

团 体 标 准

T/SZAS 76—2023

预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测 试剂性能验证

Performance verification of prefabricated real-time fluorescence
quantitative polymerase chain reaction nucleic acid detection
reagents

2023 - 12 - 20 发布

2023 - 12 - 30 实施

深圳市标准化协会 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 预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂的分类 2

5 性能要求 2

6 验证方法 2

7 验证规则 3

8 包装、运输和贮存 3

附录 A（资料性） 质控品相关信息..... 4

参考文献 5

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。

本文件由深圳华大医学检验实验室提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：深圳华大医学检验实验室、武汉华大医学检验所有限公司、深圳华大基因科技有限公司、深圳粒影生物科技有限公司、江苏康为世纪生物科技股份有限公司、翌圣生物科技(上海)股份有限公司、南京诺唯赞生物科技股份有限公司、北京全式金生物技术有限公司、武汉爱博泰克生物科技有限公司、武汉市中心医院、杭州博岳生物技术有限公司。

本文件主要起草人：吴亚、阳晶晶、魏鹏飞、乔明、唐美芳、吴平、姜丹、葛建敬、何文龙、孙晓亮、苏伟生、殷钦虎、李荣、柴智、李因来、甘家骅、董德坤、刘杨杨、吴昊、李倩一。

预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂性能验证

1 范围

本文件规定了预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂的分类、性能要求、验证方法、验证规则、包装运输和贮存。

本文件适用于预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂制造商和使用预制型核酸检测试剂进行PCR相关实验的各类检测机构。

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/T 2828.1—2012 计数抽样检验程序 第1部分：按接收质量限（AQL）检索的逐批检验抽样计划

YY/T 0681.11—2014 无菌医疗器械包装试验方法 第11部分：目力检测医用包装密封完整性

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

热启动 Taq DNA 聚合酶 hot-start Taq DNA polymerase

热启动Taq DNA聚合酶经过化学修饰、抗原抗体结合或适配体结合，常温下，其聚合酶结构域被封闭，不具有催化活性。当PCR反应初期的热变性阶段，体系温度稳定上升到特定温度时，与活性位点氨基酸结合的化学基团、抗体或适配体与氨基酸的侧链基团解离，活性位点暴露，恢复其DNA聚合酶活性，因而这样经过修饰的Taq DNA聚合酶被称为热启动Taq DNA聚合酶。

3.2

实时荧光定量聚合酶链式反应 real-time quantitative PCR; qPCR

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

[来源：GB/T 19495.4—2018，3.1.2]

3.3

Ct 值 cycle threshold

每个PCR管内荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.4

目力检测 visual inspection

在540 lx光照度的白光或日光下，以30 cm~45 cm目力距离进行检测，用于检测试剂外观。

3.5

扩增效率 amplification efficiency

扩增效率衡量PCR在一定循环数内的有效扩增，即每个循环扩增模板的百分比，一般用E表示，与标准曲线的斜率有关，计算方程为 $E = (10^{-1/\text{斜率}}) - 1$ 。

3.6

预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂 Prefabricated real-time fluorescence polymerase chain reaction nucleic acid detection reagent

预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂是一种预先制备好的核酸检测试剂，用于快速、准确地检测样本中的特定核酸序列。这种试剂通常包含引物、探针、酶等成分，以及用于扩增核酸的PCR反

应体系。这种试剂使用非常方便，只需将样本加入试剂中，即可进行上机反应，可广泛适用于各种应用场景，如临床诊断、疫情防控、食品安全等领域。

4 预制型实时荧光聚合酶链式反应核酸检测试剂的分类

按产品型式可分为预混液型和冻干型。

5 性能要求

5.1 物理特性

5.1.1 预混液型产品外观应为澄清透明液体，无沉淀或絮状物。

5.1.2 冻干型产品外观一般应为白色或类白色，无明显杂质，形态完好饱满。冻干型产品含水量低于2%，根据产品要求加入对应体积的的溶媒中，1分钟内可完全复溶。

5.2 扩增效率

根据最适反应体系进行测试，扩增对应参考品（参考品可根据附录A.1推荐细胞系进行制备，对应扩增引物探针序列见A.2，下同），扩增效率应在90%~110%之间，且 R^2 应大于或等于0.98。

5.3 准确度

根据最适反应体系进行测试，扩增对应参考品，测试的实测Ct值与理论Ct值的变异系数应小于或等于2%。

5.4 精密度

根据最适反应体系进行测试，扩增对应参考品，批间Ct值的变异系数和批内Ct值的变异系数应小于或等于2%。

5.5 重复性

根据最适反应体系进行测试，扩增对应参考品，重复10次批内Ct值的变异系数应小于或等于2%。

5.6 稳定性

将试剂分别在温度为25℃和37℃环境下放置72h后，检测对应参考品，所测得Ct值与0h的Ct值之间变异系数应小于或等于2.5%。

将试剂分别在湿度为20%和60%环境下放置72h后，检测对应参考品，所测得Ct值与0h的Ct值之间变异系数应小于或等于2.5%。

6 验证方法

6.1 物理特性检测

根据YY/T 0681.11—2014的检测程序，通过目力检测，结果应符合5.1的要求。

对于冻干试剂，使用卡尔费休水分仪进行含水量测定。

复溶时间根据试剂实际要求，加入对应量的溶媒后使用时钟来测定。

6.2 扩增效率检测

使用对应的质控品作为扩增模板，将质控品进行10倍梯度稀释，5个梯度，依次设置为S0~S4。根据试剂说明书进行测试并制作出标准曲线，再根据公式 $E = (10^{-1/\text{斜率}}) - 1$ 及标准曲线的斜率计算出扩增效率E，结果应符合5.2的要求。

6.3 准确度检测

使用对应质控品作为扩增模板，将质控品分别稀释5个梯度，依次设置为S0~S4，稀释倍数可根据不同厂家标准调整，按照试剂说明书进行实际测试，得出实际测试的Ct值，再通过标准曲线分别计算稀

释后的5个稀释样本对应的理论Ct值，最后计算出实测Ct值与理论Ct值的变异系数，结果应符合5.3的要求。

6.4 精密度检测

使用对应质控品作为扩增模板，对试剂分别进行批内和批间（连续生产三批次）测试，两者技术重复均为3次，按照试剂说明书进行测试，最后计算批内Ct值和批间Ct值的变异系数，结果应符合5.4的要求。

6.5 重复性检测

使用对应质控品测试一个批次的试剂，设置10次技术重复，按照酶试剂说明书测试，通过Ct值计算其变异系数，结果应符合5.5的要求。

6.6 稳定性检测

将试剂分别在温度为25℃和37℃环境下放置不少于72 h，根据试剂说明书分别测试放置不同条件，最后计算在25℃和37℃相应放置时间的检测Ct值与对应0 h的Ct值之间的变异系数，结果应符合5.6的要求。

将试剂分别在湿度为20%和60%环境下放置不少于72 h，根据试剂说明书分别测试放置不同条件，最后计算在湿度20%和70%相应放置时间的检测Ct值与对应0 h的Ct值之间的变异系数，结果应符合5.6的要求。

7 验证规则

7.1 检验规则

检验规则应遵循以下几点：

- a) 新产品投产前或准备用于实验之前，对本文件中所有项目进行检验；
- b) 产品停产半年以上恢复生产时，对本文件中所有项目进行检验；
- c) 原料、工艺、配方及设备的变更可能会影响产品性能时，对可能受影响的项目增加检验次数；
- d) 新批次在出厂和使用前选择本文件中相关项目进行检验。

7.2 取样判定规则

取样判定规则应遵循以下几点：

- a) 产品按批次进行检验，同一批原料一次生产的同规格产品为一批次；
- b) 抽样样本如有一项指标测试不合格，即可判定整体指标测试不合格；
- c) 抽样方案及判定标准按GB/T 2828.1—2012规定的方法执行。

8 包装、运输和贮存

8.1 包装

包装储运图示标志应符合GB/T 191的规定。包装容器应保证密封性良好，通过目力检测，包装完整，无泄露，无破损。

8.2 运输

应按照制造商的要求运输。在运输过程中，应防潮，防止重物堆压，避免阳光直射和雨雪浸淋。

8.3 贮存

试剂盒应在制造商规定条件下保存。

附 录 A
(资料性)
参考品相关信息

A.1 NRAS Q61K 参考品

NRAS Q61K质控品是浓度为50 ng/μL的NCIH2087细胞系DNA，该细胞系存在NRAS Q61K突变，经数字PCR定量，突变频率为35%。

NRAS Q61K-WT 序列

ATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTGGATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGG
CGAAGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCA

NRAS Q61K-Mu 序列

ATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATACTGGATACAGCTGGAAAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGG
CGAAGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCA

A.2 NRAS Q61K 引物探针序列

Q61K-F: 5' -CTGTTTGTGGACATACTGGATA-3'

Q61K-R: 5' -TACACAGAGGAAGCCTTCG-3'

Q61K-Mu-P: 5' -FAM-AGCTGGAAAAGAAGAGTACAGTGCC-MGB-3'

参 考 文 献

- [1] GB/T 19495.4—2018 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应（PCR）检测方法
-