

中华人民共和国国家标准

GB/T 42753—2023

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

2023-05-23 发布

2023-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

| | |
|-------------------------------------|----|
| 前言 | I |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 缩略语 | 2 |
| 5 要求 | 2 |
| 5.1 工作条件 | 2 |
| 5.2 外观 | 2 |
| 5.3 安全性 | 2 |
| 5.4 环境适应性 | 3 |
| 5.5 电磁兼容性 | 3 |
| 5.6 性能要求 | 3 |
| 6 评价方法 | 4 |
| 6.1 外观检查 | 4 |
| 6.2 安全性试验 | 4 |
| 6.3 环境适应性试验 | 4 |
| 6.4 电磁兼容性试验 | 4 |
| 6.5 性能试验 | 4 |
| 7 评价报告 | 10 |
| 附录 A (资料性) 仪器升降温循环程序和样本测试孔位排布 | 11 |
| A.1 升降温循环程序 | 11 |
| A.2 温度控制性能试验的孔位排布 | 11 |
| A.3 荧光检测性能试验的孔位排布 | 11 |
| A.4 整机性能试验的孔位排布 | 13 |
| 附录 B (资料性) 荧光参比溶液的制备方法 | 14 |
| 附录 C (资料性) 两组数据显著差异的判断方法 | 15 |
| C.1 两组数据显著差异的判断方法 | 15 |
| C.2 F 分布分位数表 | 16 |
| C.3 t 分布分位数表 | 16 |
| 附录 D (资料性) 报告格式示例 | 17 |
| 参考文献 | 19 |

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国机械工业联合会提出。

本文件由全国工业过程测量控制和自动化标准化技术委员会(SAC/TC 124)归口。

本文件起草单位：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、中国计量科学研究院、上海市计量测试技术研究院、西安天隆科技有限公司、苏州雅睿生物技术股份有限公司、上海宏石医疗科技有限公司、杭州博日科技股份有限公司、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、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、安徽皖仪科技股份有限公司、黑龙江省计量检定测试研究院、麦成长(北京)生物技术有限公司、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、甘肃国研检验检测有限公司。

本文件主要起草人：邹明强、杜美红、薛强、车团结、李静雯、齐小花、高运华、梁文、王升、龚大江、汪秀军、秦荣、商晓辉、王梓、阮亮峰、邓中平、乔建勇、李景、郭彩虹、邓晨光、丁海铭、刘兴举、李博逸、赵屹、孙丽翠、宋薇、张莹、陈尔凝。

实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则

1 范围

本文件规定了实时荧光定量 PCR 仪的要求、评价方法和评价报告。

本文件适用于实时荧光定量 PCR 仪的性能评价,包括医用临床诊断用荧光定量 PCR 仪和一般分析用荧光定量 PCR 仪。其他基于聚合酶链式反应原理定量或定性分析靶核酸片段的装置参考本文件执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 11606 分析仪器环境试验方法

GB/T 14710 医用电器环境要求及试验方法

GB/T 18268.1 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 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

GB/T 34797 核酸引物探针质量技术要求

GB/T 35542 Taq DNA 聚合酶

YY 0648 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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

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仪器。

3.2

Ct 值 **Cycle threshold value**

每个 PCR 反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环次数。

3.3

恒温阶段 **thermostatic process**

仪器孔位平均温度达到设定值(偏差 ± 0.5 °C以内)且保持该温度的一段时间。

3.4

温度波动度 temperature fluctuation

仪器恒温阶段中,孔位的温度变化幅度。

3.5

温度均匀度 temperature uniformity

仪器恒温阶段中,各孔位之间的温度一致性。

3.6

荧光强度重复性 fluorescent repeatability

在相同温度和荧光条件下,仪器孔位的荧光强度重复检测值的一致性。

3.7

荧光强度均匀度 fluorescent uniformity

在相同温度和荧光条件下,仪器各孔位之间的荧光强度检测值的一致性。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

5 要求

5.1 工作条件

实时荧光定量 PCR 仪(以下简称仪器)在下列条件下应能正常工作。

- a) 环境温度:15 °C ~ 30 °C。
- b) 相对湿度:不大于 80%。
- c) 供电电源:符合仪器额定供电电压和频率;电源电压波动不超出±22 V,交流频率的变化在±1 Hz范围内。
- d) 工作环境无影响仪器性能的机械振动和冲击。
- e) 工作环境无影响仪器性能的电磁场干扰。

5.2 外观

仪器外观应满足如下要求:

- a) 外观平整、清洁,表面涂、镀层无明显剥落、擦伤、露底及污垢;
- b) 所有铭牌及标志耐久清晰,内容符合相关法规、标准的要求;
- c) 所有固件无松动,各种调节件灵活,功能正常;
- d) 零件表面无锈蚀;
- e) 仪器可拆部分能无障碍地拆装。

5.3 安全性

一般分析用荧光定量 PCR 仪(以下简称分析仪器)分析仪器应满足 GB/T 34065—2017 的要求,医用临床诊断用荧光定量 PCR 仪(以下简称医用仪器)医用仪器还应满足 YY 0648 的要求。

5.4 环境适应性

分析仪器应满足 GB/T 11606 的要求,医用仪器还应满足 GB/T 14710 的要求。

5.5 电磁兼容性

分析仪器应满足 GB/T 18268.1 的要求,医用仪器还应满足 GB/T 18268.26 的要求。

5.6 性能要求

5.6.1 温度控制性能

5.6.1.1 升温速率

在 50 °C~90 °C 范围内,平均升温速率应不小于 1.5 °C/s。

5.6.1.2 降温速率

在 50 °C~90 °C 范围内,平均降温速率应不小于 1.5 °C/s。

5.6.1.3 温度波动度

在恒温阶段,温度的波动应不超过 ± 0.2 °C。

5.6.1.4 温度示值误差

实际温度与设置温度之差应不超过 ± 0.5 °C。

5.6.1.5 温度均匀度

在恒温阶段,加热模块不同孔位同一时刻最大值与最小值之差应不大于 1 °C。

5.6.1.6 温度持续时间误差

温度的实际持续时间与设置时间的误差应不超过 ± 5 s。

5.6.2 荧光检测性能

5.6.2.1 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%。

5.6.2.2 荧光强度均匀度

每个荧光通道的孔间荧光强度,相对标准偏差应不大于 5%。

5.6.2.3 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。

5.6.3 整机性能

5.6.3.1 不同通道荧光干扰

仪器应判定相应目标通道结果为阳性或给出 Ct 值,其他通道结果为阴性或未检出。

5.6.3.2 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。

5.6.3.3 DNA 浓度区分度

置信水平 99.9% 时能有效分辨不同浓度 DNA 样本(浓度相差不大于 2 倍)的差异。

5.6.3.4 定量重复性

相同 DNA 样本在不同孔位测得的浓度对数值的相对标准偏差应不大于 2%。

5.6.3.5 定量示值误差

测得的 DNA 标准物质浓度对数值与标称浓度的对数值的相对误差应不超过 $\pm 15\%$ 。

5.6.3.6 稳定性

相同 DNA 样本在同一仪器上多次测得的 Ct 值的相对偏差应不大于 5%。

6 评价方法

6.1 外观检查

以目视和手感进行检查。

6.2 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、保护接地电阻的试验方法按 GB/T 34065—2017 第 5 章、6.2、6.3、6.4 执行；医疗仪器按 YY 0648 相应试验方法执行。

6.3 环境适应性试验

分析仪器按 GB/T 11606 相应试验方法执行，医疗仪器按 GB/T 14710 相应试验方法执行。

6.4 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。

6.5 性能试验

6.5.1 温度控制性能

6.5.1.1 仪器和材料

至少包括下列仪器和材料。

- a) 计量标准专用测温仪：可测量温度范围 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，分辨力 $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，示值误差在 $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内，采集频率不小于每秒一次。
- b) 矿物油等导热介质。

6.5.1.2 试验步骤

按仪器说明书预热,将计量标准专用测温仪的温控探头表面涂抹适量的导热介质,放入待测样本反应孔中。测试孔位在仪器中均匀分布(包含各方向边缘和中间的孔位,孔位排布参照图 A.1);当仪器少于 8 个孔时,应全部检测;当仪器具有 8 个孔至 48 个孔时,应检测不少于 8 个;当仪器具有 48 个孔以上时,应检测不少于 12 个。

开启测温仪,确认运行正常。参照仪器说明书设置并运行 45 °C(1 min)、95 °C(1 min)的循环程序,3 次循环;再运行 45 °C(1 min)、72 °C(1 min)、95 °C(1 min)的循环程序,5 次循环。用计量标准专用测温仪记录循环程序运行时相应的温度和时间。

当仪器温控模块为分区设置,各独立控温区域单独测试,孔位分布均按上述要求执行。

6.5.1.3 升温速率的计算

在 45 °C(1 min)、95 °C(1 min)循环程序的第 3 次循环升温过程中,计算各测试孔位每秒的温度平均值。取最接近 50 °C 的温度点,记为 T_a ,取最接近 90 °C 的温度点,记为 T_b ,得出 T_a 、 T_b 以及 T_a 到达 T_b 的时间 t_1 ,按照公式(1)计算平均升温速率。

$$V_1 = \frac{T_b - T_a}{t_1} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

V_1 ——平均升温速率,单位为摄氏度每秒(°C/s);

T_b ——各孔位温度平均值中最接近 90 °C 的温度点,单位为摄氏度(°C);

T_a ——各孔位温度平均值中最接近 50 °C 的温度点,单位为摄氏度(°C);

t_1 —— T_a 到达 T_b 的时间,单位为秒(s)。

6.5.1.4 降温速率的计算

在 45 °C(1 min)、95 °C(1 min)循环程序的第 3 次循环降温过程中,计算各测试孔位每秒的温度平均值。取最接近 90 °C 的温度点,记为 T_c ,取最接近 50 °C 的温度点,记为 T_d ,得出 T_c 、 T_d 以及 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)。

$$V_2 = \frac{T_c - T_d}{t_2} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

V_2 ——平均降温速率,单位为摄氏度每秒(°C/s);

T_c ——各孔位温度平均值中最接近 90 °C 的温度点,单位为摄氏度(°C);

T_d ——各孔位温度平均值中最接近 50 °C 的温度点,单位为摄氏度(°C);

t_2 —— T_c 到达 T_d 的时间,单位为秒(s)。

6.5.1.5 温度波动度的计算

在 45 °C(1 min)、72 °C(1 min)、95 °C(1 min)循环程序中,分别在 3 个温度点进入恒温阶段 15 s 后开始计时,统计 30 s 内同一孔位的最高温度和最低温度,其差值的一半为该测试孔位的温度波动度,按照公式(3)计算。

$$\Delta T_k = \frac{T_{k\max} - T_{k\min}}{2} \dots\dots\dots(3)$$

式中：

ΔT_k ——第 k 个测试孔位的温度波动度，单位为摄氏度(°C)；

$T_{k\max}$ ——第 k 个测试孔位的恒温 30 s 内温度的最大值，单位为摄氏度(°C)；

$T_{k\min}$ ——第 k 个测试孔位的恒温 30 s 内温度的最小值，单位为摄氏度(°C)。

计算全部测试孔位 ΔT_k 的平均值，取 5 次循环的最大值，并在数值前面冠以“±”符号，作为温度波动度。

6.5.1.6 温度示值误差的计算

在 45 °C (1 min)、72 °C (1 min)、95 °C (1 min) 循环程序中，分别在 3 个温度点进入恒温阶段 15 s 时采集 1 次温度，之后每隔 10 s 采集温度，按照公式(4)计算测试孔位温度平均值与设置温度的差值。

$$\Delta T_e = \frac{\sum_{k=1}^n T_k}{n} - T_s \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中：

ΔT_e ——某一时刻温度示值误差，单位为摄氏度(°C)；

T_k ——第 k 个孔位测得的温度，单位为摄氏度(°C)；

n ——测试孔位数，单位为个；

T_s ——设置温度(45 °C、72 °C 或 95 °C)，单位为摄氏度(°C)。

单次循环共采集 5 次温度，计算 ΔT_e 的平均值，取 5 次循环 ΔT_e 平均值的绝对值最大值，作为温度示值误差。

6.5.1.7 温度均匀度的计算

在 45 °C (1 min)、72 °C (1 min)、95 °C (1 min) 循环程序中，分别在 3 个温度点进入恒温阶段 15 s 时采集 1 次温度，之后每隔 10 s 采集温度，按照公式(5)计算不同孔位最高温度与最低温度的差值。

$$\Delta T_i = T_{i\max} - T_{i\min} \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中：

ΔT_i ——某一时刻不同孔位最高温度与最低温度的差值，单位为摄氏度(°C)；

$T_{i\max}$ ——某一时刻 n 个测试孔位测得温度的最大值，单位为摄氏度(°C)；

$T_{i\min}$ ——某一时刻 n 个测试孔位测得温度的最小值，单位为摄氏度(°C)。

单次循环共采集 5 次温度，统计 5 次循环，共计算 25 次 ΔT_i ，取最大值作为温度均匀度。

6.5.1.8 温度持续时间误差的计算

在 45 °C (1 min)、72 °C (1 min)、95 °C (1 min) 循环程序中，以 94.5 °C 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_h ，共记录 5 次循环的持续时间，按公式(6)计算持续时间误差。

$$\Delta t = \frac{\sum_{h=1}^5 t_h}{5} - 60 \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中：

Δt ——温度持续时间误差，单位为秒(s)；

t_h ——第 h 次循环的记录时间，单位为秒(s)。

6.5.2 荧光检测性能

6.5.2.1 仪器和材料

除分子生物学实验室常规设备材料外,其他需要的设备和材料如下。

- a) 荧光参比物质:6-羧基荧光素(6-FAM)、6-羧基六氯荧光素(6-HEX)、6-羧基-X-罗丹明(6-ROX)、花青素 5(Cy5)等,荧光参比溶液的配制方法见附录 B。
- b) 天平:最小分度值不大于 0.1 mg,Ⅰ级。
- c) 微量移液器:量程为 20 μL 和 100 μL ,最小刻度 0.1 μL 。

6.5.2.2 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(C_1, C_2, C_3, C_4, C_5)的荧光参比溶液。

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 $^{\circ}\text{C}$),连续采集该孔位在相应通道下的荧光强度值,从第 3 次检测开始连续记录 7 次的荧光强度值。

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 6.5.1.2 一致,孔位排布参照表 A.2。

荧光强度线性试验,在各种荧光参比溶液中每个浓度选择 3 个孔位,采集一次相应通道的荧光数据,孔位排布参照表 A.3。当仪器少于 16 个孔时,每种浓度荧光参比溶液应检测 1 个或 2 个孔位。

6.5.2.3 荧光强度重复性的计算

采集每种荧光参比物质的同一孔位重复检测的荧光强度值,计算 7 次重复检测的荧光强度值的平均值,按照公式(7)分别计算每种荧光参比物质重复检测的相对标准偏差。

$$R_1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^7 (F_i - \bar{F})^2}{6}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(7)$$

式中:

R_1 ——每种荧光参比物质重复检测的相对标准偏差;

F_i ——第 i 次测得的荧光强度值;

\bar{F} ——同一孔位重复检测 7 次的荧光强度值的平均值。

6.5.2.4 荧光强度均匀度的计算

采集每种荧光参比物质各测试孔位的荧光强度值,分别计算各测试孔位荧光强度值的平均值,根据公式(8)分别计算每种荧光参比物质的各测试孔位的荧光强度值相对标准偏差。

$$R_p = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (F_k - \bar{F}_p)^2}{m-1}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(8)$$

式中:

R_p ——每种荧光参比物质 m 个测试孔位荧光强度值的相对标准偏差;

m ——每种荧光参比物质的测试孔位数;

F_k ——第 k 个检测孔位测得的荧光强度值；

\overline{F}_p ——每种荧光参比物质 m 个测试孔位荧光强度值的平均值。

6.5.2.5 荧光强度线性的计算

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)。

6.5.3 整机性能

6.5.3.1 仪器和材料

除分子生物学实验室常规设备材料外，其他设备和材料如下。

- a) **DNA 标准物质**：国家有证标准物质，包括线性标物和样本标物，线性标物为 10 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 10^1 copies/ μ L；样本标物为 2 个中浓度 (10^3 copies/ μ L~ 10^4 copies/ μ L) 的 DNA 标准物质溶液，二者浓度相差不大于 2 倍，宜采用重量法稀释。
- b) **荧光定量 PCR 检测试剂**：Taq DNA 聚合酶符合 GB/T 35542 的要求，引物探针符合 GB/T 34797 的要求，探针的荧光基团根据仪器的荧光检测通道确定。
- c) **天平**：最小分度值不大于 0.1 mg，**Ⅰ**级。
- d) **微量移液器**：量程为 10 μ L、20 μ L 和 100 μ L，最小刻度为 0.1 μ L。

6.5.3.2 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，其他荧光定量 PCR 检测试剂均保持一致，每个浓度重复检测 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 7 个孔；孔位排布参照表 A.4。当仪器具有 8 个孔至 16 个孔时，每种浓度的线性标物应检测 1 个或 2 个孔位，每种浓度的样本标物应重复不少于 4 个孔位；当仪器少于 8 个孔时，应进行重复性试验，不宜进行区分度和线性试验。根据 DNA 标准物质和荧光定量 PCR 检测试剂的说明书设置温度循环程序，使用仪器所有通道采集荧光信号，记录每个测试孔位的 Ct 值。从重复性试验测试孔位中选择 3 个孔位，采用相同浓度的样本标物和试剂，再重复 2 次即为该仪器的稳定性试验。

6.5.3.3 不同通道荧光干扰

采集线性标物的最高浓度和最低浓度测试孔位在所有荧光通道下的检测结果。

6.5.3.4 仪器线性的计算

计算各浓度线性标物在相应通道下 Ct 值的平均值，用标物标称浓度的对数值与该 Ct 值均值拟合标准曲线，计算线性相关系数 r 。

6.5.3.5 DNA 浓度区分度的计算

采集 2 个浓度样本标物在相应通道下 Ct 值，分别计算平均值，再按照公式(9)分别计算方差。

$$S^2 = \frac{\sum_{c=1}^x (X_c - \overline{X})^2}{x - 1} \dots\dots\dots(9)$$

式中：

S^2 —— 样本标物 x 个测试孔位 Ct 值的方差；

x —— 每个样本标物的测试孔位数；

X_c —— 第 c 个测试孔位的 Ct 值；

\bar{X} —— 样本标物 x 个测试孔位 Ct 值的平均值。

验证两组 Ct 值在置信水平 99.9% 时是否有显著差异，具体方法见附录 C。

6.5.3.6 定量重复性的计算

通过 6.5.3.4 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，计算样本标物 DNA 浓度对数值的平均值，按公式(10)计算相对标准偏差。

$$R_c = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{c=1}^x (M_c - \bar{M})^2}{x-1}}}{\bar{M}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(10)$$

式中：

R_c —— 样本标物 x 个测试孔位 DNA 浓度对数值的相对标准偏差；

x —— 样本标物的测试孔位数，单位为个；

M_c —— 第 c 个孔位测得的 DNA 浓度对数值；

\bar{M} —— 样本标物 x 个测试孔位 DNA 浓度对数值的平均值。

6.5.3.7 定量示值误差的计算

通过 6.5.3.6 得到的样本标物 DNA 浓度对数值的平均值(\bar{M})，按公式(11)计算定量示值误差。

$$\delta = \frac{\bar{M} - \lg D}{\lg D} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(11)$$

式中：

δ —— 定量示值误差；

\bar{M} —— 浓度对数值的平均值；

D —— 标准物质标称值。

6.5.3.8 稳定性的计算

3 次重复试验中，计算每次试验 3 个测试孔位的 Ct 值平均值(\bar{X})，然后按公式(12)计算相对偏差。

$$B = \frac{3(\bar{X}_{\max} - \bar{X}_{\min})}{\bar{X}_{\max} + \bar{X}_{\text{mid}} + \bar{X}_{\min}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(12)$$

式中：

B —— 3 次试验各孔位 Ct 值平均值的相对偏差；

\bar{X}_{\max} —— 3 次试验各孔位 Ct 值平均值中的最大值；

\bar{X}_{mid} —— 3 次试验各孔位 Ct 值平均值中的中间值；

\bar{X}_{\min} —— 3 次试验各孔位 Ct 值平均值中的最小值。

7 评价报告

应出具仪器性能评价报告,报告内容应包括试验条件、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。格式参见表 D.1。

附录 A

(资料性)

仪器升降温循环程序和样本测试孔位排布

A.1 升降温循环程序

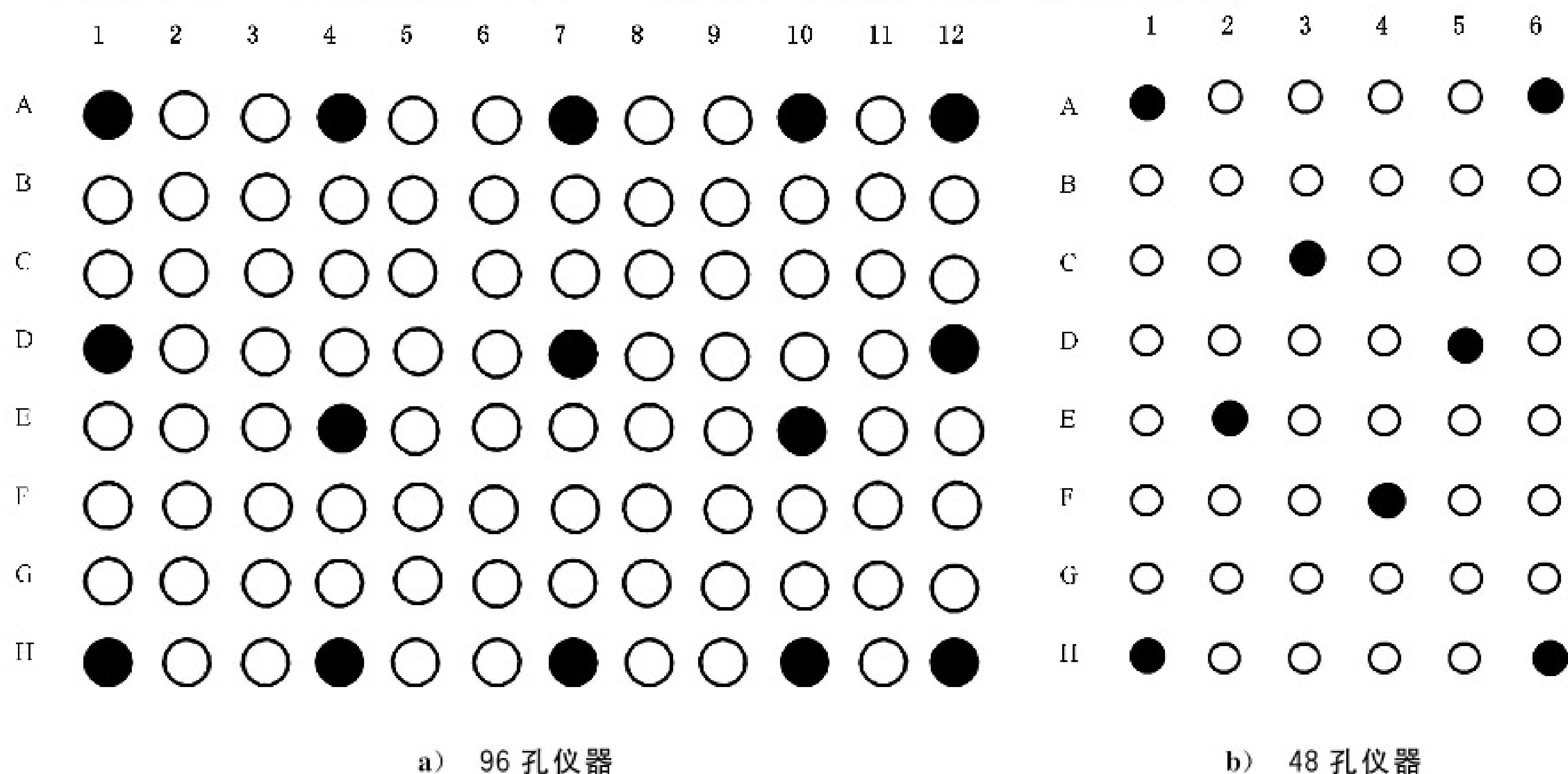
仪器的温度控制性能试验中升降温循环程序按表 A.1 进行。

表 A.1 升降温循环程序

| 步骤 | 设定温度/℃ | 持续时间/s | 循环次数 |
|----|--------|--------|-------|
| 1 | 45 | 60 | 3 次循环 |
| | 95 | 60 | |
| 2 | 45 | 60 | 5 次循环 |
| | 72 | 60 | |
| | 95 | 60 | |

A.2 温度控制性能试验的孔位排布

以整体控温 96 孔仪器为例,在图 A.1 所示孔位中进行温度控制性能的检测。



注:a)的来源为 JJF 1527—2015 的 7.2.1

图 A.1 温度控制性能试验的孔位分布图

A.3 荧光检测性能试验的孔位排布

以 96 孔 4 通道仪器为例,在图 A.2 所示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 |

注：FAM 代表荧光参比物质 6-FAM,HEX 代表荧光参比物质 6-HEX,ROX 代表荧光参比物质 6-ROX。

图 A.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,在图 A.3 所示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 | FAM-1 | FAM-1 | FAM-1 | FAM-2 | FAM-2 | FAM-2 | FAM-3 | FAM-3 | FAM-3 | — | — | — |
| B | FAM-4 | FAM-4 | FAM-4 | FAM-5 | FAM-5 | FAM-5 | FAM-6 | FAM-6 | FAM-6 | — | — | — |
| C | HEX-1 | HEX-1 | HEX-1 | HEX-2 | HEX-2 | HEX-2 | HEX-3 | HEX-3 | HEX-3 | — | — | — |
| D | HEX-4 | HEX-4 | HEX-4 | HEX-5 | HEX-5 | HEX-5 | HEX-6 | HEX-6 | HEX-6 | — | — | — |
| E | ROX-1 | ROX-1 | ROX-1 | ROX-2 | ROX-2 | ROX-2 | ROX-3 | ROX-3 | ROX-3 | — | — | — |
| F | ROX-4 | ROX-4 | ROX-4 | ROX-5 | ROX-5 | ROX-5 | ROX-6 | ROX-6 | ROX-6 | — | — | — |
| G | Cy5-1 | Cy5-1 | Cy5-1 | Cy5-2 | Cy5-2 | Cy5-2 | Cy5-3 | Cy5-3 | Cy5-3 | — | — | — |
| H | Cy5-4 | Cy5-4 | Cy5-4 | Cy5-5 | Cy5-5 | Cy5-5 | Cy5-6 | Cy5-6 | Cy5-6 | — | — | — |

注：荧光物质之后的数字 1~6 表示荧光参比物质浓度从低到高的溶液。

图 A.3 荧光强度线性检测的孔位分布图

A.4 整机性能试验的孔位排布

以 96 孔 4 通道仪器为例,在图 A.4 所示孔位中进行整机性能 qPCR 反应检测。

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

注：FAM、HEX、ROX 和 Cy5 表示探针上的荧光基团,其后的数字 1~6 表示线性标物的浓度从低到高的溶液,U-1 和 U-2 分别表示 2 个浓度的样本标物,用 FAM 荧光探针检测。

图 A.4 整机性能 qPCR 反应检测的孔位分布图

附录 B

(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 1.0 mL 水(如果在水中难以溶解,可加入二甲基亚砜等增加溶解度),并稀释至 0.001 mg/mL。再连续 10 倍稀释 3~5 个浓度,进行荧光检测的预实验,根据测得的荧光强度值,估计该仪器的荧光检测线性范围,选择合适的稀释度作为荧光参比物质溶液的最高浓度。以最高浓度的 100%、80%、60%、40%、20% 和 10% 的比例进行稀释,配制系列荧光参比溶液。宜采用重量法稀释,减少微量移液器进行体积稀释造成的误差。常见荧光参比物质见表 B.1。

表 B.1 荧光参比物质举例

| 序号 | 荧光参比物质 | CAS 登录号(包括衍生物) |
|----|-------------------|--------------------------------------|
| 1 | 6-羧基荧光素(6-FAM) | 3301-79-9/92557-81-8 |
| 2 | 6-羧基六氯荧光素(6-HEX) | 155911-16-3/2129651-79-0 |
| 3 | 6-羧基-X-罗丹明(6-ROX) | 194785-18-7/216699-36-4 |
| 4 | 花青素 5(Cy5) | 146368-15-2/146368-11-8/1032678-42-4 |
| 5 | 花青素 5.5(Cy5.5) | 210892-23-2/442912-55-2/1144107-80-1 |

附录 C

(资料性)

两组数据显著差异的判断方法

C.1 两组数据显著差异的判断方法

C.1.1 方差齐性检验

C.1.1.1 计算法

按公式(C.1)计算 F ：

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

 S_1^2, S_2^2 ——分别为 2 个样本标物的方差,且 S_1^2 不小于 S_2^2 。注：当计算得到 $F < 1$ 时,应调换两组数据的顺序。

置信水平为 95% 时,进行双侧检验,查表 C.1,自由度为 $x - 1$ (x 为样本含量,即测试孔数)。若 $F < F_{0.975}(x - 1)$,则两方差齐;若 $F \geq F_{0.975}(x - 1)$,则两方差不齐。

C.1.1.2 软件法

设置显著性水平 $\alpha = 0.05$ 进行双侧检验(只支持单侧检验时设置 $\alpha = 0.025$),若分析结果中概率 $P > 0.05$,则两方差齐;若 $P \leq 0.05$,则两方差不齐。

C.1.2 均值比较

C.1.2.1 计算法

按公式(C.2)计算 t ：

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{x}}} \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

 \bar{X}_1, \bar{X}_2 ——分别为 2 个样本标物 Ct 值的平均值； S_1^2, S_2^2 ——分别为 2 个样本标物 Ct 值的方差； x ——每个浓度样本标物的测试孔位数。若两方差齐,按公式(C.3)计算自由度 df ：

$$df = 2x - 2 \dots\dots\dots (C.3)$$

式中：

 x ——每个浓度样本标物的测试孔位数。若两方差不齐,按公式(C.4)和公式(C.5)计算自由度 df ：

$$g = \frac{S_1^2}{S_1^2 + S_2^2} \dots\dots\dots (C.4)$$

$$df = \frac{x - 1}{g^2 + (1 - g)^2} \dots\dots\dots (C.5)$$

式中：

S_1^2, S_2^2 ——分别为 2 个样本标物 Ct 值的方差；

x ——每个浓度样本标物的测试孔位数。

由于两组数据浓度大小已知，进行单侧检验，查表 C.2，在置信水平 99.9% 下，若 $t \geq t_{0.999}(df)$ ，则两组数据具有极显著差异；若 $t < t_{0.999}(df)$ ，则两组数据不具备极显著差异。

C.1.2.2 软件法

设置显著性水平 $\alpha = 0.001$ 进行单侧检验（只支持双侧检验时设置 $\alpha = 0.002$ ）。若分析结果中概率 $P \leq 0.001$ ，则两组数据具有极显著差异；若 $P > 0.001$ ，则两组数据不具备极显著差异。

C.2 F 分布分位数表

$F_{0.975}$ 单侧分位数见表 C.1。

表 C.1 F 分布分位数表 ($F_{0.975}$, 单侧)

| 自由度 ($x-1$) | | | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 15.4 | 9.60 | 7.15 | 5.82 | 4.99 | 4.43 | 4.03 | 3.72 | 3.47 | 3.28 |

C.3 t 分布分位数表

$t_{0.999}$ 单侧分位数见表 C.2。

表 C.2 t 分布分位数表 ($t_{0.999}$, 单侧)

| 自由度 (df) | | | | | | | | | |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 | 24 |
| 5.21 | 4.50 | 4.14 | 3.93 | 3.79 | 3.69 | 3.61 | 3.55 | 3.50 | 3.47 |

附 录 D
(资料性)
报告格式示例

仪器性能评价报告格式见表 D.1。

表 D.1 仪器性能评价报告

| | | | | |
|------|---------|---|-------------------------------------|-----|
| 样机信息 | 样机名称及来源 | | | |
| | 仪器型号 | | | |
| | 样机编号 | | | |
| 工作条件 | 环境温湿度 | | 供电电源 | |
| | | | | |
| 基本性能 | 外观 | | | |
| | 安全性 | 分析仪器:GB/T 34065 医用仪器:YY 0648 | 报告另附 | |
| | 环境适应性 | 分析仪器:GB/T 11606 医用仪器:GB/T 14710 | 报告另附 | |
| | 电磁兼容性 | 分析仪器:GB/T 18268.1 医用仪器:GB/T 18268.26 | 报告另附 | |
| 评价结果 | 性能 | 指标 | 性能要求 | 检测值 |
| | 温度控制 | 升温速率 | 不小于 1.5 °C/s | |
| | | 降温速率 | 不小于 1.5 °C/s | |
| | | 温度波动度 | 不超过 ±0.2 °C | |
| | | 温度示值误差 | 不超过 ±0.5 °C | |
| | | 温度均匀度 | 不大于 1 °C | |
| | | 温度持续时间准确度 | 不超过 ±5 s | |
| | 荧光检测 | 荧光强度重复性 | 相对标准偏差不大于 2% | |
| | | 荧光强度均匀度 | 相对标准偏差不大于 5% | |
| | | 荧光强度线性 | r 不低于 0.990 | |
| | 整机性能 | 不同通道荧光干扰 | 目标通道结果为阳性或给出 Ct 值, 其他通道结果为阴性或未检出 | |
| | | 仪器线性 | r 的绝对值不低于 0.990 | |
| | | DNA 浓度区分度 | 能区分浓度相差不 大于 2 倍的 DNA 样本 | |
| | | 定量重复性 | 相对标准偏差不大于 2% | |
| | | 定量示值误差 | 相对误差不超过 ±15% | |
| | | 稳定性 | 相对偏差不大于 5% | |

表 D.1 仪器性能评价报告（续）

| | | |
|----------|------|--|
| 评价 单位 | 单位名称 | |
| | 评价人 | |
| | 评价日期 | |

参 考 文 献

- [1] YY/T 1173—2010 聚合酶链反应分析仪
 - [2] JJF 1527—2015 聚合酶链反应分析仪校准规范
-