

实验小鼠肾匀浆中肽酶 -3 能力验证结果评价

王洪, 魏杰[#], 王淑菁, 巩薇, 岳秉飞^{*} (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 通过实验小鼠肾匀浆中肽酶 -3 检测能力验证计划, 了解实验动物检测机构检验能力, 提高实验动物质量检测水平。方法: 按照 CNAS 批准的能力验证方案, 通过样品制备, 经过稳定性和均匀性检验合格, 作为能力验证样品。采用随机编号, 发样给参加单位, 并附作业指导书。在规定时限提交检验报告和原始记录复印件, 其结果与样品标准结果一致的判为满意结果, 不一致或未能提交结果的判为不满意结果。结果: 共有 11 个实验室参加本次能力验证项目, 其中提交满意结果的实验室有 9 个, 占总参加机构的 81.8%, 不满意的实验室有 2 个, 占 18.2%。结论: 实验动物质量检测机构在实验小鼠肾匀浆中肽酶 -3 的检测能力较高, 实施能力验证计划能够反映实验室的检测水平。

关键词: 能力验证; 实验动物; 肽酶 -3

中图分类号: Q95-3 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)03-0329-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.03.006

Evaluation of the Proficiency Test Result of Determination of Peptidase-3 in Experimental Mouse Kidney Homogenate

Wang Hong, Wei Jie[#], Wang Shujing, Gong Wei, Yue Bingfei^{*} (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To understand the capacity of laboratory animals testing institutes of China in order to improve the quality of experimental animals testing through the proficiency test (PT) of determination of the peptidase-3 (Pep-3) in experimental mouse kidney homogenate. **Methods:** Samples were prepared and passed stability test and homogeneity test and were used as proficiency test samples according to the PT protocol approved by CNAS. The samples were numbered at random and sent to participating laboratories together with instructions. The participating laboratories should submit the test report and copies of the original records within the time limit. The laboratory results were considered to be satisfactory if the results were the same as the standard results, whereas the laboratory results were considered to be unsatisfactory if the results were not the same as the standard results or not submitted. **Results:** A total of 11 laboratories participated in this PT program. 9 laboratories presented satisfactory experiment results, accounting for 81.8%. 2 laboratories presented unsatisfactory results, accounting for 18.2%. **Conclusion:** The overall capacity of laboratory animals testing institutes in determination of the Pep-3 in experimental mouse kidney homogenate was relatively high. The PT program could reflect the capacity of laboratories.

Keywords: proficiency test; experimental animal; peptidase-3

作者简介: 王洪, 副研究员; 研究方向: 动物遗传学; E-mail: littstar@163.com

共同第一作者: 魏杰, 副研究员; 研究方向: 动物遗传学; E-mail: jane3040230@163.com

通信作者: 岳秉飞, 研究员; 研究方向: 动物遗传学; E-mail: y6784@126.com

实验动物质量控制是保证实验动物质量和动物实验可靠程度的根本手段,全国已经通过国家实验动物质量检测机构技术审查的实验室有27家。各省市级药检院也配备有相应的进行动物实验和实验动物质量控制的实验室。为了增加实验室间的技术交流,提高检测水平,按照实验室认可和实验室资质认可的有关要求,中国食品药品检定研究院-国家实验动物质量检测中心,组织实施本次能力验证活动:NIFDC-PT-106“实验小鼠肾匀浆中肽酶-3检测”。

2015年3月,中国食品药品检定研究院(简称中检院)顺利通过了中国合格评定认可委员会的能力验证提供者(Proficiency Testing Provider,简称PTP)现场评审,成为我国实验动物领域第一个通过PTP资格认定的机构。中检院(国家实验动物质量检测中心)通过PTP资格认定,将为进一步开展我国实验动物质量检测机构能力验证活动,提升能力验证活动的权威性,规范能力验证活动,提高能力验证工作水平提供有利条件。通过能力验证达到促进我国实验动物质量检测机构整体水平持续发展的目标。

实验室能力验证计划是通过实验室间检测结果的比对衡量实验室能力的活动,是实验室证明其检测技术能力水平的一种手段。能力验证是国际通行的实验室质量控制方法,已成为世界各国政府以及国际实验室认可组织广泛采用的重要技术手段。2008年之前,旧版的国家标准GB/T14927.1-2001中推荐使用了13个用于实验小鼠的遗传质量评价的生化标记位点。国家标准修订后,更正为14个生化标记位点。肽酶-3就是新版国家标准GB/T14927.1-2008新增的位点。国家标准修订后,广泛开展肽酶-3位点检测的实验室并不多,有必要组织实施该项目的能力验证活动来考察实验室的检测能力。

本次能力验证计划的目的是了解参与的实验室在肽酶-3检测项目的技术水平和能力,分析考察实验室间的差异,从而掌握实验室检测能力,为加强质量管理体系建设提供数据支持。更重要的是发现并解决检验中存在的问题,促进各实验室加强质量管理,完善程序,提高检测水平^[1]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物:20只SPF级8周龄雄性C57BL/6小鼠和15只SPF级8周龄雌性BALB/c小鼠,均来源于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。20只SPF级8周龄雌性CBA小鼠,来源于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

1.2 检测样品

本次能力验证计划提供的被测样品为小鼠肾匀浆冻干样品。制备方法:按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀,处死动物,剖腹,取小鼠肾脏2只,加入蒸馏水,蒸馏水与脏器的比例为2:1(V/W)。匀浆后,放置到4℃低温高速离心机中,15000 rpm,30 min。取上清,加一定体积的保护剂,分装,每瓶装量70 mg,用冻干机冻干。小鼠肾匀浆冻干样品为红色固体。加盖,封口膜封口,封口袋包装。采用随机数字方式编号,参见表1。贮藏条件为密封,冷藏。每个参加实验室分配3瓶样品,通过冷链运输方式运输。样品已经经过均匀性和稳定性检查,满足质量控制的要求^[2-4]。详见图1。

1.3 参加实验室

本次能力验证活动面向全国药检系统和实验动物质量检测中心以及相关企业检测实验室。报名参加本次能力验证活动的实验室共计11家,其中的10家提交了检测结果。11家实验室主要是国家级和省级实验动物质量检测中心以及科研院所的实验室,分布于北京、上海、广东、四川、湖北、辽宁、吉林、哈尔滨、陕西和新疆等地。

1.4 能力验证项目

本次试验要求进行小鼠肾匀浆中肽酶-3检测,检测指标包括肽酶-3 a基因型和肽酶-3 b基因型。

1.5 试验方法

本次能力验证活动没有要求统一的检测方法,以各实验室上报的检测结果作为依据。为保证检测结果具有可比性,所提供的样品无需加工处理,可直接开封,加入70 μL蒸馏水溶解后取样测定。检测结果为定性的结果,报告基因型a型或者b

型。测定完成后在能力验证平台填写结果报告单，提交纸质版原始记录。

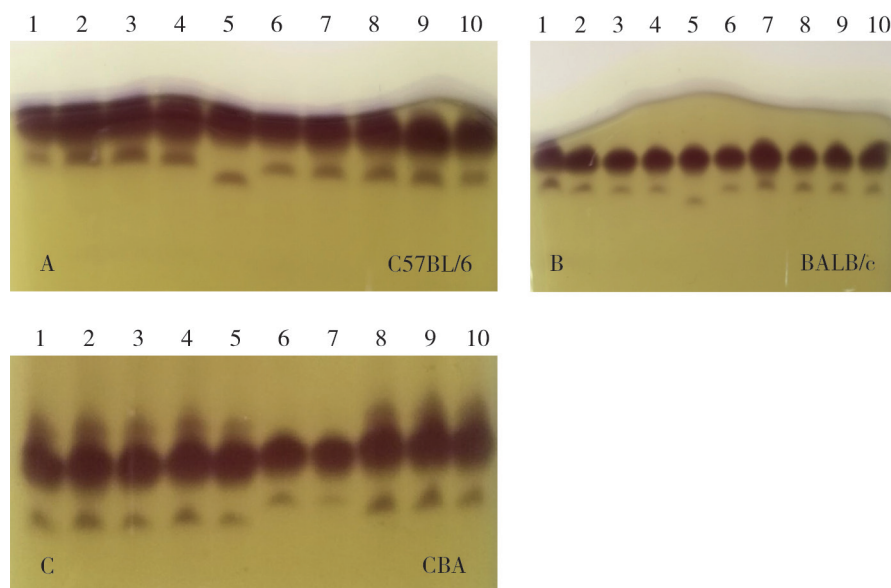
1.6 评价方法

本次能力验证活动的结果是定性的结果，依据国家标准GB/T14927.1-2008^[5]，对各实验室提供

的检测结果进行评价，实验室提供的结果与标准结果一致时，判定为满意结果；实验室提供的结果与标准结果不一致时，判定为不满意结果；如果实验室未按规定期限提交检测结果，判定为不满意结果。

表 1 能力验证样品随机分组编号

序号	单位代码	样品编号
1	281	CBG0170003, CBG0170019, CBG0170041
2	168	CBG0170006, CBG0170025, CBG0170033
3	915	CBG0170002, CBG0170024, CBG0170040
4	709	CBG0170008, CBG0170028, CBG0170044
5	614	CBG0170010, CBG0170017, CBG0170045
6	104	CBG0170009, CBG0170030, CBG0170038
7	572	CBG0170011, CBG0170016, CBG0170035
8	344	CBG0170014, CBG0170029, CBG0170042
9	587	CBG0170001, CBG0170021, CBG0170036
10	860	CBG0170015, CBG0170027, CBG0170031
11	634	CBG0170005, CBG0170022, CBG0170039



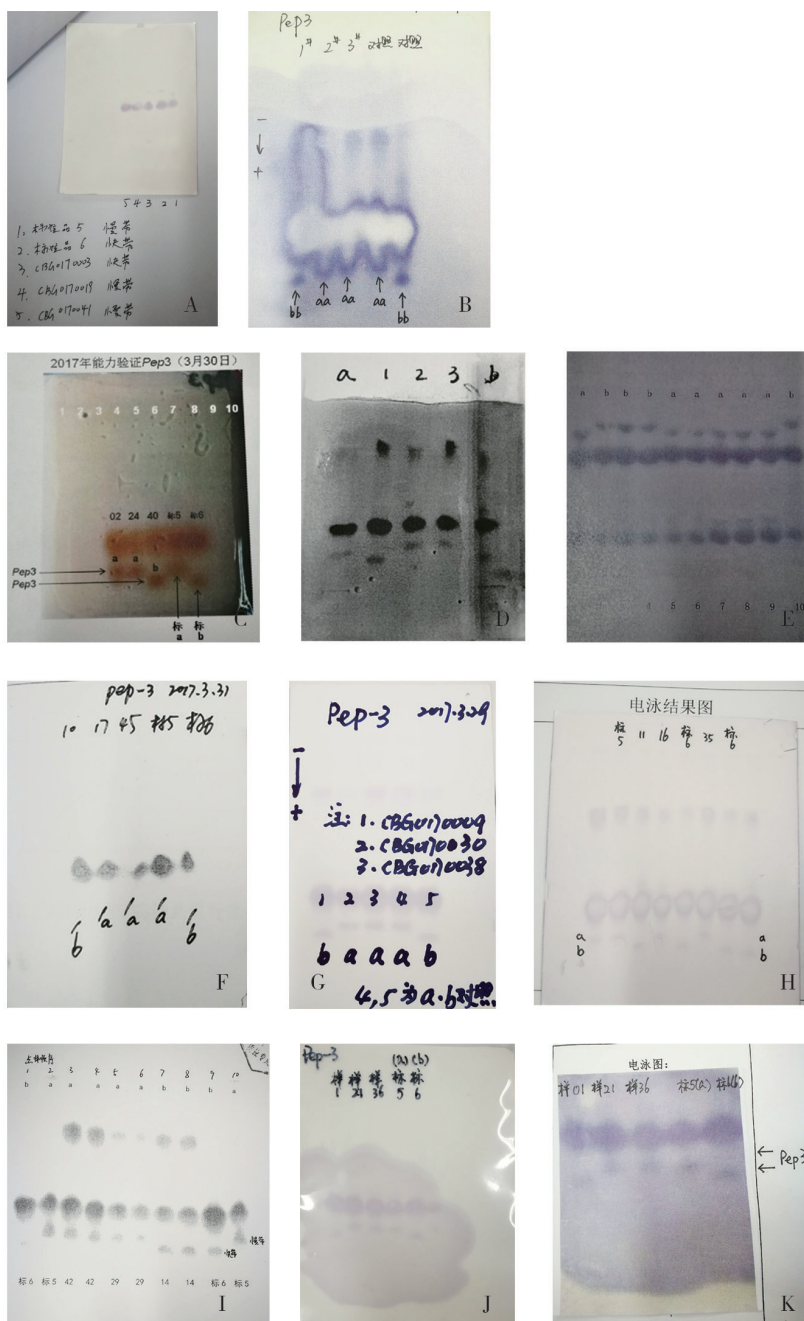
A.C57BL/6 样品的均一性；B.BALB/c 样品的均一性；C.CBA 样品的均一性；1. 样品 1；2. 样品 2；3. 样品 3；4. 样品 4；5. 标准 1；6. 标准 2；7. 标准 3；8. 样品 5；9. 样品 6；10. 样品 7。

图 1 胰酶 -3 均一性检验

2 结果

从各实验室反馈的原始记录中统计,本次能力验证活动各实验室均采用国家标准GB/T14927.1-2008推荐的生化标记检测法。本次能力验证样品共发放给11家报名实验室,提交检测结果的实验室共10家,1家实验室未提交检测结果。获满意结果的

实验室9家,占参加单位的81.8%;获得不满意结果的实验室有2家,占参加单位的18.2%。详见表2和图2。有1家实验室未反馈检测结果。依据本项目的评价原则,未按时限反馈结果的参加者,结果为不满意。



A. 代码281实验室的原始记录; B. 代码168实验室的原始记录; C. 代码915实验室的原始记录; D. 代码709实验室的原始记录; E. 代码860实验室的原始记录; F. 代码614实验室的原始记录; G. 代码104实验室的原始记录; H. 代码572实验室的原始记录; I. 代码344实验室的原始记录; J. 代码587实验室的原始记录原件; K. 代码587实验室的原始记录复印件。

图2 10家实验室提供的原始记录图

表 2 能力验证肽酶 -3 结果统计一览表

序号	代码	样品编号	肽酶 -3		备注
			标准结果	实际结果	
1	281	CBG0170003	B	B	
		CBG0170019	A	A	
		CBG0170041	A	A	
2	168	CBG0170006	B	B	
		CBG0170025	A	A	
		CBG0170033	A	A	
3	915	CBG0170002	B	A	*
		CBG0170024	A	A	
		CBG0170040	A	B	
4	709	CBG0170008	B	B	
		CBG0170028	A	A	
		CBG0170044	A	A	
5	614	CBG0170010	B	B	
		CBG0170017	A	A	
		CBG0170045	A	A	
6	104	CBG0170009	B	B	
		CBG0170030	A	A	
		CBG0170038	A	A	
7	572	CBG0170011	B	B	
		CBG0170016	A	A	
		CBG0170035	A	A	
8	344	CBG0170014	B	B	
		CBG0170029	A	A	
		CBG0170042	A	A	
9	587	CBG0170001	B	B	
		CBG0170021	A	A	
		CBG0170036	A	A	
10	860	CBG0170015	B	B	
		CBG0170027	A	A	
		CBG0170031	A	A	
11	634	CBG0170005	B	-	*
		CBG0170022	A	-	
		CBG0170039	A	-	

注：* 为不满意结果；- 为未提交检测结果。

3 讨论

3.1 原始记录中的醋纤膜电泳图应拍照, 利于结果的长期保存

反馈结果的10家实验室均在原始记录中提供了电泳图。但提供的图片形式不尽相同。有3家实验室提供醋纤膜的原图, 优势在于保持了原始记录的原始性, 有利于对检测结果进行分析。尤其是对不满意结果的原因分析, 具有不可替代的优势。有2家实验室提供的是电泳图的照片, 便于长期保存, 弥补了醋纤膜长期存放会出现褪色的弊端。有4家实验室提供的是电泳图的复印件。还有1家单位既提供了醋纤膜的原图, 也提供了电泳图的复印件。10家实验室都提供了图片清晰内容详尽的原始记录电泳图, 醋酸纤维素膜显色会随着时间逐渐变淡直至完全褪去, 虽然可以体现实验结果的原始性, 但不利于结果的长期保存。建议拍照存档。

3.2 不满意结果的原因分析

判定为不满意结果的实验室有2家: 代码为915的实验室将样品CBG0170002的肽酶-3判断为A型, 而标准结果是B型; 将样品CBG0170040的肽酶-3判断为B型, 而标准结果是A型。代码为634的实验室未提交检测结果。将这两家实验室判定为不满意结果。代码为915的实验室提供的原始结果图, 条带清晰可见, 初步分析不满意结果的原因为混淆样品编号, 导致报告错误结果。代码为634的实验室未上交检测结果, 无法确认不满意结果的原因是检测技术水平的问题, 还是在质量管理方面存在漏洞。建议参加实验室按要求提供检测结果和原始电泳图, 便于分析结果, 找出不满意原因。帮助实验室提高检测水平。

3.3 不满意结果出现时的纠正措施

一些实验室在获得不满意结果时, 并未采取有效的纠正措施。CNAS-RL01: 2011^[6]《实验室认可规则》、CNAS-RL02: 2010^[7]《能力验证规则》规定申请认可和获准认可的实验室必须通过参加能力验证活动(包括CNAS组织实施或承认的能力验证计划、测量审核)证明其技术能力。只有在能力验证活动中表现满意, 或对于不满意结果能证明已开展了有效纠正措施的实验室, CNAS方受理认可申请或予以认可。对于不能满足能力验证频次要求, 或虽参加了能力验证但结果不满意, 而且未在180天(能力验证结果报告发布之日起计)内开展

纠正措施及其验证活动的实验室, CNAS可撤销其相应项目的认可资格。对参加了CNAS组织及其承认的能力验证活动且有稳定满意表现的实验室, 在CNAS的各类评审中可考虑适当简化相关项目的能力确认过程。实验室应保存上述记录以备评审组检查。测量审核是能力验证不满意结果出现时的有效纠正措施。实验室可以通过参加测量审核, 纠正其不满意结果。在错过能力验证项目报名时, 亦可通过参加测量审核活动进行弥补。

通过实施本次实验小鼠肾匀浆中肽酶-3检测能力验证计划, 笔者发现, 全国药检系统和实验动物质量检测中心以及科研院所实验室具备肽酶-3检测能力, 个别实验室的检测水平需要提高, 对个别检测能力有待提高的实验室建议加强质量管理体系的建设, 尽快提高检测能力。每次能力验证计划完成后, CNAS都及时公布参加能力验证计划的合格实验室名单, 为各级政府管理部门利用实验室资源提供了基础数据, 为实验动物领域的社会委托检验和政府部门布置监督检查任务提供了可靠的选择依据, 对促进我国实验动物工作起到了积极的推动作用。

参考文献:

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS/GL03能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [2] 王洪, 魏杰, 李芳芳, 等. 实验动物质检机构碱性磷酸酶-1测定能力验证评价[J]. 中国药事, 2014, 28(12): 1339-1341.
- [3] 魏杰, 王洪, 李芳芳, 等. 实验室能力验证用酯酶-3标准样品的均匀性和稳定性研究[J]. 中国药事, 2014, 28(9): 990-994.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS/GL02能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [5] 国家标准GB/T14927.1-2008 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S]. 2008.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL01: 2011《实验室认可规则》[S]. 北京: 中国计量出版社, 2011.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02: 2010《能力验证规则》[S]. 北京: 中国计量出版社, 2010.

(收稿日期 2017年7月17日 编辑 邹宇玲)