ICS 71.040.10

N 53



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|       |

实时荧光定量PCR仪性能评价通则

General principles for performance evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction analyzer

|  |
| --- |
|  |
|       |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施



前  言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由中国机械工业联合会提出。

本标准由全国工业过程测量和控制标准化技术委员会分析仪器分技术委员会（SAC/TC124/SC6）归口。

本标准起草单位：。

本标准主要起草人：。

实时荧光定量PCR仪性能评价通则

1. 范围

本标准规定了实时荧光定量PCR仪（以下简称仪器）的术语、定义、性能要求和评价方法。

本标准适用于实时荧光定量PCR仪的性能评价，其他PCR仪可以参考执行。

1. 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，仅所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 4793.1-2007 测量、控制和试验室用电气设备的安全要求 第1部分：通用要求

GB 4793.6-2008 测量、控制和试验室用电气设备的安全要求 第6部分：实验室用材料加热设备的特殊要求

GB4793.9-2013测量、控制和试验室用电气设备的安全要求 第9部分：实验室用分析和其他目的自动和半自动设备的特殊要求

GB/T 11606-2007 分析仪器环境试验方法

GB/T 13384-2008 机电产品包装通用技术条件

GB/T 14710-2009 医用电器环境要求及试验方法

GB/T 18268.1-2010 测量、控制和实验室用的电设备 电磁兼容性要求 第1部分：通用要求

GB/T 18268.26-2010 测量、控制和实验室用的电设备 电磁兼容性要求 第26部分：特殊要求体外诊断（IVD）医疗设备

GB/T 34065-2017 分析仪器的安全要求

YY 0648-2008测量、控制和实验室用电气设备的安全要求第2-101部分：体外诊断（IVD）医用设备的专用要求

1. 术语

下列术语和定义适用于本文件。

实时荧光定量PCR仪 Quantitative real-time polymerase chain reaction analyzer

基于聚合酶链式反应原理，通过温度变化循环程序进行靶核酸片段的体外扩增，同时对循环过程中荧光信号进行实时采集和处理，定量或定性分析靶核酸片段的装置。

置信度 Confidence

精确区分2个相近浓度的DNA标准物质的概率。

1. 要求
	1. 正常工作条件

仪器应在下列条件下正常工作：

1. 环境温度：15℃～30℃；
2. 相对湿度：不大于80%；
3. 供电电源：符合仪器额定电源电压；电源电压波动不超出标称电压的±10%;
4. 远离机械振动和冲击；
5. 无强电磁场干扰。
	1. 仪器外观

仪器的外观应满足如下要求：

1. 仪器的外观光洁，表面涂、镀层无明显剥落、擦伤、露底及污垢；
2. 所有铭牌及标志耐久清晰，内容符合相关法规、标准的要求；
3. 所有固件不得松动、各种调节件灵活，功能正常；
4. 零件表面不得锈蚀；
5. 仪器可拆部分能无障碍地拆装。
	1. 安全性要求

分析仪器应满足GB 4793.6-2008，GB 4793.9-2013和GB/T 34065-2017要求；医疗仪器应满足YY 0648-2008要求。

* 1. 环境适应性要求

分析仪器应满足GB/T 11606-2007要求（环境条件分组Ⅰ、Ⅱ）；医疗仪器应满足GB/T 14710-2009要求（环境条件分组Ⅰ、Ⅱ）。

* 1. 电磁兼容性要求

分析仪器应满足GB/T 18268.1要求；医疗仪器应满足GB/T 18268.26要求。

* 1. 性能要求
		1. 温度控制

4.6.1.1升温速率

平均升温速率不小于1.5 ℃/s。

4.6.1.2降温速率

平均降温速率不小于1.5 ℃/s。

4.6.1.3温度波动度

温度的波动不大于0.2 ℃。

4.6.1.4温度示值误差

设置温度与测定温度差值绝对值不大于0.5 ℃。

4.6.1.5温度均匀度

加热模块不同孔位同一时刻温度差值在1 ℃范围内。

4.6.1.6温度持续时间准确度

温度持续时间与设置温度时间的相对偏差在5 %范围内。

* + 1. 荧光检测

4.6.2.1荧光强度重复性

每个荧光通道的单孔荧光强度重复检测，相对标准偏差应不大于2%。

4.6.2.2 荧光强度均匀度

每个荧光通道的孔间荧光强度的相对标准偏差应不大于5%。

4.6.2.3 荧光强度线性

荧光参比物质各浓度的荧光强度值与稀释比例的线性回归相关系数r应不低于0.990。

* + 1. 整机性能

4.6.3.1 不同通道荧光干扰

目标通道结果判定为阳性，其他通道结果判定为阴性。

4.6.3.2 仪器线性

各浓度梯度的DNA标准物质测得的Ct值与浓度对数值的线性回归相关系数r的绝对值应不低于0.990。

4.6.3.3 置信度

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%。

4.6.3.4 定量重复性

DNA样本的浓度对数值的相对标准偏差应不大于3％。

4.6.3.5 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％。

1. 评价方法
	1. 仪器外观检验

以目视和手感进行测试。

* 1. 仪器安全性试验

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按GB/T 34065-2017相关项目及试验方法执行。其他安全性试验方法按GB 4793.1-2007相应试验方法执行。

医疗仪器安全性试验方法按GB 4793.1-2007相应试验方法执行。

* 1. 环境适应性试验

分析仪器按GB/T 11606-2007相应试验方法执行；医疗仪器按GB/T 14710-2013相应试验方法执行。

* 1. 电磁兼容性试验

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

* 1. 仪器的性能试验
		1. 温度控制

5.5.1.1 实验仪器和材料

5.5.1.1.1 计量标准专用温度数据采集仪：温度范围0℃-120℃，分辨率0.01 ℃，不确定度不大于0.1 ℃。5.5.1.1.2 矿物油等导热介质。

5.5.1.2 试验步骤

按仪器说明书预热，将计量标准专用温度数据采集仪的温控探头表面上涂抹适量的导热介质，放入待测样本反应孔中。测试孔位应在仪器中均匀分布（包含边角和中间的孔位，孔位排布参照附录B）；当仪器少于8孔，应全部测试；当仪器有8孔至48孔，应检测不少于8个；当仪器有48孔以上，应检测不少于12个。温控探头另一端连接数据采集仪，开启数据采集仪，确认数据采集仪正常。参照所评价仪器的说明书设置并运行45 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）的循环程序，3次循环；再运行45 ℃（1 min）、72 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）的循环程序，5次循环。用计量标准专用温度数据采集仪记录循环程序运行时相应的温度和时间。

注:当仪器温控模块为分区设置，各独立控温区域的孔位分布均按上述要求执行。

5.5.1.3 结果计算

5.5.1.3.1 升温速率

从45 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）的循环程序的第3次循环升温过程中，取最接近50 ℃的温度点，记为*T*a，取最接近90 ℃的温度点，记为*T*b，统计测试孔位温度的平均值，得出*T*a、*T*b以及从*T*a到达*T*b的时间*t*1，按照公式（1）计算平均升温速率（*V*1），结果应符合4.6.1.1。

$V\_{1}=\frac{T\_{b}-T\_{a}}{t\_{1}}$............................................................................. (1)

式中：

*V*1——平均升温速率，单位为摄氏度每秒（℃/s）；

*T*b——最接近90 ℃的温度点，单位为摄氏度（℃）；

*T*a——最接近50 ℃的温度点，单位为摄氏度（℃）；

*t*1 ——从*T*a到达*T*b的时间，单位为秒（s）。

5.5.1.3.2 降温速率

从45 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）的循环程序的第3次循环降温过程中，取最接近90 ℃的温度点，记为*T*c，取最接近50 ℃的温度点，记为*T*d，统计测试孔位温度的平均值，得出*T*c、*T*d以及从*T*c到达*T*d的时间*t*2，按照公式（2）计算平均降温速率（*V*2），结果应符合4.6.1.2。

$V\_{2}=\frac{T\_{c}-T\_{d}}{t\_{2}}$............................................................................ (2)

式中：

*V*2——平均降温速率，单位为摄氏度每秒（℃/s）；

*T*c——最接近90℃的温度点，单位为摄氏度（℃）；

*T*d——最接近50℃的温度点，单位为摄氏度（℃）；

*t*2 ——从Tc到达Td的时间，单位为秒（s）。

5.5.1.3.3 温度波动度

从45 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）、72 ℃（1 min）循环过程中，分别统计3个温度点在恒温后计时30 s内同一孔位的最高温度和最低温度，二者的差值的一半为Δ*T*p，统计测试孔位Δ*T*p的平均值，取5次循环Δ*T*p（p=1、2……5）的最大值应符合4.6.1.3。

5.5.1.3.4 温度示值误差

从45 ℃（1 min）、72 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）循环过程中，分别在3个温度点达到恒温后，间隔10 s记录一次温度，共记录5次*T*a(a=1、2……5)，测试孔位温度平均值与设定温度的差值记为Δ*T*a，统计5次循环得平均值，结果应符合4.6.1.4。

5.5.1.3.5温度均匀度

从45 ℃（1 min）、72 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）循环过程中，分别在3个温度点达到恒温后，间隔10 s记录一次温度，共记录5次，统计5次循环，同一时刻不同孔位测定温度的最大值与最小值的差值记为Δ*T*i(i=1、2……n)，Δ*T*i的最大值应符合4.6.1.5。

5.5.1.3.6 温度持续时间准确度

从45 ℃（1 min）、72 ℃（1 min）、95 ℃（1 min）循环过程中，以95 ℃±0.5 ℃为计时参考点，统计测试孔位的平均温度，自温度首次达到计时参考点以上开始计时，至温度降至计时参考点以下结束计时，记录时间为*t*p，统计5次循环的平均值*t*m，按公式（3）计算相对偏差（*RD*），结果应符合4.6.1.6。

$RD=\frac{\left|t\_{m}-60\right|}{60}×100\%$....................................................................... (3)

式中：

*RD*——持续时间的相对偏差；

*t*m——5次循环记录时间的平均值，单位为秒（s）。

* + 1. 荧光检测

5.5.2.1 实验仪器和材料

5.5.2.1.1 荧光参比物质：FAM、HEX、ROX、Cy5、Cy5.5等。荧光参比溶液的配制方法见附录C。

5.5.2.1.2 天平：感量0.1 mg。

5.5.2.1.2 微量移液器。

5.5.2.2 试验步骤

根据仪器的荧光检测通道，每个目标检测通道选择相应的荧光参比溶液进行检测。分别配制不少于5个浓度的荧光参比溶液（*C*1, *C*2, *C*3, *C*4, *C*5）。其中，重复性试验取中浓度（*C*3）荧光参比溶液放置于1个边角的孔位，在合适的恒定温度下（如37 ℃），连续采集该孔位在相应通道下的荧光强度值，从第三次检测开始记录不少于7次的荧光强度值。然后进行均匀度试验，使用*C*3溶液置于待测孔位，采集一次相应通道的荧光数据，或将*C*3溶液依次放置于待测孔位，每次都采集相应通道的荧光数据，检测孔位要求与5.5.1.2一致（当仪器少于8孔，应全部测试；当仪器有8孔至48孔，应检测不少于8个；当仪器有48孔以上，应检测不少于12个），孔位排布参照表B.2。最后检测荧光强度的线性，各种荧光参比溶液每个浓度选择3个孔位，采集一次相应通道的荧光数据，孔位排布参照表B.3。

5.5.2.3 结果计算

5.6.2.3.1 荧光强度重复性

分别计算每种荧光参比物质的同一孔位重复检测的荧光强度平均值M和标准差SD，根据公式（4）得出相对标准偏差RSD，结果应符合4.6.2.1。

$RSD=\frac{SD}{M}×100\%$..................................................................... (4)

式中：

*RSD*——相对标准偏差；

*SD*——标准差；

*M*—荧光强度的平均值。

5.6.2.3.2 荧光强度均匀度

分别计算每种荧光参比物质的测试孔位的荧光强度平均值M和标准差SD，根据公式（4）得出相对标准偏差RSD，结果应符合4.6.2.2。

5.6.2.3.3 荧光强度线性

分别计算每种荧光参比物质不少于5个浓度荧光强度的平均值，与稀释比例计算线性相关系数r，结果应符合4.6.2.3。

* + 1. 整机性能

5.5.3.1 实验仪器和材料

5.5.3.1.1 DNA标准物质：国家有证标准物质。包括线性标物，即十倍浓度梯度的DNA标准物质系列溶液，不少于6个浓度，最低浓度为101 Copies/μL；样本标物，即2个中浓度（103 Copies/μL ~ 104 Copies/μL）的DNA标准物质溶液，2个标物浓度为1.3倍~2倍关系。浓度应可溯源，稀释操作应采用天平。

5.5.3.1.2 荧光定量PCR检测试剂：Taq DNA聚合酶符合GB/T 35542-2017的要求，引物探针符合GB/T 34797-2017的要求，探针的荧光基团根据仪器的荧光检测通道确定。

5.5.3.2 试验步骤

根据仪器的荧光检测通道，每个目标检测通道选择相应的探针进行仪器线性的检测；根据仪器的检测范围，选取不少于6个浓度的线性标物，其它荧光定量PCR检测试剂均保持一致，每个浓度重复检测不少于3个孔。另选取2个浓度的样本标物，采用常用荧光通道的探针，每个浓度重复检测不少于10个孔。使用仪器所有通道采集荧光信号，记录每个样本检测孔的Ct值。

5.5.3.3 结果计算

5.5.3.3.1 不同通道荧光干扰

收集线性标物的高浓度检测孔位在所有荧光通道下的Ct值，结果应符合4.6.3.1。

5.5.3.3.2 仪器线性

收集线性标物在相应通道下的Ct值，取标物标称浓度的对数值与Ct值均值计算线性相关系数r，结果应符合4.6.3.2。

5.5.3.3.3 置信度

收集样本标物在相应通道下的Ct值，计算每个浓度不少于10个Ct值的平均值和方差，按下列步骤计算两组Ct值差异的置信度，结果应符合4.6.3.3。

1）先进行两组Ct值方差齐性检验，F检验，双侧；

2）再进行两组Ct值均值比较，若两方差齐，t检验，单侧；若两方差不齐，近似t检验，单侧。

5.5.3.3.4 定量重复性

通过5.5.3.3.2得到的标准曲线分别计算样本标物每个孔位的Ct值对应的DNA浓度对数值，得出平均值（*M*c）和标准差（*SD*c），按公式（4）计算相对标准偏差（*RSD*c），结果应符合4.6.3.4。

5.5.3.3.5 定量示值误差

通过5.5.3.3.4得到的平均值（*M*c），按公式（5）计算定量示值误差（*δ*），结果应符合4.6.3.5。

$δ=\frac{\left|M\_{c}-S\right|}{S}×100\%$ ..................................................................... (5)

式中：

*δ*——定量示值误差；

*M*c——浓度对数值的平均值,单位为拷贝数对数每微升（Lg Copies/μL）；

*S*——标准物质标称值的对数值,单位为拷贝数对数每微升（Lg Copies/μL）。

1. 评价报告

应出具仪器性能评价报告，报告内容应包括实验条件、评价对象、评价指标、评价内容、评价结果、评价机构、地点、时间等信息，并附评价试验的原始记录，评价统计汇总表和记录表的格式自行制定，但要包含以上内容。格式参见附录A。

附录A

（规范性）

报告格式示例

表A实时荧光定量PCR仪性能评价报告

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样机信息 | 样机名称及来源 |  |
| 仪器型号 |  |
| 样机编号 |  |
| 基本性能 | 安全性 |  |
| 环境适应性 |  |
| 电磁兼容性 |  |
| 评价结果 | 性能 | 指标 | 性能参数 |
| 温度控制 | 升温速率 |  |
| 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 |  |
| 荧光检测 | 荧光强度重复性 |  |
| 荧光强度均匀度 |  |
| 荧光强度线性 |  |
| 整体性能 | 不同通道荧光干扰 |  |
| 置信度 |  |
| 仪器线性 |  |
| 定量重复性 |  |
| 定量示值误差 |  |
| 评价单位 | 单位名称 |  |
| 评价人 |  |
| 评价日期 |  |

附录B

（资料性）

样本检测孔位排布

以整体控温96孔仪器为例，在以下孔位中进行温度控制性能的检测：



图B.1 温度控制性能的孔位分布图

以96孔4通道仪器为例，在以下孔位中进行荧光强度均匀度检测：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | FAM |  | HEX |  | ROX |  | Cy5 |  | FAM |  |  | ROX |
| B | HEX |  | ROX |  | Cy5 |  | FAM |  | HEX |  |  | Cy5 |
| C | ROX |  | Cy5 |  | FAM |  | HEX |  | ROX |  |  | FAM |
| D | Cy5 |  | FAM |  | HEX |  | ROX |  | Cy5 |  |  | HEX |
| E | FAM |  |  | ROX |  | Cy5 |  | FAM |  | HEX |  | ROX |
| F | HEX |  |  | Cy5 |  | FAM |  | HEX |  | ROX |  | Cy5 |
| G | ROX |  |  | FAM |  | HEX |  | ROX |  | Cy5 |  | FAM |
| H | Cy5 |  |  | HEX |  | ROX |  | Cy5 |  | FAM |  | HEX |

图B.2 荧光强度均匀度检测的孔位分布图

以96孔4通道仪器为例，在以下孔位中进行荧光强度线性检测：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | F-1 | F-1 | F-1 | F-2 | F-2 | F-2 | F-3 | F-3 | F-3 |  |  |  |
| B | F-4 | F-4 | F-4 | F-5 | F-5 | F-5 | F-6 | F-6 | F-6 |  |  |  |
| C | H-1 | H-1 | H-1 | H-2 | H-2 | H-2 | H-3 | H-3 | H-3 |  |  |  |
| D | H-4 | H-4 | H-4 | H-5 | H-5 | H-5 | H-6 | H-6 | H-6 |  |  |  |
| E | R-1 | R-1 | R-1 | R-2 | R-2 | R-2 | R-3 | R-3 | R-3 |  |  |  |
| F | R-4 | R-4 | R-4 | R-5 | R-5 | R-5 | R-6 | R-6 | R-6 |  |  |  |
| G | C-1 | C-1 | C-1 | C-2 | C-2 | C-2 | C-3 | C-3 | C-3 |  |  |  |
| H | C-4 | C-4 | C-4 | C-5 | C-5 | C-5 | C-6 | C-6 | C-6 |  |  |  |

图B.3 荧光强度线性检测的孔位分布图

F表示FAM，H表示HEX，R表示ROX，C表示Cy5，1~6表示浓度从低到高的溶液。

附录C

（资料性）

荧光参比溶液的制备方法

称取1.0 mg荧光参比物质，溶于1 mL水（如果在水中难以溶解，可加入DMSO增加溶解度），并稀释至0.001 mg/mL。十倍稀释3~5个浓度进行荧光检测的预实验，根据荧光强度值，选择合适的稀释度；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，配制不少于5个浓度梯度荧光参比溶液。稀释操作应采用天平，不宜完全依靠移液器。

表C荧光参比物质举例

|  |  |
| --- | --- |
| 荧光参比物质 | CAS登录号 |
| FAM | 92557-80-7/92557-81-8 |
| 6-HEX | 155911-16-3 |
| 6-ROX | 194785-18-7/216699-36-4 |
| Cy5 | 146368-15-2/146368-11-8/1032678-42-4 |
| Cy5.5 | 442912-55-2/1144107-80-1 |

参 考 文 献

[1] YY/T 1173-2010 聚合酶链反应分析仪

[2] JJF 1527-2015聚合酶反应分析仪