**《实时荧光定量PCR仪性能评价通则》**

**编制说明**

**中华人民共和国国家标准**

**标准编制组**

**2021.08**

**目 次**

[1工作简况 4](#_Toc80101427)

[1.1 任务来源 4](#_Toc80101428)

[1.2主要工作过程 4](#_Toc80101429)

[1.3标准主要起草人及其工作 5](#_Toc80101430)

[2.确定标准的主要技术内容 5](#_Toc80101431)

[2.1仪器外观检验 6](#_Toc80101432)

[2.2 仪器安全性试验 6](#_Toc80101433)

[2.3环境适应性试验 6](#_Toc80101434)

[2.4电磁兼容性试验 6](#_Toc80101435)

[2.5仪器的性能试验 6](#_Toc80101436)

[2.5.1温度控制 6](#_Toc80101437)

[2.5.2荧光检测 9](#_Toc80101438)

[2.5.3整机性能 12](#_Toc80101442)

[3.验证试验及结果 13](#_Toc80101448)

[3.1温度控制 14](#_Toc80101449)

[3.1.1平均升降温速率 14](#_Toc80101450)

[3.1.2温度波动度 14](#_Toc80101451)

[3.1.3温度示值误差 15](#_Toc80101452)

[3.1.4温度均匀度 15](#_Toc80101453)

[3.1.5温度持续时间准确度 16](#_Toc80101454)

[3.2荧光检测 16](#_Toc80101455)

[3.2.1荧光强度重复性 16](#_Toc80101456)

[3.2.2荧光强度均匀度 17](#_Toc80101457)

[3.2.3荧光强度线性 17](#_Toc80101458)

[3.3整机性能 18](#_Toc80101459)

[3.3.1不同通道荧光干扰 18](#_Toc80101460)

[3.3.2仪器线性 19](#_Toc80101461)

[3.3.3置信度 19](#_Toc80101462)

[3.3.4定量重复性 20](#_Toc80101463)

[3.3.5定量示值误差 20](#_Toc80101464)

[4.采用国际标准和国外先进标准的程度 20](#_Toc80101465)

[5.与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系 21](#_Toc80101466)

[6.重大分歧意见的处理经过和依据 21](#_Toc80101467)

[7.国家标准作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议 21](#_Toc80101468)

[8.贯彻国家标准的要求和措施建议 21](#_Toc80101469)

[9.废止现行有关标准的建议 21](#_Toc80101470)

[10.其他应予说明的事项 21](#_Toc80101471)

# 1工作简况

## 1.1 任务来源

根据国标委发【2019】40号文“国家标准化管理委员会关于下达2019年第四批国家标准制修订项目计划的通知”，其中项目代号20194004-T-604的《实时荧光定量PCR仪性能评价通则》为国家标准制定项目。此计划项目由中国机械工业联合会提出，由全国工业过程测量控制和自动化标准化技术委员会分析仪器分技术委员会（SAC/TC124/SC6）归口管理，由中国检验检疫科学研究院、北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）、苏州百源基因技术有限公司牵头起草，计划完成时间2021年。

## 1.2主要工作过程

（1） 成立起草工作组

2020年2月27日SAC/TC 124/SC6秘书处组织成立标准起草工作组，起草组由中国检验检疫科学研究院、北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）、苏州百源基因技术有限公司、西安天隆科技有限公司、苏州雅睿生物技术有限公司、杭州博日科技股份有限公司、上海宏石医疗科技有限公司、鲲鹏基因（北京）科技有限责任公司、杭州晶格科学仪器有限公司、安徽皖仪科技股份有限公司、圣湘生物科技股份有限公司、安图实验仪器（郑州）有限公司、深圳华大智造科技股份有限公司、上海科源电子科技有限公司、中国计量科学研究院、上海市计量测试技术研究院、黑龙江省计量检定测试研究院、中国疾病预防控制中心营养与健康所、谱尼测试集团股份有限公司等企业、检测和用户组成。

（2）起草过程

2020年5月至10月组织标准起草小组，起草小组对实时荧光定量PCR仪相关标准和文献资料进行了梳理，提出了性能评价关键参数指标，并完成了相关方法研制工作。

2021年1月26日，由全国工业过程测量控制和自动化标准化技术委员会分析仪器分技术委员会秘书处组织召开了第一场标准讨论会，起草小组汇报了“实时荧光定量PCR仪性能评价通则”标准的起草工作，与会专家就标准（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议。标准起草小组根据专家意见进行了修改和完善。

2021年3月21日由秘书处组织了第二场标准讨论会，就性能检测方法的细节进行再次进行商议，标准起草小组对标准（草案）再次进行了完善和细化。

2021年4月23日由秘书处组织召开了第三场标准讨论会安排方法确认工作，与各仪器厂家商议验证实验的实施方案和实施细节。各厂家自行实验提供了相应性能数据。

2021年7月10日至14日，标准起草组根据验证实验中出现的问题集中国内7台代表性仪器和3台进口仪器统一实验，验证标准相关指标。

（3）征求意见阶段

2021年8月13日标准牵头单位向全国工业过程测量控制和自动化标准化技术委员会分析仪器分技术委员会提交了“实时荧光定量PCR仪性能评价通则”标准（征求意见稿）和编制说明。

## 1.3标准主要起草人及其工作

邹明强负责标准的立项申请、工作计划制定、指导标准制定。

杜美红、李静雯、陈尔凝负责查阅不同国家和地区的相关资料，制定试验方案，开展现场试验，编写标准和编制说明。

车团结、龚大江、汪秀军、商晓辉、秦荣、王梓、阮亮峰、邓晨光、邓中平、刘聪、李景、袁旭军、高运华、梁文、丁海铭、孙丽翠、宋薇、罗超、张莹等参与实验验证提出专业意见，指导标准编写。

# 2.确定标准的主要技术内容

本文件征求意见稿主要内容为实时荧光定量PCR仪的性能评价，涉及对仪器的评价要求及检测方法。其中，评价要求包括评价仪器的正常工作条件、外观、环境适应性和电磁兼容性及性能；性能要求中包括仪器的温度控制、荧光检测、整机性能等，相应评价技术具体方法如下：

## 2.1仪器外观检验

对仪器的外观评价采用目视和手感进行测试。

## 2.2 仪器安全性试验

涉及分析仪器标识检查、接触电流试验、介电强度试验、保护接地电阻试验的方法参照GB/T 34065相关项目及试验方法执行。安全性试验方法参照GB 4793.1相应试验方法执行。

## 2.3环境适应性试验

根据仪器的应用范围将该项性能测试分为两类，分析仪器与医学仪器，分析仪器参照GB/T 11606-2007（环境条件分组Ⅰ、Ⅱ）相应试验方法执行；医疗仪器参照GB/T 14710-2013（环境条件分组Ⅰ、Ⅱ）相应试验方法执行。

## 2.4电磁兼容性试验

分析仪器参照GB/T 18268.1相应试验方法执行；医疗仪器参照GB/T 18268.26相应试验方法执行。

## 2.5仪器的性能试验

### 2.5.1温度控制

温度控制性能主要涉及平均升温速率、平均降温速率、温度波动度、温度示值误差、温度均匀度、温度持续时间准确度6个参数。通过计量标准专用温度数据采集仪记录仪器在循环程序下样本检测孔的实时温度来评价温度控制性能。

#### 2.5.1.1平均升降温速率

**循环次数的确定**

由于第一次循环时仪器温度控制未达最佳状态，一些仪器第一次循环的升温速率与之后的循环差异较大（见表1）。所以本文件征求意见稿升降温速率的计算采用第三次循环的数据。

表1.平均升温速率5次循环的检测结果（单位：℃/s）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 循环次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Ta(50℃温度点) | 48.7 | 47.8 | 49.5 | 49.5 | 49.3 |
| Tb(90℃温度点) | 89.8 | 89.2 | 88.4 | 89.3 | 89.5 |
| 升温时间t1 | 18 | 16 | 14 | 14 | 14 |
| 平均升温速度 | 2.3 | 2.6 | 2.8 | 2.8 | 2.9 |

**循环温度的确定**

关于温度的设定参照YY/T 1173-2010的方法，设置45 ℃至95 ℃的温度循环，检测从50℃到90℃的平均升温速率，基本是PCR仪常用的温度范围。有专家建议将循环温度设为45℃到97℃，计算50℃到95℃的平均升温速率。为此，通过实验对两种温度设置进行了比较。

表2平均升降温速率在两种温度设置下的检测结果（单位：℃/s）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 性能指标 | 温度范围 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 1 |
| 平均升温速率（℃） | 50℃~90℃ | 2.2  | 3.3  | 5.1  | 2.9  | 3.4  |
| 50℃~95℃ | 2.2  | 3.1  | 5.7  | 2.7  | 3.5  |
| 平均降温速率（℃） | 90℃~50℃ | 2.1  | 2.7  | 5.7  | 1.9  | 2.6  |
| 95℃~50℃ | 2.0  | 2.4  | 5.4  | 2.1  | 2.5  |

两种温度设置程序的检测结果差别不大，有高有低无规律。考虑各仪器达到恒温的模式不一样，而且升降温速率快的仪器每秒变化5℃以上，所以升温至97℃取95℃为检测点可能存在减速的情况，所以本文件征求意见稿确定采用50℃~90℃范围计算平均升降温速率。

**循环时间的确定**

考虑到温度控制性能检测时间不应过长的问题，本文件征求意见稿将温度持续时间设为1 min，此持续时间也为一般PCR检测持续时间的较大值。

**测试孔位的确定**

考虑到目前荧光定量PCR仪小型化的发展趋势，本文件征求意见稿根据仪器的样本孔位数分类规定了温控性能检测的孔数；而且规定了梯度PCR仪温控模块为分区设置时，各独立控温区均需按要求检测。参考了常用的计量标准专用温度数据采集仪的温控探头布局情况，在附录B中给出了布孔的示例。

#### 2.5.1.2温度波动度

**循环温度的确定**

在PCR试验的温度范围中选择高中低三个温度，高温度为常见解链温度95 ℃，中温度为常见延伸温度72 ℃，低温度为较低的退火温度45 ℃（退火温度一般设为45 ℃至60 ℃）。YY/T 1173-2010的低温度设为55 ℃，本文件征求意见稿考虑到低温的温控能力是仪器性能的重要方面，所以设为45 ℃。

#### 2.5.1.3温度示值误差和温度均匀度

**温度统计时间点的确定**

考虑到各仪器达到设置温度的模式不同，部分仪器存在过冲的情况，即温度首次达到设置温度点后到恒温约需5 s~20 s（图1）。由于温度持续时间设置为1 min，故本文件征求意见稿统计恒温后间隔10 s记录温度值，共记录5次，相当于40秒内的控温情况。



图1荧光定量PCR仪达到设置温度的示意图

#### 2.5.1.4 温度持续时间准确度

**计时参考点的确定**

由于95 ℃温度高，属于较难控温的温度，所以本项指标以95 ℃为计时参考点。根据温度示值误差不大于0.5 ℃，本文件征求意见稿允许±0.5 ℃示值误差。这种计时方法考虑到温和升温的仪器，也将有温度过冲现象仪器的过冲时间计入温度持续时间，我们进行了恒温1 min和2 min实验，恒温1 min更能反映出仪器间差距。

表3温度持续时间准确度检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 持续时间准确度 | 恒温1 min | 恒温2 min |
| 循环数 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 时间（s） | 61 | 60 | 60 | 121 | 119 | 119 |
| 相对偏差 | -1.7% | 0.0% | 0.0% | -0.8% | 0.8% | 0.8% |

表4温度持续时间准确度检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 持续时间准确度 | 恒温1 min | 恒温2 min |
| 循环数 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 时间（s） | 70 | 70 | 70 | 135 | 135 | 139 |
| 相对偏差 | -16.7% | -16.7% | -16.7% | -12.5% | -12.5% | -15.8% |

### 2.5.2荧光检测

荧光检测是实时荧光定量PCR仪中关键功能，包括荧光强度的重复性、均匀度、和线性等3个主要参数。

**检测试剂的确定**

由于荧光染料稳定差，易见光衰减，目前还没有适用于荧光定量PCR仪的荧光标准物质，仅有适用于数字PCR仪的两种荧光标准物质FAM和HEX。本文件并不涉及荧光强度绝对值的检测，所以本文件征求意见稿用荧光参比物质进行性能检测。荧光参比物质采用纯度为95%以上的荧光染料，附录C中给出了荧光参比物质的CAS登陆号和荧光参比溶液的配制方法。

**检测温度的选择**

本文件征求意见稿要求荧光检测在恒定温度下进行，具体温度选择由待测仪器具体设置和荧光参比物质的稳定性决定。由于荧光染料在高温下衰减严重，所以举例采用37 ℃作为实验温度。荧光参比溶液在此温度下稳定性较高，检测十次后的衰减非常小（表5），满足重复性和均匀度的检测需求。

表5 荧光参比溶液37℃检测10次的荧光强度

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 荧光参比物质 | 荧光强度 | 平均值 | 标准差 | 相对标准偏差（%） |
| FAM | 5151.00 | 5060.13 | 7.74 | 0.15% |
| 5091.00 |
| 5058.00 |
| 5053.00 |
| 5048.00 |
| 5059.00 |
| 5066.00 |
| 5058.00 |
| 5064.00 |
| 5075.00 |

### 2.5.2.1荧光强度重复性

**检测方法的确定**

因为荧光定量PCR检测的关键是荧光阈值线附近荧光强度的重复性，而荧光阈值线的荧光强度往往是中浓度荧光参比溶液的强度，所以本文件征求意见稿荧光强度重复性仅要求检测中浓度荧光参比溶液多次检测的重复性。同理荧光强度均匀度也仅通过中浓度的荧光参比溶液来评价。

考虑到荧光检测器初始检测的稳定度较差，一些仪器前两次荧光强度较后几次差异较大。所以本文件征求意见稿采用第三次检测开始的荧光强度数据。

考虑到边缘孔位的荧光强度较中间孔位受环境的影响较大，因此本文件征求意见稿规定随机选择1个边缘孔位进行重复性检测。

### 2.5.2.2 荧光强度均匀度

**检测方法的确定**

由于荧光参比溶液使用微量加样器，不确定度较大，导致多孔加样的实验结果无法代表仪器实际均匀度（表6）。通过单管移孔的方法进行检测相对标准偏差更小（表7），而且荧光参比溶液在37 ℃下稳定性较高，衰减不超过0.2%，所以用单管移孔多次检测的结果来代表仪器的均匀度更为合适。

表6 多孔加样一次检测的荧光强度均匀度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 荧光强度均匀度 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 相对标准偏差 |
| FAM | 4721 | 4628 | 5013 | 5264 | 5057 | 4258 | 4848 | 4805 | 5493 | 6.98% |
| HEX | 11028 | 11006 | 8993 | 10284 | 10247 | 11692 | 9680 | 9183 | 10738 | 8.24% |

表7 单管移孔多次检测的荧光强度均匀度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 荧光强度均匀度 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 相对标准偏差 |
| FAM | 4783  | 4818  | 4844  | 4796  | 4766  | 4734  | 4688  | 4653  | 4629  | 1.49% |
| HEX | 11408 | 10028 | 9936 | 10120 | 10396 | 10488 | 10028 | 10212 | 10120 | 4.12% |

### 2.5.2.3 荧光强度线性

**线性浓度范围的确定**

本文件征求意见稿给出了荧光线性检测的荧光参比溶液的配制稀释方法。由于不同仪器的线性范围不一样，我们在附录C提出先对较高浓度荧光参比溶液进行十倍稀释3~5个浓度进行预实验，选择最合适的浓度；再在荧光检测线性范围内，对高浓度荧光参比溶液进行两倍稀释。5个浓度梯度的荧光参比溶液的荧光强度相差16倍，补充了YY/T 1173-2010未明确的对荧光检测器的线性要求。

### 2.5.3整机性能

### 2.5.3.1不同通道荧光干扰

**检测方法的确定**

本文件征求意见稿采用高浓度DNA标准物质进行荧光定量PCR实验来确定有无干扰，以在其他通道的荧光信号值没有超过阈值线为无干扰。YY/T 1173-2010通过荧光染料溶液进行试验，要求非目标通道的荧光值不能超过其荧光阈值，由于荧光阈值难以界定，而且有部分仪器通过软件设计荧光串扰修正功能，所以本文件征求意见稿用荧光定量PCR实验来确定经过仪器自带软件修正过的数据来确定有无通道间的荧光干扰更为合适。

### 2.5.3.2仪器线性

**线性浓度范围的确定**

本文件征求意见稿规定了线性检测的DNA标准物质的具体要求：不少于6个梯度，需10倍浓度梯度，而且最小定量浓度为101 Copies/μL。因为一般荧光定量PCR实验的DNA浓度范围是101 Copies/μL ~ 106 Copies/μL，所以本文件对仪器的性能检测明确了这一要求。相比YY/T 1173-2010规定的5个梯度10倍或5倍数稀释，对仪器提出了更严格的要求。

### 2.5.3.3置信度

**检测浓度的确定**

精确区分两个相近浓度DNA样本的能力是进口仪器常见的性能评价指标，为了推动国产荧光定量PCR仪参与国际竞争，本文件征求意见稿规定这一性能指标。采用中浓度（103 Copies/μL ~ 104 Copies/μL）的DNA标准物质溶液进行检测，DNA标准物质的不确定度相对较小，各测试孔中的实际DNA浓度能够保持一致的，使得该项的检测结果受试剂的影响更小，更能体现出仪器自身的性能。

能区分2倍浓度差的DNA样本是对荧光定量PCR实验的基本要求，而新一代进口仪器已经能够精确区分1.5倍浓度差的DNA样本，精确区分更相近浓度的DNA样本对标准物质溶液和检测试剂的要求就越高，所以本文件征求意见稿规定仪器浓度关系为1.3倍~2倍。

**计算方法的确定**

以2个浓度DNA标准物质测得的Ct值作为两组应具有显著性差异的数据，由于两组Ct值为随机抽样数据符合正态分布，根据生物统计学先进行方差齐性分析，再进行均值比较。

### 2.5.3.4定量重复性

**计算方法的确定**

定量重复性属于检测的精确度评价，选择中浓度进行试验的理由在2.5.3.3已经阐述。由于荧光定量PCR是用标准曲线实现DNA样本的定量，该标准曲线由Ct值与DNA浓度的对数值绘制，所以本文件征求意见稿规定用通过标准曲线得出的DNA浓度对数值来计算重复性。

### 2.5.3.5定量示值误差

**计算方法的确定**

定量示值误差属于检测的正确度评价，同样用DNA浓度的对数值来计算。计算方法参考了JJF 1527-2015，为了排除DNA浓度大小的影响，采用相对偏差来表示示值误差。

# 3.验证试验及结果

按照本文件征求意见稿的试验方法，工作组选用7台国内代表性仪器：百源基因ASA-9600、西安天隆Gentier 96E、上海宏石SLAN-96s、杭州博日FQD-96C、鲲鹏基因ArchimiedX4、杭州晶格X960和苏州雅睿MA-6000；以及3台进口代表性仪器：Bio-Rad CFX-96、ABI 7500和Roche Light Cy、于2021年7月10日至14日在苏州集中进行验证。本次实验使用的仪器与试剂：计量标准专用温度数据采集仪由上海计量院提供，DNA标准品为鸭源性基因和引物探针由中国检验检疫科学研究院提供，qPCR预混液（ABI，4444557）、FAM荧光染料（源叶生物,S50510）、HEX荧光染料（源叶生物，S22167）、ROX荧光染料（麦克林，C832396）、Cy5荧光染料（源叶生物，S61728）。试验结果如下。

## 3.1温度控制

## 3.1.1平均升降温速率

本文件征求意见稿规定平均升温降速率不小于1.5 ℃，与YY/T 1173-2010一致。9台仪器都能达到此要求。

表8 九台仪器平均升温降速率的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 性能参数 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 平均升温速率（℃/s） | 2.0 | 4.9 | 2.7 | 3.6 | 2.7 | 4.4 | 2.7 | 3.3 | 3.4 |
| 平均降温速率（℃/s） | 1.8 | 3.4 | 1.8 | 2.8 | 2.9 | 2.9 | 2.3 | 2.8 | 2.6 |

## 3.1.2温度波动度

本文件征求意见稿规定温度的波动不大于0.2 ℃，较YY/T 1173-2010不大于0.5 ℃更为严格。根据9台仪器的验证数据，绝大多数仪器都能达到此要求，仅一台进口仪器未能达标。此项参数的严格要求有利于高分辨率熔解曲线方法的应用。

表9 九台仪器温度波动度的验证结果（单位：℃）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 性能参数 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 温度波动度（45℃） | 0.11  | 0.03  | 0.04  | 0.12  | 0.08  | 0.07  | 0.17  | 0.09  | 0.26 |
| 温度波动度（72℃） | 0.10  | 0.01  | 0.03  | 0.05  | 0.05  | 0.03  | 0.10  | 0.08  | 0.44 |
| 温度波动度（95℃） | 0.08  | 0.00  | 0.04  | 0.07  | 0.03  | 0.01  | 0.09  | 0.04  | 0.29 |

## 3.1.3温度示值误差

本文件征求意见稿规定温度示值误差不大于0.5 ℃，与YY/T 1173-2010一致。根据9台仪器的验证数据，绝大多数仪器都能达到此要求，仅一台进口仪器未能达标。

表10 九台仪器温度示值误差的验证结果（单位：℃）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 性能参数 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 温度示值误差（45℃） | 0.5 | 0.1 | 0.04 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | -0.28 | 0.5 | 0.79 |
| 温度示值误差（72℃） | 0.1 | 0.1 | 0.06 | 0.3 | 0.3 | 0.1 | -0.30 | 0.4 | 0.52 |
| 温度示值误差（95℃） | 0.5 | 0.1 | 0.13 | 0.4 | 0.4 | 0.0 | -0.46 | 0.3 | 0.55 |

## 3.1.4温度均匀度

本文件征求意见稿规定温度均匀度不同孔位同一时刻温度差值在1℃范围内，与YY/T 1173-2010一致。根据9台仪器的验证数据，绝大多数仪器都能达到此要求，仅一台进口仪器未能达标。

表11 九台仪器温度均匀度的验证结果（单位：℃）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 性能参数 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 温度均匀度（45℃） | 0.8 | 0.15 | 0.111 | 0.58 | 0.52 | 0.67 | 0.41 | 0.35 | 0.65 |
| 温度均匀度（72℃） | 0.46 | 0.38 | 0.685 | 0.52 | 0.58 | 0.28 | 0.4 | 0.28 | 0.82 |
| 温度均匀度（95℃） | 0.54 | 0.65 | 0.857 | 0.75 | 0.79 | 0.72 | 0.57 | 0.52 | 1.1 |

## 3.1.5温度持续时间准确度

本文件征求意见稿规定温度持续时间与设置温度时间的相对偏差在5 %范围内，与YY/T 1173-2010一致。根据9台仪器的验证数据，绝大多数仪器都能达到此要求，仅一台国产仪器未能达标。

表12 九台仪器温度均匀度的验证结果（单位：℃）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 温度持续时间准确度 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 相对偏差（%） | 3.89 | 5.55 | 4.17 | 1.11 | 0.28 | 1.67 | 0.56 | 3.33 | 0.56 |

## 3.2荧光检测

## 3.2.1荧光强度重复性

本文件征求意见稿规定重复性检测的相对标准偏差不大于2%。根据9台仪器的验证数据，绝大多数仪器都能达到此要求，YY/T 1173-2010对此项的要求是高中低浓度的荧光检测均不大于3%，因为低浓度的重复性相对较差，因此本文件征求意见稿对中浓度荧光重复性的要求也是适度的严格。

表13 九台仪器荧光强度重复性的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 荧光参比物质 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| FAM | 1.31% | 0.33% | 0.06% | 0.90% | 0.09% | 0.67% | 0.3% | 0.94% | 0.77% |
| HEX | 0.35% | 0.44% | 0.04% | 1.10% | 0.16% | 0.78% | 0.1% | 0.92% | 2.57% |
| ROX | 1.83% | 0.71% | 0.62% | 0.34% | 0.26% | 0.65% | 0.7% | 1.82% | 2.56% |
| Cy5 | 0.66% | 0.28% | 0.30% | 0.37% | 0.10% | 0.62% | 0.5% | 0.17% | 0.14% |

## 3.2.2荧光强度均匀度

本文件征求意见稿规定均匀度检测的相对标准偏差不大于5%。根据9台仪器的验证数据，大多数仪器都能达到此要求，有一台国产仪器和一台进口仪器未能到要求。

表14 九台仪器荧光强度均匀度的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 荧光参比物质 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| FAM | 5.59% | 3.51% | 3.64% | 4.7% | 4.36% | 3.85% | 1.24% | 5.00% | 11.46% |
| HEX | 5.70% | 2.55% | 3.88% | 4.0% | 3.81% | 3.56% | 1.59% | 3.84% | 10.33% |
| ROX | 6.00% | 3.05% | 4.04% | 4.3% | 4.33% | 4.37% | 1.45% | 4.08% | 5.36% |
| Cy5 | 6.20% | 2.51% | 4.52% | 4.1% | 4.32% | 4.60% | 2.14% | 2.49% | 9.04% |

## 3.2.3荧光强度线性

本文件征求意见稿参考YY/T 1173-2010对荧光线性的要求，“至少5个梯度浓度的荧光染料溶液的荧光测定值与稀释比例的线性回归相关系数r应不低于0.99”。经过9台仪器的验证，除一台进口仪器外均符合相关系数r应不低于0.990的要求。个别仪器实验时某种荧光参比物质浓度不合适，所以没有统计数据。

表15 九台仪器荧光强度线性相关系数r的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 荧光参比物质 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| FAM | 0.992 | 0.998 | 0.996 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.991 |
| HEX | 0.995 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | - |
| ROX | 0.999 | 0.999 | 0.999 | - | 0.999 | 0.999 | - | 0.997 | 0.985 |
| Cy5 | 0.993 | 0.999 | 0.995 | - | 0.998 | 0.999 | 0.998 | 0.993 | 0.986 |

## 3.3整机性能

## 3.3.1不同通道荧光干扰

本文件求意见稿规定不同通道荧光干扰的检测要求时目标通道结果判定为阳性，其他通道结果判定为阴性。经过9台仪器验证，国产和进口的1号仪器使用中高浓度的DNA标准物质，国产的2~5号仪器和进口的2号仪器使用高浓度的DNA标准物质，结果都符合要求。

表16 九台仪器不同通道荧光干扰的Ct值验证结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 荧光参比物质 | 荧光通道 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 |
| FAM | FAM | 22.28 | 18.17 | 17.86 | 17.77 | 17.87 | 17.71 | 18.41 |
| HEX | - | - | - | - | - | - | - |
| ROX | - | - | - | - | - | - | - |
| Cy5 | - | - | - | - | - | - | - |
| HEX | FAM | - | - | - | - | - | - | - |
| HEX | 26.27 | 16.54 | 16.20 | 16.41 | 18.18 | 26.74 | 16.54 |
| ROX | - | - | - | - | - | - | - |
| Cy5 | - | - | - | - | - | - | - |
| ROX | FAM | - | - | - | - | - | - | - |
| HEX | - | - | - | - | - | - | - |
| ROX | 26.59 | 16.82 | 16.45 | 16.37 | 19.18 | 26.40 | 17.06 |
| Cy5 | - | - | - | - | - | - | - |
| Cy5 | FAM | - | - | - | - | - | - | - |
| HEX | - | - | - | - | - | - | - |
| ROX | - | - | - | - | - | - | - |
| Cy5 | 26.84 | 16.90 | 16.41 | 16.39 | 20.36 | 26.97 | 17.17 |

## 3.3.2仪器线性

本文件征求意见稿要求至少6个梯度浓度的荧光染料溶液的荧光测定值与稀释比例的线性回归相关系数r应不低于0.990，较YY/T 1173-2010更为严格。根据10台仪器的验证数据，均符合相关系数r应不低于0.990的要求。

表17 十台仪器线性的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器线性 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 | 3 |
| 相关系数r | 0.999 | 0.996 | 0.999 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.999 |

## 3.3.3置信度

本文件征求意见稿规定2个相近浓度的DNA标准物质测得的Ct值具有显著差异的置信度应不低于99.9%。经过10台仪器的验证，采用两倍浓度的DNA标准物质，t值均大于t0.999(18)=3.61。

表18 十台仪器置信度的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 置信度 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 | 3 |
| t值 | 33.7 | 27.8 | 22.3 | 17.3 | 10.9 | 19.8 | 22.6 | 22.4 | 4.46 | 18.8 |

## 3.3.4定量重复性

本文件征求意见稿规定DNA样本的浓度对数值的相对标准偏差应不大于3%，与YY/T 1173-2010基本一致。根据10台仪器的验证数据，均满足要求。

表19 十台仪器定量重复性的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 定量重复性 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 | 3 |
| 相对标准偏差 | 0.76%1.12% | 0.71%0.44% | 0.62%0.58% | 1.28%0.48% | 1.75%1.18% | 1.08%0.98% | 0.68%0.69% | 2.36%3.00% | 0.95%0.22% | 0.89%0.42% |

## 3.3.5定量示值误差

本文件征求意见稿规定定量示值误差不大于试验用DNA标准物质不确定度的三倍，最大应不大于15％。本项的指标设定与DNA标准物质的不确定度相关，按照GB/T 37871-2019核酸检测试剂盒质量评价技术规范的规定定量偏差应在标准物质量值的不确定度范围内。参考YY/T 1182-2010核酸扩增检测用试剂（盒）的要求，定量试剂的批内精密度为检测浓度对数值的变异系数（CV,%）⩽5%，所以本项要求示值误差为不大于试验用DNA标准物质的三倍，最大应不大于15%。根据10台仪器的验证数据，均不大于2%。

表20 九台仪器定量示值误差的验证结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 验证结果 | 国产仪器 | 进口仪器 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 |
| 定量示值误差 | 1.46% | 0.08% | 1.00 | 0.93% | 0.51% | 0.83% | 0.39% | 1.98% | 1.84% |

# 4.采用国际标准和国外先进标准的程度

本标准未采用国际标准和国外标准。

# 5.与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准中引用了《GB 4793.1-2007》《GB 4793.6-2007》《GB 4793.9-2007》《GB/T 11606-2007》 《GB/T 13384-2008》《GB/T 14710-2009》《GB/T 18268.1-2010》《GB/T 18268.26-2010》《GB/T 34065-2017》和《YY 0648-2008》相关规定，保持一致；与相关的现行法律、法规和强制性国家标准没有冲突。

# 6.重大分歧意见的处理经过和依据

无。

# 7.国家标准作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议

建议作为推荐性国家标准。

# 8.贯彻国家标准的要求和措施建议

本标准一经发布，标准编制组首先将制定出《实时荧光定量PCR仪性能评价通则》标准实施建议方案；其次，在国标委及归口单位的协调下，组织标准的宣贯和集中培训，推进标准的顺利实施。

# 9.废止现行有关标准的建议

无。

# 10.其他应予说明的事项

无。