

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4561—2016

转基因检测非标方法确认评价指南

Guideline for validation of genetically-modified organism test methods

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

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出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：饶红、张锡全、郭铮蕾、傅溥博、李宏、梁新苗、马丹、徐姗、韩玥、林远辉。

引 言

在本标准中技术性内容与欧盟委员会联合研究中心组织编写的指南性文件《Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories》中的内容完全一致。该指南性文件中规定了转基因检测方法涉及的性能指标的判定标准,这一文件是欧盟对转基因非标检测方法确认过程是否有效的评价依据。在欧盟范围内所有转基因非标检测方法的确认均使用这一文件进行评价。本标准采纳了该指南的技术性内容。在转基因检测领域,国内尚无指导性的行业或国家标准规范来统一转基因检测方法确认工作的尺度,保证不同实验室在统一的技术规范指导之下进行方法确认工作,因此编制本标准。

转基因检测非标方法确认评价指南

1 范围

本标准规定了转基因生物检验方法确认中的术语和定义、技术方案、数据统计分析、方法的性能指标及结果报告等评价内容。

本标准适用于拟制定或修订的各类方法中涉及转基因生物定性、定量检验方法的确认活动有效性的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(ISO 5725-2:1994 IDT)

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求(ISO/IEC 17025:2005 IDT)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

待确认方法 alternative method

拟制定或修订的用于检验给定目标转基因生物的分析方法。

3.2

基准方法 reference method

国际、国家或行业或组织认可并被广泛接受的方法。优先考虑国际标准化组织(ISO)、中国国家标准(GB)、国际分析家协会(AOAC)推荐的方法,其他国际认可的方法也可以作为基准方法。

3.3

方法确认 validation of method

使用批准生效的确认方案中所规定的统计学方法,比较分析使用待确认方法(3.1)和基准方法(3.2)获得的检测结果,证实待确认方法有足够的可信度。

3.4

实验室内确认 validated in the laboratory

在组织实验室或方法确认负责人的指导下,在方法制定或使用的实验室内对待确认方法和基准方法进行比较。

3.5

合作实验室间的研究 inter-laboratory collaborative study

几个实验室在有证明文件的情况下对一个或多个稳定的、均一的原料进行量化检测实验,并把结果汇编成单一的文件。合作实验的指导方针在 ISO 5725 和 ISO/AOAC/IUPAC 协议草案中有详细的描述。

SN/T 4561—2016

3.6

方法确认负责人或组织实验室的负责人 study director or organizing laboratory responsibilities

负责组织实验室内方法比较,提出基准方法,依照方法确认标准来确定提供试验数据;并制定和组织实施实验室间协同试验方案等确认工作的人员。

3.7

协作者 collaborators

在方法确认负责人或组织实验室的指导下进行实验分析,并按照要求对待确认方法进行各项确认试验并报告所有结果的人员。协作者可以是管理机构、工厂或研究院等不同实验室的有分子生物学试验经验的人员。

3.8

协作实验室 collaborate laboratory

协作者所属的实验室。协作实验室应通过 GB/T 27025(ISO/IEC 17025:2005 IDT)认可,实验室间协同试验所需的基准方法在实验室认可范围内。

3.9

适用性 applicability

用于鉴定基质、分析物或种类的方法的应用范围,根据其性能特征来判断它的浓度范围和研究/监控类型是合适的。也就是通常所说的方法的局限性。

3.10

实用性 practicability

操作的简便性,根据完成特定必要的性能标准从而符合指定的目的所需的样品量和费用。

3.11

DNA 浓度 DNA concentration

每个单位体积溶液中分析物的数量。

3.12

DNA 断裂度 DNA degree of rupture

基因组 DNA(高分子量)断裂成 DNA 碎片的断裂度。

3.13

DNA 提取纯度 DNA extraction purity

降低可以观察到的或可测量到的 PCR 抑制物的作用。

3.14

特异性 specificity

方法只能检测特定的分析物。

3.15

动态范围 dynamic range

由合作实验证明了分析过程内的浓度间隔具有适当水平的精确度和正确度。

3.16

真实度 truness

大量实验结果的平均值和认可参考值的一致性。真实度的量度标准通常是以斜率表示的。

3.17

扩增效率 amplification efficiency

DNA 扩增呈指数上升的效率。PCR 原理中,反应一个循环,PCR 产物扩增一倍,反应 N 个循环,理论上应为原来的 2^N 。此时,理论的扩增效率是 100%。实际上由于酶、dNTPs、引物、模板等因素,扩增效率达不到 100%,100%的扩增效率换算得到的标准曲线斜率是 -3.32。扩增效率可以用式(1)

计算。

$$\text{Efficiency} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} - 1 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Efficiency ——效率；

slope ——斜率。

3.18

R2 系数 R2 coefficient

通过线性回归分析获得的标准曲线的相关系数。

3.19

精密度——相对可重复性标准偏差 relative repeatability standard deviation; RSDr

在重复性(重现性)条件下获得的测试结果的标准偏差。可重复性条件是相同操作人员在短时间的间隔时间内在同一实验室,应用相同的仪器设备、相同的方法,完成相同的测试项目所获得的独立测试结果条件。

3.20

定量检测低限 limit of quantitation; LOQ

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 GB/T 6379.2,经过合作实验的满意证明或单一实验室的确认。

3.21

检测低限 limit of detection; LOD

被检测物能被可靠检出的最低浓度或含量。

注:不必进行定量,并且已经经过合作实验室的证明或单一实验室的确认。

3.22

稳健性 robustness

方法的稳健性是测量检测方法在实验操作中受小的但是不可避免的实验条件影响而保持稳定的能力。

注:要在方法基础上证明稳健性检测的充分性。比如,对于实时荧光 PCR 方法,需要考虑以下因素和其来源:不同的热循环模式、DNA 聚合酶、尿嘧啶-糖基化酶、氯化镁浓度、正向引物和反向引物的浓度、探针浓度、温度、时间、dNTP,包括 dUTP 的浓度。

4 方法确认基本原则

4.1 方法的确认程序

4.1.1 方法确认负责人应首先根据要求制定方法确认的技术方案,并经相关管理部门或专家的评估。

4.1.2 方法确认实验室按照技术方案先进行实验室内确认研究试验,然后,由协作实验室用相同的样品进行实验室间协同试验。可采用对待确认方法与基准方法进行比较研究的方式,对方法的性能指标进行确认。

4.1.3 由检测方法或标准的管理部门对确认方案和数据资料进行审查、评价和审批。

4.2 性能指标

4.2.1 适用性指标

适用性的描述中一定要包含方法使用范围的信息,还应包含哪些物质是测试干扰物,或该方法不适用于哪些样品基质或情况。以上这些描述都应提供数据支持。

4.2.2 实用性指标

与其他具有相同目的方法相比较,该方法更容易实施。如果这种方法具有以下特征,我们往往会认为是缺乏实用性的:该方法需要一种新型的设备(这种设备通常很难获得)或价格较昂贵的设备;与其他可实现同样目的的测试方法相比,该方法在使用时需付出更多时间、更大劳动负荷、更高价格的试剂或更高的检测成本。

4.2.3 DNA 提取和纯化的指标

4.2.3.1 DNA 提取的目的是为随后的分析提供高质量的 DNA。DNA 质量取决于所提取的样品中 DNA 平均长度、结构完整性和化学纯度。

4.2.3.2 高度断裂的 DNA 和与 DNA 制备中共同提取的杂质都会影响后续的对特定 DNA 片段的检测和定量。食品和饲料由各种不同的成分构成,会产生基体效应,使用不同的 DNA 提取方法这种效应会降低下游分析方法的灵敏度,使用不同的 DNA 提取方法产生基体效应的影响大小也不同。基于这一原因,对 DNA 提取和纯化的关键步骤在随方法提交的技术性文件中一定要进行详细的描述,并且建立客观评价标准来评价所提取的、用于后续 PCR(定性和或定量检测)检测的 DNA 质量。

4.2.3.3 DNA 的提取步骤会影响方法的回收率、碎片大小、DNA 浓度和 DNA 提取物的 PCR 质量等。推荐利用足够数量的试验,每天至少 6 次试验,至少分 3 d 对 DNA 提取方法进行测试。

4.2.3.4 DNA 浓度验证标准:使用的 DNA 提取方法要保证得到进一步分析所需要的足够数量的核酸。以分析物的重量除以溶液的体积计算的 DNA 浓度要高于检测方法中描述的工作浓度。在 RT-PCR 方案中,加到 master-mix 中的 DNA 溶液浓度应为 40 ng/ μ L,那么提取后获得的 DNA 的浓度要高于 40 ng/ μ L。

4.2.3.5 DNA 断裂度验证标准:做定量(实时荧光)分析时,提取的 DNA 样本的片段应该至少大于要检测的特定扩增产物和特定内源对照的扩增产物的大小。在做定性分析时,使用 DNA 沉淀悬液进行定性分析的情况下,有一定比例的分子量低于扩增产物的 DNA 分子存在是可接受的。

4.2.3.6 DNA 提取纯度验证标准:抑制实验中第一次稀释的样本的测量 Ct 值和推测 Ct 值的平均差异(Δ Ct)应该 <0.5 。[(测量 Ct 值-推测 Ct 值) <0.5],抑制曲线的斜率应该在-3.6 和-3.1 之间。优先选择的 PCR 抑制实验是内部控制实验(内源对照基因)。在第一次稀释样本中的 DNA 总量不能小于提交方法的 DNA 总量(内源对照基因的 PCR 试验中的 DNA 含量)。

4.2.4 特异性验证标准

4.2.4.1 方法不应该产生除目标扩增片段以外的其他的目标序列。应通过对数据库(EMBL, GenBank, Patent 等)的相似查找,对非目标转基因和非转基因材料进行检测,从而对方法的特异性进行证实。为了检测到特异的转基因成分,检测的目标序列也应该是特异性的。

4.2.4.2 对于特异性的内源目标序列,要通过具有全球有代表性和多个物种的不同样品证明不存在等位基因和拷贝数的变异。方法编制者如果能够知道该目标序列在其他品系中等位基因和/或拷贝数的变异也要说明。目标基因的特异性要针对公开可用的基因序列数据库,通过生物信息学理论研究证实,而且要进行实验验证。目标序列特异性试验应证明在扩增的产物中不会出现非目标序列的反应产物,该实验应使用与目标分类群及最重要的食用作物最接近的有代表性样本的纯基因组 DNA。

4.2.5 动态范围验证标准

方法的动态范围应包括 1/10 浓度和至少 5 倍目标浓度。目标浓度要作为和阈值相关的限定要求。实时荧光 PCR 的标准曲线应允许在整个动态范围内检测到盲样,包括更低(10%)和更高(500%)的浓度点。对 0.9%的转基因生物范围是 0.09%和 4.5%浓度,或者目标是 500 个拷贝数,那么范围是 50 和

25 000。

4.2.6 准确度验证标准

在整个动态范围里,准确性应在参考值的 $\pm 25\%$ 范围内。

4.2.7 扩增效率验证标准

标准曲线斜率的平均值范围($-3.1 \geq \text{斜率} \geq -3.6$)。

4.2.8 R^2 系数验证标准

R^2 的平均值 ≥ 0.98 。

4.2.9 精密度——相对可重复性标准偏差(RSD_r)验证标准

相对可重复性标准偏差应该在整个方法的动态范围里 $\leq 25\%$ 。

4.2.10 定量检测限(LOQ)验证标准

LOQ 应该小于目标物浓度的 $1/10$,精确性 $\leq 25\%$ 。目标浓度要作为和阈值相关的限定要求。对于 0.9% 的标准值,LOQ 应 $\leq 0.09\%$ 。

4.2.11 检出限(LOD)验证标准

LOQ 应低于 $1/20$ 的目标浓度。实验方法应在 LOQ 检测到 95% 的分析物,确保假阴性结果 $\leq 5\%$ 。目标浓度要作为和阈值相关的限定要求。对于 0.9% 的标准值,LOD 应 $< 0.045\%$ 。

4.2.12 稳健性验证标准

实验对这些变化的偏离不能超过 $\pm 30\%$ 。或者,也可以通过 Plackett Burman⁷ 或 Youden⁸ 提到的最优化多因子试验设计的方式进行正式的稳健性实验。

5 方法确认试验

5.1 实验室内确认试验

5.1.1 一般规则

实验室内确认目的是通过使用各种不同种类和类型的生物制品来证实待确认方法的适用性。转基因方法的使用范围一般包括目标基因和所涵盖的食品种类。

5.1.2 实验室要求

实验室内确认一般在编制方法的实验室内进行。

5.1.3 采用的基准方法

基准方法优先采用国际标准化组织(ISO)、中国国家标准(GB)、国际分析家协会(AOAC)推荐的方法,其他国际认可的方法也可以作为基准方法[例如:美国食品药品监督管理局(FDA)的 FDA/BAM 等]。

5.1.4 食品种类和类型

5.1.4.1 转基因方法推荐的生物种类和生物类型取决于目标基因所存在的生物制品。如果方法适用范

SN/T 4561—2016

围为所有或绝大部分食品,那么应选择至少 5 个食品种类,每个种类中选 3 个类型的食品进行分析。如果方法仅限于特定的食品范围,那么挑选的食品种类数目可以缩减到 1、2、3 或 4 类食品。

5.1.4.2 为减少当地特殊生物造成的偏差,应当在尽可能广的范围内选择生物种类。

5.1.4.3 对于每一类生物制品,如果不可能获得足够数目的阳性产品,允许使用人工添加的生物样品。

5.1.5 测试样品数量

每一接种水平的测试样品数量是 20 份。即每一种类生物应测试 60 个样品(3 个类型×20 个样品)。

5.1.6 自然阳性样品

每个自然阳性的生物类型至少需要 2 批。应努力获得自然阳性样品,这些产品最大程度的代表了方法使用的真实环境。对于这些自然阳性样品,没有阴性对照。要分析 20 份由每批自然阳性制品而成的样品,如果所有的 20 份都是阳性,可将样品稀释以获得部分阳性,并重复分析该批样品。

5.2 实验室间协同试验

5.2.1 一般规则

实验室间协同试验是申请为标准的转基因方法必须进行的试验,在完成实验室内确认试验后进行。实验室间协同试验的目的在于确定不同实验室使用相同的样品进行检测所得到结果的差异,从而对方法的性能指标作出实际的估计,特别是当该方法在实际应用过程中出现预期的系统及随机误差时。

5.2.2 实验室的数量

每个食品类型至少需要 8 个协作实验室的数据,涉及贵重仪器或对实验室有特殊要求时,最少应在 5 个实验室进行。

5.2.3 采用的基准方法与食品种类

实验室间协同试验所采用的基准方法与食品种类的要求与实验室内确认试验要求一致,应符合 5.1.4 的要求。

5.2.4 测试样品要求

由组织实验室制备统一的测试样品,并尽可能结合使用人工和自然阳性样品。如没有自然阳性样品,可以使用人工污染的样品。

5.2.5 实验室间协同试验的标准

5.2.5.1 精密度验证

相对可重复性标准偏差 RSD_R 在整个动态范围里应 $<35\%$ 。但是,浓度 $<0.2\%$ 时, $RSD_R<50\%$ 也可接受。

5.2.5.2 准确度验证

在整个动态范围里,准确性应在参考值的 $\pm 25\%$ 范围内。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
转基因检测非标方法确认评价指南
SN/T 4561—2016

*

中国标准出版社出版
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)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32352 定价 16.00 元



SN/T 4561-2016