

动物检疫 分子水平标准物质 研制技术及其应用

梁成珠 雷质文 孙涛 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

动物检疫分子水平标准物质 研制技术及其应用

梁成珠 雷质文 孙 涛 主编

中国质检出版社
中国标准出版社
北京

图书在版编目 (CIP) 数据

动物检疫分子水平标准物质研制技术及其应用/梁成珠主编. —北京: 中国标准出版社, 2014. 5

ISBN 978-7-5066-7501-7

I. ①动… II. ①梁… III. ①动物—检疫—分子生物学—生物制品 IV. ①S851.34

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 034388 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100013)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 64275323 发行中心: (010) 51780235

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 13.5 字数 323 千字

2014 年 5 月第一版 2014 年 5 月第一次印刷

*

定价 42.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

编 委 会

主 编 梁成珠 雷质文 孙 涛

副 主 编 吴 斌 麻丽丹 李 叶 王殿夫 肇慧君

李正义 于 兵 岳志芹 徐 彪 徐大军

房保海

编写人员 (按姓氏笔画排序)

于 兵 王 群 王妍婷 王海燕 王曼霞

王殿夫 邓明俊 田 卓 仲吉伟 孙 涛

孙 敏 李 叶 李正义 李蓉娟 杨 钦

吴 斌 吴孝槐 何 平 宋立奇 张吉良

张秀云 陈晓东 林天闻 岳志芹 郑小龙

房保海 赵玉然 姜英辉 徐 彪 徐大军

高世光 高宏伟 陶雨风 麻丽丹 梁成珠

雷质文 蔡晓萍 肇慧君



疯牛病、非洲马瘟、高致病性禽流感 H5N1、新城疫、甲型流感 H1N1、口蹄疫、猪链球菌病、猪蓝耳病、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫情不仅会造成畜禽死亡和畜产品损失，影响畜牧业发展和流通贸易，更会危及人类健康。而且重大动物疫病的影响具有很大的外延性和不确定性，已成为一个超越国界、全人类共同关注的问题，一旦处理不好，应对不当，将会引发较大的公共卫生事件，严重时还可能会对国民经济的健康发展造成巨大冲击，更会造成严重的社会和政治问题。因此，必须将重大动物疫病尽快纳入国家公共卫生管理范畴，将其放到更加突出的位置，高度重视，全力应对。

重大动物疫病防控是一个长期艰巨的过程，是涉及多环节、多主体、多部门、多层次的复杂工作，是一项庞大的系统工程，“加强疫情监测体系建设，实现科学预警”是重大动物疫病长效防控的核心环节之一。为了防止“生物安全事故”引发“公共卫生事件”，国内外均一致禁止“买卖”口蹄疫、非洲马瘟等重大动物疫病病原，要求在 PⅢ生物安全实验室内进行监测，检测条件要求苛刻。《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006—2020 年）》确定了“畜禽水产健康养殖与疫病防控”的优先主题，将重点研究“开发动物疫病及动物源性人畜共患病的流行病学预警监测、检疫诊断、免疫防治、区域净化与根除技术”。

在众多跟踪监测方法中，分子生物监测方法具有特异、灵敏、快速、准确、方便、高通量等优点，可以避免或减少“生物安全事故”，而且对于对虾白斑综合症病毒、鲤春病毒血症病毒等重大水生动物疫病，由于没有理想的体外病原扩增模型，所以国际权威组织、欧美等发达国家的政府机构、我国农业部和检验检疫系统早已认可运用分子生物学技术检测疯牛病、非洲马瘟、高致病性禽流感 H5N1、新城疫、甲型流感 H1N1、口蹄疫、猪链球菌病、猪蓝耳病、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫病病原。《OIE Manual of diagnostic tests for aquatic animals》《OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals》、GB/T 19438.1～19438.3、GB/T 18935、SN/T 1151.1～1151.6 等方法已陆续发布，并在应急处理和阻断非洲马瘟、口蹄疫、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫病传播等方面发挥着重大作用。我国农业部和检验检疫系统很多实验室有关疯牛病、非洲马瘟、高致病性禽流感 H5N1、新城疫、甲型流感 H1N1、口蹄疫、猪链球菌病、猪蓝耳病、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫病病原的分子生物学检测能力已获得认证认可。

分子生物学技术检验重大动物疫病病原需要以可靠的试验数据作验证，准

确、可溯源的标准物质作保障。发挥分子生物学技术重要作用的必要条件是必须在试验体系中设置合格的阳性对照，非洲马瘟、口蹄疫、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫病病原核酸标准样品可以用于实验室的内部控制、实验室间的质量控制（外部质量评价）、评价检测方法的准确度、测量过程中的质量评价以及实验室的计量认证与测量仲裁。在 GB/T 27025—2008/ISO/IEC 17025: 2005《检测和校准实验室能力的通用要求》中，直接涉及到标准物质（应该涵盖核酸质控参照品）的有关规定有近十条，而且把标准物质与参考标准单独列为技术要求条款（5.6.3），足见标准物质（应该涵盖核酸质控参照品）的使用和管理对实验室认可的重要性。

目前无论在国内还是国际上，用于重大动物疫病病原的核酸标准样品极其匮乏，在许多方面还是空白，我国缺乏大量的用于分子生物学检测的标准物质。为了将非洲马瘟、口蹄疫、鲤春病毒血症、白斑综合症等重大动物疫病病原堵在国门之外，我国很多实验室或生物试剂生产厂家均大量使用分子水平标准物质，这些分子水平标准物质生产供应来源、定量单位均不统一，造成检测结果存在各种差异，因此不同实验室所做出的试验数据没有可比性，但是这些分子水平标准物质对于建立检测方法、进行校准和方法验证，控制试验过程和方法，保证分析测试数据的准确性、可靠性、可重复性和可比性不可或缺，设计和生产与国际接轨的重大动物疫病病原分子水平标准物质迫在眉睫。

2011年中华人民共和国山东检验检疫局和中华人民共和国辽宁检验检疫局承担了国家质量监督检验检疫总局资助的科研项目“动物检疫分子水平标准物质研制技术及其应用”展开了一系列卓有成效的研究，本书的主要内容便是国家质检总局资助科研成果输出，集中展示了把国内外研制标准物质的要求结合和融入到动物检疫分子水平标准物质研制技术及其应用中的核心成果和研究精髓。本书主要适用于农业部门、质检部门、高等院校、科研院所、食品生产企业等管理人员和动物检疫人员，可作为学习培训及日常工作参考书，同时对动物检疫实验室的认可工作和质量管理方面亦有一定的专业性参考价值。

书中涉及一些公司产品的商品名及型号，给出这一信息，是为了方便本书的读者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

由于编写人员都是利用业余时间辛勤笔耕，加上编者水平有限，书中难免出现纰漏和错误，恳请专家、老师、同行和广大读者朋友们批评指正。

编者

2014年2月



第一章 绪论	1
第一节 概论	1
一、标准物质概念更为包容	1
二、新类型标准物质不断出现	1
三、标准物质评定技术不断发展并面临新挑战	2
四、规范化研制标准物质形成趋势	2
五、高等级标准物质的发展受到重视	2
六、标准物质国际合作日益广泛	3
第二节 分子水平标准物质研制历史和现状	3
一、分子水平标准物质的研制历史	3
二、分子水平生物标准物质的研制现状	7
第三节 分子水平标准物质的种类及其应用	8
一、生物成分量标准物质	8
二、生物活性量标准物质	9
三、生物结构量标准物质	9
第四节 研制动物检疫分子水平标准物质的重要性和必要性	9
一、我国动物检疫诊断试剂现状	10
二、我国动物传染病体外诊断试剂质量评价标准物质的研制及审批管理	10
三、动物检疫分子水平标准物质的研制意义	11
第二章 生物计量学在动物检疫分子水平标准物质研制中的应用	13
第一节 生物计量学概述	13
一、生物计量概述与起源	13
二、生物计量特点	14
三、生物计量的任务	15
第二节 生物计量基标准	15
一、基本定义	15
二、标准物质的分类与分级	16
三、标准物质的特点	18
四、标准物质的基本要求	18
五、标准物质的溯源性	19
第三节 分子水平生物标准物质的研制	19
一、候选物质的选择	19

二、生物标准物质的制备	19
三、均匀性检验	20
四、稳定性考察	21
五、生物标准物质的定值	23
第四节 生物标准物质的研制实例	25
一、血细胞计数国家标准物质的研制	25
二、核苷酸纯度标准物质研制	30
参考文献	36

第三章 动物检疫 DNA 标准样品的研制

第一节 概论	37
第二节 动物检疫基因组 DNA 标准样品的研制方案简介	37
一、国内外研究现状	37
二、制备基因组 DNA 标准样品的操作步骤	38
三、均匀性检验	39
四、稳定性检验	40
五、定值	42
六、计量溯源性	43
第三节 霍乱弧菌 <i>hlyA</i> 基因、 <i>rfb-O1</i> 基因、 <i>rfb-O139</i> 基因和 <i>ctxAB</i> 基因标准质粒库的研制实例	44
一、概述	44
二、材料与方法	44
三、试验结果	47
四、实验室间定性验证	56
五、讨论	57
第四节 霍乱弧菌 <i>hlyA</i> 基因、 <i>rfb-O1</i> 基因、 <i>rfb-O139</i> 基因和 <i>ctxAB</i> 基因标准样品的制备实例	58
一、样品制备	58
二、均匀性检验	58
三、稳定性检验	62
第五节 沙门氏菌 <i>invA</i> 基因质粒标准样品的研制实例	65
一、材料	65
二、试验方法	66
三、结果与讨论	68
第六节 白斑综合症病毒核酸标准物质的制备实例	72
一、材料与仪器	73
二、试验方法	74
三、试验结果	77
四、讨论	80

参考文献	80
第四章 动物检疫 RNA 核酸基因片段标准样品的研制	83
第一节 概论	83
第二节 病毒全 RNA 标准样品的研制方案简介	83
一、病毒的分离与纯化	83
二、病毒的增殖	86
三、病毒的特性	86
四、一级结构的获得	87
五、均匀性	88
六、稳定性检验	89
七、标准样品的定值	90
八、标准样品的包装与贮存	90
第三节 RNA 功能基因片段标准样品的研制方案简介	91
一、病毒 RNA 功能基因片段质粒的获取	91
二、体外转录	92
三、稳定性基质的研究	92
四、均匀性	92
五、稳定性	92
六、定值	92
第四节 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因片段标准样品的研制实例	92
一、H5 亚型禽流感病毒命名	92
二、选择目标片段及克隆载体	92
三、H5 亚型禽流感病毒目标分子片段的扩增、克隆与测序	93
四、体外转录	96
五、定性检定	96
六、均匀性和稳定性检验	97
七、定值方法	97
第五节 H9N2 亚型禽流感病毒全 RNA 标准样品研制实例	97
一、病毒初步鉴定	97
二、病毒的增殖与纯化	98
三、本研究病毒株的命名	98
四、病毒株各基因引物对的设计	98
五、病毒株的荧光 RT-PCR 鉴定	98
六、全基因的 RT-PCR 扩增、测序及分析	99
七、均匀性	104
八、稳定性	104
九、定值	104

第六节 A 型禽流感病毒通用型核酸检测标准样品的研制及不确定度分析	105
一、材料	105
二、试验方法	105
三、试验结果	107
四、讨论	111
第七节 新城疫病毒中强毒株核酸检测用标准样品的研制及不确定度分析	112
一、材料	112
二、试验方法	113
三、试验结果	115
四、讨论	119
第八节 口蹄疫病毒核酸检测标准样品的研制	120
一、材料	120
二、试验方法	121
三、试验结果	122
四、讨论	126
参考文献	127

第五章 动物检疫假病毒标准物质的研制

第一节 概论	131
一、裸露核酸	131
二、病毒颗粒	132
三、内含特定核酸片段的病毒样颗粒	132
第二节 RNA 功能基因片段假病毒标准样品的研制方案简介	134
一、病毒 RNA 功能基因片段质粒的获取	134
二、病毒 RNA 功能基因片段质粒的增殖	134
三、真核表达载体及假病毒载体的选择	134
四、稳定性基质的研究	134
五、均匀性	135
六、稳定性	135
七、定值	135
第三节 含马动脉炎病毒 N 基因序列的病毒样颗粒的制备	135
一、材料	135
二、试验方法	136
三、试验结果	143
四、讨论	147
第四节 含非洲马瘟病毒核酸序列的病毒样颗粒的研制报告	148
一、材料	148
二、试验方法	148
三、试验结果	152

四、结论和讨论	153
第五节 鲤春病毒假病毒标准物质的制备	154
一、材料	155
二、试验方法	155
三、试验结果	159
四、讨论	162
第六节 H9 亚型流感病毒 HA 基因假病毒标准样品实例	162
一、引物设计	162
二、病毒基因组 RNA 的提取	162
三、HA 基因的 RT-PCR 扩增	162
四、HA 基因的克隆	163
五、感受态细胞的制备 (氯化钙法)	163
六、连接产物及质粒的转化	164
七、质粒的提取	164
八、序列测定	164
九、转移载体的构建	164
十、假病毒的包装	164
十一、均匀性	164
十二、稳定性	165
十三、定值方法	165
参考文献	165
第六章 动物检疫蛋白质标准样品的研制	168
第一节 概论	168
第二节 蛋白质含量标准物质的研制	168
一、蛋白质计量的重要性和迫切性	169
二、国际蛋白质含量标准物质研制现状及趋势	169
三、我国在蛋白质计量方面存在的主要问题	170
四、我国蛋白质含量标准物质研制情况	170
第三节 动物检疫蛋白质标准样品的研制及实例	171
一、蛋白质标准样品中的冻干保护剂	171
二、蛋白质标准样品的冻干保护机制	173
三、蛋白质冻干保护剂的选择	174
四、动物检疫蛋白质标准样品研制实例——牛布鲁氏菌病阳性 血清标准样品	175
参考文献	175
第七章 动物检疫分子水平标准样品质量控制	179
第一节 概述	179

第二节 动物检疫分子水平标准样品研制过程中的质量控制	180
一、动物检疫分子水平标准样品研制过程质量控制	180
二、动物检疫分子水平标准样品生产复制过程质量控制	189
三、动物检疫分子水平标准样品的保存	191
四、动物检疫分子水平标准样品分发及运输	192
五、动物检疫分子水平标准样品技术咨询服务	193
第三节 动物检疫分子水平标准样品使用过程中的质量控制	193
一、标准样品证书	193
二、标准样品开封后保存	194
第四节 动物检疫分子水平标准样品的外部质量评价	194
一、标准样品质量管理体系的外部评审	194
二、针对标准样品检测方法的外部质量控制	195
三、针对标准样品研制项目的外部评审	195
四、标准样品评价	195
参考文献	197
第八章 动物检疫分子水平有证标准样品的认定和管理	198
第一节 我国标准物质的认定及管理模式	198
一、标准物质管理规章	198
二、标准物质的分类和分级	199
三、标准物质的定级评审	200
第二节 标准样品的认定流程	201
一、标准物质申报的技术文件和样品的要求	201
二、标准物质制造计量器具许可证申请书的填写	202
三、标准物质研制报告的编写要求	202
四、标准物质定级评审的依据	202
五、标准物质定级评审程序	203
六、标准物质证书编写要求	204

第一章 绪论

第一节 概论

标准物质作为开展测量仪器校准、测量方法评价确认、测量过程质量控制等方面的重要工具，随着全世界对检测结果可靠性与可比性的不断追求，正得到越来越广泛的应用。巨大的需求推动了标准物质领域的快速发展，无论是品种与应用领域的拓展，还是研制技术的提升，都在为提高标准物质满足各类预期使用目的的程度而作出努力。总结各国及国际组织的标准物质发展状况，可以得出以下发展趋势：

一、标准物质概念更为包容

从标准物质实现的基本用途（即测量方法确认评价、校准、质量控制等）出发，标准物质在概念上逐渐更为包容。标准物质作为一个大家族，既包括了有证标准物质，也包括其他类型的标准物质。在这种发展趋势下，如何界定有证标准物质和其他类型标准物质的界限以及各自的应用场合显得尤为重要。综合国际标准化组织/标准样品委员会（ISO/REMCO）与《国际通用计量学基本术语》（VIM）对标准物质和有证标准物质的定义，是否具有明确、经过认定的计量学溯源性成为区分有证标准物质与其他类型标准物质的关键特征。标准物质的范畴如下所示：

- a) 有证标准物质（CRM）的特征：认定值（标准值）及不确定度、证书、声明的溯源性。
- b) 校准物质（CAL）的特征：特征值及不确定度、溯源性。
- c) 质量控制标准物质（QCM）的特征：具有满足预期使用目的的均匀性与稳定性。

二、新类型标准物质不断出现

随着标准物质应用领域的不断拓展和应用需求的不断增加，标准物质的发展正经历着加速的过程，具体来讲就是：

- a) 标准物质由钢铁、地质等传统领域向生物、临床、新材料等新兴领域拓展（如微生物标准物质、表面分析标准物质、纳米尺度标准物质、基因测试标准物质等），大众健康、高新与纳米材料成为各国标准物质发展的重点领域。
- b) 用于法医鉴定、医学诊断、基因测试、微生物检测等领域的定性分析用标准物质，以及大量应用于实验室内部质量控制的质量控制用标准物质发展迅速。
- c) 标准物质由单一特性量值向多特性量值发展，由常量、微量水平向痕量、超痕量水平发展，由总量向形态发展，由无机特性量向有机、生物特性量发展，以满足越来越多样的应用需求。同时，满足高端量值溯源和校准需求的高纯金属、高纯化合物，同位素基准纯物质和满足方法评价确认需求的生物、环境等复杂基体标准物质两极化发展。

三、标准物质评定技术不断发展并面临新挑战

在制备技术方面,一方面,越来越多的标准物质研究对象涉及不稳定的有机或生物介质体系,为样品的均匀化、稳定化制备技术带来了巨大的挑战;另一方面,制备过程(如粒度控制技术、冻鲜技术、冻干技术、稳定剂、包装及保存技术等)对标准物质适用性与可替换性(commutability)的影响还需要开展进一步的评估研究。在尽量接近真实样品的同时,给样品的量值水平控制、均匀性、稳定性和保存带来困难。

在标准物质定值技术方面,同位素稀释质谱法等高精度测量方法得到不断的发展与应用,尤其是拓展到生物和临床领域,为测量溯源性的建立提供了新的方向。在高纯物质纯度定值技术方面,多种测量技术(如经典库仑法、凝固点下降法、定量核磁共振法、同位素丰度测量、DSC、热重分析、卡尔费休水滴定法、GC-MS、LC-MS、LC-UV、GC/FID、灰化法、残渣法、UV、IR等)的联合应用,为高端量值溯源源头标准物质的研制提供了更为准确、可靠的手段。

在标准物质不确定度评定技术方面,贝叶斯、蒙特卡罗等新的不确定度评定技术以及统计学模型在处理不同方法、不同定值组测量结果不确定度等方面逐步得到应用,同时,均匀性、稳定性不确定度的量化和引入,使得高重复性均匀性、稳定性测试技术与评估模型的发展受到重视。

四、规范化研制标准物质形成趋势

由ISO/REMCO制定的《标准物质国际导则》在全世界标准物质研制生产、应用与认证认可领域发挥着越来越重要的作用。针对标准物质发展的需要,ISO/REMCO对《标准物质国际导则》的构架进行了全面完善,并在该构架的指导下,开展相关导则和技术文件的起草和修订工作。导则和技术文件的内容涵盖了标准物质术语定义、分类、研制及定值原则,对研制生产者的能力要求,标准物质溯源性的建立、运输、使用等各方面的内容。其中,最引人注目的是《定性分析标准物质国际导则》、《内部及质量控制用标准物质国际导则》、《标准物质计量学溯源性的建立和表示》等技术文件的起草工作。在确定一致性准则的基础上,通过规范化的标准物质研制生产质量管理体系的建立,为实现标准物质国际互认和各领域检测结果的国际互认提供了基础支撑。

五、高等级标准物质的发展受到重视

在国家校准测量能力全球互认(CMC-MRA)趋势的引领下,各国更加重视开展体现国家核心测量能力、具有国际竞争力的高端、量值溯源源头标准物质的研制,以支持CMC能力的持续申报与对外开展服务,推动全球测量结果的互认。在此基础上,基准标准物质(PRM)用于保存国家最高校准测量能力,满足其他级别标准物质的量值溯源要求。CRM用于下一级标准物质的量值溯源和高端、关键测量领域的量值溯源以及实验室检测能力评估;其他商业开发、日常大量使用的标准物质,则通过建立与PRM、CRM的溯源性关系,确保其量值的可靠性,用于日常检测、校准和质量控制。

六、标准物质国际合作日益广泛

基于标准物质的全球化流通和标准物质与各国检测结果一致性方面的重要关联,标准物质的国际合作日益广泛 [如欧盟 ERM 标准物质品牌和欧洲虚拟标准物质研究院,以及中日韩合作研究标准物质 (ACRM) 的创建],通过标准物质的联合研发,为各国之间实现优势互补,增强联合研发标准物质在全球范围内的竞争力,开展标准物质共享,推动国际互认起到了十分积极的作用。与此同时,标准物质国际合作也是对各国标准物质研发实力的考验和比拼,将对未来全球标准物质的研发格局和标准物质技术规范体系的发展方向产生重要影响。

第二节 分子水平标准物质研制历史和现状

分子水平标准物质的分类具有其自身特点。目前,其计量研究对象主要包括生物活性成分(小分子为主)、核酸、蛋白质、细胞和微生物,其中,核酸、蛋白质、微生物是目前国际生物计量研究的重点。核酸计量以含量、序列计量为主;蛋白质计量主要包括含量、酶活、免疫、结构计量等;微生物计量刚刚开始,以鉴定和定量研究为主;活性成分计量以纯度、含量计量为主。从上述研究对象的分析可以看出。分子水平标准物质可以分为成分标准物质和生物特性标准物质两类。成分标准物质主要包括食品、农产品及其制品等的营养成分分析标准物质、有毒有害残留成分分析标准物质等。这类标准物质与人们所熟悉的化学成分标准物质具有相近和相通之处。生物特性标准物质包括用于鉴定、评价、分析、安全监控等用途的核酸标准物质、蛋白质标准物质、活性成分标准物质、微生物活体标准物质等。生物标准物质按照其物料水平分为核酸水平、蛋白质水平、细胞水平、组织水平及机体水平。

生物标准物质尤其是生物特性标准物质的制备需要先进的生物技术作为支撑。生物技术的发展水平及人们对生命现象的理解程度决定了生物标准物质的需求和制备的难易程度。如基因操作技术的发展使得转基因动植物成为可能,而转基因生物及其制品所带来的安全问题及其所引发的贸易争端,在不断地要求进行转基因生物标准物质和标准检测方法的研制。有证标准物质是转基因核酸量值的载体,是实现转基因生物核酸量值溯源和传递的技术手段。包含转入基因序列、边界序列、特征标记的标准质粒是转基因核酸标准物质的重要形式之一。该标准质粒的研制正是基于基因克隆技术、反向 PCR 技术、Tail-PCR 技术及分子标记技术等的发展。

一、分子水平标准物质的研制历史

分子水平的生物标准物质是生物检定的工具,只有正确地研制和使用生物标准物质,才能使生物检定设计合理、结果可靠、结论正确。正确研制和使用生物标准物质的关键在于对生物标准物质性质的认识。

早在 1890 年, VonBehring 和 Kitasato 用白喉毒素反复接种动物后,其血清中可产生抗毒素,该抗毒素可保护正常动物免受白喉毒素致死的攻击。不久即有人用该抗毒素治疗患白喉的儿童。从此,西欧各国纷纷生产抗白喉毒素,直至 1895 年,英国在使用效价太

低的抗毒素后，达不到治疗目的，因此提出白喉抗毒素的效价问题。1897年 Ehrlich 经过认真研究，提出了解决制品效价的方法。他认为应该选用一批抗毒素原料作为标准品，将其一定量所产生的抗毒素效果作为效价单位，以此作为标准可比较出各批样品的效价差异。鉴于标准品的单位效价应较长时期不变，因此提出了标准品应冻干低温避光保存，且制备量要大，足够分发若干年，以保持结果的一致性。这些要求为生物标准品打下了基础。1914年他正式为各研究单位分发了白喉抗毒素标准品，1922年该标准品与华盛顿制备的标准品，在弗莱柯富、哥本哈根、罗马3个实验室同时作对比，得到一致的结果，从此 Ehrlich 白喉标准品被正式认定为第一个国际标准品。

1921年8月国际联盟成立临时卫生委员会，1924年2月改为国际联盟卫生委员会，即世界卫生组织的前身。在此期间，丹麦国立血清研究所所长 Thorvald Madson 一直担任卫生委员会的主席，并于1921年主持召开了第一次生物标准品国际会议。他非常重视生物检定工作，并为此做出了重要贡献。他曾多次主持了国际联盟卫生委员会下设的生物检定常设委员会会议，并在这些会议上，提出了国际生物标准品需多国协作研究的重要思想。

之后，在建立第二个生物标准品破伤风抗毒素时遇到了困难。当时有华盛顿、巴黎和弗莱柯富3种标准品和4种效价测定方法，各国都制定了各自标准品的效价单位。后经5个实验室用不同方法测得结果，其效比值相同，因此各国一致同意用新的德国所定单位作为国际单位。但美国却坚持用自己定的效价单位，以致造成破伤风抗毒素单位定义上的混乱，一直到1950年，世界卫生组织才将两种单位统一。

在药品生物检定方面最早作出贡献的是英国国立医学研究所的 Sir Henry Dale，他在1923年~1928年期间，主持召开了3次国际会议，研究讨论了药品和其他非免疫制品的生物检定原则。他指出对于不能用化学方法测定其活性成分的药品或组织提取物，亦可运用和破伤风抗毒素效价测定相同的原理进行生物检定。但由于生物反应的变异较大，用少量动物所产生的绝对反应来判定药品的效价单位是不够的。正确的方法应选择一批稳定性好的原料作为标准品，以其一定的重量作为单位数，样品的效价可与标准品对比而得。至于检定方法，可随着科学技术的发展不断改进和完善。

截至1939年，世界卫生组织共建立了13个免疫制品、10个内分泌物质、5个药品、4个维生素国际标准品，丹麦血清研究所和英国医学研究所被分别指定为研究、制备及分发血清和药品生物制品的两个标准品中心。

由于各国使用标准品量与日俱增，两个中心制备的标准品难以满足各国的需要。1935年召开了生物标准品国际会议，要求各国都成立生物标准品的研究中心，选择一批原料与国际标准品对比后作为国家标准品分发使用。

第二次世界大战爆发后，由于青霉素大量使用，临床上很需要正确地指导其用量。1941年 Florey 等制备了一批提纯并干燥的青霉素，任意定其单位值，称牛津单位，分别给各国统一作为标准品使用。后来 USP 制备了一批纯度较高的青霉素钠盐作为标准品，提出效价以质量 (mg) 表示，遭到各国学者的反对，他们认为如用纯度表示将会引起临床使用剂量的混乱。1944年在伦敦召开了会议，决定以一批青霉素钠盐作为国际标准品，另制备一批青霉素钙盐作为工作标准，其效价与国际标准比较后，供各国常规检定使用。同时，规定两株金黄色葡萄球菌作为检验菌株，由美国菌种保藏中心 (ACTT) 保存

分发。

1946 年国际联盟决定设立一个临时委员会，以筹备建立世界卫生组织。临时委员会第二次会议决定设立一个由 8 位著名专家组成的生物检定专家委员会，其任务之一是制定、制备国际标准品规划。1948 年 6 月 24 日世界卫生组织召开第一次世界卫生大会，继承了国际联盟的政策，决定在世界卫生组织（WHO）内设生物制品科（BLG），它的任务是：

- a) 为生物检定专家委员会服务；
- b) 将专家委员会的建议提交世界卫生组织执委会；
- c) 对成员国有生物检定方面的问题咨询；
- d) 参与生产黄热病和脊髓灰质炎疫苗的质量监督。

随后，1947 年 6 月召开了第一次生物检定专家委员会，会议议程共 6 项，它们是：

- a) 建议各国成立检定机构；b) 老标准品的更换；c) 战时临时建立的维生素 E、肝素和青霉素临时标准品的接纳问题；d) 制备第三批洋地黄标准品；e) 白喉、破伤风类毒素、PPD 标准品的协作研究；f) 抗 A 血清、抗 B 血清和抗 Rh 血清的建立。

1950 年以后，随着预防治疗医学的不断发展，生物检定专家委员会任务亦随之而增。在 1950 年～1954 年期间，建立了抗原抗体标准品 14 种，抗生素标准品 50 种，血液制品和内分泌制品亦有所增加。

1951 年在第五次生物检定专家委员会会议上，世界粮农组织（FAO）的寄生虫病专家委员会要求将生物检定专家委员会的任务扩大到兽药领域。1952 年在第六次生物检定专家委员会会议上，强调了世界卫生组织与世界粮农组织在标准品合作上的重要性，在这次会议上，正式将英国剑桥中央兽药研究所研制的牛抗布氏流产血清接纳为国际标准品。1962 年该所正式被世界卫生组织任命为第三个国际标准品实验室。之后，荷兰的红十字输血所又被指定为第 4 个血液制品的国际标准品实验室。

国际标准品的分发，对各国用生物检定控制药品、生物制品质量方面起了很大作用。人力物力缺乏难以建立检定机构的国家希望能更多地得到世界卫生组织的帮助。1953 年在第七次生物检定专家会议上，决定由世界卫生组织向成员国提供标准化的详细资料，培训标准化的技术人员。

关于标准品名称问题，早在 1923 年国际联盟常务委员会就采用国际标准品（IS）的术语。后来，对名称问题提出了许多更改意见。1958 年，决定建立两类标准品：一类是有国际单位表示的，称国际标准品（IS），另一类是没有国际单位表示的称国际参考品（IRP）。随后，各国呼吁要求尽快建立新的标准品。世界卫生组织将一些原料，精确分装，在保证稳定条件下，根据标定的数据，确定其单位数，称 IRP，分发到各国使用。使用若干年后，再根据反映的情况决定能否作为国际标准品（IS）。12 个抗生素 IRP，就是在这种指导思想下建立的，每个才用 1 年～2 年时间，这里的 IRP 实际上是“临时”和“不成熟”的概念。这个概念又与 1958 年提出的没有国际单位表示的 IRP，形成名称上的混乱。一直到 1986 年第 37 次生物检定专家委员会会议上才重新纠正过来，决定对有国际单位表示的称国际标准品（IS），而其他的则称国际参考试剂（IRR），两者总称为国际参考物质（international reference materials）。从此以后，除了 1986 年以前已建立的国际参考品（IRP）外，不再有 IRP 的名称。但对于诊断试剂，则从 1964 年起，至今一直应用国际参