量评价技术规范

1 范围

本标准规定了核酸提取纯化试剂盒质量评价的术语和定义、质量评价技术指标和评价方法。
本标准适用于细菌、质粒、真核细胞等的 DNA 和 RNA 提取纯化试剂盒的生产和服务。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 20001.4—2015 标准编写规则 第4部分:试验方法标准

JJF 1001—2011 通用计量术语及定义

JJF 1265—2010 生物计量术语及定义

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 20001.4—2015、JJF 1001—2011 和 JJF 1265—2010 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用,以下重复列出了 GB/T 20001.4—2015、JJF 1001—2011 和 JJF 1265—2010 中的某些术语和定义。

3.1.1

核酸的一级结构 nucleic acid primary structure

多核苷酸链中核苷酸的排列顺序(或碱基排列顺序)。

3.1.2

标准物质 reference material

具有足够均匀和稳定的特定特性的物质,其特性被证实适用于测量中或标称特性检查中的预期用途。

[JJF 1001—2011,定义 8.14]

3.1.3

精密度 precision

在规定条件下,所获得的独立测试/测量结果间的一致程度。

注1:精密度仅依赖于随机误差的分布,与真值或规定值无关。

注2:精密度的度量通常以表示“不精密”的术语来表示,其值用测试结果或测量结果的标准差来表示。标准差越大,精密度越低。

注3:精密度的定量度量严格依赖于所规定的条件,重复性条件和再现性条件为其中两种极端情况。

[GB/T 20001.4—2015,定义 3.3]

3.1.4

重复性 repeatability

重复性条件下的精密度。

注：重复性可以用结果的离散特性来定量表示。

[GB/T 20001.4—2015, 定义 3.5]

3.1.5

重复性条件 repeatability conditions

为获得独立测试/测量结果,由同一操作员按相同的方法、使用相同的测试/测量设施、在短时间间隔内对同一测试/测量对象进行测试/测量的观测条件。

注：重复性条件包括：

- 相同的测量程序或测试方法；
- 同一操作员；
- 在同一条件下使用同一测量或测试设施；
- 同一地点；
- 在短时间间隔内的重复。

[GB/T 20001.4—2015, 定义 3.6]

3.1.6

再现性 reproducibility

再现性条件下的精密度。

注 1：再现性可以用结果的离散特性来定量表示。

注 2：结果通常理解为已修正的结果。

[GB/T 20001.4—2015, 定义 3.8]

3.1.7

再现性条件 reproducibility conditions

由不同的操作员按相同的方法、使用不同的测试/测量设施、对同一测试/测量对象进行观测以获得独立测试/测量结果的观测条件。

[GB/T 20001.4—2015, 定义 3.9]

3.1.8

批间差异 batch-to-batch variation

在重复性条件下,同一厂家不同批次提取纯化试剂盒的核酸提取产量、纯度和完整度等指标的精密密度。

3.2 缩略语



下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

mRNA: 信使核糖核酸(messenger Ribonucleic Acid)

OD: 光密度(Optical Density)

RNA: 核糖核酸(Ribonucleic Acid)

rRNA: 核糖体核糖核酸(ribosomal Ribonucleic Acid)

TAE: 由三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、乙酸(Acetic acid)和乙二胺四乙酸(EDTA)组成的缓冲液

tRNA: 转运核糖核酸(transfer Ribonucleic Acid)

4 评价指标

4.1 产量

核酸提取纯化试剂盒从一定质量或体积的样本中提取得到的 DNA 或 RNA 的总质量。应达到或符合试剂盒说明书声称的提取产量要求。

4.2 纯度

核酸提取物中目标核酸的纯度,以核酸提取物中目标核酸与残留杂质的相对比值(如 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230})或电泳图条带等表示核酸提取产物的纯度。

注:残留杂质包括来自于样本的蛋白质、多糖、多酚等,来自于提取溶剂的有机溶剂、异硫氰酸等,以及 DNA 提取时残留的 RNA、RNA 提取时残留的 DNA、mRNA 提取时残留的 rRNA 等。

4.3 完整度

提取核酸时,防止物理因素(剪切力、高温)、化学因素(强酸、强碱)和生物因素(核酸酶)破坏,保持核酸一级结构完整而不发生改变的程度。

4.4 重复性

重复性条件下,核酸提取产量、纯度和完整度的精密度。

4.5 再现性

再现性条件下,核酸提取产量、纯度和完整度的精密度。

4.6 批间差异

重复性条件下,同一厂家试剂盒,不同批次间的核酸提取产量、纯度和完整度的精密度。

4.7 细菌内毒素残留

核酸提取物中残留的来源于革兰氏阴性菌细胞壁的细菌内毒素脂多糖的含量。

注:对于用于转染的质粒或其他用于生物体内试验的核酸,需要检测细菌内毒素的残留量。

5 评价方法

5.1 总则

核酸提取纯化试剂盒的质量评价,应使用与试剂盒声称适用的样品一致或接近的标准物质(包括日常用于评估测量程序精密度的标准物质/标准样品,即质量控制样品)。当没有标准物质时,可使用足够均匀的、与试剂盒声称适用的样品一致或接近的样品。应使用经计量检定或校准的仪器。

5.2 产量

采用紫外分光光度法、荧光法等测定核酸提取液中的核酸浓度,经计算,得到提取核酸的产量。
测定方法参见附录 A 中的 A.1。

5.3 纯度

对蛋白质、多糖、多酚、异硫氰酸等残留杂质,采用紫外分光光度法,测定 260 nm、280 nm、230 nm

下的光密度 OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₂₃₀，计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值，评估提取核酸的纯度。

对 DNA 提取时残留的 RNA、RNA 提取时残留的 DNA、mRNA 提取时残留的 rRNA，采用琼脂糖凝胶电泳法，检测非目标核酸残留的电泳条带，评估提取核酸的纯度。

测定方法参见 A.2。

5.4 完整度

采用琼脂糖凝胶平板电泳法、芯片电泳法等方法进行核酸完整度的测定。分析不同相对分子质量大小核酸片段的荧光亮度或峰高，评估提取核酸的完整度。

测定方法参见 A.3。

5.5 重复性

在同一实验室，由同一操作员使用相同的设备，采用同一批次的提取纯化试剂盒，对标准物质或足够均匀的样品，进行提取纯化。在 1 d 内重复提取不少于 6 个平行样品。以重复性条件下提取核酸的产量、纯度和完整度的精密度的指标评价重复性，计算见式(1)。

$$RSD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- RSD_r ——重复性测量结果的相对标准偏差，%；
- n ——平行测定样品的数量，个；
- x_i ——第 i 个样品的测量结果；
- \bar{x} ——n 个样品的测量结果的平均值。

5.6 再现性



在不少于 5 家不同的实验室，由不同的操作员使用不同的设备，采用同一批次的核酸提取纯化试剂盒，对同一标准物质或足够均匀的样品，进行提取纯化。各重复提取 3 个平行样品。以再现性条件下提取核酸的产量、纯度和完整度的精密度的指标评价再现性，计算见式(2)。

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2}{m-1}} \times \frac{1}{\bar{y}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- RSD_R ——再现性测量结果的相对标准偏差，%；
- m ——参加再现性评价的实验室的数量，家；
- y_i ——第 i 家实验室的 3 个平行样品测量结果的平均值；
- \bar{y} ——m 家实验室测量结果的总平均值。

5.7 批间差异

在同一实验室，由同一操作员，使用相同的设备，采用同一核酸提取纯化试剂盒的 3 个不同批次，对同一标准物质或足够均匀的样品，进行提取纯化。各批次试剂盒分别重复提取 3 个平行样品。以上述条件下试剂盒批次间提取产量、纯度和完整度的精密度的指标评价批间差异，计算见式(3)。

$$RSD_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^b (z_i - \bar{z})^2}{b-1}} \times \frac{1}{\bar{z}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

RSD_b ——批间差异测量结果的相对标准偏差，%；

b ——样品不同批次的数量，个；

z_i ——第 i 个批次的 3 个平行样品测量结果的平均值；

\bar{z} —— b 个批次样品的测量结果的总平均值。

5.8 细菌内毒素残留

对于提取用于转染的质粒或其他用于生物体内试验的核酸试剂盒，对提取核酸中的细菌内毒素残留进行定量。

测定方法参见 A.4。

6 质量评价报告

应包括试剂盒所提取核酸的产量、纯度、完整度，及其重复性、再现性和批间差异。如有必要，还应包括细菌内毒素残留。



附 录 A
(资料性附录)

核酸提取产量、纯度、完整度和细菌内毒素残留的测定方法

A.1 核酸提取产量测定方法

A.1.1 紫外分光光度法

A.1.1.1 试剂和仪器

去离子水,18.2 MΩ;
核酸样品溶解缓冲液;
微量紫外分光光度计;
微量移液器。



A.1.1.2 操作步骤

用去离子水将检测池清洗三次,每次 2 μL,用无尘纸擦拭干净。加入 2 μL 核酸样品溶解液作为空白对照,在 260 nm 波长下校零。取核酸提取溶液 2 μL,在 260 nm 波长下测定,每测一次,用去离子水清洗检测池三次。

注:利用微量紫外分光光度计测定核酸提取溶液的 OD₂₆₀,OD₂₆₀测量值的范围在 0.05~1.0 之间才能保证测量值的有效性。如果不在此范围,可进行适当的稀释或浓缩。

A.1.1.3 结果计算

核酸提取产量计算方法:按照式(A.1)计算核酸提取原溶液中的核酸质量浓度 ρ,按照式(A.2)计算提取核酸产量 m。

$$\rho = OD_{260} \times N \times \epsilon / b \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- ρ ——核酸提取原溶液中的核酸质量浓度,单位为纳克每微升(ng/μL);
- OD₂₆₀ ——核酸在 260 nm 下的光密度;
- N ——样品稀释倍数;
- ε ——消光系数,依赖于波长(双链 DNA 为 50 ng · cm/μL,单链 DNA 为 33 ng · cm/μL, RNA 为 40 ng · cm/μL);
- b ——光程,单位为厘米(cm)。

$$m = \rho \times V \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

- m ——提取核酸产量,单位为纳克(ng);
- ρ ——核酸提取原溶液中的核酸质量浓度,单位为纳克每微升(ng/μL);
- V ——核酸提取原溶液的体积,单位为微升(μL)。

A.1.2 荧光法

采用荧光计测量,荧光染料标记核酸的荧光强度与核酸含量成正比。此方法可以排除核糖核酸、脱氧核糖核酸以及蛋白质三者之间的相互干扰。

A.1.2.1 试剂和仪器

荧光法核酸定量试剂盒:含核酸荧光染料、核酸样品溶解缓冲液、标准品溶液;
去离子水,18.2 MΩ;
微量荧光计;
微量移液器;
涡旋仪。

A.1.2.2 操作步骤

配制检测工作液:将试剂盒中的各组分恢复至室温。在 0.5 mL PCR 薄壁管中,使用核酸样品溶解缓冲液,按比例将适量核酸荧光染料试剂稀释至 1×(如:取 1 μL 荧光染料试剂,加入 199 μL 核酸样品溶解缓冲液),现用现配。工作液配制好后,3 h 内使用。

配制待检标准品溶液:取 190 μL 检测工作液至 2 个 0.5 mL PCR 薄壁管中,分别加入 10 μL 标准品 1 溶液和标准品 2 溶液,轻轻涡旋振荡 2 s~3 s,尽量避免气泡产生。

配制待检核酸样品溶液:取 180 μL~199 μL 检测工作液至样本的 PCR 管中,分别加入 1 μL~20 μL 待检样本,使 PCR 管中每个样本终体积为 200 μL,轻轻涡旋振荡 2 s~3 s,尽量避免气泡产生。

将所有待检 PCR 管置于室温避光孵育 2 min。

按照荧光计的操作说明,测定荧光信号值。

为保证结果的准确性,标准曲线上的每个浓度应做 2 个平行。每个样品应重复检测三次,从与荧光染料的混合开始。

A.1.2.3 结果计算

使用核酸标准品溶液绘制标准曲线,通过标准曲线线性回归方程计算核酸提取原溶液中核酸浓度。然后根据式(A.2)计算提取核酸产量。

A.2 纯度测定方法

A.2.1 紫外分光光度法

A.2.1.1 试剂和仪器

去离子水,18.2 MΩ;
核酸样品溶解缓冲液;
微量紫外分光光度计;
微量移液器。

A.2.1.2 操作步骤

用去离子水将检测池清洗三次,每次 2 μL,用无尘纸擦拭干净。

加入 2 μL pH 7.0~8.5 的核酸样品溶解液作为空白对照,在 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长下校零。

取核酸样品溶液 2 μL 核酸样品溶液,在 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长下测定,每测一个样品,用去离子水清洗基座三次。

注 1:利用紫外分光光度计测定核酸样品溶液的 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{230} ,OD 测量值的范围在 0.05~1.0 之间才能保证测量值的有效性。如果不在此范围,可对核酸样品溶液进行适当的稀释或浓缩。

注2: OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 比率是依赖于用于空白和样品测量的缓冲 pH 值和离子强度。对照及样品稀释液需使用 10 mmol/L Tris · HCl, pH 值 7.5, 用水作为稀释液将导致比值偏低, 此时可尝试将 pH 值调到 8.0 左右再检测。

A.2.1.3 结果计算

计算 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 的比值。每个样品重复测定 3 次, 计算求得平均比值。

A.2.1.4 纯度判断

理论上核酸在 260 nm 处达到最大的吸收峰, 蛋白质在 280 nm 处达到最大的吸收峰, 多糖和有机溶剂在 230 nm 处达到最大的吸收峰。通过计算 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 判断提取产物的纯度。

纯 DNA: $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8(1.8 \sim 2.0)$ (> 2.0 , 表明有 RNA 污染; < 1.8 , 表明有蛋白质、多酚等污染)。 $OD_{260}/OD_{230} > 2.0(2.0 \sim 2.5)$ (< 2.0 , 表明有残存的多糖、盐或其他有机溶剂)。

纯 RNA: $OD_{260}/OD_{280} \approx 2.0(1.8 \sim 2.0)$ (< 1.8 时表明有蛋白质污染; > 2.0 时表明可能有异硫氰酸残存)。 $OD_{260}/OD_{230} > 2.0(2.0 \sim 2.5)$ (< 2.0 , 表明有残存的多糖、盐或其他有机溶剂)。

A.2.2 琼脂糖凝胶平板电泳法

采用琼脂糖凝胶平板电泳法检测非目标核酸残留的电泳条带。方法可参考 A.3 中的琼脂糖凝胶平板电泳法。

对 DNA 提取时残留的 RNA, DNA 中的 RNA 污染为较小片段的电泳条带。

对 RNA 提取时残留的 DNA, DNA 污染为较大片段的基因组 DNA 残留电泳条带。

对 RNA, 包括真核样品的 28S 和 18S 的 rRNA 条带, 原核样品 23S 和 16S 的 rRNA 条带, 以及细胞内 mRNA 和 tRNA 的非常明亮的连续条带。

A.3 完整度测定方法

A.3.1 DNA 琼脂糖凝胶平板电泳法

根据核酸本身携带的电荷和相对分子质量的差异, 经琼脂糖凝胶平板电泳实现分离。核酸分子经染色剂染色, 在凝胶成像系统的紫外光激发下, 发出荧光。根据电泳条带的位置, 与 DNA 分子量标准进行对比, 判断核酸片段的相对分子质量, 分析核酸完整度。

A.3.1.1 试剂和仪器

灭菌双蒸水;

TAE 缓冲液: 羟甲基氨基甲烷 (Tris) 242 g, 冰乙酸 57.1 mL, 0.5 mol/L EDTA 溶液 100 mL (pH 8.0), 灭菌双蒸水加至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min。得到 50×TAE 电泳缓冲液。用灭菌双蒸水稀释至 1×TAE;

6×核酸上样缓冲液: 含 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 30% 甘油的水溶液;

琼脂糖, 生化级;

溴化乙锭, 生化级;

溴酚蓝, 生化级;

DNA 分子量标准, 分析纯;

平板电泳仪;

凝胶成像系统;

微量移液器。

A.3.1.2 操作步骤

A.3.1.2.1 制胶

按表 A.1 选择合适的凝胶浓度,以 20 mL 胶体为例,称取 0.2 g 琼脂糖凝胶,按比例加入 20 mL 1×TAE 缓冲液,放入锥形瓶中。摇匀,微波炉加热煮沸至琼脂糖完全溶解,稍冷却加入适量的溴化乙锭至浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。水平放置胶槽,在一端插好梳子,在槽内缓慢倒入已冷至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右的胶液,室温冷却凝固 30 min~45 min,待完全凝固后,使之形成均匀水平的胶面。缓慢拔起梳子,确保点样孔完好。使加样孔端置阴极端放进电泳槽内。在槽内加入 1×TAE 电泳缓冲液直至液面覆盖过胶面。

表 A.1 琼脂糖凝胶电泳分离范围

琼脂糖凝胶浓度/%	可分辨的线性 DNA 大小范围/kb
0.4	5~60
0.7	0.8~10
1.0	0.4~6
1.5	0.2~4
1.75	0.2~3
2.0	0.1~3

A.3.1.2.2 点样

取 1 μL 上样缓冲液(6×),加入 5 μL 待测 DNA 提取溶液,混合均匀,以微量移液器加入点样孔下部。上样的 DNA 提取溶液浓度不低于 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。本条件下,宜使用 15 000 DNA 分子量标准或 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 标准,上样量 4 μL 。

A.3.1.2.3 电泳

接通电泳仪和电泳槽并接通电源,调节电压至 100 V(3 V/cm~5 V/cm),开始电泳。可见染色条带由负极向正极移动,当溴酚蓝移动至距胶板前沿约 1 cm 处,可停止电泳。根据实际情况对电压和时间进行调整。

A.3.1.2.4 观察

经琼脂糖凝胶平板电泳后使用凝胶成像系统与 DNA 分子量标准进行对比,分析 DNA 完整度。根据条带位置判断 DNA 链的长度,根据条带的荧光强度大致判断 DNA 量。

A.3.1.3 完整度判断

若琼脂糖凝胶电泳主带单一,为一条清晰明亮的条带,无拖尾和弥散,说明 DNA 的完整性好。若条带拖尾或者弥散,均为完整度差,说明提取的 DNA 发生了较严重的降解。

A.3.2 RNA 琼脂糖凝胶平板电泳法

A.3.2.1 试剂和仪器

灭菌双蒸水;

MOPS 缓冲液(10×): 0.4 mol/L 吗啉代丙烷磺酸(MOPS) (pH 7.0), 0.1 mol/L 醋酸钠(NaAc) 溶液, 10 mol/L EDTA;

上样染料: 50%甘油, 1 mmol/L EDTA, 0.4%溴酚蓝, 0.4%二甲苯蓝;

甲醛, 分析纯;

乙醇, 分析纯;

H₂O₂, 分析纯;

去离子甲酰胺, 生化级;

琼脂糖, 生化级;

溴化乙锭, 生化级;

0.1%DEPC 水(焦碳酸二乙酯处理的水);

RNA 分子量标准, 分析纯;

平板电泳仪;

凝胶成像系统;

微量移液器。

A.3.2.2 操作步骤

A.3.2.2.1 制胶和灌胶

称取 0.5 g 琼脂糖, 置干净的 100 mL 锥形瓶中, 加入 40 mL 蒸馏水, 微波炉内加热使琼脂糖彻底溶化均匀。待胶凉至 60 °C~70 °C, 依次向其中加入 9 mL 甲醛、5 mL 10× MOPS 缓冲液和 0.5 μL 溴化乙锭, 混合均匀。经去污剂洗干净(一般浸泡过夜)一水冲洗一乙醇干燥一3% H₂O₂ 灌满一室温放置 10 min—0.1%DEPC 水清洗电泳槽, 烘干后, 灌制琼脂糖凝胶。

A.3.2.2.2 上样

取 DEPC 处理过的 500 μL 离心管, 依次加入如下试剂: 10×MOPS 缓冲液 2 μL, 甲醛 3.5 μL, 甲酰胺(去离子)10 μL, RNA 样品 4.5 μL, 混匀。

将离心管置于 60 °C 水浴中保 10 min, 再置冰浴上 2 min。

向管中加入 3 μL 上样染料, 混匀。

以微量移液器加入点样孔下部, 上样量 4 μL。

A.3.2.2.3 电泳

电泳槽内加入 1×MOPS 缓冲液, 7.5 V/mL 的电压条件下电泳。

A.3.2.2.4 观察

使用凝胶成像系统与 RNA 分子量标准进行对比, 分析 RNA 完整度。根据荧光位置判断 RNA 链的长度, 根据荧光强度大致判断 RNA 量。

完整总 RNA 的电泳谱图为清晰的两条条带, 真核样品为 28S 和 18S 的 rRNA 条带, 原核样品为 23S 和 16S 的 rRNA 条带。

A.3.3 DNA 和 RNA 的芯片电泳法

将试剂盒提取所得的核酸提取液, 依据芯片电泳仪的操作指南, 在核酸芯片电泳装置下由微流体芯片进行分离, 测定不同片段大小核酸的荧光信号强度。

对 DNA 提取物, 测定 DNA 样本中不同片段长度 DNA 的分布和丰度大小, 综合计算后评价 DNA

完整性。

对真核生物总 RNA,测定真核生物核糖体小亚基 28S rRNA 与 18S rRNA 的丰度比,计算后评价真核生物总 RNA 完整性,比值 >1.5 为高质量,1.3~1.5 为尚可使用, <1.3 为较差。

对原核生物总 RNA,测定原核生物核糖体小亚基 23S rRNA 与 16S rRNA 的丰度比,计算后评价原核生物总 RNA 完整性,比值 >1.5 为高质量,1.3~1.5 尚可使用, <1.3 为较差。数值越大表明核酸完整度越高,质量越好。

对总 RNA 提取物,电泳时会产生清晰的两条条带(真核样品为 28S 和 18S 的 rRNA 条带,原核样品为 23S 和 16S 的 rRNA 条带)。28S rRNA 条带的强度应当大致为 18S rRNA 条带的两倍。2:1 的比率(28S:18S)是判断 RNA 完整性的重要指标。部分降解的 RNA 样品电泳条带会弥散,没有清晰的 rRNA 条带,或者不会出现 2:1 比率(28S:18S)。完全降解的 RNA 会表现为在极低相对分子质量处的弥散状。如果 28S 和 18S rRNA 条带清晰,且(28S:18S) >1 ,该完整性可以满足绝大部分后续试验的要求。

完整的 mRNA 的电泳谱图无明显的 rRNA 条带,为 0.5 kb~6 kb 大小范围的弥散。

A.4 细菌内毒素残留测定方法

测定方法参考《中华人民共和国药典》(2015 年版)四部的“1143 细菌内毒素检查法”中的方法 2“光度测定法”。