

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

RB

中华人民共和国认证认可行业标准

RB/T XXXXX—XXXX

检测仪器设备国产化验证评价指南 数字 PCR 仪

Guidance for verification and evaluation of domestic testing instrument-Digital PCR
instrument

(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

国家认证认可监督管理委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 概述	2
5 试剂及设备	2
6 验证与综合评价项目	2
6.1 安装条件及验评实施准备	2
6.2 基本性能	2
6.3 应用性能	8
6.4 综合评价（可选）	9
附录 A（资料性） 验证与综合评价原始记录参考格式	10
参考文献	14

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。

本文件由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次制定。

检测仪器设备国产化验证评价指南

数字 PCR 仪

1 范围

本标准规定了国产数字聚合酶链反应分析仪（以下简称“数字 PCR 仪”）验证与综合评价方法。本文件适用于使用数字 PCR 仪的检验检测机构开展该设备的性能评价，为设备生产商、检验检测机构及用户提供技术依据，旨在提升国产仪器的性能可靠性和国际竞争力，推动数字 PCR 技术的标准化应用与推广。

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。

YY/T 1173 聚合酶链反应分析仪

YY/T 1918 数字聚合酶链反应分析系统

JJF 2055 数字聚合酶链反应分析仪校准规范

GB/T 42077 生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 数字 PCR digital PCR (dPCR)

将核酸模板分布在多个等体积的反应单元中，每个反应单元包含或不包含一个或多个拷贝的靶序列（核酸模板），对靶序列进行 PCR 扩增，并对特定的 PCR 产物进行检测，再根据阳性反应单元的比例以及泊松分布原理，计算出靶序列的浓度或拷贝数。

注1：假设在分割过程中，核酸靶序列是随机且独立地分布在各个反应单元中。

注2：通常在热循环反应后对 PCR 产物的阳性分割和阴性分割的计数进行终点检测，也有一些dPCR平台可以对 PCR产物进行实时qPCR监测。

3.2 反应单元 reaction partition

反应单元即微液滴或微腔室，数字 PCR 检测体系被分割成的上万个微小液滴或腔室，每个单元可独立进行 PCR 反应。

3.3 泊松分布 poisson distribution

一种统计与概率学里常见到的离散概率分布，数字聚合酶链反应分析仪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 拷贝数浓度 copy number concentration

规定体积内含有特定核酸分子的数目，单位通常为 copies/ μ L 或 copies/test。

3.5 数字 PCR 仪 digital polymerase chain reaction (digital PCR) analyzer

实现数字聚合酶链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、反应单元的检测和核酸拷贝数浓度计算等。

4 概述

本标准对数字 PCR 仪的温度性能、荧光检测效果、反应单元以及应用性能进行验证并开展综合评价。

5 试剂及设备

5.1 试剂

5.1.1 核酸标准物质：采用 DNA 国家有证标准物质，其标准值 $\geq 10^4$ copies/ μL ，相对扩展不确定度 $\leq 10\%$ 。

5.1.2 荧光素标准物质：采用荧光素国家有证标准物质，其标准值 $\geq 3.0 \times 10^2$ nmol/L，扩展不确定度 $\leq 0.2 \times 10^2$ nmol/L。

5.1.3 实验用水：符合 GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》中一级水的规定要求，用于分子生物学试剂制备。

5.2 设备

5.2.1 温度测量装置：由若干个经计量校准的精密温度传感器、数据采集分析模块组成的校温仪，测温范围（0~120） $^{\circ}\text{C}$ ，温度校准装置测量不确定度 $\leq 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.2 显微镜：采用经计量校准的光学显微镜，显微物镜放大率误差 $\leq \pm 5\%$ 。

5.2.3 移液器：规格为 10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL ，经计量检定合格。

6 验证与综合评价项目

6.1 安装条件及验评实施准备

6.1.1 实验室温度应当控制在（15~30） $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $\leq 80\%$ 。

6.1.2 实验室环境不得存在强烈的机械振动和电磁干扰。

6.1.3 其他环境条件应满足厂家规定的使用条件。

6.2 基本性能

基本验评项目和指标要求见表1。

表1 数字 PCR 仪验评项目及指标要求

序号	性能	验评项目	指标要求
1	温度	温度示值误差	$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$
2		温度均匀度	$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$
3		温度波动度	$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$
4		平均升温速率（50 $^{\circ}\text{C}$ ~90 $^{\circ}\text{C}$ ）	$\geq 1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$
5		最大升温速率（50 $^{\circ}\text{C}$ ~90 $^{\circ}\text{C}$ ）	$\geq 2.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$
6		平均降温速率（90 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ ）	$\geq 1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$
7		最大降温速率（90 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ ）	$\geq 2.0^{\circ}\text{C}/\text{s}$
8	荧光检测	荧光通道串扰度	$\leq 10\%$
9		荧光强度重复性（CV，%）	$\leq 5\%$
10	反应单元	有效反应单元体积重复性（CV，%）	$\leq 5\%$
11		有效反应单元数量重复性（CV，%）	$\leq 15\%$
12	应用	拷贝数浓度相对示值误差	$\pm 10\%$
13		拷贝数浓度重复性（CV，%）	$\leq 10\%$

6.2.1 温度性能

6.2.1.1 温度示值误差

在仪器方法设置中编辑并运行程序，95℃ 预热 2 min，60℃ 恒温 2 min、72℃ 恒温 2 min 和 95℃ 恒温 2 min 之间循环，循环 5 次。将温度传感器放到模块的测试点（该测试点应尽量靠近仪器内部传感器）处，另一端连接数据采集器。开启数据采集，确认仪器正常工作，运行编辑程序，显示温度到达设定温度（以设定温度 ±1℃ 为计时参考点），恒温 10 s 后计时 30 s，之后记录 60℃、72℃ 和 95℃ 三个温度下测量值 T_c ，按公式（1）计算测量值和设定值的差值 ΔT_i 。连续记录 5 个循环，取其中的最大值作为仪器的温度示值误差 ΔT_{iMAX} 。

$$\Delta T_i = T_c - T_s \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ΔT_i ——测量值和设定值的差值，℃；

T_c ——60℃、72℃ 和 95℃ 三个温度下测量值，℃；

T_s ——设定值，℃；分别取 60℃、72℃ 和 95℃；

注： ΔT_{iMAX} 为单个温度设定值下的 ΔT_i 最大值，℃。

6.2.1.2 温度均匀度

按照 6.2.1.1 的热循环程序同步进行，布点示意图选取 PCR 模块的对应检测孔或位置（见图 1~4），取所有孔位温度平均值的最大值与最小值，计算各孔位的温度差值 ΔT 。连续记录 5 个循环，取其中的最大值作为温度均匀度。

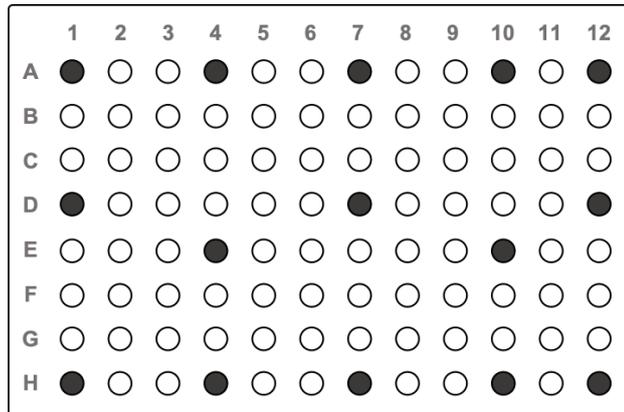


图1 96 孔加热测温示意图

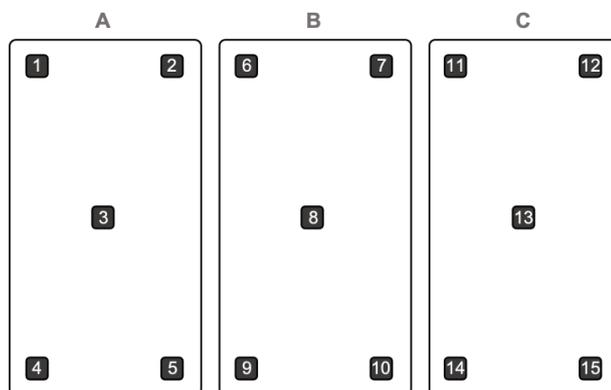


图2 三头平板加热测温示意图

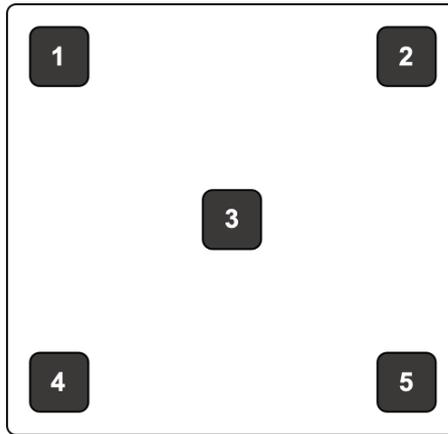


图3 单温控平台加热测温示意图

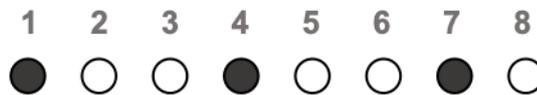


图4 八连排测温

6.2.1.3 温度波动度

测试仪器温度设定为 65℃ 时加热区域的温度波动度。待仪器温度稳定后，测试 10 min，隔 1 min 记录一次所有测温点温度传感器测量平均值，这些平均值极差的一半，冠以 ± 号表示温度的波动度。根据公式（2）计算温度的波动度。

$$\Delta T_W = \pm \frac{1}{2} (\bar{T}_{max} - \bar{T}_{min}) \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ΔT_W ——温度波动度，℃；

\bar{T}_{max} ——所有测温点温度传感器测量平均值中的最大值，℃；

\bar{T}_{min} ——所有测温点温度传感器测量平均值中的最小值，℃。

6.2.1.4 平均升温速率

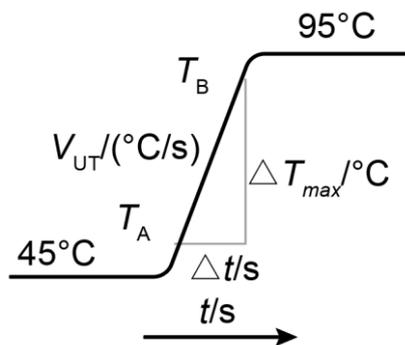


图5 升温速率计算模式图

在仪器操作界面中编辑并运行程序，45℃ 恒温 2 min和 95℃ 恒温 2 min 之间循环。将温度传感器放到模块的测试点（该测试点应尽量靠近仪器内部传感器）处，另一端连接数据采集器。开启数据采集，确认仪器正常工作，运行编辑程序，显示温度到达设定温度，监测恒温 10 s 后至恒温结束这段时间内的温度变化。

参考图 5，取 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点，温度记为 T_A ，取 $90\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点，温度记为 T_B ，从 T_A 到达 T_B 的时间记为 t ，按照公式 (3) 计算平均升温速率。

$$V_{UT} = \frac{T_B - T_A}{t} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

V_{UT} ——平均升温速率， $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ；

T_B —— $90\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_A —— $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点， $^{\circ}\text{C}$ ；

t ——从 T_A 到达 T_B 的时间， s 。

6.2.1.5 最大升温速率

参照平均升温速率测试编辑并运行升温测温程序，设置温度采集时间间隔为 Δt ， $\Delta t \leq 1\text{ s}$ 并尽可能足够小，参考图 5，扫描温度从 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升至 $90\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过程中的瞬时最大温度变化 ΔT_{MAX} ，按照公式 (4) 计算最大升温速率。

$$V_{UMAX} = \frac{\Delta T_{MAX}}{\Delta t} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

V_{UMAX} —— 最大升温速率， $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ；

ΔT_{MAX} —— 从 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升至 $90\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过程中的瞬时最大温度变化， $^{\circ}\text{C}$ ；

Δt —— 温度采集时间间隔， s 。

6.2.1.6 平均降温速率

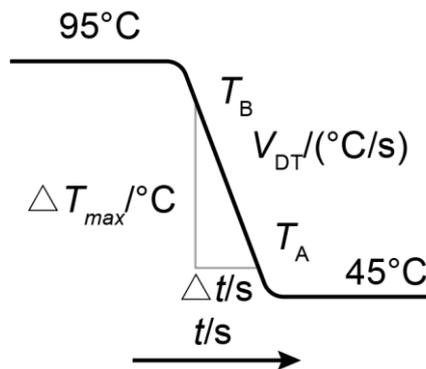


图6 降温速率计算模式图

在仪器操作界面中编辑并运行程序， $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温 2 min 和 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温 2 min 之间循环。将温度传感器放到模块的测试点（该测试点应尽量靠近仪器内部传感器）处，另一端连接数据采集器。开启数据采集，确认仪器正常工作，运行编辑程序，显示温度到达设定温度（以设定温度 $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为计时参考点），监测恒温 10 s 后至恒温结束这段时间内的温度变化。

参照图6，取 $90\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点，温度记为 T_A ，取 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内温度点，温度记为 T_B ，从 T_A 到达 T_B 的时间记为 t ，按照公式 (5) 计算平均降温速率。

$$V_{DT} = \frac{T_A - T_B}{t} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

V_{DT} ——平均降温速率， $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ；

T_A —— $90^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 范围内温度点, $^\circ\text{C}$ 。

T_B —— $50^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 范围内温度点, $^\circ\text{C}$ ；

t —— 从 T_A 到达 T_B 的时间, s。

6.2.1.7 最大降温速率

按照平均降温速率测试编辑并运行程序, 设置温度采集时间间隔为 Δt , $\Delta t \leq 1\text{s}$ 并尽可能足够小, 参照图 6, 扫描温度从 $90^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 降至 $50^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 过程中的瞬时最大温度变化 ΔT_{MAX} , 按照公式 (6) 计算最大降温速率。

$$V_{D\text{MAX}} = \frac{\Delta T_{\text{MAX}}}{\Delta t} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

$V_{D\text{MAX}}$ —— 最大降温速率, $^\circ\text{C}/\text{s}$;

ΔT_{MAX} —— 从 $90^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 降至 $50^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 过程中的瞬时最大温度变化, $^\circ\text{C}$;

Δt —— 温度采集时间间隔, s。

6.2.2 荧光检测性能

6.2.2.1 荧光通道串扰度

使用荧光素标准物质 (5.1.2) 检测不同荧光通道的荧光强度值, 分别记录各非目标荧光通道的荧光强度 F_U 与目标荧光通道的荧光强度 F_T 。每个荧光通道最少测试 6 次, 统计非目标荧光通道和目标荧光通道的荧光强度均值 \bar{F}_U 和 \bar{F}_T , 并按照公式 (7) 至公式 (9) 计算目标荧光通道的荧光强度串扰度 $F_{T/U}$ 。

$$\bar{F}_U = \frac{\sum F_{Ui}}{n} \dots\dots\dots (7)$$

$$\bar{F}_T = \frac{\sum F_{Ti}}{n} \dots\dots\dots (8)$$

$$F_{T/U} = \frac{\bar{F}_T}{\bar{F}_U} \times 100\% \dots\dots\dots (9)$$

式中:

\bar{F}_U —— 非目标荧光通道的荧光强度平均值;

F_U —— 非目标荧光通道的荧光强度值;

n —— 单个荧光通道的测试次数, 不少于 6 次。

\bar{F}_T —— 目标荧光通道的荧光强度平均值;

F_T —— 目标荧光通道的荧光强度值;

$F_{T/U}$ —— 荧光通道串扰度。

6.2.2.2 荧光强度重复性

在仪器测定范围内, 按 1:1、1:3、1:9 的比例对荧光素标准物质 (5.1.2) 进行梯度稀释, 形成高、中、低三个浓度。分别测试这 3 个浓度下每个荧光通道的信号强度, 每个浓度重复检测 10 次, 按照公式 (10) 至公式 (12) 计算荧光强度重复性 CV_R 。

$$\bar{x}_R = \frac{\sum_{i=1}^n x_{iR}}{n} \dots\dots\dots (10)$$

$$SD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{iR} - \bar{x}_R)^2}{n-1}} \dots\dots\dots (11)$$

$$CV_R = \frac{SD_R}{\bar{x}_R} \times 100\% \dots\dots\dots (12)$$

式中：

\bar{x}_R —— 10 次测定值的算术平均值；

x_{iR} —— 每次的测定值， $i=1\sim 10$ ；

SD_R —— 测定值的标准差；

CV_R —— 荧光强度重复性。

6.2.3 反应单元性能

6.2.3.1 有效反应单元体积重复性

扩增前，检测同一样本有效反应单元体积。将 DNA 国家有证标准物质（5.1.1）按照操作说明生成相应生成液。针对微液滴法，用移液枪吸取一定体积的生成液置于高分辨率显微镜下，随机选取 100 个微液滴，测算其体积；针对芯片微腔室法，加载荧光染料样本后，采用仪器自带成像系统或高分辨率显微镜获取微室阵列图像，随机选取 100 个微腔室，测算其体积。并按照公式（13）至公式（15）计算有效反应单元体积重复性。

$$M = \frac{\sum_{iv=1}^n x_{iv}}{n} \dots\dots\dots (13)$$

$$SD_V = \sqrt{\frac{\sum_{iv=1}^n (x_{iv} - \bar{x}_V)^2}{n-1}} \dots\dots\dots (14)$$

$$CV_V = \frac{SD_V}{M} \times 100\% \dots\dots\dots (15)$$

式中：

M —— 体积测量值的平均值；

x_{iv} —— 每份生成液（微液滴或微腔室）的体积测定值， $iv=1\sim 8$ ；

\bar{x}_V —— 8 份生成液体积测定值的算术平均值；

SD_V —— 有效反应单元体积标准差；

CV_V —— 有效反应单元体积重复性。

6.2.3.2 有效反应单元数重复性

扩增后，检测不少于 8 个重复样本的有效反应单元数量。利用分析仪计数平台，统计每个样本检测到的有效反应单元数，根据公式（16）至公式（18）计算有效反应单元数重复性。

$$M_F = \frac{\sum_{iF=1}^n x_{iF}}{n} \dots\dots\dots (16)$$

$$SD_F = \sqrt{\frac{\sum_{iF=1}^n (x_{iF} - \bar{x}_{iF})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (17)$$

$$CV_F = \frac{SD_F}{M} \times 100\% \dots\dots\dots (18)$$

式中：

M_F ——有效反应单元数的平均值；

x_{iF} ——每份反应液的有效反应单元数测定值， $iF=1\sim 8$ ；

\bar{x}_{iF} ——8份生成液测定值的算术平均值；

SD_F ——有效反应单元数标准差；

CV_F ——有效反应单元重复性。

6.3 应用性能

6.3.1 拷贝数浓度相对示值误差

使用 DNA 国家有证标准物质（5.1.1）测试拷贝数浓度误差，目标通道分别进行 3 次测量，取各通道 3 次测定值的平均值，按公式（19）计算各通道拷贝数浓度相对示值误差。

$$B = \frac{\bar{x}_S - N}{N} \times 100\% \dots\dots\dots (19)$$

式中：

\bar{x}_S ——测定值的平均值；

N ——标准物质标示值；

B ——拷贝数浓度相对示值误差。

6.3.2 拷贝数浓度重复性

使用 DNA 国家有证标准物质（5.1.1），选取高、中、低（如 20 000，2 000，200 copies/test）三组拷贝数浓度样本，每组检测 10 次。

待测设备加入高、中、低三组拷贝数浓度样本。各通道分别对同一浓度各测定 10 个反应，按照公式（20）至公式（22）分别计算拷贝数浓度重复性。

$$\bar{x}_{CP} = \frac{\sum_{iCP=1}^n x_{iCP}}{n} \dots\dots\dots (20)$$

$$SD_{CP} = \sqrt{\frac{\sum_{iCP=1}^n (x_{iCP} - \bar{x}_{CP})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (21)$$

$$CV_{CP} = \frac{SD_{CP}}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (22)$$

式中：

\bar{x}_{CP} ——10次测定值的算术平均值；

x_{iCP} ——每次的测定值， $i=1\sim 10$ ；

SD_{CP} ——拷贝数浓度测定值的标准差；

CV_{CP} —— 拷贝数浓度重复性。

6.4 综合评价（可选）

6.4.1 安装评价

需要时，可对产品运输和安装过程中发生故障和服务的描述和评价。

6.4.2 培训评价

需要时，可对培训内容和实际操作的全面性、针对性、专业性、应用案例等方面进行评价。

6.4.3 维修评价

需要时，可对维修服务的及时性、所需备件的提供速度、维修期间备用产品的提供情况进行描述和评价。

6.4.4 操作评价

需要时，可对仪器设备整体的易用性、容错性、可溯源性、扩展性、智能性、自动化水平、手工操作时间等进行描述和评价。

1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

2. 温度均匀度

加热台类型：96孔加温 三头平板 单温控平台 八连排

测定孔位	孔位温度差值 ΔT				
	循环 1	循环 2	循环 3	循环 4	循环 5
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

3. 温度波动度

$\Delta T_w =$

4. 平均升温速率

$T_A =$ °C $T_B =$ °C $t =$ s。

5. 最大升温速率

$\Delta T_{\max} =$ °C $\Delta t =$ s

6. 平均降温速率

$T_A =$ °C $T_B =$ °C $t =$ s。

7. 最大降温速率

$\Delta T_{\max} =$ °C $\Delta t =$ s

8. 荧光通道串扰度 (6 荧光通道)

通道编号	A	B	C	D	E	F
名称						

荧光强度	目标荧光通道
------	--------

		A	B	C	D	E	F
非目标荧光通道	A						
	B						
	C						
	D						
	E						
	F						

荧光通道串扰度： $CV_C =$ %

9. 荧光强度重复性（6 荧光通道）

10 次测定 数平均值 \bar{x}_R	荧光通道					
	A	B	C	D	E	F
低浓度						
中浓度						
高浓度						

荧光强度重复性 $CV_R =$ %

10. 有效反应单元体积重复性

体积均值	生成液编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M								

有效反应单元体积重复性 $CV_V =$ %

11. 有效反应单元数重复性

测量值	生成液编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M_F								

有效反应单元数重复性 $CV_F =$ %

12. 拷贝数浓度相对示值误差

目标通道	拷贝数浓度测定值 (copies/ μ L)		
	重复 1	重复 2	重复 3
A			
B			
C			
D			
E			
F			

拷贝数浓度相对示值误差 $B =$ %

13. 拷贝数浓度重复性

(1) 高浓度 DNA 国家有证标准物质标定值： Copies/ μ L

目标通道	拷贝数浓度测定值 (copies/ μ L)										CV_{CP}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A											

B											
C											
D											
E											
F											

(2) 中浓度 DNA 国家有证标准物质标定值: _____copies/ μ L

目标通道	拷贝数浓度测定值 (copies/ μ L)										CV_{CP}	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A												
B												
C												
D												
E												
F												

(3) 低浓度 DNA 国家有证标准物质标定值: _____copies/ μ L

目标通道	拷贝数浓度测定值 (copies/ μ L)										CV_{CP}	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A												
B												
C												
D												
E												
F												

校准员: _____ 核验员: _____

参 考 文 献

- [1] 《检验检测机构资质认定管理办法》（修正案）（国家质量监督检验检疫总局令第163号）
 - [2] 《检验检测机构监督管理办法》（国家市场监督管理总局令第39号）
-