



中华人民共和国医药行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

数字聚合酶链反应分析系统

Digital Polymerase Chain Reaction Analysis System

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

发 布

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这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

数字聚合酶链反应分析系统

1 范围

本文件规定了数字聚合酶链反应分析系统（以下简称数字PCR）的术语和定义、分类和命名、要求、试验方法、标志和使用说明书、包装、运输和贮存等内容。

本文件适用于对核酸样本以单液滴或单核酸分子方式生成数百个至数百万个独立反应单元的设备，分析系统包括微液滴生成模块、聚合酶链反应模块和微滴检测模块等。

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 191 包装储运图示标志

GB 4793.1 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 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

GB 4793.9 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 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 29791.3 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示） 第3部分：专业用体外诊断仪器

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

数字聚合酶链反应 digital polymerase chain reaction

将核酸样本分散到成千上万个等体积反应单元中，反应单元中包含0个、1个或多个核酸分子，同时进行的聚合酶链反应。

一种无需标准曲线的核酸分子绝对定量技术，可直接给出DNA或RNA分子的拷贝数，是对起始核酸样品浓度的绝对定量。

3.2

数字聚合酶链反应分析系统 digital polymerase chain reaction analysis system

实现数字聚合酶链式反应及数据分析过程的仪器设备，具体步骤包括反应单元的生成、聚合酶链反应、反应单元的监测和核酸拷贝数浓度计算等。

3.3

泊松分布 poisson

数字聚合酶链式反应分析系统计算拷贝数浓度的数据统计的理论基础。计算一个反应单元中最初包含有0个、1个或多个目标的可能性的概率分布。

3.4

反应单元 partition

利用有限稀释法分割核酸，并进行聚合酶链反应，最后可以监测阳性或者阴性的亚反应体系，如微液滴、微腔室。

3.5

拷贝数浓度 copy number concentration

在一定的体积内含有目标基因的个数。

3.6

升降温控温精度 accuracy of thermos control

聚合酶链反应的升温或降温速率的准确度。

3.7

荧光强度重复性 repeatability of fluorescent intensity

检测同一荧光物质的荧光强度的一致性。

3.8

样本检测准确性 sample accuracy

数字聚合酶链反应分析系统检测核酸的绝对定量的准确度。

4 分类和命名

4.1 分类

数字聚合酶链反应分析系统主要由微滴生成模块、聚合酶链反应模块、微滴检测模块和数据分析模块组成。

根据数字PCR反应单元形式的不同，可以分为微滴式、芯片式和微孔板式等。

4.2 命名

数字聚合酶链反应分析系统分为样本制备仪、聚合酶链反应仪和生物（数字PCR）芯片阅读仪（分析仪）等构成。

5 要求

5.1 外观要求

仪器外观符合如下要求：

- 设备表面不应有明显的凹凸、划痕、脱漆，金属部位不应有锈蚀及机械损伤；
- 开关、按键应灵活、可靠，紧固件应紧固、无松动；
- 标志、符号应清晰、端正。

5.2 反应单元均匀性

5.2.1 反应单元数量

有效反应单元数量应不低于制造商的要求；

检测同一样本之间有效反应单元数量，其变异系数（CV，%）小于15%。

5.2.2 反应单元体积

反应单元体积应符合制造商要求；

反应单元体积的变异系数小于5.0%。

注：微孔板式数字聚合酶链反应分析系统为微孔填充体积。

5.3 温度控制

5.3.1 升降温控温精度：

应符合制造商说明书规定；
平均升降温速度绝对误差应不大于 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ；
或平均升降温速度相对误差应小于10%。

5.3.2 温度准确度

测定值与设定温度的差值应不大于 0.5°C 。

5.3.3 温度均匀性

应在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 范围内。

5.4 荧光强度重复性

用高、中、低浓度的校准染料重复检测，其荧光强度的相对标准偏差（RSD，%）应不大于10%。
注：应考虑检测位置对荧光强度的影响。

5.5 荧光干扰

非目标荧光通道检测到的荧光信号强度小于目标通道检测到的荧光信号的10%；

5.6 样本检测准确性

测定有量值溯源单位的标准物质或标准品的拷贝数浓度与规定样本的拷贝数浓度相对误差应不大于15.0%。

5.7 样本检测重复性

在仪器检测范围内，选取不少于10个重复，用高、中、低拷贝数浓度的样本进行检测，其变异系数（CV，%）应小于10%。

——高浓度不低于中浓度 10 倍；

——中浓度不低于低浓度 10 倍。

5.8 样本线性

对系列稀释梯度不同浓度的样本，至少5个梯度（ $10\text{ copies/test}\sim 10^5\text{ copies/test}$ ）进行检测，各浓度拷贝数值与浓度拷贝数的线性回归系数 r 的绝对值不低于0.980。

5.9 荧光线性

对系列稀释的荧光染料进行检测，至少5个梯度（应涵盖检测上限和下限），各浓度荧光测定值与稀释比例的线性回归系数 r 应不低于0.990。

5.10 软件功能

数字聚合酶链反应分析系统软件功能应至少包含仪器运行控制功能和信号实时采集功能两部分：

——仪器运行控制部分应能引导完成仪器运行和控制，并符合制造商的要求；

——信号实时采集软件应能完成荧光信号提取和处理，并符合制造商的要求。

5.11 安全要求

应符合GB 4793.1、GB 4793.6、GB 4793.9和YY 0648中相关规定。

5.12 电磁兼容性要求

应符合GB/T 18268.1和GB/T 18268.26中相关规定。

5.13 环境试验要求

应符合GB/T 14710中相关规定。

6 试验方法

6.1 外观

在自然光下，目测检查仪器外观，应符合4.1的要求。

6.2 反应单元均匀性

6.2.1 反应单元数量

应符合制造商说明书规定；随机选取 n ($n \geq 8$) 个通道或反应孔，相同体积反应液生成反应单元，光学系统收集信号，计算每个通道或反应孔有效的反应单元个数，根据公式(1)得出变异系数CV，结果符合5.2.1要求。

6.2.2 反应单元体积

应符合制造商说明书规定；随机选取 n ($n \geq 4$) 个通道或反应孔，相同体积反应液生成反应单元，光学显微镜下观察生成的反应单元，计算每个通道或反应孔不少于100个反应单元体积，其平均值应符合制造商规定，根据公式(1)得出变异系数CV，结果符合5.2.2要求。

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}_{\text{测量值}}} \times 100\% \quad (1)$$

SD ——测量值的标准差；

$\bar{X}_{\text{测量值}}$ ——实际测量值的均值。

6.3 温度控制

6.3.1 升降温控温精度：

根据产品说明书中的操作方法，编辑并运行一个在 45°C（或95°C）恒温 2min 和 95°C（或45°C）恒温 2min 之间循环的文件，并设置循环次数2次。将温度传感器的感温头外涂上适量导热介质（例：矿物油或导热硅脂等），放入样品台中（应尽量靠近仪器内部传感器）。另一端连接数据采集仪，开启数据采集仪，确认仪器工作正常，运行编辑的文件，用数据采集仪记录仪器显示温度到达设定温度，恒温10s后至循环程序结束这段时间内的温度变化。

取50°C±0.5°C（或90°C±0.5°C）范围内一温度点，温度记为 T_a ，取90°C±0.5°C（或50°C±0.5°C）范围内一温度点，温度记为 T_b ，从 T_a 到达 T_b 的时间记为 t ， T_s 为设定的平均升降温速率，按照公式(2)或(3)计算平均升温速率，结果应符合5.3.1的相关要求。

$$\text{控温精度} = \left| \frac{(T_b - T_a)}{t} - T_s \right| \quad (2)$$

$$\text{控温精度} = \left| \frac{(T_b - T_a)}{t \times T_s} - 1 \right| \times 100\% \quad (3)$$

6.3.2 温度准确度

根据产品说明书中的操作方法，编辑并运行一个温度循环文件，在 55°C±5°C、72°C±5°C、95°C±5°C 范围内各取一个温度点，设置恒温 2min。将温度传感器的感温头外涂上适量导热介质（例：矿物油或导热硅脂等），放入样品台中（应尽量靠近仪器内部传感器）。另一端连接数据采集仪，开启数据采集仪，确认仪器工作正常，运行编辑的文件，显示温度到达设定温度，恒温 10s 后，计时60s，每10s记录一次温度为 T_i ($i=1,2,\dots,6$)， T_i 值与设定温度 T_s 的差值 T_Δ 应符合 5.3.2的要求。

$$T_\Delta = |T_s - T_i| \quad (4)$$

6.3.3 温度均匀性

根据产品说明书中的操作方法，编辑并运行一个温度循环文件，在 55°C±5°C、72°C±5°C、95°C±5°C 范围内各取一个温度点，设置恒温2min，循环次数 5 次。将温度传感器的感温头外涂上适量导热介质

（例：矿物油或导热硅脂等），放入样品台中（应尽量靠近仪器内部传感器）。另一端连接数据采集仪，开启数据采集仪，确认仪器工作正常，运行编辑的文件，显示温度到达设定温度恒温10s后，计时60s，记录温度为 T_i ($i=1,2,\dots,n$)，在样品台上随机或均匀选取 n ($n\geq 6$) 个不同的位置，取 T_i 最大值与最小值，计算各位置的温度差值，结果应符合5.3.3的要求。

6.4 荧光强度重复性

光学系统收集目标通道的数据，分别计算10次同一荧光测试液的荧光信号均值，根据公式（5）得出荧光强度的相对标准偏差，结果均应符合5.5要求。

$$RSD = \frac{SD}{M} \times 100\% \quad (5)$$

式中：

RSD——相对标准偏差；

SD——标准偏差；

M——测量结果的平均值。

6.5 荧光干扰

分别对仪器中的检测通道（如FAM、HEX、ROX或CY5等）依次测试目标通道的荧光染料，光学系统搜集非目标通道的数据，结果应符合5.5的要求。

6.6 样本检测准确性

用基因检测试剂盒测试基因拷贝数定量标准物质或标准品，目标通道（FAM、HEX、ROX或CY5等）分别进行3次测量，取各通道3次测定值的平均值，按公式（6）计算各通道拷贝数的相对误差，结果应符合5.6的要求。

$$B = \left| \frac{\bar{X} - N}{N} \right| \times 100 \quad (6)$$

式中：

$\bar{X}$ — 测定值的平均值；

N — 标准物质标示值。

6.7 样本检测重复性

分别加入仪器目标通道（如FAM、HEX、ROX或CY5等）高、中、低浓度的样本。各通道分别对同一浓度各测定10次反应，分别计算同一通道各浓度测定值的算术平均值（ $\bar{x}$ ）和标准差（SD），按式（7）、（8）、（9）计算变异系数（CV，%）。结果应符合2.3.3的要求。

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (7)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (8)$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (9)$$

式中：

CV — 变异系数；

SD — 测定值的标准差；

$\bar{x}$ — 测定值的算术平均值；

x_i — 每次的测定值， $i=1\sim 10$ 。

6.8 样本线性

用已知浓度的标准品按照梯度稀释成5个浓度，对目标通道依次测试5个不同浓度的样本，每一浓度梯度平行测试3孔，计算同一样本的测定结果的平均值（ y ），以每一稀释梯度的浓度（ x ）为自变量，

以样本实际测定结果平均值（ y ）为因变量做线性回归，按式（10）计算线性回归系数，结果应符合5.8的要求。

6.9 荧光线性

目标通道的各通道荧光染料均按照梯度稀释成5个浓度，每一浓度梯度平行测试3孔；计算同一通道同一浓度染料的测定值的平均值（ y ），以稀释比例（ x ）为自变量，以荧光测定值的平均值为因变量（ y ），按式（10）计算线性回归系数，结果应符合5.9的要求。

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} \quad (10)$$

6.10 软件功能

目视仪器用户界面及手动操作，应符合5.10的要求。

6.11 安全要求

按照GB 4793.1、GB 4793.6、GB 4793.9和YY 0648规定的方法进行，结果应符合5.11的规定。

6.12 电磁兼容性要求

按照GB/T 18268.1和GB/T 18268.26规定的方法进行，结果应符合5.12的规定。

6.13 环境试验要求

按照GB/T 14710规定的方法进行，结果应符合5.13的规定。

7 标签和使用说明书

应符合GB/T 29791.3的规定。

8 包装、运输和贮存

8.1 包装

数字聚合酶链反应分析系统应按照GB/T 191的有关规定进行包装。
包装箱内应附有合格证、装箱单和产品使用说明书。

8.2 运输

数字聚合酶链反应分析系统应按制造商的要求运输。

8.3 贮存

数字聚合酶链反应分析系统应在制造商规定的条件下贮存。

参 考 文 献

[1] YY/T 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用

[2] MM3-P2 Molecular Diagnostic Methods for Infection Diseases;Proposed Guidline –Second Edition,CLSI,2005

[3] The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. Clin Chem.
