

核糖核酸标准物质研制与应用进展

王丹^{1,3} 赵文江² 齐鑫³ 李欣然³ 李凯³ 樊丽¹ 李亮³

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010019; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 齐齐哈尔 161005; 3. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘要: 核糖核酸 (RNA) 标准物质是保证核酸体外诊断数据准确一致的重要实物标准, 广泛用于病毒类疾病的检测、仪器校准、试剂盒评价及能力验证等工作中, 其目的是保证测量过程和测量结果的准确一致。自 1997 年, WHO 研制出了首个针对核酸扩增技术的丙型肝炎核酸国际标准物质, 使全球不同实验室、不同方法检测的结果有了可比性。截至 2023 年, 中国在国家标准物质资源共享平台发布的 RNA 有证标准物质有近百种, 对于 RNA 标准物质的研究与应用, 日益受到世界各国计量机构、相关国际学术组织与企业的重视, 尤其是新型冠状病毒疫情暴发后, RNA 标准物质成为了生物标准物质的研制热点。随着标准物质研制技术的不断发展, 标准物质的量值准确性也有所提升, 为测量结果的准确一致提供保障。通过对当前 RNA 标准物质的制备方法、分装、定值技术、不确定度评定及应用领域进行综述, 为 RNA 标准物质的研制工作以及未来在临床医学、农业生产、动物医学、食品安全等领域的应用提供参考。

关键词: 核糖核酸; 标准物质; 标准物质定值; 稳定性; 均匀性; 不确定度评定

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-1202

Progress in the Development and Application of RNA Reference Materials

WANG Dan^{1,3} ZHAO Wen-jiang² QI Xin³ LI Xin-ran³ LI Kai³ FAN Li¹ LI Liang³

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019; 2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005; 3. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: RNA reference materials is an important physical standard to ensure the accuracy and consistency of nucleic acid in vitro diagnostic data. It is widely used in the detection of viral diseases. It can also be used in calibration instruments, evaluation kits and proficiency testing, which purpose is to ensure the accuracy and consistency of the measurement process and measurement results. Since 1997, WHO has developed the first hepatitis C nucleic acid international reference material for nucleic acid amplification technology, which makes the results of different laboratories and different methods in the world comparable. By 2023, there are nearly 100 kinds of RNA certified reference materials released by China on the National Sharing Platform for Reference Materials. The research and application of RNA reference materials have been paid more and more attention by metrology institutions, relevant international academic organizations and enterprises all over the world. Especially after the outbreak of the novel coronavirus epidemic, the development of RNA reference materials has become a hot spot in the development of biological reference materials. With the continuous development of the reference materials development technology, the accuracy of the reference materials has also been improved, which provides a guarantee for the accuracy and consistency of the measurement results. The preparation methods, sub-package, fixed value technology, uncertainty evaluation and application fields of RNA reference materials are briefly reviewed, which provides a reference for the development of RNA reference materials and their future applications in various fields.

Key words: RNA; reference material; characterization of reference materials; stability; homogeneity; evaluation of uncertainty

收稿日期: 2023-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32360788), 中国科学院西部之光人才培养计划, 科技创新 2030 农业生物育种重大专项 (2022ZD0402013), 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2023-IQSTAP), 中国农业科学院研究所级工作任务 (1610072023101)

作者简介: 王丹, 硕士研究生, 研究方向: 农业核酸标准物质; E-mail: 547927592@qq.com

通讯作者: 李亮, 博士, 研究员, 研究方向: 农业标准物质; E-mail: liliang@caas.cn;

樊丽, 博士, 副教授, 研究方向: 果树种质资源与育种; E-mail: chenlugh@126.com

标准物质 (reference material, RM) 是具有足够均匀和稳定的特定特性的物质, 其特性被证明适用于测量和标称特性检查中的预期用途^[1]。自 1906 年美国标准局 (National Bureau of Standards, NBS) 首次制备并发布铸铁、转炉钢等 5 种标准物质以来, 标准物质的发展历程已跨越了一个多世纪^[2]。不同标准物质逐步出现, 使各行各业能够建立起统一的计量标准, 为国际和国内的贸易、生产、检测、交流等各方面提供了便利。我国标准物质研究历史虽短, 但发展较快。自 1951 年颁布“弹簧钢”标准物质以来, 我国的标准物质研制工作取得了显著的成果。这些标准物质在国民经济各个领域的产品质量保证、科学研究、技术监督方面都发挥了良好的作用^[3]。2023 年 8 月 30 日,《科技日报》报道, 我国已批准发布国家标准物质 17 137 项, 其中国家一级标准物质 3 219 项, 国家二级标准物质 13 918 项。这些标准物质已全面覆盖临床化学分析、药物成分分析、环境监测、食品检测等 13 大领域, 为民生的保障、科技的进步以及经济社会的高质量发展, 提供了关键的计量技术支持^[4]。

核酸标准物质是保证核酸检测结果准确性和溯源性的“金标准”。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 和我国国家市场监督管理总局均对体外诊断试剂的准确性提出了溯源要求, 这意味着体外诊断试剂在研发、生产和使用过程中, 需要使用国际或国家标准物质、参考品等进行准确性评估^[5]。目前, DNA 标准物质在遗传病的诊断、病毒及细菌的检测等均有重要价值。除 DNA 标准物质外, 核酸标准物质还包括 RNA 标准物质。以 RNA 作为遗传物质的各类生物及生物制品, 同样需要 RNA 标准物质进行量值的传递和统一, 以保证检测的准确性。

随着新冠疫情的暴发, RNA 病原核酸检测备受关注, 如何保证低丰度病毒样本的良好检测性能, 成为研究人员和卫生部门关注的重点。通过现场精准检测, 可以对包括无症状感染者在内的感染者进行辨别, 可进一步降低病毒的感染和传播, 并为流行病学的监测提供信息^[6]。临床诊断的准确性离不开新冠病毒 RNA 标准物质, 由此体现了研制 RNA 标准物质的重要性和必要性。针对 RNA 标准物质,

全球已有多个国家、组织、机构进行了深入的研发。1997 年, WHO 研制出了首个针对核酸扩增技术的丙型肝炎核酸国际标准物质, 使全球不同实验室、不同方法检测的结果有了可比性^[7]。2016 年, 我国研制出了首个溯源至国际标准的 RNA 标准物质——丙型肝炎病毒核酸标准物质^[8]。丙型肝炎病毒核酸标准物质的研制成功意义重大, 不仅提高了我国丙型肝炎病毒诊断的准确性, 还填补了我国在 RNA 标准物质这一领域的空白, 是我国核酸检测标准化迈向世界的第一步。2020 年, 在全球新冠疫情形势不断变化的背景下, 中国计量科学研究院积极应对挑战, 成功研制出一种安全性高、无生物污染的新冠假病毒 RNA 标准物质, 为新冠病毒的核酸提取和定量检测提供更接近临床样本的新冠 RNA 标准物质^[9]。

截至 2023 年, 中国在国家标准物质资源共享平台 (<https://www.ncrm.org.cn/>) 发布的 RNA 有证标准物质有近百种, 均为与人类和动物相关的 RNA 标准物质, 本文从研制技术和应用两个方面对 RNA 标准物质进行综述。

1 RNA 标准物质研制技术

1.1 标准物质制备方法

目前, RNA 标准物质的制备方法根据材料来源, 一般分为三类: (1) 基体标准物质, 包括灭活病毒、假病毒和慢病毒; (2) RNA 基因组标准物质, 一般分离于病毒; (3) 体外转录或合成 RNA 片段。RNA 标准物质的制备流程有所不同, 但在研制过程仍存在一些共性问题, 如生物污染性、定量准确性和标准物质稳定性等。研究人员通过开发新方法, 提升科学技术, 逐步解决研制难点, 使 RNA 标准物质研制流程不断完善。2006 年以前, 由于丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) RNA 的定值缺乏统一的标准, 标准物质原材料大多采用质粒 DNA 和 PCR 扩增的短片段, 由于其不稳定性和技术操作方面存在不足, 导致定量结果有所差异。为建立我国 RNA 标准物质研制体系, 王露楠等^[8]以 HCV 入手, 开始研制 HCV RNA 标准物质, 以 HCV 的阴性血浆和阳性血浆为原材料, 利用阴性血浆将阳性血浆稀释至含量为 3 000 copies/mL, 再采用真空干燥技术, 制成 HCV RNA 标准物质, 使标准物质以冻干粉的形式

态进行保存。这种制备方法可以消除基质效应和减少操作过程中所带来的差异,但是这种材料存在一定的生物危险性,使 RNA 标准物质在运输和使用方面受到限制,要解决这一问题,就必须制备安全性更高的 RNA 标准物质。2012 年,谷强等^[10]在研制新城疫病毒标准物质时,选择了两种新城疫灭活毒株,提取其 RNA 后分别对两种毒株的 M、FA、HN 基因进行扩增,克隆至质粒载体 pGEM-P 上,经体外转录出 RNA 纯品,使用 RNA 保存液稀释 RNA 纯品制备得到 10^8 copies/mL 的新城疫病毒的 RNA 标准物质。此外亚洲 I 型口蹄疫病毒、A 型禽流感病毒、O 型口蹄疫病毒、星状病毒、病毒性出血性败血症病毒、病毒性神经坏死病病毒、轮状病毒、H5N8 亚型禽流感病毒等相关标准物质的制备均采用了核酸扩增、体外转录的方法,将纯化的 RNA 制成标准物质。体外转录这一方法成功解决了生物安全问题,降低了工作过程中的危险性, RNA 标准物质的运输及应用也更加方便。2018 年,张奇等^[11]在研制诺如病毒标准物质的过程中,通过人工合成了包含目的基因片段的 PET-28a 载体,构建出重组质粒,经大肠杆菌感受态细胞表达,产物离心、纯化等步骤,成功研制出诺如病毒 RNA 标准物质。在无生物危险性的前提下,此方法提高了 RNA 标准物质的制备效率,降低了 RNA 标准物质的生产中原材料数量的限制。2019 年原霖等^[12]在猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 标准物质的研制中将 PRRSV 欧洲株代表毒株接种到细胞,通过鉴定,将出现病变的细胞反复冻融和离心,收集病毒液并灭活,制成 PRRSV RNA 标准物质。

自 2019 年,新冠肺炎疫情在全球暴发以来,出现了新冠病毒及其多个“需关切突变株”(variants of concern, VOC),如阿尔法、德尔塔、奥密克戎等^[13]。新冠病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)是全球关注的公共卫生事件,它在人类历史中并非孤例,是继 SARS 病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[14-15]之后报道的第七例感染人类的冠状病毒^[16]。2020 年,

欧阳艳艳等^[9]在研制新冠病毒 RNA 标准物质的过程中,选择假病毒作为制备 RNA 标准物质的新材料,新冠假病毒 RNA 核酸标准物质是将新型冠状病毒的关键基因片段,包括核衣壳蛋白 N 基因(全长)、包膜蛋白 E 基因(全长)以及开放阅读框 1ab (ORF1ab)基因片段,成功克隆至慢病毒载体 pCDH 上,构建出包装有新型冠状病毒重要特征基因 RNA 的假病毒,具有无生物污染性、可模拟病毒核酸提取效率的优点,使检测结果具有更准确的量值溯源性,为核酸提取和定量测量的全流程操作提供了测量标准,这对于加强核酸检测实验室的质量控制和提升能力建设具有重要意义。2021 年,韩国标准与科学研究所(Korea Research Institute of Standards and Science, KRISS)^[17]在对新冠病毒标准物质的研究过程中,制备了包括新冠病毒常见的诊断靶点,如 RdRp、N、E 和 S 基因的慢病毒 RNA 标准物质。经反转录 PCR(RT-PCR)方法合成 cDNA 链,从 PCR 扩增产物中获得插入片段 A 和插入片段 B,并插入至慢病毒载体中,将每个慢病毒(Lenti-A 和 Lenti-B)在 65℃下热灭活 30 min,与人的 RNA 一起稀释到病毒运输介质中,制备出新冠病毒阳性标准物质。将来自悬浮细胞(Jurkat)的总 RNA 加入到病毒运输介质中,制备阴性标准物质。2020 年由土耳其科学技术研究委员会、国家计量研究所^[16]将 10 个不同的 SARS-CoV-2 靶基因片段和一个人类内控基因片段组成 RNA 片段,随后克隆至 pEX-A258 质粒,并进行体外转录,分别制备了液体冷冻形式的 UME RM 2019 和冻干形式的 UME RM 2020 标准物质。

1.2 原材料的分装

为了便于 RNA 标准物质的保存和利用,需要根据标准物质的原材料不同以及其生物特性进行特定的分装操作,主要有以下几个原则:(1)分装应在清洁的环境中尽快完成。目的是避免生物、化学等污染,并确保同一批次所有的分装单元是在相同时间和条件下分装^[18]。(2)分装过程中使用的分配器和检测仪需要进行定期校准,以确保其精度和可靠性^[19]。(3)RNA 生产要按照规范的操作流程,使用经过核糖核酸酶处理的玻璃器皿,一次性消耗品也应在使用前进行核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶处

理^[20]。确保 RNA 标准物质在分装过程无其他核酸的污染。

2006 年,王露楠等^[8]以 0.5 mL/支的规格分装液体标准物质;2020 年,欧阳艳艳等^[9]在新冠病毒 RNA 标准物质的分装过程中,采用自主研发的假病毒保护剂对新冠假病毒 RNA 标准物质进行了保存和分装。2012 年,谷强等^[10]分别将新城疫病毒 Lasota 株和 F48E9 株的 M、F 和 HN 三种 RNA 片段进行等体积混合,随后分装为 1 mL/支的液体 RNA 标准物质。为了在保证量值准确的前提下,更好的发挥标准物质在实际中的作用,标准物质的分装可依据标准物质的材料、预期用途等的差异,选择合适的包装规格、包装方式以及保存基质等。

1.3 RNA 标准物质定值技术

标准物质的研制重点在于采用准确、可靠的定值方法进行赋值,这直接决定标准物质质量值的溯源

性。随着病毒学和分子生物技术的不断发展,核酸标准物质的定值方法也在不断发展和改进。RNA 标准物质定值的方法主要可以分为以下几种:紫外分光光度法、实时荧光定量 PCR、数字 PCR、同位素稀释质谱法^[21]。

第一类是基于分光光度法进行定量。其中紫外分光光度法如图 1-a,是利用朗伯比尔定律和核酸分子在 260 nm 波长处有最大吸收值的特性。利用公式吸光度 = 摩尔吸光系数 × 吸收层厚度 × 吸光物质的浓度,计算出核酸的浓度,进行定值。如病毒性神经坏死病毒,这是一种感染鱼类且致死率极高的病毒,此病毒的标准物质则是采用紫外分光光度法进行定值^[22]。这种方法的缺点是容易受到其他具有紫外吸收特性物质的干扰,如在核酸提取过程中加入的苯酚、丙酮等试剂,以及保证单链 RNA 稳定性的酶抑制剂焦碳酸二乙酯等均能引起实验结果的

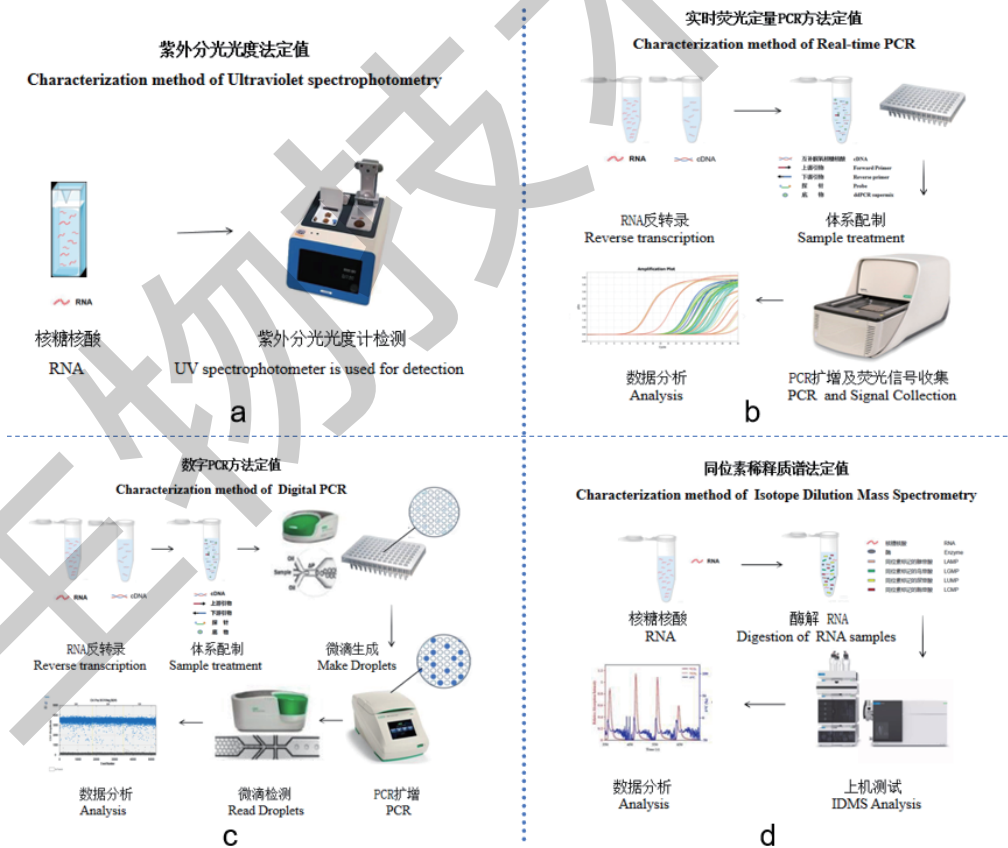


图 1 RNA 标准物质定值方法

Fig. 1 Characterization of RNA reference materials

波动。然而,目前采用的分光光度法只能测定 RNA 的初始含量,而 RNA 提取试剂盒引入核酸助沉剂(Carrier RNA)后,由于分光光度法只能测核酸总浓度,故无法实现对病毒 RNA 的定量及标准物质定值。

第二类是基于核酸扩增进行定量。这一类有两种不同原理的定值方法:实时荧光定量 PCR 和数字 PCR。实时荧光定量 PCR 的原理是利用荧光标记物与目的基因特异性结合,并通过实时监测 PCR 反应中循环产物的荧光强度和 Ct 值,结合定量标准品进行定值分析,如图 1-b。但在进行荧光定量 PCR 检测之前要将 RNA 反转录为 cDNA,反转录步骤会对实验结果有影响,此方法也需提前建立已知量值的标准样品曲线。数字 PCR 方法,如图 1-c,利用油包水或芯片技术,使每个反应单元没有或至少有 1 个 DNA 分子,PCR 扩增后,对荧光和无荧光单元进行计数,结合泊松分布函数计算样品的拷贝数浓度。此定值方法的优点是不依赖于标准曲线,但需对样品进行初步测量和稀释,RNA 的提取和反转录过程也会引起实验的误差。2020 年,欧阳艳艳等^[9]在研制新冠病毒 RNA 标准物质的过程中,采用数字 PCR 绝对定量测量方法和经检定/校准的容量计量器具,测量出每管溶液中含有的病毒 E 基因、ORF1ab 基因和 N 基因的拷贝数浓度,得到该新型冠状病毒假病毒核糖核酸标准物质的特性量值。使用实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 方法对 RNA 进行定量时,需反转录过程,目前多数标准物质定值实验室均采用了一步法反转录试剂盒,减少了实验步骤,降低了误差来源,提高了定值结果的准确性。但反转录过程会对定值结果造成影响,具体影响尚无法全面评估,在 RNA 标准物质研制中,此部分未纳入不确定度评定中,各标准物质研制机构也都在标准物质证书中进行了声明。

第三类是基于核苷酸测量的定量方法。酶消化液相色谱-同位素稀释质谱法的原理如图 1-d,为样品经酶消化处理后,RNA 分解为 4 种核苷酸,再利用液相色谱或质谱进行分离和测定。液相质谱法是根据核酸浓度与峰面积成正比进行定量。同位素稀释质谱法是以同位素标记物作为内标,根据核酸浓度与其离子峰峰面积成正比,计算样品中的核苷酸数量。这类方法的优点是 RNA 不需要进行反转录步

骤,可直接进行检测,其中的关键在于 RNA 是否能够完全水解为核苷酸^[23]。因此,此方法对样本的纯度要求高,处理过程复杂。

1.4 均匀性和稳定性评估

标准物质均匀性是标准物质各指定部分中某个特定特性值的一致性^[19],是标准物质基本的属性,用来描述标准物质特性空间分布特征。标准物质的稳定性是在指定条件下贮存时,标准物质在规定时间内保持特定特性值在一定限度内的特性^[19]。2006 年王露楠等^[8]在丙型肝炎病毒标准物质的均匀性检验中随机抽取了 30 支冻干样本,用无 RNase 灭菌双蒸水复溶,混合均匀并编号。先将 30 份样本分别抽取 200 μ L 混匀并检测,测定批内不精密度,再将 30 份样本分别进行检测,测定总不精密度。稳定性检验则是随机抽取样本,在(1)室温 20–25 $^{\circ}$ C,相对湿度 20%–50%,14 d;(2)37 $^{\circ}$ C,相对湿度 60%–80%,7 d;(3)冰箱冷藏温度 2–8 $^{\circ}$ C,6 个月;(4)–20 $^{\circ}$ C(对照)4 种不同条件下分别放置 5 支样本,在不同时间进行复溶,以 –70 $^{\circ}$ C 的样本作为参照,进行检测。2012 年新城疫病毒标准物质的均匀性检验方法为随机取 10 支样品,提取样品 RNA,通用荧光 RT-PCR 方法对样品进行检测,验证标准物质的均匀性。在其稳定性检验中,将样品分别放置在室温 20–25 $^{\circ}$ C、冷藏温度 2–8 $^{\circ}$ C、–20 $^{\circ}$ C 和 –80 $^{\circ}$ C 条件下,待达到相应截止时间后进行检测,采用 *t* 检验进行统计分析,以判断不同条件下标准物质的稳定性^[10]。标准物质进行均匀性、稳定性评估时,均采用随机取样的方法,更好的保证了标准物质质量值的准确性和一致性。

1.5 测量不确定度评定

我国的标准物质管理法规规定定值结果一般表示为:标准值 $\pm$ 总不确定度^[24]。RNA 标准物质的定值过程中会存在各种因素的干扰,每次测得的结果按照一定的概率分散。因此,不确定度作为测量结果所包含的一个参数,反映了定值结果的分散程度^[25],它不能说明测量结果是否接近真值^[26],但不确定度越小,定值结果越准确,其使用价值也就越高;反之不确定也大,定值结果偏差越大。

核酸国际标准物质质量值的不确定性主要源于均匀性评估引入不确定度、稳定性评估引入不确定度

以及联合定值引入不确定度^[18]。我们可以将其划分为两大类：A类和B类。其中，A类评定指在规定测量条件下，利用统计分析方法对获得的量值进行测量不确定度分量的评估^[1]。B类不确定度利用非统计学的方式进行评定，是用数据、经验、常识和假定的概率分布估算出的标准偏差^[1]。如实验所制备的标准物质联合多家实验室进行定值，不确定度的评定通过对实际检测过程进行分析，多家单位在定值过程中均包含了样品复溶、移液器加样等产生的不确定度，故联合定值的不确定度计算多家实验的A类不确定度，B类不确定度的计算，合并为最终的扩展不确定度。从国家标准物质资源共享平台(<https://www.ncrm.org.cn/>)查询可知，RNA标准物质不确定度水平一般在15%–30%之间，部分数据见表1。

2 RNA标准物质应用领域

2.1 人类传染病

核酸检测对于人类传染病的早期诊断和抗病毒疗效的动态观察具有重要价值^[31]。RNA标准物质已广泛应用于人类传染病的诊断，包括新型冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒等。2023年，李会杰等^[29]以含HPV16和HPV18 E6/E7 RNA序列的假病毒为候选材料，制备出高危型HPV E6/E7 RNA标准物质，为相关检测的质量控制提供了参考，解决了检测结果的量值溯源性问题。未来，病毒类传染病在临床医学领域仍然是必须重视的一大类疾

病，RNA标准物质作为防控疾病的重要辅助诊断工具，持续开展各类病毒检测标准物质的研究具有十分重要的意义。

2.2 动物疫病

基于PCR扩增技术的核酸检测方法，凭借其迅速、灵敏、特异性高以及定量精确等优势，在动物疫病病原检测领域得到了广泛应用，逐渐成为动物疫病诊断的主流技术^[32]。核酸标准物质能够验证和考评核酸检测方法的准确性，对检测的全过程进行严格的质量控制^[33]。2019年，中国动物疫病预防控制中心研发了猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲经典株、美洲变异株和欧洲株核酸标准物质，获得由国家市场监督管理总局颁发的国家标准物质定级证书。这三项国家二级标准物质是国内首批动物疫病核酸检测国家标准物质，在填补国内领域空白的同时，对兽医实验室的检测质量控制、检测技术研究以及评价产生了深远影响，具有重大意义^[30]。在此之后，口蹄疫病毒RNA标准物质、A型禽流感病毒、病毒性出血性败血病毒和病毒性神经坏死病病毒、新城疫病毒等RNA标准物质的研制成功和应用，大大降低了动物养殖业的损失和风险，保障了人类食品安全。

2.3 食品安全

近年来，食品安全问题成为人们关注的焦点，其中食源性RNA病毒对人类健康构成严重威胁。相关核酸标准物质推动了核酸分析技术在食品安全检

表1 部分RNA国家有证标准物质相关信息

标准物质名称 Name of reference standard	定值结果 Quantification result	不确定度 Uncertainty/%	参考文献 Reference
丙型肝炎病毒脱氧核糖酸血清标准物质	1.29×10^5 IU/mL	18.6	[8]
猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲株（PRRSV LV）核酸标准物质	1.83×10^4 copies/ μ L	12	[12]
新城疫病毒（NDV Lasota 株）核酸标准物质	1.7×10^5 copies/mg	17.6	[27]
新型冠状病毒体外转录 RNA 标准物质（新冠）ORF1ab 基因	7.70×10^5 copies/ μ L	16.7	[28]
新型冠状病毒体外转录 RNA 标准物质（新冠）E 基因	4.30×10^5 copies/ μ L	15	[28]
新型冠状病毒体外转录 RNA 标准物质（新冠）N 基因	6.10×10^5 copies/ μ L	23	[28]
HPV16 E6/E7 RNA 假病毒标准物质	1.10×10^3 copies/ μ L	17	[29]
猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲变异株（PRRSV JXA1）核酸标准物质	1.13×10^4 copies/ μ L	16	[30]

测领域的应用和高质量发展,为病原微生物定量检测提供量值溯源的依据,还可应用于相关分析仪器的计量校准及不同检测机构核酸检测能力比对^[34]。2021年王鸣秋等^[35]通过对人工合成的诺如假病毒进行核酸定量,研制了GI/GII型诺如病毒两联装甲RNA标准样品。徐蕾蕊等^[36-37]研制了轮状病毒核酸标准物质和星状病毒核酸标准物质,主要用于食源性病毒的检测,为我国食品安全检测和监管提供有力的技术保障。除此之外,骆海朋等^[38]研制了诺如病毒标准物质,研制过程中采用冷冻干燥技术,为诺如病毒标准物质的运输和储存提供更多便利。随着食源性病毒RNA标准物质的研制范围不断扩大,我国食品安全保障能力也得到进一步提升。

以上介绍了RNA标准物质在人类传染病、动物疫病和食品安全领域的应用,尽管RNA标准物质在多个领域发挥着重要作用,但在实际应用中仍存在一些问題,首先,RNA的稳定性是RNA标准物质应用中的一个重要问題。RNA易受到外界环境的影响,如温度、湿度、酶活性等,导致RNA的降解。因此,在运输、保存和使用RNA标准物质时,需要特别注意保持适宜的温度和湿度条件,以防止RNA的降解。

其次,在RNA标准物质的应用过程中,存在一些潜在的安全性问題,某些RNA标准物质可能具有生物传染性,因此,在使用这些RNA标准物质时,必须对其进行准确的分辨,以确保不会造成意外的感染或疾病的传播。为了防止RNA标准物质的生物传染性带来的风险,使用者需要遵循实验室生物安全规范,采取一系列的防护措施。此外,实验室应具备适当的生物安全设施,如生物安全柜,以确保RNA标准物质在操作过程中的安全处理。

另外,RNA标准物质的供应和质量控制也是应用中的一个挑战。高质量的RNA标准物质是实验结果可靠性的保证,然而,目前市场上RNA标准物质的供应相对有限,且质量控制标准不统一。这可能导致实验结果的差异,影响科研工作的准确性和可靠性。

综上所述,RNA标准物质在应用中存在一些问題,如稳定性、生物安全性、供应问題。为了解决

这些问題,科研人员需要采取适当的保存和使用条件,进行严格的纯度检测和定量分析,同时也需要加强对RNA标准物质的生产和质量控制的监管,以确保实验结果的准确性和可靠性。

3 展望

随着核酸检测技术的不断发展,对RNA标准物质的需求和依赖程度也越来越高,其应用范围将会不断扩大,未来可应用于以下几个方面。

(1) 临床医学的诊断。核酸检测及基因组测序的准确度对于人类传染病的诊断极其重要,不准确的结果不仅会造成病人重复检测,浪费医疗资源,还易造成更大范围的传染。而目前研制出的针对人类传染病诊断相关的RNA标准物质种类数,与RNA病毒种类数量相差甚远。RNA标准物质的应用可以提高检测的准确度,减少或避免病毒的大范围传播,也更好地为我国传染病防控提供更全面的计量技术支撑。

(2) 植物检疫领域。面对全球农业生物安全的关注热潮,我们需要一种更快、更准、更全面的检测方法来应对植物病毒的检疫需求。植物RNA病毒标准物质可广泛应用于植物疫病的早防早治、相关口岸检测中,能够避免带毒植株流入市场,从源头发现植物病毒的出现,有效指导农业生产,然而,目前植物疫病领域标准物质仍为空白,急需相关部门设立研究项目或第三方标准物质企业开展研制工作。

(3) 供研究用途。标准物质在量值传递与修正的全过程中,具有复现量值、传递测量不确定度、保证测量准确一致性的作用。核酸标准物质可用于确定和比较现有诊断试剂盒的最低检测限和精密性,有助于开发更加可靠和准确的诊断试剂盒,为相关试剂盒的高质量研发和生产提供计量学支撑的保障。同时,RNA标准物质对分子生物学基础科学研究,如细胞因子和mRNA表达水平等也具有重要意义。

(4) 质量检测。RNA标准物质对我国食品、生物质量检测具有重要意义,RNA病毒在生物群体间的传播,不仅会造成严重的动物疫病以及经济损失,还会引发更多食品安全问題。为保证人民的食品安全,RNA标准物质在未来的应用也会更加广泛。

参考文献

- [1] 国家质量监督检验检疫总局. 通用计量术语及定义: JJF 1001—2011 [S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. General Terms in Metrology and Their Definitions: JJF 1001—2011 [S]. Beijing: China Quality Inspection Publishing House, 2012.
- [2] 孙明山. 标准物质在仪器分析中的使用 [J]. 现代化农业, 2012 (4): 32-33.
- Sun MS. Use of reference materials in instrumental analysis [J]. Mod Agric, 2012 (4): 32-33.
- [3] 倪晓丽. 我国的标准物质及其发展 [J]. 化学分析计量, 2000, 9 (3): 6-7.
- Ni XL. Certified reference materials of our country and their development [J]. Chem Anal Meterage, 2000, 9 (3): 6-7.
- [4] 王怡. 我国已批准发布 17137 项国家标准物质 [N]. 科技日报, 2023-08-30 (3).
- Wang Y. China has approved the release of 17137 national standard substances [N]. Science and Technology Daily, 2023-08-30 (3).
- [5] 赵雨佳, 廖焱毅, 范培蕾, 等. 核酸标准物质的研究进展 [J]. 计量科学与技术, 2022, 66 (2): 15-20.
- Zhao YJ, Liao TY, et al. A perspective on nucleic acid reference materials [J]. Metrol Sci Technol, 2022, 66 (2): 15-20.
- [6] Zhou HW, Liu DL, Ma L, et al. A SARS-CoV-2 reference standard quantified by multiple digital PCR platforms for quality assessment of molecular tests [J]. Anal Chem, 2021, 93 (2): 715-721.
- [7] 原霖, 韩焘, 翟新验. 核酸标准物质研究现状 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (11): 89-92.
- Yuan L, Han T, Zhai XY. Research status of nucleic acid reference materials [J]. China Anim Husb Vet Med, 2014, 41 (11): 89-92.
- [8] 王露楠, 吴健民, 等. 丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研制 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29 (4): 354-357.
- Wang LN, Wu JM, et al. Establishment of the first national standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HCV RNA [J]. Chin J Lab Med, 2006, 29 (4): 354-357.
- [9] 欧阳艳艳, 张永卓, 高颖, 等. 新冠假病毒核糖核酸标准物质的研制和应用 [J]. 中国计量, 2020 (11): 87-88.
- Ouyang YY, Zhang YZ, Gao Y, et al. Development and application of COVID-19 pseudovirus RNA reference material [J]. China Metrol, 2020 (11): 87-88.
- [10] 谷强, 张伟, 高志强, 等. 新城疫病毒核酸检测标准物质研究 [J]. 中国动物检疫, 2012, 29 (11): 40-43.
- Gu Q, Zhang W, Gao ZQ, et al. Study on reference materials for Nucleic Acid testing of Newcastle disease virus [J]. China Anim Health Insp, 2012, 29 (11): 40-43.
- [11] 张奇, 姚琳, 江艳华, 等. 基于 Qbeta 噬菌体装甲 RNA 技术的诺如病毒 RNA 标准参考样品的研制 [J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38 (1): 42-50.
- Zhang Q, Yao L, Jiang YH, et al. Development of armored RNA reference material of norovirus based on qbeta bacteriophage [J]. China Biotechnol, 2018, 38 (1): 42-50.
- [12] 原霖, 钟凤然, 董浩, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲株国家核酸标准物质的研制 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (4): 627-630.
- Yuan L, Zhong FR, Dong H, et al. Establishment of the national nucleic acid reference material of EU-PRRSV [J]. Chin J Vet Sci, 2019, 39 (4): 627-630.
- [13] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. [2024-01-05]. <https://co-vid19.who.int/>.
- [14] 吴凡, 陈燕玫, 等. 在中国发现的一种与人类呼吸系统疾病相关的新新型冠状病毒 [J]. 上海医药, 2020, 41 (S1): 50.
- Wu F, Chen YM, et al. A novel coronavirus associated with human respiratory diseases found in China [J]. Shanghai Med Pharm J, 2020, 41 (S1): 50.
- [15] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17 (3): 181-192.
- [16] Akyurek S, Demirci SNS, Bayrak Z, et al. The production and characterization of SARS-CoV-2 RNA reference material [J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413 (13): 3411-3419.
- [17] Lee SS, Kim S, Yoo HM, et al. Development of SARS-CoV-2 packaged RNA reference material for nucleic acid testing [J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414 (5): 1773-1785.
- [18] WHO. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards [EB/OL]. [2024-12-21]. [2023-07-08]. <http://who.int/publications/i/item/9241209321>.
- [19] 国家市场监督管理总局. 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估: JJF 1343—2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- Characterization, Homogeneity and Stability Assessment of Reference Materials: JJF 1343—2022 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2022.
- [20] 李金明. 实时荧光 PCR 技术 [M]. 北京: 中国军医出版社 (第二版), 2023.
- Li Jinming. Real-time fluorescent per technology [M]. Beijing: China Military Medical Publishing House (Second Edition), 2023.
- [21] 陈桂芳, 欧阳艳艳, 杨佳怡, 等. 核酸标准物质测量方法研究进展 [J]. 计量科学与技术, 2021, 65 (6): 25-33.
- Chen GF, Ouyang YY, Yang JY, et al. Research progress

- on common measurement methods of nucleic acid reference materials [J]. *Metro Sci Technol*, 2021, 65 (6): 25-33.
- [22] 段燕喻, 陈茹, 等. 病毒性神经坏死病病毒核酸检测用标准物质的制备 [J]. *中国动物检疫*, 2018, 35 (2): 102-107.
- Duan YY, Chen R, et al. Preparation of reference materials used for detecting nucleic acids of nervous necrosis virus [J]. *China Anim Health Insp*, 2018, 35 (2): 102-107.
- [23] Niu CY, Wang X, Gao YH, et al. Accurate quantification of SARS-CoV-2 RNA by isotope dilution mass spectrometry and providing a correction of reverse transcription efficiency in droplet digital PCR [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414 (23): 6771-6777.
- [24] 国家技术监督局. 一级标准物质技术规范: JJF 1006—1994 [S]. 北京: 中国计量出版社, 1994.
- State Bureau of Quality and Technical Supervision of the People's Republic of China. Technical Norm of Primary Reference Material: JJF 1006—1994 [S]. Beijing: China Metrology Publishing House, 1994.
- [25] 国家质量监督检验检疫总局. 化学分析测量不确定度评定: JJF 1135—2005 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Evaluation of Uncertainty in Chemical Analysis Measurement: JJF 1135—2005 [S]. China Metrology Publishing House, 2005.
- [26] 王萍. 浅谈对实验室测量不确定度的认识 [J]. *四川建材*, 2011, 37 (2): 91-92.
- Wang P. Discussion on the understanding of uncertainty in laboratory measurement [J]. *Sichuan Build Mater*, 2011, 37 (2): 91-92.
- [27] 梅力, 高晓龙, 等. 新城疫病毒 LaSota 株检测用国家核酸标准物质的研制 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42 (7): 28-33.
- Mei L, Gao XL, et al. Preparation of national nucleic acid reference material for detection of Newcastle disease virus LaSota strain [J]. *Prog Vet Med*, 2021, 42 (7): 28-33.
- [28] 许丽, 梁文, 杨雪, 等. 新型冠状病毒 RNA 标准物质 [J]. *科学通报*, 2020, 65 (22): 2363-2370.
- Xu L, Liang W, Yang X, et al. SARS-CoV-2 RNA reference materials [J]. *Chin Sci Bull*, 2020, 65 (22): 2363-2370.
- [29] 李会杰, 陈桂芳, 高运华, 等. HPV16 与 HPV18 (E6/E7 基因) RNA 假病毒核酸标准物质定值研究 [J]. *计量学报*, 2023, 44 (3): 401-409.
- Li HJ, Chen GF, et al. The research of quantification for HPV16 and HPV18 (E6/E7) RNA pseudovirus nucleic acid reference materials [J]. *Acta Metrol Sin*, 2023, 44 (3): 401-409.
- [30] 原霖, 李尔华, 董浩, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒国家核酸标准物质的研制 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39 (5): 826-829.
- Yuan L, Li EH, Dong H, et al. Establishment of the national nucleic acid reference material of HP-PRRSV [J]. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39 (5): 826-829.
- [31] 李金明. RNA 病毒扩增检测的质控品和标准品研究进展 [J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27 (12): 873-874.
- Li JM. Research progress of quality control products and standards for RNA virus amplification detection [J]. *Chin J Lab Med*, 2004, 27 (12): 873-874.
- [32] 乔彩霞, 张鹤晓, 高志强, 等. 动物病毒核酸检测质控品和标准物质研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (7): 582-584.
- Qiao CX, Zhang HX, et al. Research progress of quality control materials and reference materials for animal virus nucleic acid detection [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2014, 36 (7): 582-584.
- [33] Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16 (2): 99-110.
- [34] 陈天奇, 齐鑫, 王敏, 等. 食源性病原微生物核酸标准物质研制进展 [J]. *计量学报*, 2023, 44 (3): 464-471.
- Chen TQ, Qi X, Wang M, et al. Development progress of nucleic acid reference materials for foodborne pathogenic microorganisms [J]. *Acta Metrol Sin*, 2023, 44 (3): 464-471.
- [35] 王鸣秋, 杨俊, 常雨桐, 等. GI/GII 型诺如病毒两联装甲 RNA 标准样品的研制 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37 (3): 286-293, 131.
- Wang MQ, Yang J, Chang YT, et al. Preparation of coupled armored RNA reference material for norovirus GI/GII [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37 (3): 286-293, 131.
- [36] 徐蕾蕊, 魏海燕, 马丹, 等. 轮状病毒核酸标准物质研究 [J]. *中国食品学报*, 2018, 18 (7): 201-209.
- Xu LR, Wei HY, Ma D, et al. Establishment of a nucleic reference material for rotavirus detection [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18 (7): 201-209.
- [37] 徐蕾蕊, 魏海燕, 林长军, 等. 星状病毒核酸检测标准物质的研制 [J]. *食品科学*, 2016, 37 (6): 172-177.
- Xu LR, Wei HY, Lin CJ, et al. Development of astrovirus reference material used in nucleic acid amplification testing [J]. *Food Sci*, 2016, 37 (6): 172-177.
- [38] 骆海朋, 瞿洪仁, 任秀, 等. 诺如病毒检验用大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的研制 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12 (17): 6788-6794.
- Luo HP, Qu HR, Ren X, et al. Preparation of coliphage MS2 reference material for norovirus test [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12 (17): 6788-6794.