

基于基因芯片的药物评价技术与方法指导原则

本指导原则规定了将基因芯片技术用于药物安全性和有效性评价的原理、定义、主要技术指标和待测样品的要求、样品图谱的制作及分析方法。目的是规范基于基因芯片技术的药物安全性、有效性评价研究，为该类研究的实验设计、方法学建立等过程和测定方法的适用范围提供指导性的原则要求。

一、定义及原理

药物基因组学(pharmacogenomics)，又称基因组药理学或基因组药理学，是药理学的一个分支，定义为在基因组学的基础上，通过将基因表达或单核苷酸的多态性与药物的疗效或毒性联系起来，研究药物如何由于遗传变异而产生不同的作用。

毒理基因组学(toxicogenomics)是从多基因、全基因组水平研究毒物作用与基因表达的相互影响，其研究内容主要包括3个方面：促进环境应激原与疾病易感性关系的理解、阐明毒性分子机制、筛选和确认与疾病和毒物暴露相关的生物标志物(biomarkers)。

DNA 微阵列(DNA microarray)又称 DNA 阵列或 DNA 芯片，比较常用的名字是基因芯片(gene chip)。是一块带有 DNA 微阵列(microarray)的特殊玻璃片或硅芯片，在数平方厘米的面积上布放数千或数万个核酸探针；样品中的 DNA、cDNA、RNA 等与探针结合后，借由荧光或电流等方式检测每个探针分子的杂交信号强度，进而获取样品分子的数量和序列信息。经由一次测定，即可提供大量基因序列相关信息，以高通量、多因素、微型化和快速灵敏的特点而见长。

原理：利用生物分子相互间的特异识别作用进行生物信号处理。

根据检测样本的不同，基因芯片可分为表达谱芯片(cDNA 芯片)、SNP(单核苷酸多态性，single nucleotide polymorphism)芯片、miRNA 芯片、siRNA 芯片、染色质免疫共沉淀芯片(chromatin immunoprecipitation-chip, CHIP-chip)和 DNA 甲基化芯片(MeDIP-chip)等。

二、基本原则

基于基因组学技术的药物安全性、有效性评价方法应符合药物基因组学研究的随机、对照、重复的基本原则；具备简单、精确的特点；应有明确的判断标准。

三、基本内容

1.生物样本的获取

试验系的选择 基于基因芯片技术的药物安全性、有效性评价方法中所用的试验系，包括整体动物、离体器官、血清、组织、细胞等。试验系的选择与试验原理和测定指标密切相关，应选择背景资料清楚、影响因素少、检测指标灵敏和成本低廉的试验系统。应尽可能研究各种因素对试验系的影响，采取必要的措施对影响因素进行控制。

如采用实验动物，尽可能使用大鼠和小鼠等来源多，成本低的实验动物，并说明其种属、品系、性别和周龄。实验动物的使用应遵循“优化、减少、替代”的“3R”原则。

供试品选择 应选择工艺稳定，质量合格的供试品。应至少使用3批供试品。若为饮片，应基源清楚。

标准品或对照品选择 采用标准品或对照品均应有理论依据和/或实验依据。国家标准中采用的标准品或对照品的使用应符合国家有关规定要求。

2.生物实验设计

设计原理 所选实验方法的原理应明确，检测指标灵敏度高，客观、专属性强。

设计类型 试验设计可考虑设供试品组、阴性对照组或阳性对照组，使用动物模型应考虑设置模型对照组。对于重现性好的试验，可不设或仅在复试时设阳性对照组。

剂量设计 按照生物检定的要求，参照药物临床用药剂量进行合理的剂量设计，试验剂量的选择以产生采用基因芯片能检测到生物效应为宜；在制订质量标准研究中，应采取多剂量试验，并充分说明标准中设定限值剂量的依据。

给药途径 与临床用药途径一致。如采用不同的给药途径，应说明理由。

给药次数 根据药理学研究合理设计给药次数，可采用多次或单次给药，尽量与临床用药给药次数一致。

指标选择应客观、明确、专属，与药物药效或安全性相关。

生物样本处理 应尽量使用无菌、一次性塑料制品，已标明不含有核糖核酸酶(RNase-free)且未开封过的塑料制品；在试剂中可适当加入一定量的 RNA 稳定剂；尽量确定每次处理样本的最大数量，减少处理过程对 RNA 整体性的影响；需要对影响 RNA 质量的多个因素进行评价：如样品量等。在收集到生物样本后，最好能即刻进行 RNA 制备工作，若需暂时储存，则应以液氮将生物样本急速冷冻后，储存于-80℃冰箱中。在制备 RNA 时，将储存于冷冻柜的材料取出，立即以加入液氮研磨的方式打破细胞。不可先行解冻，以避免 RNase 的作用。

3.基因芯片技术

为了基因芯片分析数据的准确、稳定和可靠，应建立并严格执行基因芯片技术的标准操作规程(SOP)。基于基因芯片技术的药物安全性、有效性评价方法主要包括：基因芯片制备、样本获取、总 RNA 提取(extraction)、体外扩增(amplification)、标记(labeling)、芯片杂交(hybridization)、洗涤(wash)、差异基因检测、分析及验证。

以下内容详细说明各流程中的主要原理及注意事项。

RNA 提取、分离和制备 RNA 的提取主要包括组织、细胞、全血或外周血单核细胞(PBMCs)中 RNA 的提取，常见的 RNA 提取方法有 TRIzol 法、苯酚法和胍盐/ β -巯基乙醇法等；提取的总 RNA 采用 RNA 纯化试剂盒纯化，纯化后不应存在对逆转录酶等有抑制作用的物质，排除有机溶剂和金属离子的污染，尽量避免蛋白质、多糖和脂类分子等污染。

基因芯片的制备 以玻璃片或硅片为载体，采用原位合成和微矩阵的方法将寡核苷酸片段或 cDNA 作为探针按顺序排列在载体上。

荧光标记 在基因组 DNA 扩增过程中，将带有 Cy3 或 Cy5 荧光素的 dUTP 或 dCTP 加入到新合成的 DNA 链，使新合成的 DNA 链带有荧光标识。

杂交和洗涤 使带有荧光标记 gDNA/cDNA 与基因芯片上的探针进行特异性互补结合的过程称为杂交。

基因芯片扫描(microarray scanning)将杂交后的基因芯片置于芯片扫描仪内获得不同探针杂交信号强度的全貌图。

基因芯片数据分析 采用图像分析软件对芯片图像进行分析，将图像信号转化为数字信号，对芯片上的数据采用局部加权回归散点平滑法(locally weighted scatter plot smoothing, LOWESS 或 LOESS)进行归一化，根据 Cy3 或 Cy5 信号强度和比值判断差异基因。

采用实时荧光定量 PCR 对差异表达基因定量，验证差异表达基因。

4.方法学验证

(1) 测定方法影响因素 应考察测定方法的各种影响因素，确定最佳的试验条件，以保证试验方法的专属性和准确性。根据对影响因素考察结果，规定方法误差控制限值或对统计有效性进行说明。

(2) 精密度考察 应进行重复性、中间精密度、重现性考察。

重复性 按确定的测定方法，至少用 3 批供试品、每批 3 次或同批供试品进行 6 次测定试验后对结果进行评价。基因芯片测定试验结果判断应基本一致。

中间精密度 考察试验内部条件改变(如不同人员、不同仪器、不同工作日和实验时间)对测定结果的影响。

重现性 基因芯片测定试验结果必须在 3 家以上实验室能够重现。

(3)方法适用性考察按拟采用的基因芯片测定方法和剂量对 10 批以上该产品进行测定，以积累数据，考察质量标准中该测定项目的适用性。