

人类基因检测相关试剂评价国家参考品研制技术要求介绍

曹丽梅, 王一平, 袁伟媛, 黄杰* (中国食品药品检定研究院, 北京 102269)

摘要 目的:进一步规范人类基因检测相关试剂评价国家参考品的研制工作。方法:人类基因检测相关试剂评价国家参考品是指用于人类基因检测相关试剂质量评价的参考物质。本文详细介绍了这类参考物质的原材料筛选、制备、标定、稳定性研究、包装、储存及供应方面的要求。结果与结论:人类基因检测相关试剂评价国家参考品研制过程更加清晰,管理更加规范。

关键词: 人类基因检测试剂; 参考品; 技术要求

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)08-1108-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.08.016

Introduction to the Technical Requirements for the Development of National References for the Evaluation of the Related Reagents of Human Gene Detection

Cao Limei, Wang Yiping, Yuan Weiyuan, Huang Jie* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102269, China)

Abstract Objective: To further standardize the development of national references for the evaluation of the related reagents of human gene detection. **Methods:** The national references for the related reagents of human gene detection refer to the reference products which are used for quality assessment of the related reagents of human gene detection. This article introduced the requirements for raw materials' screening, preparation, calibration, stability studies, packaging, storage and supply of the references in details. **Results and Conclusion:** The development process of national references for the evaluation of the related reagents of human gene detection is made more clearly and is managed more normatively.

Keywords: the related reagents of human gene detection; references; technical requirements

药品标准物质是药品检定的重要物质基础,也是国家药品标准的物质基础,是控制药品质量必不可少的工具。根据《中华人民共和国药品管理法》《药品注册管理办法》,中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)负责对标定的药品标准物质从原材料选择、制备方法、标定方法、标定结果、定值准确性、量值溯源、稳定性及分

装与包装条件等资料进行全面技术审核,并作出可否作为国家药品标准物质的结论^[1]。另外,根据《医疗器械监督管理条例》《体外诊断试剂注册管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第5号)精神,将“组织体外诊断试剂国家标准品、参考品的制备和标定工作”的责任主体明确为中检院^[2]。

基金项目:国家重点研发计划项目“新一代基因组测序技术、临床用测序设备及配套试剂的研发”(编号2017YFC0906500)

作者简介:曹丽梅,女,主要从事国家体外诊断试剂标准物质管理工作;E-mail: caolm@nifdc.org.cn

通信作者:黄杰, Tel: (010) 67095283; E-mail: jhuang5522@nifdc.org.cn

目前,中检院可以提供113种注册检验用体外诊断试剂国家标准品和参考品,其中有8种人类基因检测相关试剂评价国家参考品,具体品种和名称如表1所示。

表1 中检院人类基因检测相关试剂评价国家参考物质

序号	名称
1	测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品
2	高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体(T21、T18和T13)国家参考品
3	胚胎植入前染色体非整倍体国家参考品
4	耳聋基因突变检测国家参考品
5	地中海贫血核酸检测国家参考品
6	BRCA基因突变检测国家参考品
7	高通量测序用肺癌游离脱氧核糖核酸基因突变国家参考品
8	高通量测序用肠癌游离脱氧核糖核酸基因突变国家参考品

中检院目前正在开展以下几种人类基因检测相关试剂评价国家参考品的研制工作,如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测参考品、单倍型基因组DNA参考品、流产组织拷贝数变异检测参考品、HLA分型参考品及脆性X综合征FMR1基因突变参考品等。为进一步规范这类体外诊断试剂标准物质的研制工作,现将人类基因检测相关试剂评价国家参考物质研制过程中的一般技术要求介绍如下。

1 相关概念

体外诊断试剂是指按医疗器械管理的体外诊断试剂,包括在疾病的预测、预防、诊断、治疗监测、预后观察和健康状态评价的过程中,用于人体样本的体外检测的试剂、试剂盒、校准品、质控品等产品^[2]。人类基因检测相关试剂评价国家参考物质是指用于人类基因检测相关试剂质量评价的参考物质。

2 人类基因检测相关试剂评价国家参考物质原料选择及确证

人类基因检测相关试剂评价国家参考品的原材料应尽可能与临床样本相一致或接近^[3],主要来

源于临床样本、永生化细胞系、基因编辑细胞系,也可来自基因工程构建产品及重组质粒等,需采用国内外公认的方法进行验证,并有足够的稳定性。如采用质粒作为参考品样本,应尽可能模拟真实样本,并对样本基质进行基质效应研究。

人类基因检测相关试剂评价国家参考物质通常由检测基因位点阳性参考品(有时也称为突变阳性参考品)、检测基因位点阴性参考品(有时也称为野生型以及其他同源基因位点阳性参考品)、检测限参考品及精密性参考品等组成,用于全面控制诊断试剂的质量,主要控制试剂的阴性或阳性符合率、检测限及重复性等^[4]。测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品是一类特殊的参考品,其目的是评价测序性能,其组成主要考虑临床测序技术的应用领域,如病原微生物、人基因组片段、全基因组、全外显子、微生物宏基因组等。因此,测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品的组成主要考虑不同种属基因组。

阳性参考品由一定数量的阳性样品组成,通常从大量样品中根据不同目的筛选出来,要求尽可能覆盖靶基因多种等位基因或突变类型,应具有代表性、满足临床样本的分布类型、地域或民族等群体遗传标记代表性,并经过确认为阳性参考品。阳性参考品还可以根据需求采用相应基因突变的永生化淋巴细胞系、基因编辑突变细胞系等。根据试剂检测样本类型,应考虑参考品的基质。如肿瘤基因突变检测试剂评价参考品的设置就应充分考虑样本基质的影响。检测血浆中基因突变的试剂评价参考品的设置应根据血浆样本中突变类型分布、片段长度、浓度等进行模拟。阳性参考品用来控制试剂的阳性符合率^[4]。

阴性参考品由一定数量的阴性样品组成,通常来自检测靶基因野生型或其他突变类型人群样本、同源基因位点阳性人群样品和(或)易产生交叉反应的样品,为了控制试剂的非特异反应,并和阳性参考品一致,根据试剂检测样本类型,应考虑参考品的基质。应经逐一确证确定为阴性样本。阴性参考品也可以根据需求采用特定基因野生型或相关基因突变类型明确的永生化淋巴细胞系、基因编辑突变细胞系等。阴性参考品用来控制试剂的阴性符合率^[4]。

检测限参考品通常由一份或多份经过确证的

稀释阳性样品组成,用来控制试剂的检测限,即试剂所能检出的样品中阳性物质的最低限度^[4]。检测限参考品设置应根据试剂的临床预期用途进行合理设立。如临床预期用途为靶向药物指导的检测试剂,其检测限参考品设置建议和临床治疗以及临床样本中的实际分布相关联,并采用具有药效相关的浓度和比例进行设置,并不是追求低检测限;建议设置多个梯度,主要从核酸浓度和突变所占百分率两个方面进行评价。

精密性参考品通常由一份或几份经过确认的阳性样品组成,用来控制试剂的重复性,建议包括弱阳性、中阳性或强阳性水平的精密度验证;必要时设置阴性参考品重复性验证。

标准物质原料的均匀性和稳定性亦是重要的条件。均匀性可保证一批原料所制备的标准物质均匀一致,稳定性可使一批标准物质长期分发使用,以保持特性值的连续性。为了保持原料的稳定性,标准物质的原料确定后,贮存于避光、低温等必要条件下,存放和运输过程采取严密的防污染措施^[5]。

3 人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的制备

应根据人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的品种要求进行配制、稀释、分装、冻存,必要时进行冻干熔封。人类基因检测相关试剂评价国家参考物质一般采用液体冰冻的方式保存,不需要进行冻干操作。在稀释过程中,应对采用的稀释液进行充分验证。稀释液一般采用的是TE溶液、去核酸酶水以及野生型基因组DNA溶液、处理后的临床样本等。稀释液的选择应保证不干扰后续的检测、有助于更好的模拟临床样本,并不对参考品的浓度定量和/或比例确定造成干扰。经一般质量检定合格后进行分装,并严格控制其分装精确度^[6]。

必要时进行冻干操作,冻干一般需加保护剂等物质,该类物质应对参考物质的特性量值、稳定性和试验操作过程无影响,并且其本身在干燥时不挥发。需要干燥保存者应在分装后立即进行冻干和熔封。冻干者水分含量应不高于3.0%。整个分装、冻干和熔封过程,应保证对各安瓿间主要指标和稳定性的一致性不产生影响^[7]。

4 人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的标定

人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的

定值首先应确定是否有国际标准品或参考品,如果有,以其作为标准标定待制备的参考物质^[8];如果没有,则依据相关标准、指南、规范或其它经过验证的方法来制定该参考物质的定值方案和方法。

定值通常采用协作标定的方法,一般需经3个以上有经验的实验室职员协作进行。参加单位应采用统一的设计方案、统一的方法和统一的记录格式,标定结果须经适宜方式进行处理,标定结果应取得一定次数独立的有效结果。最后,组织者收集各协作单位的标定结果,整理并统计分析,最终的结果一般用各协作单位结果的公议值表示。

为了保证新研制参考品的适用性,在选择参与协作标定的试剂盒时应注意其技术原理、试剂盒生产企业的代表性及覆盖面,以确定其在实际工作中的适用情况。人类基因检测相关试剂评价国家参考物质应尽可能进行全面的适用性研究。

人类基因检测相关试剂评价国家参考物质主要控制的指标有阴阳性符合率、检测限及重复性等,不同类型的人类基因检测相关试剂评价国家参考物质,对这些指标的考核标准也不尽相同,应依据各种人类基因检测相关试剂的特点建立其相应的考核标准。

另外,人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的换批制备,应保证原料特性的一致性和稳定性,其生物学特性指标应尽可能与上批参考物质相同或接近。

5 人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的稳定性研究

人类基因检测相关试剂评价国家参考物质稳定性研究可采用适宜方式进行,如经验资料或进行加速破坏试验。进行加速破坏试验,一般根据制品性质放置不同温度,一般放置-20℃、4℃、25℃、37℃等、不同时间,测定考核指标,以评估其稳定情况。参考物质建立后应定期进行期间核查,观察其稳定性,同时,还应对其反复冻融稳定性进行考察^[5]。

根据国际惯例,目前人类基因检测相关试剂评价国家参考物质不设“有效期”,由中检院对标准物质进行定期监测。

6 人类基因检测相关试剂评价国家参考物质的包装、储存与供应

研制工作的实验室在工作完成后,还要经过

严格的审评审批, 获得签批的标准品应进行贴标签及外包装工作, 标签内容一般包括: 中文名称、批号及标识量; 如果超出规定的用途时, 使用者应对标准物质的适用性负责。中检院在官网设立了体外诊断试剂标准物质查询专栏, 方便用户查询相关品种和下载电子版说明书。说明书内容包括中文名称、英文名称、批号、性状、用途、包装、规格、特性量值、使用方法和要求、储藏条件、注意事项和技术咨询电话等12项内容。

该类标准物质的贮存条件应有利于基因特性的稳定, 通常为低温冷冻保存, 其贮存情况应定期检查并记录。某些有特殊贮存要求的, 应有特殊的贮存措施, 并应在标签与使用说明书中注明。

人类基因检测相关试剂评价国家参考物质应有专人负责保管和发放, 由中检院直接提供给各生产单位标定其工作参考品或用于产品检定。

7 结论

本文详细介绍了人类基因检测相关试剂质量评价国家参考品制备的原料筛选、制备、标定、稳定性研究、包装、储存及供应方面的要求。对于人类基因检测相关试剂质量评价国家参考品的管理更加清晰和规范。

参考文献:

- [1] 曹丽梅, 马双成, 马玲云, 等. 中检所药品、医疗器械标准物质管理新模式—从分散多头管理走向集中统一管理[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1993-1994.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. (国家食品药品监督管理总局令5号) 体外诊断试剂注册管理办法[S]. 2014.
- [3] 马玲云, 宁保明, 陈国庆, 等. 国家药品标准物质研制技术要求的介绍[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1990-1992.
- [4] 曲守方, 于婷, 孙楠, 等. 人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒评价[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2): 181-182.
- [5] 丁丽霞, 周海钧. 生物标准物质的研究和技术要求(上)[J]. 中国药师, 2007, 10(3): 229-231.
- [6] 中国药典: 三部[S]. 2010.
- [7] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制(第二版)[M]. 北京: 科学技术出版社2013: 138-140.
- [8] 中华人民共和国标准GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003 体外诊断医疗器械生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性[S]. 2008.

(收稿日期 2018年6月19日 编辑 范玉明)