



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1918—2023

数字聚合酶链反应分析系统

Digital polymerase chain reaction analysis system

2023-09-05 发布

2024-09-15 实施

国家药品监督管理局 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：北京市医疗器械检验研究院(北京市医用生物防护装备检验研究中心)、中国食品药品检定研究院、北京市医疗器械审评检查中心、北京新羿生物科技有限公司、广东永诺医疗科技有限公司、伯乐生命医学产品(上海)有限公司、北京达微生物科技有限公司、苏州思纳福医疗科技有限公司、重庆泛生子生物科技有限公司。

本文件主要起草人：李达、黄杰、周海卫、孙嵘、苏世圣、许少飞、王瑞霞、刘靖闻、付军、吴琨、袁成彬。

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)的分类,要求,试验方法,标签、标识和使用说明,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液滴检测模块等。

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、控制和实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、控制和实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、控制和实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。

注:一种无须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。

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 partitioned distribution

利用有限稀释法分割核酸,并进行聚合酶链反应,最后可以检测阳性或者阴性的亚反应体系。

示例: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 thermo 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 quantitative 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

数字聚合酶链反应分析系统主要由微液滴生成模块、聚合酶链反应模块、微液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。

5 要求

5.1 外观要求

仪器外观符合下列要求:

- 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

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

应符合制造商要求,其变异系数小于 5.0%。

注:微孔板式数字聚合酶链反应分析系统中为微孔填充体积。

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 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C/s}$, 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 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.3 温度均匀性

不大于 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.4 荧光强度重复性

用高、中、低浓度的校准染料重复检测, 其荧光强度的变异系数(CV, %)应不大于 10% 。

注: 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% , 样本浓度应符合以下要求:

- 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 中的相关规定。

5.12 电磁兼容性要求

应符合 GB/T 18268.1 和 GB/T 18268.26 中的相关规定。

5.13 环境试验要求

应符合 GB/T 14710 中的相关规定。

6 试验方法

6.1 外观

在自然光下,目测检查仪器外观,判定结果是否符合 5.1 的要求。

6.2 反应单元均匀性

6.2.1 反应单元数量

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,按公式(1)计算变异系数(CV,%),判定结果是否符合 5.2.1 的要求。

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

SD ——测量值的标准差;

$\bar{X}$ ——实际测量值的均值。

6.2.2 反应单元体积

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,其平均值符合制造商规定,按公式(1)计算变异系数(CV,%),判定结果是否符合 5.2.2 要求。

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 2 min 和 95 °C(或 45 °C)恒温 2 min 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(如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 10 s 后至循环程序结束这段时间内的温度变化。

取 50 °C ± 0.5 °C(或降温时 90 °C ± 0.5 °C)范围内一温度点,温度记为 T_a ,取 90 °C ± 0.5 °C(或降温时 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)计算平均升降温速度绝对误差 E ,判定结果是否符合 5.3.1 的要求。

$$E = \left| \frac{|T_b - T_a|}{t} - T_s \right| \dots\dots\dots (2)$$

式中：

T_a ——50℃±0.5℃(或降温时 90℃±0.5℃)范围内一温度点；

T_b ——90℃±0.5℃(或降温时 50℃±0.5℃)范围内一温度点；

t ——从 T_a 到达 T_b 的时间；

T_s ——设定的平均升降温速率。

按照公式(3)计算平均升降温速度相对误差 W ，判定结果是否符合 5.3.1 的要求。

$$W = \left| \frac{|T_b - T_a|}{t \times T_s} - 1 \right| \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

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℃±5℃、72℃±5℃、95℃±5℃范围内各取一个温度点，设置恒温 2 min。将温度传感器的感温头外涂上适量导热介质(如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 10 s 后，计时 60 s，每 10 s 记录一次温度为 $T_i (i=1, 2, \dots, 6)$ ， T_i 值与设定温度 T_m 的差值 T_Δ ，判定结果是否符合 5.3.2 的要求。

$$T_\Delta = |T_m - T_i| \dots\dots\dots (4)$$

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℃±5℃、72℃±5℃、95℃±5℃范围内各取一个温度点，设置恒温 2 min，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(如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 10 s 后，计时 60 s，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，判定结果是否符合 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，按公式(1)计算变异系数(CV，%)，判定结果是否符合 5.4 的要求。

6.5 荧光干扰

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，光学系统收集非目标通道的数据，判定结果是否符合 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，按公式(5)计算拷贝数的相对误差，判定结果是否符合 5.6 的要求。

$$a = \left| \frac{X - X_n}{X_n} \right| \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

式中：

X ——测定值；

X_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,按公式(1)分别计算同一通道各浓度测定值变异系数(CV,%),判定结果是否符合 5.7 的要求。

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,以每一稀释梯度的浓度(x)为自变量,以每一样本实际测定结果平均值(y)为因变量做线性回归,按公式(6)计算线性回归系数,判定结果是否符合 5.8 的要求。

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

$\bar{x}$ ——浓度的平均值;

$\bar{y}$ ——测定结果的平均值。

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(6)计算线性回归系数,判定结果是否符合 5.9 的要求。

6.10 软件功能

目视仪器用户界面及手动操作,判定结果是否符合 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,判定结果是否符合 5.11 的要求。

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,判定结果是否符合 5.12 的要求。

6.13 环境试验要求

按照 GB/T 14710 规定的方法进行,判定结果是否符合 5.13 的要求。

7 标签、标识和使用说明

应符合 GB/T 29791.3 的规定。

8 包装、运输和贮存

8.1 包装

应按照 GB/T 191 的有关规定进行包装。

8.2 运输

应按制造商的要求运输。

8.3 贮存

应在制造商规定的条件下贮存。

参 考 文 献

- [1] GB/T 42062 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 Guideline-Second Edition, CLSI, 2005
 - [3] The Digital MIQE Guidelines Update; Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020, Clin Chem
-