



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO 20184-3:2021

分子体外诊断检验 冷冻组织检验前过程的 规范 第3部分：分离DNA

Molecular in vitro diagnostic examinations—Specifications for pre-examination
processes for frozen tissue—Part 3: Isolated DNA

(ISO 20184-3:2021, IDT)

草案版次选择

(本草案完成时间：)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

引 言

分子体外诊断，包括分子病理学，使医学取得了重大进展。随着分析人体组织和体液中的核酸、蛋白质和代谢物的新技术有望取得进一步进展。然而，这些分子的完整性和图谱在标本采集、运输、储存和加工过程中会发生变化。因此，诊断或研究的结果可能变得不可靠，甚至变得不可能，因为随后的检测分析可能无法确定患者的真实情况，而是测定检验前过程中生成的人造图谱。

组织中的DNA完整性在加工和储存过程中可能会发生变化。DNA分子的修饰会影响检测结果的有效性和可靠性。必须采取特殊措施，尽量减少所描述的DNA变化和修饰，以便随后的检测。

因此，需要对从标本采集到DNA检测的整个过程进行标准化。多项研究已经确定了这一过程中重要的影响因素。本文件利用这些工作来编纂和标准化在检测前过程中的冷冻组织DNA检测步骤。

分子体外诊断检验 冷冻组织检验前过程的规范 第3部分：分离DNA

1 范围

注：国际、国家或地区法规或要求也可适用于本文件所涵盖的特定主题。

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。

ISO 15189，医学实验室-质量和能力要求

ISO 15190，医学实验室-安全要求

3 术语和定义

ISO 15189界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抽样 aliquot

同质材料中的一部分，假定带有不可接受的采样误差。

注1：该词汇适用于液体。组织是不均匀的，因此不适用。

[来源：Compendium of Chemical Terminology Gold Book. International Union of Pure and Applied Chemistry. Version 2.3.3., 2014; the PAC, 1990, 62, 1193 (Nomenclature for sampling in analytical chemistry (Recommendations 1990)) p. 1206; and the PAC 1990, 62, 2167 (Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990)) p. 2173.]

3.2

环境温度 ambient temperature

周围空气的不可调节温度。

3.3

分析物 analyte

可测量名称中示出的组分。

[来源：ISO 17511:2020, 3.2, 修改-示例被删除]

3.4

分析试验性能 analytical test performance

测量感兴趣分析物[3.3]的测试的准确性、精密度和敏感度。

注：其他性能指标，例如稳定性和可重复性，也适用。

3.5

生物库biobanking

获取和储存与收集、制备、保存、测试、分析和分发确定的生物材料以及相关信息和数据有关的部分或全部活动的过程。

[来源：ISO 20387:2018, 3.6]

3.6

冷缺血 cold ischemia

从体内取出组织直至稳定或固定的状态。

[来源：ISO 20184-2:2018, 3.5]

3.7

诊断 diagnosis

根据其症状和/或体征识别健康或疾病状态，诊断过程可包括检查和测试，以将个体的病情分为不同的类别或亚类，从而对治疗和预后作出医学决定。

[来源：ISO 20184-2:2018, 3.6]

3.8

脱氧核糖核酸deoxyribonucleic acid

DNA

以双链或单链形式存在的脱氧核糖核苷酸聚合体。

[来源：ISO 22174:2005, 3.1.2]

3.9

脱氧核糖核酸酶 deoxyribonuclease

DNase

催化DNA降解成更小成分的酶。

[来源：ISO 20184-1:2018, 3.8]

3.10

检验 examination

分析试验 analytical test

以确定一个特性的值或特征为目标的一组操作。

注：从分离的分析物开始、包括各种用于定性或定量检验的参数测试或化学操作的过程。

[来源：ISO 15189:2012, 3.7, 修改 — 删除原注1~3，补充新注，“分析测试”被添加为首选术语。]

3.11

大体检查 grossing, gross examination

裸眼检查病理标本以获得诊断信息，为进行进一步的显微镜检查做准备。

[来源：ISO 20184-1:2018, 3.10]

3.12

同质性 homogeneous

结构和组成均匀

[来源: ISO 20184-1:2018, 3.11]

3.13

干扰物质 interfering substance

可能改变检验结果的标本/样品的内源性物质或外源性物质（如稳定溶液）

[来源: ISO 20184-1:2018, 3.12]

3.14

预检流程 pre-examination

预检流程 process preanalytical phase

检测前工作流程 preanalytical workflow

按照时间顺序从临床医生申请至分析检验启动的过程，包括检验申请、患者准备和识别、原始样品采集、在医学或病理实验室间或实验室内运送、分析物的分离。

注：检验前过程包括影响预期检验结果的准备过程。

[来源: ISO 15189:2012, 3.15, 有修改，增加了一个附加术语，并包含了更多细节。]

3.15

能力验证 proficiency test

利用实验室间比对，按照预先制定的准则评价参加者的能力。

[来源: ISO/IEC 17043:2010, 3.7, 有修改 — 这里使用的术语和定义没有原始注释。]

3.16

室温 room temperature

在本文件中，温度范围为18° C至25° C。

注：地方或国家法规可能有不同的定义。

[来源: ISO 20184-1:2018, 3.19]

3.17

样品 sample

取自原始样品的一部分或多部分。

[来源: ISO 15189:2012, 3.24, 有修改-该示例被删除]

3.18

标本 specimen

原始标本 primary sample

为检验、研究或分析一种或多种量或特性而取出的认为可代表全部的一独立部分的体液、呼出气、头发或组织。

[来源: ISO 20184-1:2018, 3.14]

3.19

稳定性 stability

样品在规定条件下贮存时的特性，其某个规定特性值在规定时间内保持在规定的限值范围内。

注：本文件中的分析物是分离的DNA。

[来源：ISO Guide 30:2015, 2.1.15, 有修改，“参考材料”替换为“样品材料”]

3.20

存储 storage

在适当的条件下，分别对样品或分析物或其衍生物(如染色切片或组织块)的分析前工作流程长时间中断，以保持其特性。

注：长期储存通常发生在实验室档案或生物库中。

3.21

确认 validation

通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。

“已确认”一词用于表明相应的状态。

[来源：ISO 9000:2015, 3.8.13, 有修改，删除原注1和注3。]

3.22

验证 verification

通过提供客观证据对规定要求已得到满足的认定。

注1：“已验证”一词用于表明相应的状态。

注2：认定可包括以下活动

- 进行替代计算；
- 将新的设计规范与类似的经验证的设计规范进行比较；
- 进行测试和演示；
- 在发布前审查文件。

[来源：ISO 9000:2015, 3.8.12, 有修改，删除原注1和注2。条目的注3已重新编号为条目的注1；添加了新的注释2。]

3.23

热缺血 warm ischemia

组织从身体中移除前的状态，但在那里它被剥夺了正常的血液供应。

[来源：ISO 20184-1:2018, 3.25]

注：正常血液供应的中断因情况而异。因此，热缺血持续时间及其影响取决于具体情况，还取决于动脉供血的解剖结构。

3.24

工作流程 workflow

完成任务所需的一系列活动。

[来源：ISO 20184-1:2018, 3.26]

4 总则

关于医学实验室质量管理体系的一般说明,特别是关于标本采集、接收和处理(包括避免交叉污染)的一般说明,见ISO 15189、ISO/IEC 17025或ISO/IEC 17020。应遵循ISO 15189对实验室设备、试剂和耗材的要求;ISO/IEC 17025和ISO/IEC 17020也适用。

检验前、检验和检验后的所有步骤(即整个工作流程)都会影响诊断或研究结果。因此,整个工作流程应在检验制定过程中进行规定、验证和确认。这具体包括所有检验前过程,如检验申请、患者准备和识别、原始样品采集、在医学或病理实验室间或实验室内运送、分析物的储存和分离。不能始终控制的工作流程(如热缺血)应记录在案。

与RNA或蛋白质相反,组织的DNA在冷热缺血期间相对稳定。未知较长的冷热缺血持续时间导致DNA序列或拷贝数的变化(例如,比较基因组杂交(CGH)图谱)[9]。然而,DNA甲基化谱可能会因缺血而改变[10]。样品冷冻之前的时间应尽可能短,以避免DNA的酶促降解。应当记录冻结前的时间,并记录冻结前的温度[9]。

在基于DNA的检验的设计和开发过程中,应进行风险评估(另请参见ISO 14971)。为了确保检验的进行,应在需要的地方建立缓解措施,以消除或减少已确定的风险。

应按照ISO 15189和ISO 15190的要求考虑样品运输和处理的安全要求。国际,国家或地区的法规或要求也可以适用。

在整个检验前过程中,应采取预防措施以避免不同样品/样品之间的交叉污染,例如在可行的情况下使用一次性材料或在处理不同样本/样品之间进行适当的清洁程序。

在整个检验前过程中,应采取预防措施以避免不同标本/样品之间的交叉污染,例如在可行的情况下使用一次性材料或在处理不同标本/样品之间进行适当的清洁程序。

如果检验制造商规定了预检验步骤的说明,则应遵循这些说明。如果出于正当理由(如未满足患者需求),未按照制造商的说明使用商业产品,则用户应承担其确认,验证,使用和性能的责任。

有关样品收集,运输,接收和处理的一般注意事项,请参见ISO 20658和ISO 20387。

5 在实验室外面

5.1 标本采集

5.1.1 一般

如果已知预期检验,则应遵循其使用说明,包括检验前步骤(如样本采集)的要求(另见第6条和ISO 15189)。

5.1.2 患者/标本供体的信息

文件应包括患者/标本供体的身份ID,可以是代码的形式。文件应由收集患者标本的部门负责,包括但不限于:

文件应包括标本供体/患者的ID,可以采用代码的形式。文件包括但不限于:

- 患者/标本供体的相关健康状况【例如健康、疾病类型、伴随的疾病、人口统计学(例如年龄和性别)】;
- 关于组织采集前的常规医疗和特殊治疗的信息(例如麻醉剂、药物、手术或诊断程序);
- 患者/标本供体的适当同意。

5.1.3 有关标本的信息

文件包括但不限于:

- 通过记录缺血相关的血管结扎/夹闭时间点(通常是动脉夹闭时间)来记录体内缺血的开始时间(热缺血);

注意不需要进行小组织切片活检切除冷冻。

- b) 从身体取出组织的时间和日期以及移除方法(例如芯针活检、切除、用于标本收集的活组织检查装置);
- c) 组织类型和来源、组织状况(例如患病、未受疾病影响)的描述,包括对外科医生、放射科医生或病理学家在手术室内外所做的任何标记。

如果在实验室外进行组织冷冻,则必须记录6.2中描述的步骤,其中需要进行病理评估,并且必须进行6.3。文件还应包括收集标本的负责人的ID。ID可以是代码的形式。

5.1.4 标本处理

为了诊断目的而需要冷冻的组织可以来自大样本或可以是小样本,例如通过内窥镜检查或在需要快速冰冻切片诊断的外科手术过程中从患者身上取的活检标本。

- a) 从身体取出后对标本的任何添加或修改【例如标记标本的方向(例如墨水标记、缝合、切口)】均应记录在案。

如果需要对标本进行病理诊断,则应在具有医学合格(如委员会认证)的病理学家的监督下或在其指导下进行取样(参见6.2),这些人员应了解标本的所有检查,以确保正确处理。

如果在没有病理诊断要求的情况下取出标本,则可以由病理学家以外的其他合格人员进行标本的评估、选择和记录。

- b) 福尔马林固定可能会对基于DNA的检测产生负面影响(请参阅ISO 20166-3)。因此,根据具体的分析检测,优选冷冻组织样品。关于同时检测DNA和RNA的情况,请参见ISO 20184-1。
- c) 冷缺血可改变DNA(例如甲基化);因此,只要对预期检查没有不同规定,均应立即冷冻标本/样品(见6.3)。

冷冻可以在实验室外进行,也可以在病理学家的指导或监督下在实验室内进行。

如果标本或样品在实验室外冷冻,则应立即执行6.2。

如果标本或样品在实验室内冷冻,则需要将新鲜组织标本运送到实验室。应立即执行5.2中描述的新鲜组织运输步骤。

5.2 新鲜组织运输要求

5.2.1 一般

如果需要将标本或样品运输到实验室进行冷冻,则实验室应与临床或外科部门合作,并提供标本运输程序。

5.2.2 运输准备

执行以下步骤:

- a) 根据适用的运输规定选择和使用容器和包装(例如冷却箱、存储和运输箱、真空包装);
- b) 选择和使用稳定程序(例如冷却方法)进行运输;

注意 意外冻结组织(例如以错误的方式使用冷包)将导致组织解冻时DNA降解。它还可能影响形态特征

- c) 容器的标签(例如注册号、条形码、标本类型、数量和等级、来源的器官组织)和其他文件[5.1.2, 5.1.3 和 5.1.4 和 5.2.2 a) 和 b)]。

如果这些标本来自同一部位(即相似或相应的解剖或组织器官),并且具有相同的宏观特征,例如组织类型和疾病状态(例如炎症、肿瘤和坏死),则可以放入单个容器。

注:具有相同宏观特征的标本可以具有不同的分子特征。

从人体中取出后,应立即将标本转移到容器中。然后将容器放在湿冰上或2° C至8° C的温度下,以最大程度地减少DNA的变化(例如片段化)。另外,根据预期的检测要求,短时间(例如最多3小时)的室温暴露也是可以接受的。在进行检查的过程中,应规定并验证在规定温度范围内的最大存放时间。

应记录冷缺血期间收集容器周围的温度(例如不同房间的温度、运输)。如果未测量温度,则应将温度范围分类为环境温度、室温或2° C至8° C。

应记录冷缺血期间容器周围环境的温度(例如不同房间的温度、运输中的温度)。如果未测量温度,则应按环境温度、室温或2° C至8° C的分类估算温度范围。

5.2.3 运输中

应以适当的方式进行温度监测(例如温度跟踪)。如果无法测量温度,则应估计并记录运输过程中的最高温度(例如环境温度、室温、2° C至8° C或湿冰(包))。

如果标本尚未冷冻,应立即在湿冰(包)上或在2° C至8° C下运输,以尽量减少DNA的变化。

应记录对运输程序协议的遵守情况。应描述和记录与协议的任何偏差。

6 在实验室内

6.1 有关标本接受的信息

应记录接收标本的人员的姓名(可采用代码形式)。应记录收到标本的日期、时间和条件(例如标签、运输条件,包括温度、组织类型和标本数量、容器泄漏/破裂)。应记录与运输程序既定方案(见5.2)的任何偏差。

应检查标本的正确身份。这应该包括标本的临床信息(见5.1.2和5.1.3)(例如类型、大小、数量)、住院号和/或供体/患者ID、患者姓名、患者出生日期和组织类型。应记录不符合说明的情况,例如标签、存储和运输条件(温度和持续时间)、标本和泄漏/破损的收集装置。

6.2 标本病理学评估和样品选择

标本的病理学评估和记录以及标本中样品的选择以供进行进一步处理,应由具有医学资格(如经委员会认证)的病理学家进行或在其监督下进行。

可以适用当地、国家或地区法规。

选择用于DNA检测的样品的选择。

- a) 用于分子和组织病理学检查以及可选的进一步研究目的的标本的适当部分的选择,应由具有医学资格(例如协会认证)的病理学家进行或在其监督下进行,以确保收集样品用于DNA检测不会影响组织病理学分析。

对于分子检测,应选择合适的组织部位,而在适当情况下应避免可能损害分子检测的部分,如出血和坏死部位。应考虑对组织进行显微切割以选择或富集疾病的某些特征细胞。

注1:根据当地程序,标本的适当部分的选择也可以在实验室外进行,例如在手术室(见5.1.4)。

在冷冻之前和/或之后对手术标本进行宏观评估前,标本的临床信息(见5.1.2和5.1.3)(例如类型、大小、数量),住院号和/或病理学检查病例号和/或供体/患者ID,患者姓名,患者出生日期和组织类型。手术标本和所有发现应根据各医学学会的指南适当描述,并与临床信息和问题相关联。应描述标本中所示的解剖学定位,必要时可标记切除边缘和其他重要区域,有助于以后的显微镜评估;可以拍摄照片。应根据各医学学会的器官/疾病相关指南,获取有代表性的用于显微镜评估的样品(即大体检查)。

注2:上述评估或记录也可在实验室外进行,例如:在手术室

- b) 当组织标本从体内取出而不需要进行组织病理学诊断时,该标本的记录以及样品的评估、选择和记录可由其他合格人员进行,而不是病理学家。

- c) 当需要冷冻切片诊断时, 应将标本的选定部分冷冻在适当的冷冻介质中(见 6.3)。使用的冷冻介质应记录在案。冷冻切片应由具有医学资格(如协会认证)的病理学家进行评估。

6.3 标本或样品的冷冻

标本或样品的冷冻应立即进行。应该选择和使用最适合目标用途和工作条件的最佳标本/样品冷冻方法【参见下面的1), 2) 或3)】。

样品瓶在预先冷却之前应贴上标签。

三种可能的冷冻程序如下:

- 1) 快速冷冻程序[11]: 这种方法应该首选, 因为它能最好地保存冷冻组织样品的形态[12]。异戊烷(C_5H_{12} , 也称为甲基丁烷或 2-甲基丁烷)应在 $\leq -80^\circ C$ 至 $> -160^\circ C$ 范围内进行预冷, 以便用于快速冷冻。可使用液氮($-196^\circ C$)、干冰($-80^\circ C$)、 $-80^\circ C$ 冷冻机或专用冷冻设备进行预冷, 以保持异戊烷 $\leq -80^\circ C$, 并控制或不控制冷却速度。异戊烷应在管子或其他容器(如玻璃烧杯)中冷却, 以抵抗较大和突然的温度变化。预冷异戊烷的体积应至少为标本或样品体积的 10 倍。对于快速冷冻, 组织样品应完全浸入预冷的异戊烷中。

在组织冷冻后, 应将其转移到其指定的预冷标记的低温小瓶中。应按照制造商的说明关闭样品瓶。当在管底部看到组织沉淀物时, 应该更新异戊烷。

异戊烷在室温和压力下是极易挥发且极易燃的液体。因此, 实验室应通风良好。管中的异戊烷应冷却。

- 2) 快速冷冻程序: 组织应在预先冷却的金属板或置于液氮表面的金属篮上或干冰上快速冷冻。金属表面应预冷, 温度范围为 $\leq -80^\circ C$ 至 $> -196^\circ C$ 。可以使用合适的支架和夹具将金属板或金属篮固定到位。或者, 样品可以直接在液氮中冷冻, 甚至可以在液氮或干冰中的贴有标签的封闭储存瓶中冷冻。然而, 缓慢的冷冻过程可能会因盐浓度升高和晶体形成而导致膜破裂, 这会严重影响形态[13]。为避免交叉污染, 应在冷冻样品之间清洗篮子或盘子。

注1: 液氮冷冻的特点是组织周围的液氮由于温度相对较高而沸腾, 从而产生莱登弗罗斯特效应[14]。这减少了从样品到液氮的热传导; 当样品在冷冻前放置在小瓶中时, 情况变得更糟。

- 3) 用于快速冷冻切片诊断的冷冻组织程序[另见 6.2 c]: 应立即将组织新鲜运送到实验室。应将标本的选定部分冷冻到专用支撑装置(如金属格栅、底座、圆盘)上, 该装置安装在适当冷冻介质(如适用)中的低温恒温器上。所用冷冻介质的使用应记录在案。含有组织和冷冻介质的支撑装置最好在液氮或干冰中冷冻, 以改善形态。切割冷冻切片后, 剩余部分应在不解冻的情况下从支撑装置中取出, 并储存在预冷却的小瓶中, 以便长期储存。

用冷冻介质处理过的样品应保存在 $\leq -70^\circ C$ 的温度下, 以避免干燥, 使用前应评估每种冷冻介质处理过的样品的DNA质量(见6.6)。

应在冷冻程序之前、期间和之后执行以下步骤:

- a) 冷冻程序的记录(如液氮冷冻、液氮或干冰冷却的异戊烷快速冷冻、适当冷冻介质冷冻、控制冷却速率冷冻);
- b) 冷冻时间点和日期的记录(以确定滞后时间: 从身体取出到标本或样品冻结之间的时间段);
- c) 冷冻保存用冷冻瓶的选择:
 - 冷冻瓶应具有足够的体积, 以容纳待储存的标本或样品;
 - 容器应经过储存温度认证;
 - 冷冻瓶应能安全密封, 最好使用螺旋盖; 不得使用带翻盖的容器;

注2: 由于密封不正确, 当容器储存在液氮下且管内发生液氮泄漏时, 在取回标本或样品时容器可能发生爆炸。

- d) 在冷冻前,确定样品所需的组织尺寸是否适合所选的冷冻瓶,因为组织尺寸决定容器的尺寸;因此,建议标本或样品的一维尺寸不超过 1 cm;
- e) 标签应适用于各自的冷冻储存条件;

注3: 合适的标签【例如自粘标签、手写、射频识别(RFID)、预先标记的容器】应通过质量验证。

- f) 容器的标签应确保标本和样品的适当可追溯性。因此,容器标签应至少提供以下信息:
 - 标本供体/患者的 ID,独特的标本/样品 ID 和采集标本和/或样品的日期,所有这些都可能是代码的形式(每个标本/样品都是唯一的);
 - 关于组织类型、组织和疾病状况(例如肿瘤)和/或未受影响的基本信息,除非样品跟踪系统能够提供与识别 6.3 f) 1 中使用的标本或样品相匹配的信息;
 - 每个容器的唯一编号,可包括在 6.3 f) 1) 中。

- g) 标本或样品的类型、数量和描述的文件

应该考虑在某些疾病条件下,例如肿瘤,分子特征可能不会均匀地存在于组织标本中。因此,重要的是用于分子检查的实际组织样品的部分由具有医学资格(例如认证)的病理学家评估。在这种情况下,应记录疾病的哪个方面实际上反映在用于分子检查的组织标本中(例如不同的分子机制可以在肿瘤的中心或浸润前沿被激活,肿瘤也可以由显示不同分化等级的区域构成)。

6.4 存储要求

恒温应 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 。应使用温度监测系统。

冷冻机或液氮罐应具有温度报警系统。

在取回标本或样品期间可能发生严重的温度变化。因此,检索时间应尽可能短,以避免样品解冻。

应记录发生的温度变化,这些温度变化可能会使待处理或进一步储存的标本或样品意外解冻。

应提供备用低温储存设施。

应记录从储存系统中取出任何标本或样品的储存位置,储存温度,时间和日期。

6.5 DNA 的分离

6.5.1 一般

应根据国际上定义的组织病理学分类(如参考文献[15]),对标本或样品的细胞组成和疾病状况进行组织病理学诊断[例如在苏木精/伊红(H&E)切片上]。用于分子体外诊断的标本或样品,在进行DNA分离前,应根据检测要求确定靶细胞的比例。靶细胞的数量应足以进行检查。当标本或样品不用于分子体外诊断时,例如用于研究时,建议采用类似的方法。

- a) 所有可接触样品或组织切片的材料,包括裂解缓冲液和含有该缓冲液的小瓶、用于操纵冷冻样品进行冷冻切片或转移至裂解缓冲液的小瓶和工具,应清洁且无核酸酶。所有使用的材料(不包括裂解缓冲液和含有该缓冲液的小瓶)和工具应在操作冷冻样品进行冷冻切片和转移到裂解缓冲液之前冷却至 $<0^{\circ}\text{C}$ 。搬运材料和/或冷冻样品的人员应戴手套。切片机的相关部分,包括可重复使用的刀片,应根据制造商的说明,在切割每个冷冻组织标本/样品后,用核酸去除溶液清洗。应考虑在切片机上使用新的一次性刀片,以避免交叉污染。
- b) 形态变化(例如肿瘤含量)会影响检测结果;冷冻切片应用于DNA分离,每隔 $50\mu\text{m}$ 切割一次切片,进行苏木精和伊红(H&E)染色,以检查其形态学。
- c) 应记录过程中所用方法以及使用的试剂盒和批号。

分离的DNA应保存在湿冰上或 2°C 至 8°C (例如冷却块)上,并应立即进行检测或长期储存(见6.7)。

为避免DNA检测中扩增材料的交叉污染,DNA的分离不应与检测过程的扩增步骤在同一区域进行,除非使用封闭系统,以避免交叉污染。

如果对本标本或样品的正确识别存在疑问，应验证标本/样品的身份，例如短串联重复序列（STR）分析等人类身份测试中使用的方法。

DNA 的分离是诊断工作流程中的关键步骤，在整个工作流程的验证过程中应特别关注。

应在 DNA 能力测试程序中测试 DNA 分离性能。

6.5.2 使用商业试剂盒

当使用专用于从冷冻组织中分离DNA的商业试剂盒时，应遵循制造商的使用说明。

6.5.3 使用实验室制定的程序

如果商业试剂盒未按照其预期用途使用，但经验证符合用户定义的目的，则应编写并遵循说明。

如果实验室使用自己的方案（独立于商业试剂盒），则应进行验证，证明它符合使用目的，并写下和遵循说明。

由于产品可能不兼容，因此使用不同制造商的产品可能会影响结果。仅当组件已经一起测试并针对预期检测进行了验证时，才应将它们用于诊断测试。

实验室开发的冷冻组织切片DNA分离程序应包含以下步骤：

- a) 将组织切片重悬于裂解缓冲液中。
- b) 用蛋白酶K消化以去除蛋白质并从较大的部分或片段中释放DNA。对于蛋白酶K的消化步骤（例如 55° C 至 56° C），应优化裂解缓冲液，然后进行蛋白酶K的热灭活步骤（例如 95° C）。

注：一些商业试剂盒和实验室开发的蛋白酶K方案可用于从同一组织中依次提取RNA和DNA。此类方案通常会导致RNA提取过程中DNA的丢失，并且会影响一定量组织的预期DNA产量。

- c) 可选：如果需要无RNA的基因组DNA，则与RNase A一起孵育。

注1：当使用实验室开发的方法时，过量的RNA可与DNA共同纯化，这可能会干扰预期的检测。在这种情况下，可能需要加入核糖核酸酶消化步骤。

注2：如果在DNA纯化过程中消化的RNA片段没有被充分去除，即使在消化后，共纯化的RNA也可能导致分光光度法对DNA产量的过度量化。这种过度量化和RNA的实际存在也会干扰检测。

- d) 从裂解物中分离DNA，例如通过基于苯酚/氯仿的方法或通过使用适于从冷冻组织中纯化DNA的市售试剂盒。

6.6 分离DNA的数量和质量评估

应根据诊断试剂盒制造商的说明检测DNA的数量和质量，或根据公认的物理、化学和生物化学程序进行验证。ISO 20395为DNA质量和数量测量验证提供了更具体的指导。根据具体的检查测试，检测程序可能包括以下一种或多种技术：

- a) 通过吸光度测量（A260）、荧光分光光度法或基因组特异性qPCR进行定量，见参考文献[16]和[17]；
- b) 通过吸光度测量来测试纯度（例如波长扫描，A260/A280比率评估蛋白质污染；A260/A230比率评估苯酚、盐、酒精等污染）；
- c) DNA完整性和可扩增性测试【例如电泳、色谱或分子方法（例如不同长度的扩增子比例）】[18][19]；

- d) 检测是否存在干扰物质（使用外源对照物（在DNA对照物中掺入）或检查qPCR反应曲线是否异常）[20]。

注：对于定性检测，如存在/不存在、测序、拷贝数变异，6.6 a) 和b) 通常适用；对于定量检测，可能需要6.6 a)

至d)。

6.7 分离 DNA 的储存

对于储存分离的DNA,应遵循检验制造商的说明。如果没有,则应遵循DNA分离试剂盒制造商的说明。

如果上述信息均不可用,实验室应使用自己指定和验证的程序储存分离的DNA。

如果没有DNA分离试剂盒供应商提供的信息,或者如果使用了实验室自己验证的DNA分离程序,则实验室应制定并验证如何储存分离的DNA的程序。

为了长期储存, DNA应在弱碱性洗脱缓冲液中洗脱,例如TE缓冲液,它是一种10 mM Tris溶液,包括1 mM EDTA,并用HCl使pH值达到8.0,用于DNA检测。

注:根据DNA分离程序和由此产生的洗脱液质量,在某些情况下,在室温下短时间储存或在2° C至8° C下储存是合适的。

通常在-70° C或更低温度下进行长期储存。也可以使用其他经验证的存档方法[21][22]。

应使用适当的储存容器,如冷冻瓶。

一般来说,应避免多次循环冻融。为了长期保存,应该将DNA分成小份。应记录DNA小份的任何解冻和再冻结。

对于长期储存,应该有一个经过验证的程序来组织和唯一标记含有分离DNA或由其衍生的等分试样的储存容器。

应确保可追溯性,例如通过使用可读取的RFID、1D或2D条形码或预打印的储存容器,其具有适合于低温度存储的制造商提供的唯一代码。

参 考 文 献

- [1] ISO 14971, Medical devices — Application of risk management to medical devices
- [2] ISO/IEC 17020, Conformity assessment — Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection
- [3] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [4] ISO 20166-3, Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 3: Isolated DNA
- [5] ISO 20184-1, Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for frozen tissue — Part 1: Isolated RNA
- [6] ISO 20387, Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking
- [7] ISO 20395, Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR
- [8] ISO 20658, Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples
- [9] HewITT S.M., LewIs F.A., CAo Y. et al. , Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch. Pathol. Lab. Med. 2008 Dec, 132 (12) pp. 1929–1935
- [10] HeyLEN L., ThIENpont B., NAEsens M. et al. , The Emerging Role of DNA Methylation in Kidney Transplantation: A Perspective. Am. J. Transplant. 2016, (Jan) p. 18
- [11] MAgeR S.R., OoMEN M.H., MoRENTE M.M. et al. , Eur. J. Cancer. 2007 Mar, 43 (5) pp. 828–834. Available at: Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples.
- [12] SteU S., BAUCAMp M., von DACH G., BAwohL M., DettwILER S., StoRZ M., MoCh H., SchRAML P., A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology. Virchows Arch. 2008, 452(3) pp. 305–12
- [13] BeesLEy J.E., ed. Immunocytochemistry and In Situ Hybridization in the Biomedical Sciences; 2013 Chapter 2: Preservation of tissue for Immunocytochemical Studies – I. ap Gwynn ISBN-13: 978-1461266303
- [14] GottFRIED B. S., Lee C. J., BeLL K. J., The Leidenfrost Phenomenon: Film Boiling of Liquid Dropletson a Flat Plate. Int. J. Heat Mass Transfer. 1966, 9 pp. 1167–1187
- [15] WHO/IARC Classification of Tumours <https://whobluebooks.iarc.fr/>
- [16] LAURELL H., IACovonI J.S., Abot A. et al. , Correction of RT-qPCR data for genomic DNA derived signals with ValidPrime. Nucleic Acids Res. 2012 Apr, 40 (7) pp. 1–10
- [17] DevonSHIRE A.S., WhALE A.S., GUTTERIDGe A. et al. , Towards standardization of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. Anal. Bioanal. Chem. 2014, 406 p. 6499. DOI:.10.1007/s00216-014-7835-3
- [18] CoLotte M., CoUALLIER V. et al. , Simultaneous assessment of average fragment size and amount in minute samples of degraded DNA. Anal. Biochem. 2009 May, 388 (2) pp. 345–347
- [19] PAVšIČ J., ŽeL J., MILAveC M., Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. Anal. Bioanal. Chem. 2016 Oct, 408 (1) pp. 107–121

[20]TIChopAD A., BAR T., PeCEN L., KITChen R.R., KUblstA M., PFAFFL M.W., Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods*. 50 (4) pp. 308–312

[21]Muller R., Betsou F., Barnes M., Harding K., J., Bonnet J., Kofanova O. et al. , Preservation of biospecimens at ambient temperature: special focus on nucleic acids and opportunities for the biobanking community. *Biopreserv. Biobank*. 2016, 14 pp. 89 – 98

[22]CoLotte M., CoUDy D. et al. , Adverse Effect of Air Exposure on the Stability of DNA Stored atRoom Temperature. *Biopreserv. Biobank*. 2011, 9 (1) pp. 47–50
