



中华人民共和国医药行业标准

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

Tissue engineered medical product—Part 25:
Quantification of remnant DNA in biological materials utilizing animal
tissues and their derivatives: Fluorescence method

2014-06-17 发布

2015-07-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0606《组织工程医疗产品》已经或计划发布以下部分：

- 第2部分：术语；
- 第3部分：通用分类；
- 第4部分：皮肤替代品(物)的术语和分类；
- 第5部分：基质及支架的性能和测试；
- 第6部分：I型胶原蛋白；
- 第7部分：壳聚糖；
- 第8部分：海藻酸钠；
- 第9部分：透明质酸钠；
- 第10部分：修复或再生关节软骨的植入物的体内评价；
- 第12部分：细胞、组织、器官的加工处理指南；
- 第13部分：细胞自动计数法；
- 第14部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：ELISA法；
- 第15部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验；
- 第16部分：保存指南；
- 第17部分：外源性因子评价指南；
- 第18部分：海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南；
- 第19部分：修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南；
- 第20部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：细胞迁移试验；
- 第24部分：可吸收生物材料植入试验评价规范；
- 第25部分：动物源性生物材料DNA残留量测定法：荧光染色法；
- 第26部分：聚合物支架微结构评价指南。

本部分为YY/T 0606的第25部分。

本部分按GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本部分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。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由中国食品药品检定研究院归口。

本部分起草单位：中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：徐丽明、陈亮、邵安良。

引 言

由哺乳动物细胞外基质构成的生物源性支架材料被普遍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,人的皮肤等。由于细胞膜的表位抗原、同种异体或异种的 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。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。美国的 FDA 也没有对动物源性生物材料残留 DNA 限量的具体规定。使用动物源性生物材料的医疗器械成为动物源医疗器械。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”行业标准。此标准包括第 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”。我国于 2009 年出台了“动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则”(食药监办械函[2009]519 号)。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 探针杂交法及荧光染色法(《中华人民共和国药典》2010 年版 三部,附录 IX-B 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或人的组织(主要是基质组织),经脱细胞等工艺制作而成,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。

所以,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。本标准将阐述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 第 25 部分：
动物源性生物材料 DNA 残留量测定法：
荧光染色法

1 范围

YY/T 0606 的本部分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，也可用于人源性材料。

本部分所述试验方法用于动物源性生物材料的残留 DNA 定量检测。待检测样品的 DNA 残留量在本部分所述方法的检测灵敏度之内的检测结果有效。针对每一特定的样品，试验条件的设定是否合理需要有适当的方法学验证。除本标准所选方法外，可采纳其他等效方法。

实施本部分的使用者应建立相应的安全与健康条例，并规定管理条例的适用性。

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。

中华人民共和国药典 2010 年版 三部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基质 matrix

组织工程医疗产品中作为细胞或生物分子生长、支持或输送载体的原材料，可以是高分子合成物质，也可以是生物组织的细胞外基质(matrix)来源的生物源性物质。

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、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。

4 样品、试剂和器材

4.1 样品

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,应使用化学交联等工艺前的中间产品。

注: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,可采用材料浸提液进行后续实验。但是,结果只能反映可浸提的 DNA 残留量,不能代表被检品的实际 DNA 残留量。此时应对浸提条件作具体规定。

4.2 试剂

4.2.1 蛋白酶 K 消化用试剂

蛋白酶 K(−20 °C 保存,避免反复冻存和融化)、蛋白酶 K 缓冲液。

4.2.2 DNA 纯化用试剂

磁珠(4 °C 保存)、裂解液、DNA 结合液、漂洗液、溶出液(室温保存)。

注 1:可选择使用核酸精制试剂盒,例如“PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit”。

注 2:可选用其他同等效果的试剂盒,也可采用传统的酚氯仿抽提/乙醇沉淀法,但需要验证其回收率、灵敏度及可重复性,确保能够满足实验的要求。

4.2.3 荧光染色法检测试剂

本部分验证实验所用试剂盒为“Quant-IT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits”。

注:选用其他双链 DNA 荧光染料时,按试剂使用说明书配制。

4.2.4 其他试剂

回收率试验用标准品 Lambda DNA、DEPC water、3% BSA。

注:DEPC 水(DEPC treated water):用焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)处理过并经高温高压灭菌的微滤(MiliQ)纯净水。经检测证实不含核酸分解酶(RNase、DNase)和蛋白分解酶(proteinase)。DEPC 水可以用于 RNA 沉淀的溶解,含有 RNA 的各种反应体系如反转录、siRNA 的退火等,以及其他各种要求无核酸分解酶和蛋白分解酶的反应体系。

4.3 器材

4.3.1 磁力架。

4.3.2 96 孔板(黑色)。

4.3.3 荧光酶标仪。

4.3.4 DNase-free 无菌离心管;吸头。

4.3.5 冷冻离心机。

4.3.6 真空干燥器。

- 4.3.7 震荡器。
- 4.3.8 漩涡混悬器。
- 4.3.9 高精度天平(0.000 1 g)。

5 试验过程

5.1 总则

实验方案的设计主要依据《中华人民共和国药典》2010 年版,三部,附录 IX-B 外源性 DNA 残留量测定法及参考文献。

本部分所采用的实验方案包括三个步骤:

- 动物源性生物材料的消化处理,如:蛋白酶 K 消化(适用于固体或胶体状材料);
- 消化后样品的 DNA 纯化(如:磁珠吸附法);
- 纯化后样品的 DNA 残留量测定(荧光染色法)。

试验样品除供试品之外,需同步设定回收率试验样品(可使用标准品 Lambda DNA)。

因动物源性生物材料以胶原纤维等结构蛋白为主要组成成分,其对荧光染色法 DNA 测定有较强的干扰作用,因此本试验方法设定对供试品 DNA 做进一步纯化以排除干扰,保证精密度和回收率试验均符合要求。每次测定均应从一开始的消化步骤起增加回收率实验,并用回收率方程对测定结果进行校正。

试验过程中应采取防止 DNAase 污染的措施,如:戴手套操作、使用没有 DNAase 污染的专用实验台和实验用具及仪器。

以下将以蛋白酶 K 消化、磁珠法 DNA 纯化、PicoGreen 荧光染色三步法为例叙述试验步骤。

5.2 试验步骤

5.2.1 消化处理

5.2.1.1 供试品及反应液的准备

每份样品设三个平行样。取供试品精确称重并记录,放进 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内。

注 1:干燥型样品:取供试品精确称重并记录,放进 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内,用无菌眼科剪将样品剪裁成适当大小,加 DEPC 水至预先设定的体积,于 4℃ 冰箱内放置 12 h~24 h,使样品充分水和、软化。

注 2:湿润型样品:取供试品,放进 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内,13 000 r/min 离心 10 min,去除液体部分。另取与上述同样大小的样品,冻干或真空干燥后精确称重并记录,用于样品干重单位重量内 DNA 残留量的计算。

注 3:胶体型样品:称取供试品,放于 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。

注 4:骨质类样品:对于诸如同种异体骨等骨植入物样品应参照 GA/T 383—2002 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。

注 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 纯化试验。

注 6:不含 DNA 分解酶(DNase-free):经过特殊处理,已证实不含 DNA 分解酶。本实验实施过程中所用的所有和样品直接接触的离心管、吸头、移液管等器材均需保证不含 DNA 分解酶,以便防止样本中残留 DNA 被分解而不能正确地检测到。

将上述供试品剪成尽量小的碎片后,加蛋白酶 K 缓冲液(10 × 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 210 μL。

5.2.1.2 回收率样品及反应液的准备

取 DNA 标准品(Lambda DNA standard),如:400 ng、200 ng、100 ng、50 ng、25 ng、0 ng,用 DEPC

水稀释至 100 μL , 分别加在 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内, 添加蛋白消化酶 K 缓冲液 20 μL , 蛋白酶 K (20 mg/mL) 10 μL , 3% BSA 80 μL (目的是保证与供试品反应系统相同), 至最终反应体积为 210 μL 。

注: 标准品 DNA 样品系列浓度的设定应根据待检测样品 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), 保证待检测样品 DNA 含量在回收率曲线样品 DNA 添加量的范围之内。

5.2.1.3 蛋白酶 K 消化

将上述供试品和回收率样品反应液分别混匀后放在 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽内消化, 至待检测样品完全消化, 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: 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, 消化条件需要针对所选择的方法进行优化设计。

5.2.2 DNA 纯化

5.2.2.1 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。

示例: 使用 PrepSEQ™ 核酸提取试剂盒 (PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit) 进行 DNA 纯化。

注: 如果使用其他试剂盒请按说明书操作。

5.2.2.2 在上述各样品反应液中分别加入裂解液 400 μL , 震荡 10 s 使样品充分混匀, 室温放置 10 min, 使样品完全溶解 (最多可放置 1 h~2 h, 直至样品完全溶解)。

5.2.2.3 取出装有磁珠的离心管, 震荡 10 s 混匀后, 取 30 μL 磁珠液分别加入上述各样品内, 震荡 10 s 混匀。

5.2.2.4 加入 400 μL 结合液 (异丙醇), 震荡 5 s。

5.2.2.5 室温下震荡 (1 000 r/min) 孵育 10 min。

5.2.2.6 再次震荡 10 s 后, 将内装样品的离心管放在磁力架上, 收集结合有 DNA 的磁珠, 去除上清液。

5.2.2.7 漂洗 DNA: 加入 300 μL 洗液, 震荡 10 s 后, 将内装样品的离心管放在磁力架上, 收集结合有 DNA 的磁珠, 去除上清液。

5.2.2.8 重复步骤 5.2.2.7, 漂洗 DNA, 至少 2 次。

5.2.2.9 使结合有 DNA 的磁珠在室温下干燥 5 min。

5.2.2.10 溶出 DNA: 加入 50 μL 溶出液, 震荡 5 min, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽内孵育 5 min, 震荡 2 s 后, 将内装样品的离心管放在磁力架上, 分离 DNA。

5.2.2.11 转移上清部分 (含有纯化 DNA) 至新的 1.5 mL DNase-free 无菌离心管内, 标记为纯化后 DNA。

5.2.2.12 重复溶出 DNA: 加入 50 μL 溶出液, 重复 5.2.2.10~5.2.2.11, 共 2 次。

将三次溶出液充分混合, 最终获得纯化 DNA 总量 150 μL 。

注 1: 纯化后的 DNA 样品应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。

注 2: 可取纯化后的 DNA 进行凝胶电泳实验, 用于检测 DNA 断片的大小。

5.2.3 DNA 含量测定 (荧光染色法)

5.2.3.1 使用 5.2.2 中步骤 5.2.2.12 的纯化 DNA 样品进行 DNA 含量测定。

5.2.3.2 DNA 标准曲线组样品的准备: 标准品溶液的配制: 用 1 $\times$ TE 缓冲液将 DNA 标准品配成 0 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 。

将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。

5.2.3.3 回收率实验样品及供试品的准备: 取回收率实验 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：回收率实验 DNA 纯化样品和供试品 DNA 纯化样品的稀释倍数可以调整，应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）。

5.2.3.4 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，530 nm 为截止波长进行测定，以所得数据作图分析并求得回归方程。以 $1\times\text{TE}$ 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：该荧光测定法 DNA 检出限为 0.3 ng/mL。DNA 含量在 1.25 ng/mL~80 ng/mL 范围线性较好，因此供试品 DNA 含量在该范围内可定量测定；当 DNA 含量低于 1.25 ng/mL 时应为限量测定，表示为小于 1.25 ng/mL，此时应减少样品的稀释倍数后重新测定。

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

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

6 结果计算

6.1 首先对标准品和回收率试验样品及供试品进行 5 次重复测定，获得相对荧光强度值；取五次测定的 RFI 值平均数，并减去本底（只有 TE，无 DNA 时测得的 RFI 值）；

6.2 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：

$$x = (y - a_1) / b_1, R_1^2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

x ——添加量，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

y ——测定值，无单位；

a_1 ——常数；

b_1 ——常数；

R_1 ——相关系数。

6.3 将回收率试验 DNA 纯化样品和供试品 DNA 纯化样品所测得的 RFI 值分别减去回收率试验“0 ng”样品的 RFI 值，再分别代入标准曲线回归方程的 y ，求得各样品的 x ，即为 DNA 含量实测值(c ; ng/mL)；

6.4 通过 DNA 含量实测值，获得实测 DNA 质量；

$$m = c \times V \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

m ——实测 DNA 质量，单位为纳克(ng)；

c ——DNA 含量实测值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V ——测试前的反应体积，单位为毫升(mL)。

6.5 通过实测 DNA 质量，获得纯化后样品 DNA 总量；

$$m_{\text{post}} = m \times V_1 / V_2 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

m ——实测 DNA 质量，单位为纳克(ng)；

V_2 ——检测取样量，单位为微升(μL)；

V_1 ——纯化样品总量，单位为微升(μL)；

m_{post} ——纯化后样品 DNA 总量，单位为纳克(ng)。

6.6 用回收率样品的纯化前初始添加量(m_{pre})和纯化后样品的 DNA 含量(m_{post})绘制回收率曲线，获

得回收率曲线方程：

$$m_{\text{pre}} = (m_{\text{post}} - a_2)/b_2, R_2^2 \dots\dots\dots (4)$$

式中：

m_{pre} ——纯化前初始添加量,单位为纳克(ng)；

m_{post} ——纯化后样品 DNA 总量,单位为纳克(ng)；

a_2 ——常数；

b_2 ——常数；

R_2 ——相关系数。

6.7 将供试品纯化后样品的 DNA 含量(ng)代入回收率曲线方程,求得供试品纯化前 DNA 残留量(ng)；

6.8 最后通过供试品纯化前 DNA 残留量(ng),得到供试品单位重量的 DNA 残留量。

$$M_x = m_1/m_2 \dots\dots\dots (5)$$

式中：

M_x ——供试品单位重量 DNA 残留量,单位为纳克每毫克(ng/mg)；

m_1 ——供试品纯化前 DNA 残留量,单位为纳克(ng)；

m_2 ——供试品干重量,单位为毫克(mg)。

7 结果判定

7.1 标准曲线方程的相关系数 R_1^2 应大于 0.99。

7.2 回收率曲线方程的相关系数 R_2^2 应大于 0.95;最低回收率应不低于 50%。

7.3 以供试品单位重量(mg)的 DNA 含量为最终的 DNA 残留量,报告实际检测数值。

7.4 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。

7.5 以蛋白酶 K 消化、磁珠法 DNA 纯化、PicoGreen 荧光染色三步法为例的试验方法中回收率试验最低样本量为 6.25 ng DNA,低于 6.25 ng 时回收率明显下降,不能满足良好的准确性和精密度。因此,本试验方法中适宜的样本量为 ≥ 6.25 ng DNA/样品,即:最低检测限为 6.25 ng DNA/样品。若样品中 DNA 残留量低于 6.25 ng DNA/样品时,应加大样品的取样量,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,则只能报告未经回收率校正的检测值作为参考资料,此种情况在最终报告中应注明。

注 1: 选用不同的 DNA 纯化方法时应预先进行最低检测限和最低回收率验证。

注 2: 应充分考虑本标准中方法的适用性和灵敏度。如果被检样品的残留 DNA 量很低,DNA 纯化后的含量低于本方法的检出限时,应考虑使用其他方法(如实时定量 PCR 法)。

注 3: 在实施本标准推荐的试验前,应考虑 GB/T 16886.1—2011 或管理部门所推荐的方法(文件)所提示的信息,同时参考国内外研究的最新进展。

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—2002 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.
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
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 YY/T 0606.25—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2014 年 9 月第一版 2014 年 9 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 2-27335 定价 18.00 元



YY/T 0606.25-2014

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107