

团 体 标 准

T/SZAS 46—2022

热启动 Taq DNA 聚合酶性能验证

Performance verification of hot-start Taq DNA polymerase

2022 - 07 - 01 发布

2022 - 07 - 10 实施

深圳市标准化协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 热启动 Taq DNA 聚合酶的分类	2
5 性能要求	2
6 验证方法	3
7 验证规则	5
附录 A（资料性）质控品相关信息	6

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。

本文件由深圳华大医学检验实验室提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：深圳华大医学检验实验室、武汉华大医学检验所有限公司、深圳华大基因股份有限公司、深圳华大生命科学研究院、天根生化科技(北京)有限公司、苏州海狸生物医学工程有限公司、江苏康为世纪生物科技股份有限公司、翌圣生物科技(上海)股份有限公司、南京诺唯赞生物科技股份有限公司、菲鹏生物股份有限公司、北京全式金生物技术有限公司、武汉爱博泰克生物技术有限公司、武汉瀚海新酶生物技术有限公司、上海吐露港生物技术有限公司、广州华峰生物技术有限公司。

本文件主要起草人：阳晶晶、唐美芳、葛建敬、吴平、吴亚、张红云、张双宇、任辉、何文龙、杨广宇、杨浩、罗丹、耿亮、苏伟生、柴智、刘杨杨、吴昊、李倩一、肖周婷。

热启动 Taq DNA 聚合酶性能验证

1 范围

本文件规定了热启动 Taq DNA 聚合酶的分类、性能要求、验证方法、验证规则。

本文件适用于热启动 Taq DNA 聚合酶制造商和使用热启动 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 相关实验的各类检测机构。

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/T 191 包装储运图示标志

GB/T 2828.1—2012 计数抽样检验程序 第1部分：按接收质量限（AQL）检索的逐批检验抽样计划

GB/T 19495.4—2018 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应（PCR）检测方法

GB/T 35542—2017 Taq DNA聚合酶

GB/T 40174—2021 工具酶纯度的检测方法

YY/T 0681.11—2014 无菌医疗器械包装试验方法 第11部分：目力检测医用包装密封完整性

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

热启动 Taq DNA 聚合酶 hot-start Taq DNA polymerase

热启动Taq DNA聚合酶经过人工化学修饰或抗体结合或配体结合，在常温下，其活性位点被封闭，不具有催化活性。当PCR反应初期的热变性阶段，体系稳定上升到90℃以上时，与活性位点氨基酸结合的化学基团或抗体与氨基酸的侧链基团解离，活性位点暴露，恢复其DNA聚合酶活性，因而这样经过修饰的Taq DNA聚合酶被称为热启动Taq DNA聚合酶。

3.2

Taq DNA 聚合酶活性单位 activity unit of Taq DNA polymerase

用活化的大马哈鱼精子DNA或M13噬菌体基因组单链作为模板/引物，74℃，30 min内，将10 nmol的脱氧核苷酸掺入到酸不溶性物质所需的酶量为一个单位（U）。活力单位检测方法可以用放射性标记法或化学发光法。

3.3

热启动 Taq DNA 聚合酶纯度 purity of hot-start Taq DNA polymerase

热启动Taq DNA聚合酶在样品总蛋白中所占的质量百分比。

[来源：GB/T 40174—2021， 3.1]

3.4

实时荧光定量聚合酶链式反应 real-time quantitative PCR; qPCR

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

[来源：GB/T 19495.4—2018， 3.1.2]

3.5

Ct 值 cycle threshold

每个管内荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.6

目力检测 visual inspection

在540 lx光照度的白光或日光下，以30 cm~45 cm目力距离进行检测。

3.7

扩增效率 amplification efficiency

扩增效率衡量PCR在一定循环数内的有效扩增，即每个循环扩增模板的百分比，一般用E表示，与标准曲线的斜率有关，计算方程为 $E = (10^{-1/\text{斜率}}) - 1$ 。

3.8

核酸内切酶 endonuclease

在核酸水解酶中，可水解分子链内部磷酸二酯键生成寡核苷酸的酶。

3.9

核酸外切酶 exonuclease

在核酸水解酶中，是具有从分子链的末端顺次水解磷酸二酯键而生成单核苷酸作用的酶。

4 热启动 Taq DNA 聚合酶的分类

4.1 按产品工艺分类

按产品工艺可分为化学修饰型、抗体修饰型和配体修饰型。

4.2 按产品储存分类

按产品储存分类可分为含甘油型和不含甘油型，其中不含甘油型为冻干型。

5 性能要求

5.1 外观

5.1.1 外包装箱储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

5.1.2 含甘油型产品外观应澄清透明液体，无沉淀。冻干型产品外观一般应为白色或类白色，无明显杂质。

5.2 酶活力

酶的活力应大于或等于5000 U/mL，其中酶活力大小用Taq DNA聚合酶活性单位来表示。

5.3 酶纯度

取5 μg Taq DNA聚合酶，加入聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液后置于沸水浴5min，经聚丙烯酰胺凝胶电泳，考马斯亮蓝G250染色，摇床脱色，最后用凝胶分析软件得出目的条带含量，纯度应大于或等于95%。此项不适用于抗体修饰型热启动Taq DNA聚合酶。

5.4 干扰物质

5.4.1 核酸外切酶残留：使用ccc pUC19 DNA测试热启动Taq DNA聚合酶，在37℃下孵育10h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，电泳条带应不发生变化。

5.4.2 核酸内切酶残留：5U热启动Taq DNA聚合酶与0.3 μg pBR322 DNA在37℃下孵育4h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，电泳条带应不发生变化。

5.4.3 核糖核酸酶残留：5U热启动Taq DNA聚合酶与1 μg 293T cell RNA在37℃下孵育2h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，RNA的电泳条带应不发生变化。

5.4.4 脱氧核糖核酸酶残留：5U热启动Taq DNA聚合酶与1 μg 293T cell DNA在37℃下孵育2h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，DNA的电泳条带应不发生变化。

5.4.5 宿主DNA残留：使用*E. coli*残留DNA检测试剂盒进行DNA检测，Ct值大于37或无明显扩增曲线。

5.5 扩增效率

用NRAS Q61K质控品(具体信息见附录A)作为扩增模板，根据最适反应体系进行测试，扩增效率应在90%~110%之间，且 R^2 应大于或等于0.98。

5.6 准确度

用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，根据最适反应体系进行测试，测试的实测Ct值与理论Ct值的变异系数应小于或等于2%。

5.7 精密度

用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，根据最适反应体系进行测试，批间Ct值的CV值和批内Ct值的CV值应小于或等于2%。

5.8 重复性

用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，根据最适反应体系进行测试，重复10次批内Ct值的CV值应小于或等于2%。

5.9 稳定性

5.9.1 热稳定性：将 Taq DNA 聚合酶分别在 25℃ 和 37℃ 放置 72h 后所测得 Ct 值与 0h 的 Ct 值之间 CV 应小于或等于 2.5%。

5.9.2 反复冻融：将 Taq DNA 聚合酶分别反复冻融 15 次后测得 Ct 值与未反复冻融的 Ct 值之间 CV 应小于或等于 2.5%。

5.10 检测下限

用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，最低检测的扩增模板量应不高于30拷贝数。

5.11 热启动性能

使用多重PCR体系，在25℃孵育25min后，进行PCR扩增，产物进行凝胶电泳，电泳谱带应无二聚体条带产生。

6 验证方法

6.1 外观检测

根据 YY/T 0681.11—2014 的检测程序，通过目力检测，结果应符合 5.1 的要求。

6.2 酶活检测

根据GB/T 35542—2017中 Taq DNA聚合酶活性检测方法进行测试，结果应符合5.2的要求。

6.3 酶纯度检测

取5 μg Taq DNA聚合酶于EP管中，加入适量聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液，混匀后置于沸水浴中5min，冷却后的样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后考马斯亮蓝G250染色，再摇床脱色30min，最后用凝胶分析软件得出目的条带含量，通过其含量计算酶的纯度，结果应符合5.3的要求。此项不适用于抗体修饰型热启动Taq DNA聚合酶。

6.4 干扰物质检测

6.4.1 核酸外切酶残留：根据 GB/T 35542—2017 中核酸外切酶检测方法进行测试，结果应符合 5.4.1 的要求。

6.4.2 核酸内切酶残留：5U 热启动 Taq DNA 聚合酶与 0.3 μg pBR322 DNA 在 37℃ 下孵育 4h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，电泳条带应符合 5.4.2 的要求。

6.4.3 核糖核酸酶残留：5U 热启动 Taq DNA 聚合酶与 1 μg 293T cell RNA 在 37℃ 下孵育 2h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，电泳条带应符合 5.4.3 的要求。

6.4.4 脱氧核糖核酸酶残留：5U 热启动 Taq DNA 聚合酶与 1 μg 293T cell DNA 在 37℃ 下孵育 2h，经琼脂糖凝胶电泳，染色，电泳条带应符合 5.4.4 的要求。

6.4.5 宿主 DNA 残留：使用 *E. coli* 残留 DNA 检测试剂盒进行 DNA 检测，Ct 值大于 37 或无明显扩增曲线。

6.5 扩增效率检测

使用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，将质控品进行10倍梯度稀释，5个梯度，依次设置为S0~S4。根据酶试剂说明书进行测试并制作出标准曲线，再根据公式 $E = (10^{-1/\text{斜率}}) - 1$ 及标准曲线的斜率计算出扩增效率E，结果应符合5.5的要求。

6.6 准确度检测

使用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，将质控品分别稀释5个梯度，依次设置为S0~S4，稀释倍数可根据不同厂家标准调整，按照酶试剂说明书进行实际测试，得出实际测试的Ct值，再通过标准曲线分别计算稀释后的5个稀释样本对应的理论Ct值，最后计算出实测Ct值与理论Ct值的CV值，结果应符合5.6的要求。

6.7 精密度检测

使用NRAS Q61K质控品作为扩增模板，对酶试剂分别进行批内和批间测试，两者技术重复均为3次，按照酶试剂说明书进行测试，最后计算批内Ct值和批间Ct值的CV值，结果应符合5.7的要求。

6.8 重复性检测

使用NRAS Q61K质控品测试一个批次的酶试剂，设置10次技术重复，按照酶试剂说明书测试，通过Ct值计算其CV值，结果应符合5.8的要求。

6.9 稳定性检测

6.9.1 热稳定性：将Taq DNA聚合酶分别在25℃和37℃放置72h，根据酶试剂说明书分别测试放置不同条件的酶，最后计算在25℃和37℃相应放置时间的酶的Ct值与对应0h的Ct值之间的CV值，结果应符合5.9.1的要求。

6.9.2 反复冻融：将Taq DNA聚合酶分别反复冻融15次后，根据酶试剂说明书分别测试放置不同条件的酶，最后计算测得Ct值与未反复冻融的Ct值之间CV值，结果应符合5.9.2的要求。

6.10 检测下限检测

NRAS Q61K质控品作为扩增模板，将质控品稀释成30拷贝数的起始量，根据酶试剂说明书进行测试，结果应符合5.10的要求。

6.11 热启动性能检测

使用多重PCR体系，在25℃孵育25min后，进行PCR扩增，产物进行凝胶电泳，结果应符合5.11的要求。

参考多重PCR体系见表1。

表1 多重 PCR 体系

PCR 组分	体积用量 (μL)
PCR Buffer (含dNTP、Mg ²⁺)	12.5 μL
Q61K-F (10μM)	0.5 μL
Q61K-R (10μM)	0.5 μL
ICON-F (10μM)	0.5 μL
ICON-R (10μM)	0.5 μL
Hot start Taq (5U/μL)	0.2 μL
H ₂ O	8.3 μL
Q61K细胞系DNA (5ng/μL)	2.0 μL

参考多重PCR程序见表2。

表2 多重 PCR 程序

温度	时间	循环数
25℃	25min	1

表2 多重PCR程序（续）

温度	时间	循环数
95℃	5min	1
95℃	15s	40
60℃	30s	
72℃	15s	
4℃	hold	

7 验证规则

7.1 检验规则

检验规则应遵循以下几点：

- a) 新产品投产前或准备用于实验之前，对本文件中所有项目进行检验；
- b) 产品停产半年以上恢复生产时，对本文件中所有项目进行检验；
- c) 原料、工艺、配方及设备的变更可能会影响产品性能时，对可能受影响的项目增加检验次数；
- d) 新批次在出厂和使用前选择本文件中相关项目进行检验。

7.2 取样判定规则

取样判定规则应遵循以下几点：

- a) 产品按批次进行检验，同一批原料一次生产的同规格产品为一批次；
- b) 抽样样本如有一项指标测试不合格，即可判定整体指标测试不合格；
- c) 抽样方案及判定标准按 GB/T 2828.1—2012 规定的方法执行。

附录 A
(资料性)
质控品相关信息

A.1 NRAS Q61K-WT 序列

ATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTGGATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGAA
GGCTTCCTCTGTGTATTTGCCA

A.2 NRAS Q61K-Mu 序列

ATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTGGATACAGCTGGAAAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGAA
GGCTTCCTCTGTGTATTTGCCA

A.3 NRAS Q61K 引物探针序列

Q61K-F: 5' -CTGTTTGTGGACATACTGGATA-3'

Q61K-R: 5' TACACAGAGGAAGCCTTCG-3'

Q61K-Mu-P: 5' -FAM-AGCTGGAAAAGAAGAGTACAGTGCC-MGB-3'

A.4 ICON 引物序列

ICON-F: GGGCCACTAGGCGCTCA

ICON-R: AGCCACCCGCGAACTCA

A.5 NRAS Q61K 质控品

NRAS Q61K 质控品是浓度为 50 ng/ μ L 的 NCIH2087 细胞系 DNA，该细胞系存在 NRAS Q61K 突变，经数字 PCR 定量，突变频率为 35%。
