



中华人民共和国国家标准

GB/T 42077—2022/ISO 20395:2019

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

Biotechnology—Requirements for evaluating the performance of quantification
methods for nucleic acid target sequences—qPCR and dPCR

(ISO 20395:2019, IDT)

2022-12-30 发布

2022-12-30 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 2

4 测量程序设计 7

5 样品质控——核酸总量、完整性和纯度 11

6 核酸靶序列定量的方法设计和优化..... 13

7 数据质量控制与分析..... 16

8 核酸定量测量方法的验证..... 18

9 核酸定量测量方法的溯源性和可比性..... 20

10 qPCR 和 dPCR 测量的测量不确定度 21

11 报告 22

附录 A（资料性） 分光光度法 23

附录 B（资料性） 核酸完整性 25

附录 C（资料性） PCR 扩增效率..... 27

附录 D（资料性） 测量不确定度 29

附录 E（资料性） MIQE 和 dMIQE 清单 31

参考文献 38

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。

本文件等同采用 ISO 20395:2019《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》。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院、中国计量科学研究院、四川大学华西医院、深圳市分析测试协会、军事医学研究院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、青岛瑞思德生物科技有限公司、通用生物(安徽)股份有限公司、成都市世联康健生物科技有限公司。

本文件主要起草人：周李华、马丽侠、张懿、高运华、孙羽婕、李亮、张辰、田卫东、孙登峰、喻明军、姜展樾、张炳强、叶德萍、门敬涛、蒋子敬、杨国武、杨杰斌。

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

1 范围

本文件规定了核酸靶序列定量方法的性能评估和质量保证的通用要求。

本文件适用于数字 PCR(dPCR)或实时定量 PCR(qPCR)扩增技术对 DNA(脱氧核糖核酸)和 RNA(核糖核酸)靶序列的定量测定。适用的靶序列核酸分子,包括双链 DNA(dsDNA),如基因组 DNA(gDNA)和质粒 DNA;单链 DNA(ssDNA),互补 DNA(cDNA),单链 RNA(ssRNA)包括核糖体 RNA(rRNA)、信使 RNA(mRNA);双链 RNA,包括长链和短链非编码 RNA[微小 RNA(miRNA)和小干扰 RNA(siRNA)等]。

本文件适用于生物来源的核酸(如病毒、原核细胞和真核细胞)、无细胞生物液体样本(如血浆或细胞基质);体外非生物来源的核酸[如寡核苷酸、合成的基因片段和体外转录(IVT)的 RNA]中提取的核酸。

本文件不适用于过短的 DNA 寡核苷酸(<50 碱基)的定量。

本文件包含:

- 分析设计,包括定量策略(qPCR 标准曲线法、dPCR 分子计数法、qPCR 相对定量法、dPCR 比值定量法)和使用控制;
- 总核酸质量浓度定量和核酸样本质量控制,包括核酸质量的评估(纯度和完整性);
- PCR 试验设计、优化,生物信息学和体外特异性测试;
- 数据质量控制和分析,包括验收标准、阈值设置以及归一化方法;
- 根据 qPCR/dPCR 具体要求的方法验证(精密性、线性、定量限、检出限、正确度和稳健性);
- 计量溯源性建立和测量不确定度评估的方法。

本文件不对生物材料的抽样或生物样本的处理过程(如采集、保存、运输、储存、处理和核酸提取)提出要求或验收标准。也不对特殊应用(如可能出现特殊基质问题的食品或者临床应用领域)提出要求和验收标准。

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。

ISO/IEC 指南 98-3:2008 测量不确定度 第 3 部分:测量不确定度的表达指南(GUM:1995) [Uncertainty of measurement—Part 3:Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)]

注: GB/T 27418—2017 测量不确定度评定和表示(ISO/IEC 指南 98-3:2008,MOD)。

ISO/IEC 指南 99 国际计量词汇 基本和通用概念以及相关术语(VIM) [International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM)]