

C O D E X A L I M E N T A R I U S

国际食品标准



联合国粮食
及农业组织



世界卫生组织

E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.org

国际食品法典

检测、鉴定和量化食品中特定基因序列和蛋白质*

的执行标准和方法确认准则

CAC/GL 74-2010

* 应用于来自现代生物技术、食品认证、食品生产和其他目的的食品。

1 引言

分子和免疫学分析方法是目前公认的测定食品中基因和蛋白质分析物的检测工具。然而,为了不同实验室通过这种方法获得的结果能被广泛接受和认可,这就需要分析方法满足特定的质量准则。

本指南提供适当的标准来验证用来测定食品中特定基因序列或特定蛋白质分析方法的可靠性。

本指南的第一部分给出了关于验证特定基因序列或特定蛋白质分析方法的一般原则。附件提供的内容包括定量聚合酶链式反应 (PCR) 方法的验证, 定性 PCR 方法的验证和基于蛋白质方法的验证。

1.1 目的和目标

本准则的目标是为分子和免疫学检测方法的建立提供支持, 食品中特定基因序列和特定蛋白质定量的验证, 确保不同实验室的结果具有类似的再现性。

本指南的目的是为通过定义适当的检验标准如何建立方法来检测和验证食品中特定基因序列和蛋白质提供指导, 一个方法是否遵守这些标准是以该方法的性能特点为基础的。

本指南详细说明相关标准, 并解释如何理解这些标准, 即:

- 通过提供标准的基本原理
- 通过展示怎样找出一个方法是否满足给定的标准要求。

1.2 适用范围

本指南提供的食品分析方法的验证标准信息涉及可能出现在食品中的特定基因序列和特定蛋白质的检测、鉴定和定量, 其中包括这些食品所含的来自现代生物技术的原料。这些分子和免疫学方法应用范围很广, 例如用于测定食品中的生物标志物, 其中包括这些来源于现代生物技术和食品认证技术, 以及用于实验室进行食品分析。

2 方法验证

食品法典委员会 (CAC) 强调任何一个被接受的分析方法必须进行国际合作试验, 同时遵守根据 ISO 5725:1994 或 AOAC/IUPAC 的国际协定。因此, 这就可能需要在没有合作试验数据时采取单一实验室确证的临时措施。然而, 用于基因序列和蛋白质的分析方法必须能够适用于多个实验室。

2.1 标准方法

本准则适用于标准方法。

2.2 通用方法标准

分析方法选择的一般原则被应用到法典程序手册。这些原则都适用于本指南。附加条件见附件。

2.3 验证程序

方法验证是确立分析方法的性能特征和局限性的过程。验证结果描述了被分析物可以在何种基质中可以检测。在相应的检测条件下, 验证结果可以呈现分析方法的精密度和准确度。

方法验证是一个漫长的过程, 它包括以下主要步骤:

- **方法预验证。**预验证应根据需要逐个进行。预验证应确保效度研究的可行性, 也就是说, 它应该提供有关方法的预期目的的适用性的证据。预验证需通过 2-4 个实验室同时进行。应根据验证过程进行统计分析 (例如, “重复性”和“重现性”)。
- **方法确认。**通过合作试验验证的方法费用较高, 通常在单一实验室通过方法可行性的预验证试验后开展。

3 确定基因序列和蛋白质的检测、鉴定、定量方法的特定条件

3.1 方法开发到正式确认

常见的 DNA 分析方法是基于 PCR 检测特定的基因序列。对于蛋白质检测的常见方法为利用酶联免疫 (ELISA) 和侧向流动装置。对于基因序列的分析, PCR 是目前使用最广泛的方法。当然, 其他可以得到相同结果的检测方法在通过方法验证后用于 DNA 序列的检测也是被认可的。

3.1.1 方法验收标准（审定要求的条件）

评估相关检测方法前，有必要对该方法和方法测试的信息进行确认，详细说明见附件一。

评价方法的前提条件是核实或者查证使用法典现有的方法能够实现相关的检测。本节描述该方法验收标准必须是在完成了预验证试验和完整的合作试验的前提之下进行的。

3.1.2 方法的适用性

方法是否适用取决于该方法是否可用于对特定食品的相关特性进行检测并作出准确的描述。特别是对基因序列和蛋白质的分析，由于 DNA 和蛋白质是可能发生改变，应用于单一基质的一些方法可能并不一定适用于复杂基质和（或）加工食品中。

原则上，该方法应适用于特定基质。用“通用”的方法来鉴定和量化一定范围食品基质中的基因序列和蛋白质，至少需要有一个萃取方法适用于一般的食品基质，则该方法是可适用的。

3.1.3 原则条件

基因序列的检测方法需能够检测、鉴定甚至是定量特定的 DNA 序列。蛋白质的检测方法需能够检测、鉴定和定量食品中的特定蛋白质。

目前，基于 DNA 的检测方法通常采用 PCR 方法，其包括以下内容：

- 制定适用于相关基质的 DNA 提取方法方案；
- 制定的方案包括 PCR 检测目标 DNA 序列所需的设备等条件；
- 用于 DNA 扩增所需引物序列的描述；
- 可特定识别目标 DNA 序列的荧光寡核苷酸探针序列的描述；
- 寡核苷酸引物序列的描述,它放大 taxon-specific DNA 序列,应该出现在传统食品矩阵无特定分析物的存在,为了区分一个负面结果提取/放大过程失败,并量化目标 DNA 的数量相对于 taxon-specific DNA;
- 如果适用，设计可特定识别 taxon-specific DNA 序列的荧光寡核苷酸探针序列；
- 检测 DNA 方法的描述；
- 适当的控制样品和标准；
- 描述用于推断结果的计算。

基于蛋白质的方法通常包括一个定量或定性的方法。这些通常是免疫吸附分析系统，包括：

- 协议描述适用于特定基质中蛋白质提取方法；
- 协议描述制定的方案包括免疫吸附剂分析测定目标蛋白质使用的设备等条件；
- 镀膜抗体；
- 酶标记的第二抗体；
- 用于显色的酶底物；
- 洗涤液和样品提取缓冲液；
- 描述检测蛋白质的方法；
- 合适的质控样品和标准样品；
- 用于推断结果的计算说明。

方法应满足以下要求：

- 检测蛋白质的方法需明确对一个特定的抗原或抗原表位的检测、鉴定和（或）定量；
- 基于 DNA 的筛选方法可用于检测存在于多个生物体中的目标 DNA。例如，筛选方法用于检测多个转换事件，应允许检测目标 DNA 序列，这些序列对于一些转换事件是常见的；
- 基于 DNA 的特定方法可用于准确的检测、鉴定和（或）量化一个特定生物体，该生物体可能混合了类似的有机体时，应该考虑到检测、鉴定和（或）量化一个对于有机体是唯一的或特定的 DNA 序列是准确的。

例如,特定靶标方法用于检测单个转换事件时应考虑到检测、鉴定和(或)量化对于该转换事件是一个唯一的或特定的 DNA 序列是准确的。对于食品认证,特定的目标序列应该按照要求单独定义其分类;

- 基于 DNA 的特定类群的方法,用于检测或相对定量目标 DNA 应该考虑到检测、鉴定和定量一个对于该类群是唯一的或特定的 DNA 序列是准确的;
- 靶标和特定类群的方法,适用于扩增片段的相对定量和识别,如探针杂交或任何适当的等效方法。

3.1.4 计量单位和结果报告

在每种方法使用前合适的计量单位(如目标拷贝数或摩尔当量)、性能和数据报告的标准需要作出规定。定性分析提供的结果为检出或者未检出,因此没有计量单位。

测量结果可以明确的用质量或相对质量表示,但是目前没有方法(基于 DNA 序列或蛋白质)可以对他们进行直接测量。

3.1.5 测量不确定度

法典不确定度指南(CAC/GL 54-2004)中提到,各实验室需估算其定量测定的不确定度。在评估一个分析测量时,样品制备和分析方法被认为是两种主要的误差来源。需要分析人员采用已验证的方法根据这些指南提供的丰富信息允许他们估算结果的不确定度。

有关详细信息,参考法典测量不确定度指南(CAC/GL 54-2004),法典程序手册中该部分标题为“分析结果的使用:抽样方案,分析结果、测量不确定度、回收率和法典标准的条款之间的关系”。

3.1.6 模块化的方法验证方法

“方法”指的是在特定基质中的所有实验程序需要估计被测变量。对于一个基质,可能包括 DNA 或蛋白质的提取方法和通过 PCR 或免疫吸附分析系统进行的最终量化,或是确定目标物是否存在的定性方法。在这种情况下,从萃取到分析步骤的整个链构成了一个方法。然而,它可能会使用相同的样品制备(如研磨)方法结合相同的 DNA 或蛋白质分离过程,不同的后续分析,实现经济效率,只要验证方法流程保持不变。

它不适用于其他的替代方法,如不同的 DNA 或蛋白质提取方法,进行验证试验没有进行额外的研究表明该方法替代不影响方法的性能。

3.2 协作试验要求

3.2.1 基本信息

协同试验的目的是验证预验证试验或者单一实验室试验提供的数据,依据重复性和再现性判断方法精密度。

验证性研究报告中出现的数值都必须能够解释和进行对比分析。真值和相应的解释可能依赖于方法的范围(不包括方法的性能)。

如果一个协同试验是根据 ISO 5725:1994 或 AOAC/IUPAC 协议协调进行的,这些信息是可以被用来评估方法的。

3.2.2 最低性能要求

协作试验中,该方法性能应遵守验收标准方法的相关要求,履行在协作试验中专门

设置的方法性能要求。特别需要对标准灵敏度、重复性、再现性、标准偏差和真值进行评估。

除了上述方法验收标准,根据附录 I 中列出的方法性能要求,需要对协作试验中所得试验数据(附录 I 中规定的)进行评估。

该方法及其相关的验证数据将根据科学发展和验证及协作试验中经验的积累进行定期修改。这些准则补充有关验证过程的操作步骤的补充和实用性信息。

3.2.3 合作试验测试材料

原则上,该方法应对所涉及的基质上适用并接受检验(即可应用于涉及的任何基质)。

萃取过程中材料/基质效应对任何分析都有重要影响。在验证研究结果报告中应包括对何种材料/基质进行分析和蛋白质或 DNA 是否已经净化过后用于靶标分析。

3.2.4 对方法确认的具体信息

对 PCR 检测方法的定量和定性验证具体信息分别见附录 II 和附录 III。

对基于蛋白质方法定量和定性验证的具体信息见附件 IV。

4 质量管理要求

4.1 实验室质量

CAC/GL 27 为涉及进出口食品的实验室提供指导。本指南是基于符合 ISO/IEC 17025 标准，能力验证和内部质量控制使用的分析方法需通过法典要求的验证。

4.2 参考资料

方法验证通常需要一个适用的参考材料。有许多基质可以用来开发成用于作为检测 DNA 序列和蛋白质的方法的相关参考材料或工作标准。作为特定用途，每种方法都有自己的优点和缺点。参考材料的物理形态决定其用于任何给定的方法使用的适用性。参考材料和常规样本之间，由于材料、粒度分布差异可能影响目标蛋白质或 DNA 的萃取效率，由于抽样误差影响方法的重现性。

基于 DNA 方法的参考材料可能是包含被分析物的基质。利用质粒 DNA 或扩增 DNA 时需要慎重考虑被合并到质粒或扩增 DNA 中的序列，保证质粒或扩增 DNA 符合要求。

基于蛋白质检测方法的参考物质可能来自重组细菌的纯化（例如大肠杆菌）、陆地生长植物（通常为叶或谷粒）或者是部分加工试品。

5 技术和方法信息

基于 DNA 和蛋白质技术和方法方面的相关参考文献：

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C and Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring sa fety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H and Van den Eede G (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.

Asensio L (2007). Review: PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T and Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.

Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215

Codex Alimentarius Commission Procedural Manual. The Use of Analytical Results: Sampling Plans, Relationship between the Analytical Results, the Measurement Uncertainty, Recovery Factors and Provisions in Codex Standards.

CAC/GL 54-2004. Codex Guidelines on Measurement Uncertainty.

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K and Ward S (2001). Development of a DNAbased assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.

Dahinden I, von Büren M and Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.

Dieffenbach CW and Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.

ISO 5725:1996 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO 21569:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO 21570:2005. Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products -

Quantitative nucleic acid based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO/DIS 24276:2006. Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO/IEC Standard 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization.

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J., and V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, pp 780-786.

Holst-Jensen A. and Berdal KG (2004). 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):927-36.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Kwok S and Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.

Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D and Song P (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International* 88 (1):36-155.

Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.

Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)

Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF and Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.

Newton CR, Herbitter A and Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons. Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and "gluten-free" bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237 .

Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.

Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. EUR - Scientific and technical research series. Luxembourg: Office for official publications of the European communities.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.

Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.

Woolfe M and Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

附件 I: 确定方法所需的信息

1. 方法描述

需要对方法的所有内容提供完整和详细描述。例如 PCR 和蛋白质检测方法中使用的多个模块需要一一列出。除此之外，描述信息还包括方法的适用范围和所使用的计量单位。具体要求如下：

1.1. 目的和方法的相关性

方法的目的应该在方法中指出，并且该方法是适用于预期用途。

1.2. 科学依据

方法所基于的科学原理（如实时 PCR 方法是以分子生物学为基础的）需要明确概述。

1.3. 方法的预测模型和数学模型

基于 DNA 和蛋白质技术过去常常用于检测和量化 DNA 序列和蛋白质是基于不同的原理。在 PCR 实验中，目标 DNA 以指数形式扩增。此外，实时 PCR 定量的方法常常是基于两个独立的 PCR 实验：一个是目标 DNA；另一个是分类学特异 DNA 序列。与 PCR 不同的是，免疫吸附试验是将一个或多个抗体绑缚到每个最初目标分子上，而且信号的放大与报告分子的数量是成比例的，如果适用的话，甚至是与酶促反应的时间也是成比例的。

如果结果依赖于数学关系，就需要描述并记录（例如： $\Delta\Delta C_t$ 方法、回归曲线或通过其他方式得到的校正曲线）。方法中需要描述提供正确的应用模型。这些可能包括，分析时需要不同的方法、推荐的数量和水平范围。常规分析包括重复和（或）稀释液的最小数量或评价拟合优度的方式和置信区间。

2. 基于 DNA 方法的特殊信息

对于基于 DNA 方法的实验程序，需要特别提供以下的附加信息：

2.1. 引物

通常方法需要提供已经规定的一对引物和它的目标序列。建议明确引物的效能/用途，包括引物是否适合筛选和（或）定量。

● 扩增长度

食品加工过程通常会导致目标 DNA 的降解。序列扩增长度通常会影响到 PCR 的效率。因此在精加工的食品分析时，选取更短的扩增子（在合理范围内）可以增加得到较好的信号的可能性。总之，分类特异 DNA 序列与目标序列扩增片段的长度的应该是类似长度范围。

● 该方法是否需要特定仪器或化学反应

目前有多种不同的实时仪器或化学反应可供使用。这些仪器或化学反应具有不同的性能，如试剂的稳定性、加热和冷却特性，会影响整个 PCR 循环的升降温速率和时间。

不同加热和冷却系统的技术有差异，软件用于诱导和记录荧光性。荧光性的不同也可以根据仪器和软件的记录来检测和量化。

没有经过评估和（或）修改，其他设备和化学反应不能替代方法常用仪器和化学反应。

● 是否需要进行单一或双重 PCR 扩增

在一个单一反应中使用不只一个引物集称为多重 PCR。

需要提供的信息证明实验室之间转移的稳定性。意味着方法应该被至少一个实验室以外其他实验室的方法测试。这是确认方法的一个重要前提条件。

3. 基于蛋白质方法的特殊信息

对于基于蛋白质方法的实验程序，需要提供以下的附加信息：

3.1. 适用性分析

食品加工通常导致目标蛋白质的降解或变性，进而可能导致免疫反应性的大幅改变。需要评估免疫分析对加工食品中靶标的适用性。提供加工食品中方法对靶标适用性测试的实证结果。

3.2. 钩状效应

在基于抗体的横向流设备和版格式分析中，钩状效应（饱和度）可能导致假阴性结果。需要完全展示工作浓度范围充分覆盖目标分析样品。因此，需要提供目标蛋白质钩状效应测试的实证结果。

3.3. 验证方法

对于免疫分析，抗体可能与基质中的其他蛋白质发生交叉反应；因此，需要证明分析的选择性。另外一种方法可能被作为验证方法。可能需要提供相同已知浓度分析样品测试的实证结果。

4. 方法性能信息

4.1. 选择性试验

必须明确方法使用适当的阴性对照，如动物源和植物源材料、不同菌株或目标 DNA 序列用于该目的。

需提供测试非目标物种/品种 DNA 的方法和测试参考物种/品种材料 DNA 的方法的实证结果。测试应包括与之密切相关材料和灵敏度极限被真实测试的情况。此外，它对分类特异 DNA 可能是适合的和独特的，为减少潜在获得的假阳性需测试其他来源的类似食品。

同样地，对于基于蛋白质的方法，需提供测试来自非靶标、与之密切相关物种或品种或品质、净化的靶蛋白和（或）阳性对照材料蛋白质的方法的实证结果。

4.2. 稳定性试验

为了证明拷贝数和分类特异基因 DNA 保存的稳定性，或者蛋白质表达的稳定性，需提供测试不同种、亚种、种类、栽培品种、动物系、微生物菌株等方法（测定涉及的目标 DNA 序列或蛋白质）的实证结果。

对蛋白质的方法，为了显示蛋白质免疫反应性形式的稳定性，需提供目标物质及其衍生物或者加工产品方法测试的实证结果。

4.3. 灵敏度试验

需提供测试在不同浓度为测试该方法灵敏度的实证结果，使用由单一成分组成样品定义最低检测限（LOD）。对于由多成分组成的实物产品，实际的灵敏度会降低，由于提取的总 DNA 来自多个成分，所以实际被测量将会被减少。

如果有必要的话，每个方法和每种基质的 LOD 均要被确定。

4.4. 稳健性试验

需提供测试该方法中小但易变的方法参数的实证结果。

4.5. 提取率

需提供测试该方法中每种基质的提取率的实证结果以证明萃取是充分的和可复制的。对于定量检测，需提供该方法不完全提取校正结果。

5. 方法的实际应用

5.1. 适用性

需要考虑该方法应用的基质特征（比如加工食品、原材料等），样品类型和范围。方法的局限性也应该考虑（比如，另外一个分析物干扰或对某一情况不适用）。局限性可能也包括成本、设备的条件限制或者对操作者和（或）环境隐含特异性和非特异性风险。

5.2. 方法的操作特点和可行性

对方法所需应用设备的要求应做明确规定，同时应考虑分析本身和样品制备。需提供有关成本、实际困难和任何其他因素的信息，这对操作者具有重要意义。

5.3. 实验设计

实验设计包括规定运行数量、样品、重复次数、稀释等等细节。

5.4. 操作者技术要求

提供操作技巧说明书对正确应用提出的方法是必要的。

6. 分析质控

应用方法时适度利用自控，对方法是有效的。自控样品应明确指定并记录它们的相关说明。这些包括正负控制、它们的详细内容、深入范围，他们应该使用和结果的解析。

以下内容应明确规定：

- 分析控制的类型：
 - i. 正负控制
 - ii. 如果适用可以使用内部控制（竞争性或非竞争性）
 - iii. 类似基质控制（确认样品添加到 PCR）的其他类型控制或萃取过程控制
- 对照样品。
- 使用参考物质。

7. 方法性能

正文第 2.2 部分提及关于标准的数据，应该提供“一般方法标准”，类似一个综合评价该标准适用于预期目的。

附件 II 定性 PCR 方法的验证

1. 简介

基于 DNA 的分析经常使用 PCR。这项技术放大了 DNA 的特定片段到其可以被仪器（比如：采用荧光的方法）测量的程度。食品加工过程（比如由于加热、酶和机械剪切）可以导致 DNA 总数的降解或者减少。这些方法最好是设计用来放大相对短的目标或者物种特异性的 DNA 序列。

定量检测经常以目标特定 DNA 序列和物种特定 DNA 序列的百分比来表示。在这样一个相对的定量测试中，这种测量实际涉及到两种基于 PCR 的测定——目标特定的 DNA 序列和内源的或者物种特定的序列。这些测定中的每个测定都有其不确定度，这两种可能具有不同的测量特征。在大部分应用中，目标 DNA 序列将会以很低的浓度呈现，物种特异性 DNA 序列将会高 10 倍到 1000 倍。因此，重要的是两个测定都要正确的验证。在测量直接以百分比表示的情况下，当验证方法时，这些因素应该考虑到。这些结果可以用其它的测量单位来报告，比如拷贝数。

DNA 分析的结果是，尤其是在加工食品中，目的是检测一个非常小数量的特定 DNA，经常在纳克/克级或者更低。PCR 定量分析的结果经常以一个特定基质中的目标 DNA 相对数量和总的相比较的物种/种类 DNA 数量百分比来表示。食品基质中可能也会包含来自其他种类/物种的大量的 DNA。

方法验证包括两个阶段。第一个是对以上除了再现性以外的所有参数的室内验证。第二个阶段是合作试验，主要测量的指标是重复性和重现性以及实验室之间方法转移性的详细信息。强烈推荐在大规模试验的花费之前，进行小规模的合作试验来检测特定方法的稳健性。在方法的任何改进或者方法描述需要的情况下，通过预实验需要有限的成本，但是由于方法描述方面的原因而导致实验室之间方法验证的失败是非常昂贵的代价。此外，需要指出的是在实验室内实施一个已经验证过的方法需要包括必须的实验来确认执行方法的当地条件和实验室之间验证的一致。需要注意到的很重要的一点是方法应该在将要开展的条件下进行验证。

2. 验证

为了预期的使用或者应用，一个定量 PCR 分析应该被验证。对于化学分析方法，建立了 ISO 5725:1996 或者 AOAC/IUPAC 一体化协议，规定了方法验证需要的步骤。需要重点强调的是一体化协议中的原理和法则是适用于定量 PCR 方法的。

一些关于定量 PCR 分析性能验证的参数将会详细讨论。这些参数是范围、LOD 和 LOQ、真值、精密度、灵敏度和稳健性。其它重要的参数是结果可以接受的标准和解释，以及结果要表达的单位的问题。

有个关于百分比数值解释的科学的讨论。大家认识到，由于成分重量和 DNA 分子数量相关性的不确定度，迄今为止，对于拷贝数关系没有可靠的权重。重量和重量的比值、拷贝数和拷贝数之间的比值计算是可以接受的，假定这一点在报告结果是明确声明了。

对于每个相关的分析，包括参照和特定目标的 PCR 分析，以下列出的所有参数，包括选择性和灵敏度，都需要单独评价。这些参数依照字母顺序排列，并非根据重要性排序。

2.1. 应用性

应该声明分析方法可能用到的分析物、基质和浓度。

提取方法无论应用到那种基质，需要其产生足够数量、结构完整和纯度的 DNA 以来满足将要开展的后续方法步骤（比如 PCR 步骤中 DNA 的足够放大）的性能合适评价。

在实时 PCR 分析中，Ct 值可以用来估计 PCR 的效率。效率可以被测试的，比如通过进行稀释一系列 DNA 模板，对每次稀释检测 Ct 值（测量荧光信号的循环阈值超过使用者定义值）。理想情况下，当放大效率是 100%，加到 PCR 的模板 DNA 数量是两倍下降，将会导致 Ct 值提高 1。因此，如果 DNA 被稀释 10X，稀释的未稀释的 DNA 之 Ct 值的理论差异应该是接近 3.32。实际情况可能不能得到理论值。这种关系的显著差异可能意味着提取的 DNA 含有 PCR 抑制剂，DNA 溶液不是均匀的或者 DNA 的数量是如此之低导致 DNA 数量的随机变异反应产生了不可靠的估计定量。采用荧光探针时的终点 PCR 反应也是这种情况。

2.2. 动态范围-定量范围

方法的范围定义了分析物将会被可靠检测的浓度范围。DNA 提取液中物种特异性 DNA 和总 DNA 的相对数量将会根据 DNA 是否来自一个单一成分或者混合食品基质而变异。这个预期的浓度范围定义了应该使用的标准曲线和足够数量的标准品，如果可行，比如标准曲线来足够定义浓度和响应值的关系。响应值和浓度之间的关系应该证明是联系的、可重现的、适当转化后应该是线性的。

目标专一方法的定量范围可以被设计到占物种特异性 DNA (w/w) 百分比从接近 0 到 100。但是，对一个方法在

应用范围内进行验证时正常的。如果一个方法在一给定的范围内进行验证，没有进一步验证的话，不能进行范围的扩大。对于某一特定应用（比如食品或者谷物分析），可以考虑使用基因组 DNA 来制备标准曲线（见下述使用质粒 DNA 的讨论）。但是，建立一个名义上的 100% 标准是很容易的，可靠的建立一个低于 0.1% 是很困难的。此外，目标点（将要方法的 DNA 序列）的数量变得如此之小，随机误差将开始占主导，不可靠的分析是可能的。

用来校正的 DNA 应该可以被溯源（在其计量学意义上）到最高计量级上的参照，比如有证标准物质。应用到样品中包含的分析物数量属于的步骤中特定的范围时或者极端值时，通过确证 PCR 步骤提供了一个线性和真值可以接受的程度建立范围。

定量 PCR 的独特性质对于定量 PCR 动态范围的底端具有特别的限制。这是由于在本范围内的非正态分布导致的在确定 LOD 和 LOQ 时的困难。

2.3. 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

如果定量 PCR 分析验证显示，可以测量 DNA（比如）在 0.1% 时，具有可以接受的真值和精密度，方法仅应用到相关的范围以上时，一般就不需要检测 LOD 和 LOQ。但是，如果方法是用在浓度接近 LOD 和 LOQ（一般是 0.01~0.05%），LOD 和 LOQ 的评估是验证步骤的一部分。

在定量 PCR 中，空白测量值的分布一般不是高斯分布，而是符合泊松分布。如果 LOD 是需要的，应该通过实验确定。对于定量方法，LOD 是分析方法检出分析物至少是 95%（假阴性结果 ≤5%）时分析物的数量

对于定量方法，明确特定基质的 LOQ 是否接近测量值是很重要的。既然定量 PCR 的测量一般不是正态分布，LOQ 需要通过实验检测。

实际上，采用两个方法来建立 LOQ。第一种方法是分析一定量的已增加（添加）已知量分析物的常规样品。LOQ 就是结果满足预设的特定规范要求（比如来自最低校正水平点的 $\pm 2SD$ ）的浓度。但是对于某些基质比如淀粉或者番茄酱，DNA 提取可能很困难，这是低的提取效率也可以接受。当提取效率很低时，在验证数据和分析报告中应该声明这一点。一个更完整的方法是采用含有已知浓度分析物的样品检测。由于要求使用含有已知量感兴趣 DNA 序列标准物质的有效量，这一种更为复杂。

2.4. 实用性

通过考虑一些参数来评估方法的实用性，比如一定时间内可以处理的样品数量、估计开展方法所需的固定成本、每个样品大致的成本、日常应用或者特定条件下的实际困难，以及其它的对于操作者来说很重要的参数。

2.5. 重复性标准差 (RSD_r)

PCR 步骤的相对重复性标准偏差在方法动态范围内应该 ≤25%。

2.6. 再现性标准差 (RSD_R)

PCR 的再现性相对标准偏差在大部分动态范围内应该低于 35%，除了在定量限时 RSD_R 可以高一些。

2.7. 稳健性

稳健性是衡量分析步骤在受到分析方法参数有意的微小改变时，保持未受影响的能力，这为日常使用中的可靠性提供了指示。这些改变的例子包括：反应体积（比如：29 vs. 30 μl ），退火温度（比如： ± 1 $^{\circ}\text{C}$ ）以及其它相关的变量。本实验需要至少 3 次重复。在重现性试验中，由这些小的改变引起的分析结果响应与初始条件下的偏差不能超过 $\pm 35\%$

稳健性测试的充分性需要根据具体方法 (method-by-method) 进行证明。比如，对于一个实时 PCR 方法，理想状态下应该考虑以下的参数以及它们原始/初始：不同的热循环模式、DNA 聚合酶、尿嘧啶 N 糖基化酶、氯化镁的浓度、正向引物和反相引物的浓度、探针浓度、温度曲线、时间曲线、dNTP（如果可能包括 dUTP）浓度

2.8. 灵敏度

对于一个 PCR 定量方法，在浓度范围内，应该得到模板浓度的对数和 Ct 的线性函数关系。应该提供相关系数、y-截距和回归曲线的斜率。每个校正曲线残差的百分比最好是 ≤30%。

除了报告曲线的参数外，为了进行定量，由于计算反应效率也很重要，建议明确斜率在什么范围内是可以接受的（比如，对 DNA 检测的 -2.9 到 -3.3，或者说明放大效率接近 100% 时相应的最佳值）。

在实验室采用的是的 Δt -方法而不是基于定量方法的校正，分析人员有责任确保左右的 DNA 数量在分析方法所验证的范围之内。

2.9. 选择性

方法的选择性应该通过提供实验证据的方法来证明。在检测限（如果在适当的动态的范围）真正检测的情况下，证明应该包括分析含有目标 DNA 和非目标 DNA 样品。由于方法对于目标 DNA 是选择性的，对于包含目标 DNA 的食品基质应该仅给出阳性的结果。

为了与预期基质中的其它序列可能的同源性，根据使用的目的，应该对引物和探针进行相关序列数据库的检测。经过这个评估后，选择性可以通过实验证明。

针对目标 DNA 的分析选择性。对于目标 DNA 的选择性实验证据应该包括：

- 分析至少 10 个来自不同批量或批次缺乏目标 DNA 的食品或者成分，尽管这些样品应该包含物种特定 DNA。所有这些分析应该得到阴性结果。比如，如果目标 DNA 对应于一个特定的重组 DNA 植物转化事件，样品应该来自其他（非目标）转化事件而且是属于同一植物种属的非重组 DNA 植物。
- 应该检测适当数量的每个来源的 DNA 样品。
- 每个 DNA 样品应该进行两次重复，结果应该在 0.5 的 Ct 值内。

检测结果应该明确说明没有观察到显著性的仪器读数或者化学影响。

针对物种特异性 DNA 序列的分析。对于物种选择性的实验证据应该包括：

- 分析至少 10 个来自不同批量或者批次的来自属于感兴趣物种组织的样品或者成分，但是要以不同的亚-物种分类。所有这些分析应该具有阳性结果。比如，假定物种特异性对应于一种植物比如是玉米，样品可以对应于不同基因来源的玉米品种。
- 分析至少 10 个来自不同批量或者批次的来自不属于感兴趣物种相似的样品或者成分，可以在相关的食品基质中呈现。所有的分析结果应该是阴性的。比如（继续前边的例子）如果第一次的 10 个分析是应用到不同的玉米面，第二组分析小麦/大豆/大米粉是合适的。
- 应该检测适当数量的每个来源的 DNA 样品。
- 每个 DNA 样品应该进行两次重复，结果应该在 0.5 的 Ct 值内。

检测结果应该明确说明没有观察到显著性的仪器读数或者化学影响。

2.10. 真值

对于任何方法，方法的真值应该通过对参考物质和已知或者指定数量的参考物质分析进行比较得到。应该考虑样品基质效应的影响，尤其是在当样品基质与标准物质不同时。

对于 PCR 步骤，整个动态范围内 $\pm 25\%$ 的真值是可以接受的。

3. 附件 II 的参考文献：

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S and Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmioli M and Marmioli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control.* 21(2):143-149.

附件III 定性 PCR 方法的验证

简介

定性 PCR 方法应该尽可能的以其用作常规分析的方法进行验证——这意味着方法的灵敏度应该可以可靠的检测一个阳性样品，没有引起阴性样品的显著增加。

由于其本身性质，定性检测结果指的是高于/低于一个检测限。就像定量方法的检测限，定性方法的检测限可以定义为对阳性样品至少有 95% 产生阳性结果时的浓度。这个结果假阴性结果的比例是 5% 或者更小。也可以用比例或者百分比表示。

假阳性率

已知的阴性测试样品被方法鉴定为阳性的概率。为了简便，这个比例可以用百分比来表示：

%假阳性结果 = $100 \times (\text{已知阴性样品中误判的数量}) / (\text{总的已知阴性样品数量})$

假阴性率

已知的阳性测试样品被方法判定为阴性的概率。为了简便，这个比率可以用百分比来表示：

%假阴性结果 = $100 \times (\text{已知阳性样品中误判的数量}) / (\text{已知阳性样品的总数量})$

备注：对于假阳性和假阴性比率既然有三种不同的定义使用，验证报告应该明确使用的是那种。

为了显示定性分析的假阴性率，对一组带有稳定、已知浓度的阳性材料的一系列样品进行分析并且评价结果。有必要要注意的一点事，置信限和统计不确定度的概念需要应用到假阳性和/或假阴性的风险中。期望的置信水平决定了需要检查的样品组的大小和数量。

稳健性

对于任何验证过的方法，尽力证明分析的额稳健性。这包括咨询的优化和调查由于技术原因导致的方法微小改变的影响，如在定量 PCR 附件中描述的那样。

附件IV：基于蛋白质方法的验证

1. 定量测试

以下描述的仅仅是对感兴趣蛋白进行免疫检测分析的几种可能之一。

比如，对于蛋白质典型的 ELISA，来自酶反应中已知物质的量被测量。通过构建 y 轴光密度 (OD) 和 x-轴标准浓度得到标准曲线，使用二次方程式或者其它的方法需要的符合模型来获得剂量响应曲线。为了获得准确的定量值，样品溶液的 OD 值必须属于校正取出的线性部分。如果 OD 值太高，必须将样品稀释直到 OD 值落到分析方法的定量范围内。原始样品中蛋白分析物的浓度的计算是通过校正应用到微型板的样品制备中所有的稀释因子。初始的样品重量和提取液体的体积，以及所有随后的稀释用来计算稀释因子。

可以使用各种分析对照来证明分析的性能。空白样品，比如空盘或者缓冲溶液，可以平行分析用于检测任何的背景响应，若需要，将会从样品和校正曲线中去掉。阴性对照样品（例子：不含有分析物的基质提取液）将可以用来显示分析中任何的非专一性响应或者基质效应影响。可以通过分析阳性对照或者添加已知分析物浓度的基质提取液来显示方法的准确性。运行合适数量的标准品和样品的重复来评价分析的精密性。空白、阴性对照、阳性对照、参考物质以及重复可以在每个微盘进行分析来控制每个盘之间的变异性。

2. 参考材料

如可行，分析与目标分析样品相同的样品基质构成的参考材料。这一般包括阴性对照和阳性对照参考材料。比如，如果要检测的基质是大豆粉，标准的阳性参考材料应该是包含已知比例感兴趣蛋白的大豆粉。作为选择，可以使用纯的样品或者感兴趣蛋白的提取液，假定对于有问题的基质使用这样的蛋白参考材料已经被验证。在一些情况下，可能没有参考材料。在开发、验证和使用食品基质中蛋白质的免疫分析中，对参考材料的使用是很重要的。应该使用最佳的参考材料以与管理测试要求一致。

含有和不含有分析物的食品或者食品成分都具备时，准备一个含有目标材料的已知浓度的控制样品是非常简单的。在其他情况下，对某一特定基质和分析物得到控制样品很困难。稳定性和均匀性是重点考虑的。比如，如果将要分析的基质由混合材料组成，操作者将需要以获得已知浓度蛋白的均匀参考材料的方式来合并材料。需要在储藏和分析条件下对这些材料的稳定性进行评价。

3. 基于蛋白的定量分析方法验证

一致的 ISO/IUPAC/AOAC 标准中定义的方法验证原理可应用到蛋白方法中。

定量方法验证包括准确性/真值、选择性、提取效率、灵敏度、定量范围、精密性、稳健性、应用性和实用性。

准确性是通过测量样品中添加分析物的回收率来证明，以定量范围内几个水平下的平均回收率来报告。

感兴趣蛋白的回收率应该通过对参考材料中获得的结果与参考材料的已知值或者指定值进行比较的方法确定。应该考虑到样品基质效应的影响，尤其是在样品材料与参考材料不同时。

提取效率是一个给定的提取方法在从基质中分离蛋白分析物效率多少的测量单位。它以从样品中回收的分析物百分比表示。真正证明提取步骤的效率是很困难的。可以用来比较免疫分析结果可能没有替代的方法。解决提取效率的一个方法是通过完全提取方法从每种食品部分证明目标蛋白分析物的回收率，比如通过重复的提取样品直至没有蛋白质被检出。

批内精密性描述了一次分析内变异性有多大。它可以通过检测在标准曲线上不同浓度的同的重复分析 (% 变异系数) 和来自不同天进行的独立分析标准品吸光度值的合并变异性 (RSD_r) 之间的变异性来评价。批间精密性描述了单独分析之间产生的变异性是多大，可以通过分析每个微盘的质量控制样品来测定。需要的质量控制样品将由两组提取组成，一组含有目标分析物的样品，一组是来自对照样品。如果蛋白质在提取液中是稳定的，它可以在冷冻条件下储藏，一部分可以在被解冻后在每个微盘上分析。批次间精密性可以在一段时间下评价，以变异系数百分比表示。

方法的整个整个动态范围内相对重复性标准偏差 (RSD_r) 应该 ≤25%。

相对重现性标准偏差 (RSD_r) 在目标浓度和主要动态范围内应该小于 35%，除了定量限上，RSD_r 大一些。

稀释一致或者线性是用来评价分析无论样品 OD 插入在标准曲线定量范围内，能够给出相同的结果。进行这些实验，目标蛋白是阳性的样品被理想的稀释到结果值至少有三个包含在曲线定量范围内。来自单一样品提取液的几个稀释的调整结果变异系数最好 ≤20%。

3.1. 检测限 (LOD) 定量限 (LOQ)

如果 LOQ 或者 LOD 建立远低于方法将要使用的范围，准确的确定是不需要的，这一点需要注意到。这将是如此，

比如，当 LOD 在 1 ng/kg 的范围时，方法验证的范围仅会扩展到浓度范围在 ug/kg。

估计 LOD 时来假定空白的信号强度增加到 3 倍的空白标准偏差，这是常用的方法。这个方法最多给出一个估计，并且依赖于空白测量在 0 附近的正态高斯分布。这一般用于一些方法比如 ELISA 方法的假定，但是 LOD 最好是通过实验确定。相应的，LOD 经常定义为测试中使用的最低标准品等同的浓度，对于那个标准品应该得到一致的阳性结果。

对于定量方法，对于一个特定的基质 LOQ 是否接近将要测量的值，这一个点很重要。

3.2. 交叉反应

交叉反应是类似物或者其它分子可以结合到检测抗体的程度，因此应该在方法中表征和描述。交叉反应的缺乏应该使用来自非目标以及紧密相关的分类、净化的目标蛋白或者参照阳性对照材料的带有蛋白质或者分子测试方法试验结果来评价。来自试剂和实验室器具的潜在干扰可以通过对来自没有分析物的材料的提取液进行分析来评价。

3.3. 基质效应

如果方法的响应受到除了特定蛋白分析物之外的最终提取液中物质的影响，特定响应应被认为是基质效应。解决基质效应的一种方法是证明分析方法对于带有或者不带有样品基质的提取液能给出相似的结果提供一种指示。在这种方法中，由于所有基质的分析使用必须证明不受基质效应影响。另一种方法(尽管不可取)计算基质效应是将准备的标准溶液从空白基质中提取。这将确保标准和样品之间的基质效应影响是一致的。

3.4. 稳健性

稳健性是衡量分析步骤在受到分析方法参数有意的微小改变时，保持未受影响的能力，这为日常使用中的可靠性提供了指示。这些变化包括：反应体积、培养温度（比如烤箱培养 ± 1 °C，室温培养 ± 4 °C）以及/或其它相关的变化。试验需要进行至少三次重复，需要计算回收率。在重现性试验中，由这些小的改变引起的分析结果响应与初始条件下的偏差不能超过 $\pm 30\%$ 。

4. 定性测试

对于现场或者实地测试，侧流装置是很有用的工具，尽管其它的免疫-吸附测试比如传统的 ELISA 方法也可以用作定性测试。为了确保可靠的结果，测试应该被验证，性能特征参数包括灵敏度、选择性、应用型、检测限、稳健性、基质效应，以及如果可能的话，hook 效应。

5. 基于蛋白定性方法的验证

与定性 PCR 测试同样的原理应用到基于蛋白的定性方法。这些方法，包括假阳性和假阴性率的计算，可以被应用到蛋白分析方法。总的来说，由于基于蛋白的侧流试纸条技术可靠性特点，它们不能对每个样品进行一式两份操作。但是，对于 ELISA 测试（由于其定量特点）一般使用重复的样品。

● 应用性

分析方法可能用到的分析物、基质和浓度应该声明。

在蛋白方法的操作中，蛋白提取可能是一个关键的因子，使用的缓冲液也可能影响检测步骤的性能。因此，需要详细的优化确保蛋白检测方法是可靠的。需要建立方法的 LOD 确定标准。对于定性分析的 LOD 确证，可以使用接近 LOD 的添加浓度，只要使用的水平中的一个满足能够满足以上的标准但是又接近 LOD。然而这些步骤可以给出方法性能的指示，具有已知特性的产生的样品（如果有的话）是建立方法应用性的最佳基质。

● 实用性

方法的实用性应该考虑以下参数评价，比如：给定时间条件下可以处理的样品的数量、使用方法时估计的固定成本以及每个样品大致的成本，日常使用或者特定条件下的实际困难以及其它可能会对操作者具有重要作用的参数

6. 附件 IV 的参考文献

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW and Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928

Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton et al., *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12, 153-164.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of

Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Mihaliak CA and Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, in: Nelson JO, Karu AE and Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR and Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [On line] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.

附件 V PCR 定量方法分析控制可以接受的标准和结果解释

最低限度上，以下的可以接受的标准是对于所有定量 PCR 方法是相同的，应用到每个 PCR 分析中：

- 在相应的浓度阳性 DNA 目标对照重复的平均值偏离指定值要小于 3 倍标准偏差。如果可行的话，目标 DNA 对照定义为参照 DNA 或者是自有证参考材料或者研究的序列或者组织中代表性已知的阳性样品中提取的 DNA。对照是用来证明含有目标序列测试样品的分析结果应该是什么。
- 试剂对照的放大将不会导致在背景噪音以上的方法。空白试剂放大定义为含有所有试剂除了提取的测试样品模板 DNA 的对照。相应体积的没有试剂（比如水或者缓冲液）的核酸加到反应中，而不是模板 DNA。

为了接受未知样品的结果，样品重复的相对标准偏差应该 $\leq 35\%$ 。