ICS 03.120.20
A 00

RB

中华人民共和国认证认可行业标准

RB/T 004—2019

转基因检测方法验证指南

Guidance on verification of analytical methods for genetically modified organism testing

2019-06-26 发布　　2019-07-01 实施

中国国家认证认可监督管理委员会　发布

目　　次

前言 …… Ⅰ
引言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　术语和定义 …… 1
3　缩略语 …… 2
4　转基因检测方法验证 …… 2
附录A（资料性附录）　DNA提取效果的评价方法 …… 6
附录B（资料性附录）　DNA提取浓度对实际LOD的影响 …… 9
附录C（资料性附录）　中间浓度阳性对照的制备 …… 10
附录D（资料性附录）　基于实时荧光PCR的转基因含量平均值、标准偏差和相对可重复性标准偏差的评估 …… 11
参考文献 …… 15

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国北京海关、沈阳检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：饶红、韩玥、郭铮蕾、徐姗、李伟、付海滨。

引　言

本标准的技术内容参考了欧盟联合研究中心(Joint Research Center,JRC)编写的JRC EUR 24790 EN《经实验室间确认的转基因检测方法的验证》(Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods)。

转基因检测方法验证指南

1 范围

本标准给出了转基因检测基因扩增方法的验证与结果评价的指南。

本标准适用于转基因检测实验室对转基因检测基因扩增标准方法进行验证。

注：本标准不涉及对方法特异性和稳健性验证的内容。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

验证 verification

提供客观证据，证明给定项目满足规定要求。

[ISO/IEC17025:2017，定义 3.8]

注：验证一个实验室能够充分按照标准要求进行操作。需要实验室提供客观证据，证明对于所用的样品基质，能满足检测方法规定的性能指标。通常，(标准)关键要求是真实度(一般用偏差形式表示)和精确度(一般为重复性和再现性)，反映在测量不确定度中。客观证据是从实验室实际数据中得到的真实度和精确度。

2.2

确认 validation

对规定要求满足预期用途的验证。

[ISO/IEC17025:2017，定义 3.9]

2.3

定量检测低限 limit of quantification

LOQ

是指被检测的样品在合适的精确度水平上能被检测出的最低含量或浓度，并且依据 ISO 5725 条款[2]或[3]，经过合作实验的满意证明或单一实验室的确认。

[GB/T 19495.1—2004，定义 3.1.6]

2.4

检测低限 limit of detection

LOD

是指被检测物能够被可靠检出的最低浓度或含量。但是不必进行定量，并且已经经过合作实验的证明或单一实验室的确认。

[GB/T19495.1—2004，定义 3.1.5]

2.5

真实度 trueness

大量实验结果的平均值和认可参考值的一致性。

注：真实度(可信度)的量度标准通常是以斜率来表示的。可信度也就是所提到的“平均值的正确度”。

[GB/T 19495.1—2004，定义 3.1.8]

2.6

精确度 precision

在规定条件下所获得的独立测试结果之间的一致性。

[GB/T 19495.1—2004,定义 3.1.9]

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CRM 有证标准物质(Certified reference material)

C_t 值 达到设定阈值的 PCR 循环次数(number of PCR cycles to pass a set threshold)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

GMO 转基因生物(genetically modified organism)

LOD_{abs} 绝对检测低限(Absolute Limit of detection)

LOD_{rel} 相对检测低限(Relative Limit of detection)

LOQ_{abs} 绝对定量检测低限(Absolute limit of quantification)

LOQ_{rel} 相对定量检测低限(Relative limit of quantification)

PCR 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

R^2 R^2 判定系数(R^2 coefficient of correlation)

RSD 可重复性标准偏差(Repeatability standard deviation)

RSDr 相对可重复性标准偏差(Precision- relative repeatability standard deviation)

4 转基因检测方法验证

4.1 总则

本标准包括定性和定量转基因检测方法的验证指标。其中,定性方法指标包括 DNA 提取和纯化的验证,DNA 浓度的验证,DNA 提取物中抑制剂的验证,RSDr 的验证,LOD 的验证;定量方法指标包括 DNA 提取和纯化的验证,DNA 浓度的验证,DNA 提取物中抑制剂的验证,动态范围、R^2 系数、扩增效率的验证,真实度的验证,RSDr 的验证,LOQ 的验证。

4.2 DNA 提取和纯化的验证

操作时样品每次分 2 份,每份至少 2 次(推荐 3 次)进行 DNA 的提取,不宜在同一天内进行,应由不同的操作者完成。提取的 DNA 应达到一定的浓度和质量标准,DNA 提取效果通过验证抑制剂的存在进行评价,评价方法参见附录 A。适用于一种样品基质的 DNA 提取方法可能不适用于其他基质。以上步骤需要针对不同样品基质进行。对于 DNA 提取方法的验证可采用内源基因,因此测试的样品基质不一定要含有转基因成分。

4.3 DNA 浓度的验证

实验室在验证过程中,提取 DNA 的浓度应和标准方法规定的浓度进行比较。实验室提取的 DNA 浓度在后续检测时应至少达到规定的 LOD/LOQ。实验室提取的 DNA 浓度对 LOD 的影响参见附录 B。

4.4 DNA 提取物中抑制剂的验证

4.4.1 将每个 DNA 提取平行稀释为工作稀释液,对这个工作溶液进行一系列稀释,并进行实时荧光

PCR 分析，每个稀释至少做 2 个 PCR 平行实验，从而得到标准曲线。

4.4.2 检测抑制剂的 PCR 实验优先选择内源基因。工作溶液中总的 DNA 量应至少和方法验证过程中及日常检测中用的 DNA 的量相同。

4.4.3 当实验室测量 C_t 值和工作溶液推测 C_t 值的平均差值 ΔC_t 小于 0.5，并且抑制剂曲线斜率在 −3.6～−3.1 时，即说明 DNA 提取物中无抑制剂影响。抑制剂实验的示例参见附录 A。

4.4.4 如果提取的 DNA 含有抑制剂，要对 DNA 进一步纯化或过滤稀释到观察不到 PCR 抑制剂的水平。

4.5 动态范围、R^2 系数、扩增效率的验证

4.5.1 动态范围、R^2 系数和扩增效率在测量其他参数，如真实度和精确度时，从标准曲线可以自动得出。应采用至少两条标准曲线的平均值(见表 1)。

4.5.2 动态范围应覆盖预期值。可用转基因成分百分比或拷贝数范围表示(例如，目标转基因浓度为 0.9%的动态范围是 0.09%和 4.5%，目标基因拷贝数为 500 拷贝的动态范围是 50 和 2500 拷贝)。

4.5.3 对定性和定量方法，标准曲线斜率的平均值应在−3.6～−3.1，相当于扩增效率在 90%到 110%之间。R^2 系数的平均值应大于或等于 0.98。

4.6 真实度的验证

4.6.1 检测条件(反应体积、PCR 仪等)应和日常检测一致。至少要得到 16 个 PCR 平行的结果。检测的设计实例见表 1、图 1 和图 2。

4.6.2 真实度应该接近规定值，或根据方法的预期使用需要，至少接近 LOQ 的水平。真实度的测量可以用 CRM 的至少 2 个浓度(如 0.1%和 1%)进行，适用时，用动态范围的上限(如 5%)作为第 3 个浓度。或者，用一个更高浓度的标准物质配制成低浓度的标准物质(如 1%)，中间浓度阳性对照的制备方法参见附录 C。基于实时荧光 PCR 的转基因含量平均值、标准偏差和相对可重复性标准偏差的计算方法参见附录 D。

4.6.3 如果没有 CRM 进行真实度的评估，可以用能力验证样品或能力验证的 Z 比分数来评价方法的真实度。

4.6.4 真实度的可接受参考值应在±25%之间，或 Z 比分数在±2 之间。

4.7 RSD_r 的验证

4.7.1 实验室可用 RSD_r 来评估方法的重复性。重复性的评估和真实度的评估方法相似，是在重复条件下通过 PCR 平行实验进行计算。重复性适用于所有转基因水平的测试。检测条件(反应体积、PCR 仪等)应和日常检测一致，至少要得到 16 个独立测量结果。检测的设计实例见表 1、图 1 和图 2。标准偏差和相对可重复性标准偏差的计算方法参见附录 D。

4.7.2 RSD_r 应小于或等于 25%，并覆盖方法的动态范围。

4.8 LOQ 的验证

4.8.1 为了建立准确的 LOQ_{rel}，需要用低浓度的转基因标准样品提取 DNA 配制溶液。当实验室验证 LOQ_{rel} 时，0.1%的阳性对照样品可以用目标转基因的 10 次 PCR 平行实验和内源基因的 10 次 PCR 平行实验进行分析。LOQ_{rel} 的 RSD 应小于 25%。

4.8.2 当实验室验证 LOQ_{abs} 时，1%的已知阳性对照样品的一系列稀释可以用 10 次 PCR 平行计算(如 80、60、40、20、10、5 和 1 个拷贝)。LOQ_{abs} 可以用一系列的稀释液中的最后一个稀释度进行评估，测量的 RSD 要小于 25%。标准曲线应该覆盖 LOQ_{abs} 值。

4.8.3 进行以上两个指标的验证时，概率分布建议 1 个拷贝应有大约 30%的阴性结果。因此，1 个拷贝的稀释液至少一个平行结果应是阴性的。只要标准曲线满足 R^2 和斜率/效率的要求，10 次 PCR 平行

实验的平均值可作为绘制标准曲线的一部分数据。标准曲线其他点的数据只需要在每个点做 2 个 PCR 平行实验。当标准方法有规定时，LOQ 应优于方法规定的要求。

4.9 LOD 的验证

4.9.1 当实验室验证 LOD_{rel} 时，一个低转基因浓度的阳性对照样品可以用 10 次 PCR 平行计算，如果所有平行的结果都是阳性，这表示 LOD_{rel} 小于或等于阳性对照水平。

4.9.2 当实验室验证 LOD_{abs} 时，计算一个方法 95%置信水平的 LOD_{abs}，需要每个浓度进行 60 个 PCR 平行。由于此方法并不实用，可用计算少量平行实验的方法进行 LOD_{abs} 的大致评估，如 10 次平行实验的假阴性率。假阴性率应小于 5%，如进行 10 个 PCR 平行实验，其结果应都是阳性。

4.9.3 假阴性率是指一个已知阳性样品被检测成阴性的可能性。当分析物的量接近方法的 LOD 时，假阴性率会上升。基于对已知方法性能的推测，选取适宜的稀释系列，使其能代表高于和低于预期 LOD_{abs} 的间隔（如 20、10、5 和 1 个拷贝）。10 个平行都是阳性的最低浓度是预估的 LOD_{abs}。概率分布建议 1 个拷贝应有大约 30%的阴性结果。因此，为了验证稀释系列正确的拷贝数，1 个拷贝的稀释液至少一个平行实验结果应是阴性的，见表 1。当标准方法有规定时，LOD 应优于方法规定的要求。

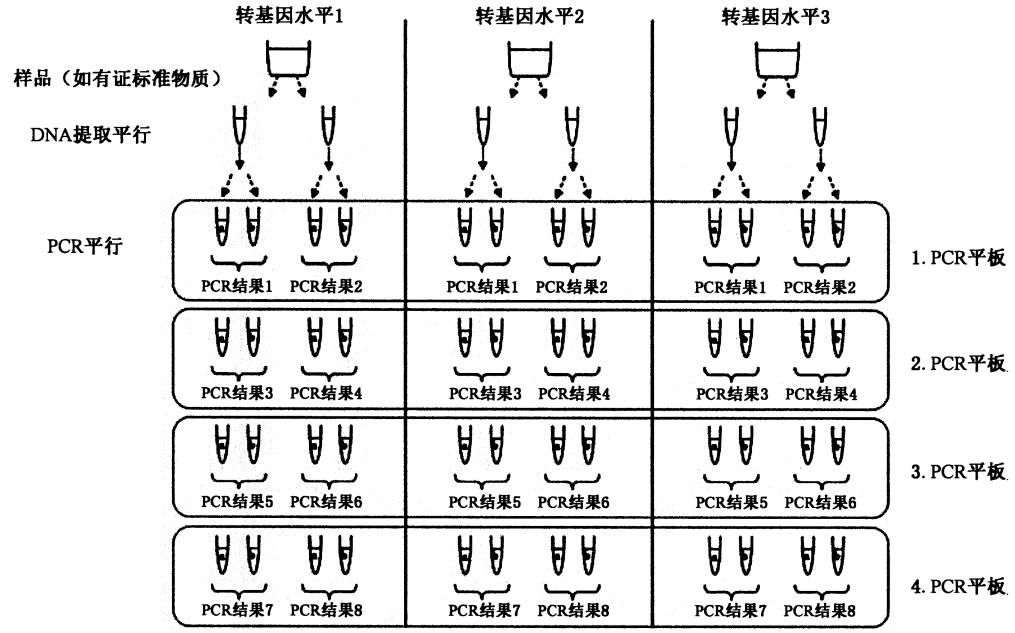
表 1 定量实时荧光 PCR 方法的验证设置实例

验证指标	验证步骤
1. 可选做： 预实验确定 DNA 的合适浓度	在 0.1 ng～300 ng 的范围里至少测试 3 个目标浓度（取决于植物物种） 如 300 ng 玉米 DNA 对应大约 110 000 内源基因拷贝，0.1 ng 对应大约 37 个拷贝
2. 动态范围、R^2 系数和扩增效率	2 个标准曲线，每个曲线用 5 个校准点，做 3 个 PCR 平行实验（×3），所有斜率都应在－3.6～－3.1，所有 R^2 值应≥0.98
	4 个标准曲线，每个曲线用 5 个校准点，做 2 个 PCR 平行实验（×2），用 4 个斜率和 R^2 的平均值进行验证
	2 个校准曲线，每个曲线用 8 个点，做 5 个 PCR 平行实验（×5），覆盖 LOD 和 LOQ 的最低浓度。用所有 LOQ 以上部分的斜率和 R^2 的平均值进行验证
3. 真实度、精确度、RSDr	至少两个转基因水平（一个近似于阈值，一个近似于 LOQ，推荐将动态范围的高浓度区域作为第三个水平） 附录 D 中示例 D.1：每个转基因水平做两个 DNA 提取的平行实验，每个提取在每一个反应板上做 2 个 PCR 平行，4 个板得到 16 个测量结果，每个转基因水平得到 8 个评估（见图 1） 附录 D 中示例 D.2：每个转基因水平做两个 DNA 提取的平行实验，每个提取在每一个反应板上做 4 个 PCR 平行，2 个板得到 16 个测量结果，每个转基因水平的到 4 个评估（见图 2） 为了评估中间过程的精密度，由同一个实验员在至少 2 d 内分别进行 PCR 实验，如果可能，由两名实验员进行试验
4. LOQ、LOD	LOQ：通过一个低浓度条件下的 10 个 PCR 平行实验（如 80、60、40、20、10、5 和 1 个拷贝）计算。LOQ 是当拷贝数测量的 RSD 低于 25%并且标准曲线覆盖了这个点的一系列浓度中的最低浓度。 LOD：通过一个低浓度条件下的 10 个 PCR 平行实验（如 20、10、5 和 1 个拷贝）计算。LOD 是当所有平行实验都是阳性时的一系列浓度中的最低浓度。

注 1：如果基于经验，实验室能够证明两个经验丰富的操作者/实验员的平行实验和一个操作者/实验员的平行实验是结果相同的，就无须两个操作者/实验员进行重复实验。

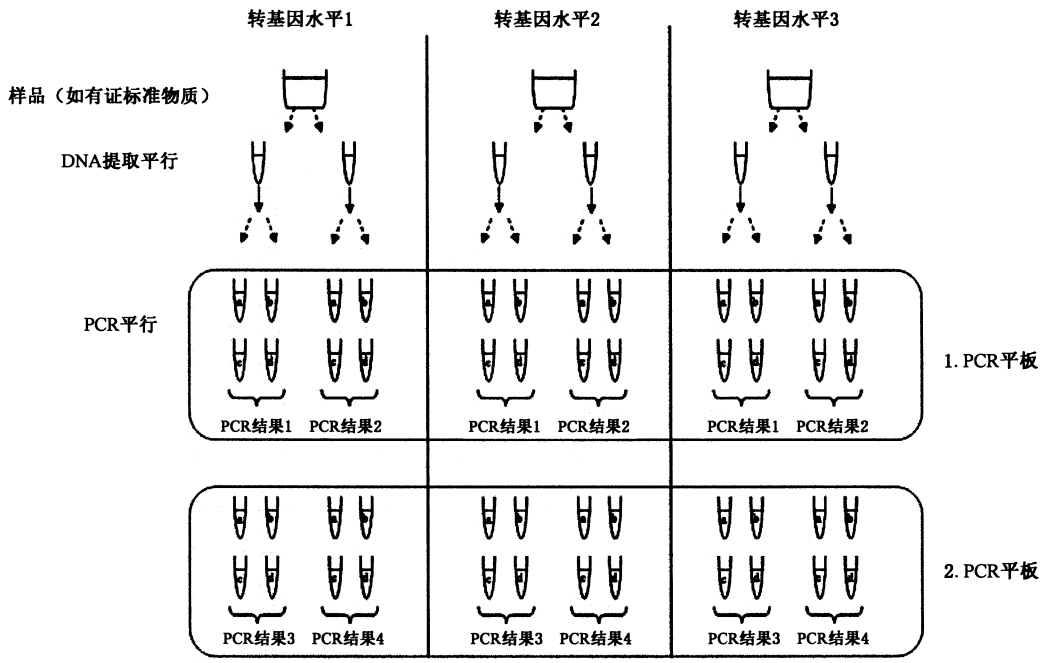
注 2：表 1 中的参数可同时评估。

注 3：针对 1 次实验，标准曲线和样品要在同一个反应板上进行。2 次实验（如内源基因和转基因实验）可以在 2 个不同反应板上进行，每个板使用相同的样品稀释液各做 1 个标准曲线。



注：参见示例 D.1。

图 1　精确度/真实度实验设计



注：参见示例 D.2。

图 2　精确度/真实度实验设计

附 录 A
（资料性附录）
DNA提取效果的评价方法

A.1 概述

抑制PCR反应的物质可以通过与DNA模板反应、干扰DNA聚合酶活性或降低聚合酶辅助因子（Mg^{2+}）的效率而影响目标DNA扩增的效率。DNA提取步骤可以在很大程度上消除或降低PCR抑制物的量。但是，一个样品中抑制剂的最终量很大程度上取决于样品的性质。样品被加工的程度越深，DNA断裂的可能性越大。植物DNA还会受到次生代谢物如多酚、脂类和能够与DNA链聚合的多糖的影响。DNA抑制剂还可能是DNA提取步骤中添加的试剂：如KCl和NaCl、离子洗涤剂、乙醇、异丙醇和苯酚等。

为了在DNA的准备工作中检测是否存在PCR抑制物，可以采取不同的措施。本附录说明了如何使用未稀释的样品提取物的反应效率（斜率和R^2）作为验收标准来评估PCR抑制物是否存在。

抑制的作用基本上取决于抑制物的浓度。当DNA被稀释时，抑制物的效果通常会在DNA低浓度时被降低或消除。对连续稀释样品的反应效率的评价，可以通过不含抑制剂的未稀释样品的理论C_t（临界循环次数）和测量C_t的对比，可以得到评估DNA质量的信息。如果只有最高DNA浓度显示抑制，则低浓度DNA可以用于定量，但是会影响实际的LOD和LOQ值。

但是，在特定情况下连接在DNA片段上的抑制物不会通过样品稀释而被消除，这样就会导致可以扩增的DNA拷贝数少于样品中预期的DNA浓度。

A.2 步骤

可以通过扩增内源基因序列来证明是否含有抑制剂。验证试验中选取样品的DNA提取平行，按照1∶4、1∶16、1∶64和1∶256对其进行4倍梯度稀释，对上述每个梯度都进行2个PCR平行实验。为了评估抑制剂是否存在，4个系列稀释的样品的C_t值从稀释因子的对数中得到，并用线性回归计算得到一个等式。从线性回归推算出的“未稀释”样品的C_t值与同一个样品的测量C_t值进行比较。DNA提取可被接受的三个条件为，回归线的斜率在−3.6～−3.1之间；判定系数（R^2）应大于或等于0.98；测量C_t和推算C_t的差ΔC_t应小于0.5。

每个稀释梯度得到的两个PCR平行的C_t值用于A.3的评价。

A.3 评价

不同抑制剂验证结果判定的示例，见图A.1～图A.4。

注：图中“工作稀释度”是未经稀释的样品DNA提取物。

稀释因子	测得的 C_t 值	C_t 平均值	ΔC_t	期望的 ΔC_t	对数
1∶4	24	24.00	2.00	2	−0.602 1
	24				−0.602 1
1∶16	26	26.00	2.00	2	−1.204 1
	26				−1.204 1
1∶64	28	28.00	2.00	2	−1.806 2
	28				−1.806 2
1∶256	30	30.00	2.00	2	−2.408 2
	30				−2.408 2

	测得的 C_t 值	C_t 平均值	期望的 C_t 值	期望 C-平均 C_t	
工作稀释度	22	22.00	22.00	0.00	满意
	22				

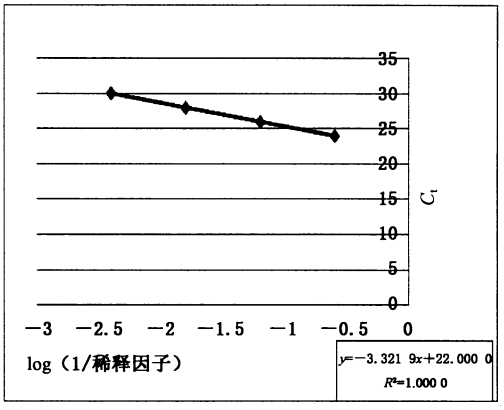
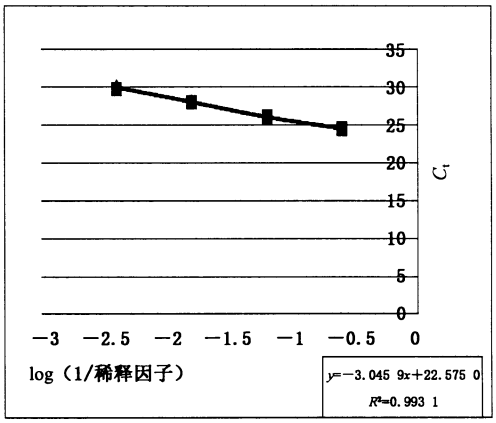


图 A.1 满足要求的 DNA 质量的示例

稀释因子	测得的 C_t 值	C_t 平均值	ΔC_t	期望的 ΔC_t	对数
1∶4	24.5	24.55	1.55	2	−0.602 1
	24.6				−0.602 1
1∶16	26	26.05	1.5	2	−1.204 1
	26.1				−1.204 1
1∶64	28.1	28.08	2.00	2	−1.806 2
	28				−1.806 2
1∶256	30.2	30.00	1.95	2	−2.408 2
	29.8				−2.408 2

	测得的 C_t 值	C_t 平均值	期望的 C_t 值	期望 C-平均 C_t	
工作稀释度	23	23.00	22.58	0.43	不满意
	23				

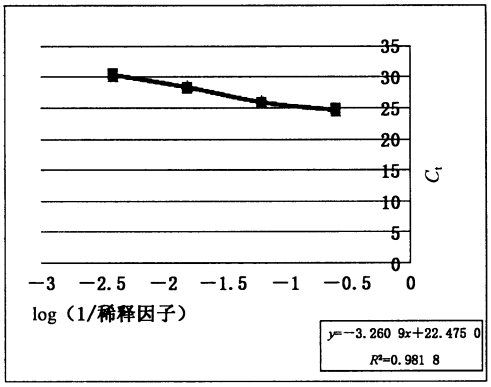


注：尽管 ΔC_t 不超过 0.5 的限制，但由于未稀释的样本和 1∶4 稀释样品发生了延迟反应(Cts)，说明 DNA 质量不佳。后者对斜率的影响表现为斜率比可接受的(−3.0)平坦。

图 A.2 DNA 中存在抑制剂的示例 1

稀释因子	测得的 C_t 值	C_t 平均值	ΔC_t	期望的 ΔC_t	对数
1∶4	24.8	24.70	1.70	2	−0.602 1
	24.6				−0.602 1
1∶16	25.8	25.95	1.25	2	−1.204 1
	26.1				−1.204 1
1∶64	28.2	28.40	2.45	2	−1.806 2
	28.6				−1.806 2
1∶256	30.5	30.40	2.00	2	−2.408 2
	30.3				−2.408 2

	测得的 C_t 值	C_t 平均值	期望的 C_t 值	期望 C-平均 C_t	
工作稀释度	23	23.00	22.48	0.52	不满意
	23				

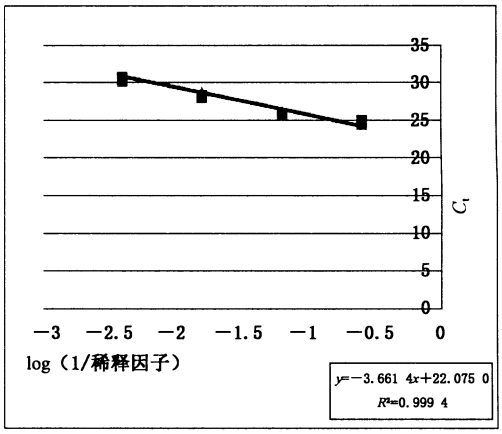


注：这是另一种 DNA 提取物质量低的情况。连续稀释的斜率在可接受范围内，然而，基于四点拟合直线的未稀释样本的推断 C_t(22.48)，应低于测量 C_t(23)。未稀释样本显示出上升的延迟，不如 1∶4 稀释样本上升的明显。因此，当线性回归的斜率落在范围−3.6 到−3.1 时，ΔC_t 证明共同提取出的成分抑制 DNA 扩增。

图 A.3　DNA 中存在抑制剂的示例 2

稀释因子	测得的 C_t 值	C_t 平均值	ΔC_t	期望的 ΔC_t	对数
1∶4	24.2	24.25	2.25	2	−0.602 1
	24.3				−0.602 1
1∶16	26.5	26.50	2.25	2	−1.204 1
	26.5				−1.204 1
1∶64	28.6	28.70	2.20	2	−1.806 2
	28.8				−1.806 2
1∶256	30.8	30.85	2.15	2	−2.408 2
	30.9				−2.408 2

	测得的 C_t 值	C_t 平均值	期望的 C_t 值	期望 C-平均 C_t	
工作稀释度	22	22.00	22.08	0.08	不满意
	22				



注：在这个例子中，回归直线的斜率在接受标准之外(−3.66)。然而，与例子 B 相反，未稀释样本和第一个梯度稀释样本没有出现 C_t 延迟。ΔC_t 显示后续梯度稀释样品的 C_t 值测量间的区别。这些值总是大于反应效率 100%时的期望值 2。基本上，稀释列表现的好像稀释样品中的 DNA 比计算的少。因此，不能推断这些样本受抑制剂影响。然而，如果排除技术错误(移液错误)，也没有其他明确可识别的原因，不应该排除含有抑制剂的可能性。

图 A.4　DNA 中存在抑制剂的示例 3

附 录 B
（资料性附录）
DNA 提取浓度对实际 LOD 的影响

DNA 提取浓度影响实际 LOD 的示例

如表 B.1 所示，在 0.1%转基因样品中，内源基因的拷贝数是目标转基因的 1 000 倍以上。这表示，对于 10 个拷贝的绝对 LOD，需要将 10 000 个内源基因序列的拷贝进行 PCR 实验以得到 0.1%的实际 LOD。如果绝对 LOD 是 10 个拷贝，用 100 000 个拷贝进行 PCR 反应，那么实际 LOD 为 0.01%（见表 B.1）。应该对每个样品进行实际 LOD 的计算。

表 B.1 DNA 含量对实际 LOD 影响的示例

内源基因拷贝数	绝对 LOD(目标转基因拷贝数)	实际 LOD/%
100 000	10	0.01
10 000	10	0.1
1 000	10	1

附 录 C
（资料性附录）
中间浓度阳性对照的制备

C.1 方法

一些标准物质只在一个或几个有限的转基因浓度可选择。可能需要将阳性材料与非转基因材料混合配制成所需的转基因浓度。可以通过测量同一 PCR 反应板上同一标准曲线的阳性转基因和非转基因的参考基因来完成。这两个 DNA 制备物的稀释因子可以使用式(C.1)计算：

$$X=(A/B)\times(Y-1)+1 \qquad \cdots\cdots(C.1)$$

式中：

X ——实际稀释系数；

A ——阳性转基因制备物中参考基因的 DNA 拷贝数；

B ——非转基因制备物中参考基因的 DNA 拷贝数；

Y ——理论稀释因子。

注 1：实际稀释系数是指转基因材料必须被稀释多少以抵消浓度的差异。

注 2：从 10%转基因稀释到 0.1%转基因的理论稀释因子是 100。

C.2 示例

DNA 制备物 A 为 100% GMO，DNA 制备物 B 为非转基因物质。编号为 A 和 B 的 PCR 管分别加入 5 μL DNA，在参考基因校准曲线上量化未知样品。其中，A 管(来自 DNA 制备物 A)DNA 浓度为 10 拷贝/5 μL，B 管(来自 DNA 制备物 B)DNA 浓度为 8 拷贝/5 μL。

从 100%转基因制备 10%转基因相当于 10 倍稀释，即理论稀释因子 Y 为 10。实际稀释系数 X 必须像理论稀释因子 Y 一样用于计算混合的体积。如果 $X=12.25$，那么实际稀释因子 X：$(10/8)\times(10-1)+1=((10/8)\times9)+1=90/8+1=11.25+1=12.25$，所以 1 μL A 需要与 11.25 μL B 混合。

在将这两个 DNA 制备物加到一起后，DNA 溶液必须完全混合。混合物的真实度可以通过用含量为 100%的 GMO 做标准曲线，分别在 3 d 用 3 个样品的 3 次平行分析来验证。

附 录 D
（资料性附录）
基于实时荧光 PCR 的转基因含量平均值、标准偏差和相对可重复性标准偏差的评估

D.1 通过目标和内源基因拷贝数估计转基因含量

基于实时荧光 PCR 估计转基因 DNA 的百分比分别需要检测转基因目标 DNA 序列的拷贝数和检测内源基因 DNA 序列的拷贝数。转基因 DNA 含量百分比的估计按式(D.1)计算：

$$转基因含量=\frac{x}{y}\times 100\% \qquad \cdots\cdots(D.1)$$

式中：

x ——转基因目标 DNA 序列的拷贝数；

y ——内源基因 DNA 序列的拷贝数。

将目标和内源基因一式两份或一式三份来进行实验，得到 2 或 3 个转基因目标 DNA 序列和内源基因 DNA 目标序列的检测结果，然后根据这两组检测结果计算转基因百分比的平均值。平均值用式(D.2) 计算，方差用式(D.3)计算，标准偏差用式(D.4)计算，相对可重复性标准偏差 RSDr 用成分的标准偏差计算，见 D.2。

$$E\left[\frac{X}{Y}\right]\approx\frac{\bar{x}}{\bar{y}}+\frac{\bar{x}}{\bar{y}^3}\mathrm{Var}(y) \qquad \cdots\cdots(D.2)$$

$$\mathrm{Var}\left[\frac{X}{Y}\right]=\left(\frac{\bar{x}}{\bar{y}}\right)^2\left(\frac{\mathrm{Var}(x)}{\bar{x}^2}+\frac{\mathrm{Var}(y)}{\bar{y}^2}\right) \qquad \cdots\cdots(D.3)$$

$$\mathrm{sd}[X/Y]=\sqrt{\mathrm{Var}[X/Y]} \qquad \cdots\cdots(D.4)$$

式中：

E ——平均值；

Var ——方差；

sd ——标准偏差；

X ——转基因目标 DNA 序列的拷贝数；

Y ——内源基因 DNA 序列的拷贝数；

$\bar{x}$ ——目标转基因 DNA 拷贝数的算术平均值；

$\bar{y}$ ——内源 DNA 拷贝数的算术平均值。

D.2 评估示例

以下示例用 x 表示转基因目标基因的拷贝数，用 y 表示内源基因拷贝数。示例对应表 1 中给出的实验设计实例。示例演示了计算方法。

示例 D.1：两个 DNA 提取，每个提取的转基因目标和内源基因都在四个 PCR 反应板上通过两个 PCR 平行进行测试。

本示例中一个反应板中得到两个转基因平均值和标准偏差的结果，4 块反应板总共有 8 个转基因平均值(GM_1～GM_8)和 8 个标准差(sd_1～sd_8)。这 8 个转基因平均值和标准差都是使用目标基因拷贝数和内源基因拷贝数两个测试结果代入公式 D.2、D.3、D.4 中求得。

表 D.1　图 1 实验设计中提取 1 得到的转基因目标基因和内源基因 C_t 值及拷贝数

转基因目标基因		内源基因	
C_t	拷贝数	C_t	拷贝数
24.41	161 19	21.30	156 758
24.61	139 54	21.18	171 196
注：提取 1 指本标准图 1 中的实验设计。			

根据表 D.1 计算得出，$\bar{x}$=15 036.97，$\bar{y}$=163 977，Var(x)=2 343 612.5，Var(y)=104 227 922。将结果代入式(D.2)得出平均值 GM_1 为 0.092 或 9.2%；代入公式 D.3、D.4 得到标准差 sd_1 为 0.010 943。

表 D.2　图 1 实验设计中提取 2 得到的转基因目标基因和内源基因 C_t 值及拷贝数

转基因目标基因		内源基因	
C_t	拷贝数	C_t	拷贝数
25.50	13 405	21.10	172 089
25.44	14 000	21.19	160 907
注：提取 2 指本标准图 1 中的实验设计。			

根据表 D.2 计算得出，$\bar{x}$=13 702.5，$\bar{y}$=166 498，Var(x)=177 012.5，Var(y)=62 518 562。将结果代入式(D.2)得出平均值 GM_2 为 0.082 或 8.2%；代入式(D.3)、式(D.4)得到标准差 sd_2 为 0.004 654。

使用四个不同的 PCR 反应板得到的数据按照上面的过程进行计算，除了 GM_1、GM_2、sd_1 和 sd_2，还得到平均值 GM_3、GM_4…GM_8 和标准差 sd_3，sd_4…sd_8。

样本转基因的总体平均值$\overline{GM}$可以通过 GM_1～GM_8 的算术平均值计算，见式(D.5)：

$$\overline{GM}=\sum_{i=1}^{8}GM_i/8 \qquad \cdots\cdots(D.5)$$

式中：

$\overline{GM}$——样本转基因的总体平均值；

GM_i——第 i 个转基因平均值。

使用 n 表示每个提取的平行数(在这个例子中 n=2)，用 k 表示每个反应管分别的标准差的数量(这里 k=8)，整体平均的标准差计算，见式(D.6)：

$$sd_{GM}=\sqrt{\sum_{i=1}^{8}(n_i-1)sd_i^2/(\sum_{i=1}^{8}n_i-k)} \qquad \cdots\cdots(D.6)$$

式中：

sd_{GM}——整体平均的标准差。

在示例 D.1 中分母是 16－8=8。相对可重复性标准差的计算，见式(D.7)：

$$RSD_r=\frac{sd_{GM}}{\overline{GM}}\times 100 \qquad \cdots\cdots(D.7)$$

示例 D.2：两个 DNA 提取，每个提取的转基因目标和内源基因都在两个 PCR 反应板上通过四个 PCR 平行进行测试。

本示例中一个反应板中得到两个转基因平均值和标准偏差的结果，2 块反应板总共有 4 个转基因平均值 GM_1～GM_4 和 4 个标准差(sd_1～sd_4)。这 4 个转基因平均值和标准差都是使用目标基因拷贝数和内源基因拷贝数 4 个测试结果带入式(D.2)、式(D.3)、式(D.4)中求得。

表 D.3　图 2 实验设计中提取 1 得到的转基因目标基因和内源基因 C_t 值及拷贝数

转基因目标基因		内源基因	
C_t	拷贝数	C_t	拷贝数
24.41	16 119	21.30	156 758
24.61	13 954	21.18	171 196
25.50	13 405	21.10	172 089
25.44	14 000	21.19	160 907
注：提取 1 指本标准图 2 中的实验设计。			

根据表 D.3 计算得出，$\overline{x}$=14 369.5，$\overline{y}$=165 237.5，Var(x)=1 433 394，Var(y)=57 700 642。将结果代入公式 D.2 得出平均值 GM_1 为 0.087 或 8.7%；代入式(D.3)、式(D.4)得到标准差 sd_1 为 0.008 28。

表 D.4　图 2 实验设计中提取 2 得到的转基因目标基因和内源基因 C_t 值及拷贝数

转基因目标基因		内源基因	
C_t	拷贝数	C_t	拷贝数
26.21	14 826.97	21.09	165 248
26.30	13 885.92	21.09	165 248
26.38	13 099.69	21.20	152 168
26.20	14 935.39	21.25	146 569
注：提取 2 指本标准图 2 中的实验设计。			

根据表 D.4 计算得出，$\overline{x}$=14 187，$\overline{y}$=157 308，Var(x)=747 515，Var(y)=89 272 181。将结果代入公式 D.2 得出平均值 GM_2 为 0.091 或 9.1%；代入式(D.3)、式(D.4)得到标准差 sd_2 为 0.007 7。

使用两个不同的 PCR 反应板得到的数据按照上面的过程进行计算，除了 GM_1、GM_2、sd_1 和 sd_2，还得到平均值 GM_3、GM_4 和标准差 sd_3、sd_4。

样本转基因的总体平均值$\overline{GM}$可以通过 GM_1～GM_8 的算术平均值计算，见公式 D.8：

$$\overline{GM}=\sum_{i=1}^{8} GM_i/4 \qquad \cdots\cdots(D.8)$$

式中：

$\overline{GM}$——样本转基因的总体平均值；

GM_i——第 i 个转基因平均值。

整体平均的标准差计算，见式(D.9)：

$$sd_{GM}=\sqrt{\sum_{i=1}^{4}(n_i-1)sd_i^2/(\sum_{i=1}^{4}n_i-k)} \qquad \cdots\cdots(D.9)$$

式中：

n ——每个提取的平行数；

k ——每个反应管分别的标准差数量；

在这个示例中分母是16－4＝12。

相对可重复性标准差的计算，见式(D.10)：

$$RSD_r=\frac{sd_{GM}}{GM}\times 100 \qquad \cdots\cdots(D.10)$$

参 考 文 献

[1] JRC EUR 24790 EN, Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validatedmethods, 2011.

[2] Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical methods of GMO Testing, European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2008. http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm

[3] Holst-Jensen A. and Berdal K.G. The Modular Analytical Procedure and Validation Approach and the Units of Measurement for Genetically Modified Materials in Foods and Feeds. Journal of AOAC International, 87 (4): 927-936, 2004.

[4] ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results

RB/T 004—2019

中华人民共和国认证认可
行 业 标 准
转基因检测方法验证指南
RB/T 004—2019
*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
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 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字
2020年1月第一版 2020年1月第一次印刷
*
书号:155066·2-34789 定价 21.00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

RB/T 004-2019

打印日期:2020年3月9日