

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 230—2024
代替 WS/T 230—2002

实时荧光聚合酶链反应 临床实验室应用指南

Guidelines for implementation of real-time fluorescent polymerase chain reaction in
clinical laboratories.

2024 - 05 - 09 发布

2024 - 11 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

华东公共卫生
www.ecphf.cn

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 缩略语	3
5 样本采集和处理	3
6 方法	7
7 污染预防和控制	8
8 质量管理	10
9 结果判读和报告	15
10 实验室生物安全	16
11 临床适用范围	16
附录 A （资料性附录） 常用实时荧光 PCR 技术方法	17
附录 B （资料性附录） 实时荧光 PCR 技术临床适用范围	18
参考文献	21

前 言

本标准为你推荐性标准。

本标准代替WS/T 230—2002《临床诊断中聚合酶链反应（PCR）技术的应用》，与WS/T 230—2002相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了“范围”部分（见第1章，2002年版的第1章），较WS/T 230—2002将所述技术范畴由“PCR”缩小为“实时荧光PCR”；
- 增加了“规范性引用文件”部分（见第2章）；
- 更改了“术语和定义”部分（见第3章，2002年版的第2章）；
- 增加了“缩略语”部分（见第4章）；
- 将“标本的收集、运输、处理和存放”部分更改为“样本采集和处理”，对2002年版相关内容进行细化补充后纳入（见第5章，2002年版的第5章）；
- 在“方法”中增加了针对实时荧光PCR技术的扩增体系、扩增反应内容，删除了该技术以外的其他PCR产物分析方法（见第6章，2002年版的第4章）；
- 在“污染预防和控制”中增加了污染的处理与控制要求内容（见第7章，2002年版的第6章）；
- 将“质量控制”部分更改为“质量管理”，增加了人员及实验室、设备管理要求、方法性能验证、室内质控、实验室间比对要求内容（见第8章，2002年版的第7章）；
- 将“结果的判读、报告和解释”部分更改为“结果判读和报告”，增加检测方法局限性、结果报告要素、检测结果解释内容（见第9章，2002年版的第8章）；
- 增加了“实验室生物安全”部分（见第10章）；
- 将“用途”部分更改为“临床适用范围”，删除了过筛实验、诊断实验、验证实验内容（见第11章，2002年版的第3章）；
- 删除了2002年版“附录”内容（见2002年版的附录A“定量PCR技术”、附录B“对生产厂商的要求和建议”）；
- 增加了资料性附录A“常用实时荧光PCR技术方法”（见附录A）；
- 增加了资料性附录B“实时荧光PCR技术临床适用范围”（见附录B）。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准主要起草单位：复旦大学附属中山医院、昆明医科大学第一附属医院、中国科学技术大学附属第一医院、复旦大学附属华山医院、北京大学人民医院、浙江省人民医院、中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心。

本标准主要起草人：潘柏申、郭玮、段勇、沈佐君、关明、赵晓涛、童向民、邱茂锋、王蓓丽。

本标准于2002年首次发布，本次为第一次修订。

实时荧光聚合酶链反应临床实验室应用指南

1 范围

本标准规定了实时荧光聚合酶链反应在临床实验室应用中的样本采集和处理、方法、污染预防和控制、质量管理、结果判读和报告、实验室生物安全、临床适用范围等要求。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及医学检验实验室开展核酸扩增基因定性及定量检测。

本标准不适用于基于核酸杂交、核酸恒温扩增、基因测序等技术所开展的检测。

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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 37874 核酸提取纯化方法评价通则

GB/T 40974 核酸样本质量评价方法

JJF 1874 （自动）核酸提取仪校准规范

JJF 1527 聚合酶链反应分析仪校准规范

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS/T 348 尿液标本的采集与处理

WS/T 414 室间质量评价不合格原因分析

WS/T 640 临床微生物学检验标本的采集和转运

WS/T 661 静脉血液标本采集指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

聚合酶链反应 polymerase chain reaction;PCR

一种利用人工合成的寡核苷酸作为引物介导的DNA目标序列特异性酶促扩增技术。当存在模板、底物、引物和耐热DNA聚合酶时，通过调节反应温度引导多次“变性-退火-延伸”反应循环，可令痕量DNA模板扩增数百万倍。

3.2

实时荧光聚合酶链反应 real-time fluorescence polymerase chain reaction;real-time PCR

在PCR反应体系中引入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监测整个PCR进程，通过连续监测绘制反应动力曲线，从而对样本中被扩增模板DNA的初始含量进行计算。该技术包含定性和定量检测，常以qPCR（quantitative polymerase chain reaction）代表定量检测。

3.3

反转录 reverse transcription;RT

以RNA单链为模板，在反转录酶催化下合成互补DNA（即cDNA）的过程。

3.4

模板 template

复制或转录、反转录过程中用来产生互补链的DNA或RNA核苷酸序列。

3.5

目标序列 target sequence

拟通过PCR技术进行定性或定量检测的特定核酸序列区域。

3.6

引物 primer

具有特定序列的人工合成寡核苷酸片段,可与目标序列区域上下游互补,从而形成稳定的氢键连接,促进DNA聚合酶的结合和DNA链的延伸。

3.7

荧光探针 fluorescent probe

根据特定基因序列设计的标记有荧光基团和淬灭基团的人工合成寡核苷酸片段,与互补序列退火杂交后,通过PCR扩增酶促反应释放荧光信号,用于检测样本中是否含有特定基因序列。

3.8

变性 denaturation

PCR反应体系中,利用高温条件破坏核酸二级结构中的氢键,使DNA与RNA均从复杂高级结构转变为线性单链核苷酸的过程。

3.9

退火 annealing

PCR反应体系中,需通过降低反应体系温度,使两条线性单链核苷酸通过互补碱基间的氢键形成局部双链的过程。

3.10

延伸 extension

PCR反应体系中,引物与模板发生退火后,在耐热DNA聚合酶作用下,根据模板DNA的碱基顺序,以单个核苷酸为原料,自引物5'端向3'端逐个添加核苷酸合成两条互补链的过程。

3.11

DNA 聚合酶 DNA polymerase

以DNA单链为模板、dNTP为原料,催化脱氧核苷酸加到引物或DNA链的3'-OH端,合成互补DNA新链所需的酶。

3.12

反转录酶 reverse transcriptase

以RNA为模板指导dNTPs合成互补DNA的聚合酶。

3.13

插入 insertion

DNA或RNA的一种突变形式,在原有核苷酸序列中插入了一个或多个额外核苷酸。

3.14

缺失 deletion

DNA或RNA的一种突变形式,在原有核苷酸序列中丢失了一个或多个原有核苷酸。

3.15

抑制物 inhibitor/干扰物 interferent

PCR检测反应体系中抑制或干扰PCR反应进行的物质,可导致PCR产物产量减少或非特异性产物增多。

3.16

污染 contamination

由于样本交叉污染或试剂、标准品、质控品、扩增产物污染等原因，导致PCR扩增体系中混入来自待检样本以外的模板，使PCR检测出现假阳性结果的情况。

3.17

循环阈值 cycle threshold (Ct) value

实时荧光PCR扩增过程中，荧光信号强度由本底水平达到所设定荧光阈值限时所对应的循环次数，即循环阈值，其数值大小与模板核酸片段的起始拷贝数成反比。

3.18

转运 transport

样本由采样地点运送到检测地点的过程，分为内部转运（例如检测机构内部使用人工或气动传输装置等进行送样）和外部转运（例如检测机构间使用汽车、火车、飞机等交通工具进行送样）。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

cDNA	互补DNA (complementary DNA)
cfDNA	游离DNA (cell free DNA)
Ct	循环阈值 (cycle threshold value)
ctDNA	循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA)
DNA	脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
DNase	脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease)
dNTP	脱氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate)
dsDNA	双链DNA (double-stranded DNA)
EDTA	乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)
FFPE	福尔马林固定石蜡包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded)
miRNA	微小RNA (microRNA)
mRNA	信使RNA (messenger RNA)
PCR	聚合酶链反应 (polymerase chain reaction)
RNA	核糖核酸 (ribonucleic acid)
RNase	核糖核酸酶 (ribonuclease)
RT-PCR	反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction)
SOP	标准操作程序 (standard operating procedure)
ssDNA	单链DNA (single-stranded DNA)
real-time PCR	实时荧光聚合酶链反应 (real-time fluorescence polymerase chain reaction)
rRNA	核糖体RNA (ribosomal RNA)
T _m	熔解温度 (melting temperature)
UDG	尿嘧啶-DNA糖基水解酶 (uracil-DNA glycosylase)

5 样本采集和处理

5.1 总体要求

应正确进行样本采集、转运、处理和保存，发生在分析前阶段的操作不当可能会破坏样本完整性、导致核酸降解，引入污染或干扰物，最终影响目标序列定性或定量检测结果的准确性。实验室应就各环节制定详细的技术要求，并向样本采集、转运、接收、检测人员分别提供相应培训。

5.2 样本采集

5.2.1 总体要求

5.2.1.1 实验室在开展实时荧光 PCR 技术服务时,除常规遵循体外诊断样本采集要求外,还可参照 WS/T 661、WS/T 348、WS/T 640 进行。应结合不同检测项目对样本的要求,并参考所使用试剂及耗材的说明,制定详细的样本采集程序,包括采样时效、采样部位、样本类型、采样装置与采集容器、采集方法、采样量、质量评价注意事项,并对采样人员提供相应培训与指导。

5.2.1.2 采样人员在采集样本前应核对受检者身份、采样部位、样本类型、采样装置与采集容器。采集完成的样本应予以唯一性标识。

5.2.1.3 如需受检者自行留取样本(例如痰液、尿液),应指导其如何正确留取并送检,避免因操作不当造成样本质量不合格、检测结果不准确。

5.2.2 样本类型

5.2.2.1 采样时应参考检测项目要求、疾病特性、病原微生物感染部位或感染细胞类型等因素,选择采样部位与样本类型,以确保所采集样本中含有检测目标序列。

5.2.2.2 实时荧光 PCR 技术可检测的临床样本类型包括组织(新鲜组织、石蜡切片组织)、细胞及其培养产物、EDTA 或枸橼酸抗凝全血、干血斑、血清、血浆、外周血单个核细胞、骨髓、其他体液(例如脑脊液、浆膜腔积液、尿液、房水等)、产前诊断样本(绒毛膜、绒毛膜培养细胞、羊水、羊水培养细胞等)、拭子(采集分泌物、脱落细胞、微生物等)、分泌物(痰液、脓液、唾液等)、体腔与体表冲洗液(含脱落细胞、cfDNA)、粪便、含微生物的临床样本或微生物培养样本,等。

5.2.3 采样时效

5.2.3.1 应结合不同检测目的与疾病特点,明确样本采集的时效性,避免因在疾病发生发展过程中样本采集过早或过迟而导致假阴性结果。感染性疾病可考虑在病程不同阶段连续采样送检。

5.2.3.2 手术、输血、药物治疗等医疗行为可影响实时荧光 PCR 检测结果,采样前应明确患者有无接受上述诊疗行为,如有宜建议推迟采样或在报告中备注相关情况。

5.2.3.3 采样完成后应标明或记录具体采样时间以供回溯。

5.2.4 防污染操作

5.2.4.1 采样过程中应注意避免外源性核酸污染。

5.2.4.2 病原微生物检测采样时遵守无菌操作,避免样本被环境微生物和定植微生物污染。

5.2.5 采样装置和采集容器

5.2.5.1 应为无菌、无 DNase/RNase、一次性。所用材质与所含添加物不可抑制或干扰 PCR 检测过程。

5.2.5.2 全血和骨髓样本抗凝首选 EDTA 与枸橼酸盐,不可使用肝素。如同时采集多管样本,应根据采集容器添加物类型及对 PCR 反应有无影响制定填装顺序。其中,真空采血管采集顺序可参照 WS/T 661 执行。

5.3 样本转运

5.3.1 应结合不同样本类型与检测目标核酸特性,参考试剂盒说明书要求,制定样本转运与保存过程中的时间、温湿度条件及生物安全要求。

5.3.2 样本经采集后,应尽可能减少运送环节、缩短转运时间,在规定时间内运达实验室。

5.4 样本接收

5.4.1 应结合不同检测项目制定各自详尽的样本接收/拒收标准及不合格样本退收流程。

5.4.2 对经评估质量合格的样本应收尽收。样本质量评估应充分考虑样本运送时间和条件,不同类型样本的质量评价标准包含以下方面:

- a) 全血样本: EDTA 或枸橼酸抗凝、样本量适宜、专用容器、无凝血或溶血;
- b) 血浆(清)样本: 样本量适宜、专用容器;

- c) 其他体液：样本量适宜、专用容器、无污染物；
- d) 拭子：专用拭子、保存液和容器；
- e) 组织：样本量适宜、专用容器、保存液。

5.4.3 已接收样本应在规定时间内录入实验室信息系统，做好接收登记，便于临床实时查询和追踪样本状态。

5.4.4 样本拒收

当样本经评估不符合接收质量评价标准，例如：标记信息错误或不足、样本类型和申请检测项目不符、抗凝方式不当、采集容器不符合专业规范、破损或严重污染、样本处理或转运不当、样本量不满足检测最低要求，等。实验室可拒收样本并做好相应记录，同时尽快通知样本采集部门，向其解释拒收原因并建议重新采集合格样本。

5.4.5 让步检测标准

5.4.5.1 特殊情况下如必须进行检测，实验室就样本可抢救程度及检测可行性进行评估后，应就样本可能存在的检测影响因素充分告知临床医师，经沟通许可后行让步检验并将具体情况详细记录在案，同时在检测报告中备注样本特殊情况。

5.4.5.2 明确存在以下情况的样本不宜进一步行 PCR 检测：肝素抗凝血样、无标识/标记错误的样本。溶血及经冻融的全血样本不宜用于 cfDNA 检测。

5.5 样本处理

5.5.1 总体要求

实施实时荧光PCR检测前，可采用经有效验证的技术方法从各类型样本中提取和纯化核酸，制备成扩增模板。提取与纯化操作可令核酸物质释放、提高目标核酸浓度、去除PCR抑制物、提高PCR扩增成功率和可重复性，有利于检测标准化。

5.5.2 样本前处理

5.5.2.1 总体要求

应根据样本类型、目标核酸来源、疾病特点、检测目的，选取适宜的样本前处理方式。

5.5.2.2 离心

对样本中特殊来源或稳定性差、含量低、易降解的核酸片段（例如 RNA、cfDNA），应及时离心分离相应检测成分。全血样本可经离心后分离血清、血浆、外周血单核细胞，其他体液样本可经离心后分离上清、沉渣。

5.5.2.3 混匀

拭子、导管等样本可经振荡，使粘附于其表面的细胞、菌体、病毒洗脱入样本保存液。

5.5.2.4 均质化

当细胞、菌体、病毒被裹挟或黏附在其它物质内时，可通过均质化使其释放。例如：痰液样本宜先消化释放菌体；粪便样本宜机械混匀；组织样本宜剪碎研磨。

5.5.2.5 浓缩和富集

对检测目标序列含量较低的样本，应通过适宜技术手段进行分离以实现浓缩和富集，提高检测灵敏度。例如：粪便、尿液、脑脊液和其他体液样本中的细胞可经离心分离；血液及其他体液样本中的特定细胞亚群可经流式细胞荧光分选、磁珠捕获等方法分离；组织样本中的特定类型细胞可经激光捕获显微切割获取。

5.5.3 组织样本处理

5.5.3.1 新鲜组织样本可采用均质器打匀、钢珠打磨、液氮研磨等方法对样本进行均质化，再以蛋白酶K消化处理。

5.5.3.2 在没有新鲜或冷冻组织样本的情况下，可使用中性福尔马林固定石蜡包埋组织（formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）样本。FFPE组织切片用于核酸提取前，应经过脱蜡、乙醇漂洗、风干、蛋白酶K消化处理。

5.5.4 核酸提取与纯化

5.5.4.1 总体要求

应根据样本类型、目标核酸类型（DNA/RNA）选择核酸提取与纯化方法。首要原则为确保核酸结构完整性，其次为去除其他干扰物，采取相应处理方法保证核酸的提取质量和产量，以确保满足下游检测要求。实验室应针对实时荧光PCR检测项目要求制定并遵照核酸提取与纯化SOP。采用商品化核酸提取试剂盒前，应对其核酸提取效率进行评估，包括核酸纯度、提取产率、完整性。

5.5.4.2 DNA提取

应根据组织、血液、拭子、尿液、粪便等不同样本类型及检测目的选择适宜提取方法。目前临床常用磁珠分离纯化法，该法高效且易实现自动化，适宜在样本量大的情况下使用。

5.5.4.3 RNA提取

应根据目标RNA类型（总RNA、mRNA、miRNA）、下游检测所需模板纯度、处理样本耗时和成本、以及RNA完整性要求进行选择。RNA提取过程中应做好环境消毒、操作者自身防护、器材预处理，注意避免RNase污染，以免RNA降解。主要方法包括：柱提法和磁珠分离法。

5.5.5 核酸模板的转化

5.5.5.1 甲基化位点转化

甲基化检测需以亚硫酸氢盐处理基因组DNA，所有未发生甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶，而甲基化胞嘧啶保持不变，再利用针对甲基化和非甲基化序列的引物进行实时荧光PCR检测。影响转化的主要因素包括亚硫酸氢盐浓度、反应温度、pH值及反应时间，应严格控制反应条件，以保证转化效率。

5.5.5.2 RNA反转录

RNA需以Oligo（dT）或随机引物经反转录成为cDNA，再进行后续实时荧光PCR检测。

5.5.6 核酸模板质量评价

经上述样本处理后获得的扩增核酸模板提取产量、纯度和完整性应符合后续检测要求，以满足扩增有效性和结果准确性。具体评价指标及判断标准、方法及操作步骤可参考GB/T 37874、GB/T 40974。如不符合相应要求，应分析原因后重新采集样本，或对样本重新进行抽提。

5.6 样本保存

5.6.1 原始样本的保存

5.6.1.1 除核酸提取纯化所需样本量外，实验室应尽力保留和妥善保存残余样本，以便追溯和复检。

5.6.1.2 实验室应结合不同样本类型与目标核酸特性明确原始样本保存条件与期限，就不同保存条件进行验证，并避免样本反复冻融以备需要时复检。

5.6.1.3 为避免RNA表达水平变化与降解，用于RNA检测的血液样本应直接抽取到含有RNA稳定添加剂的采血管中保存，组织样本立即放入含有RNA稳定剂的保存管中或直接放入液氮中快速冷冻保存。

5.6.2 核酸模板的保存

5.6.2.1 经提取纯化后的核酸模板应以适当条件保存，以尽可能减少核酸降解。

5.6.2.2 保存容器材质应避免吸附核酸，或诱导核酸结构变化。保存痕量核酸样本时，宜选择低吸附性材料以防核酸损失。

5.6.2.3 保存体系以及温度条件应根据核酸模板类型以及保存期限进行选择。拟长期保存可参考：

- a) DNA：置于 Tris-EDTA 缓冲液，保存于 0 °C 以下；
- b) RNA：置于乙醇缓冲液，保存于-70 °C 以下或液氮；
- c) cfDNA：置于 TE 缓冲液，保存于-20 °C 及以下。

5.6.2.4 用于保存核酸样本的制冷设备不应启用自动化霜功能，以免温度反复波动致核酸降解、样本变质。

5.6.3 保存样本的取用

5.6.3.1 检测后残余样本的保存周期应参照国家或地方相关法律法规，当无文件可参照时，应与临床协商制定。

5.6.3.2 对检测结果有疑问、争议或投诉时，可取用保存样本进行复检并记录。

6 方法

6.1 扩增体系

6.1.1 总体原则

实时荧光PCR扩增体系包括引物、荧光化学物质（染料或探针）、DNA聚合酶、dNTP、模板、 Mg^{2+} 及反应缓冲液等成分。引物和探针的设计是影响该技术的关键因素，其决定了检测准确性和特异性；合适的DNA聚合酶对扩增反应的成功至关重要；dNTP的质量与浓度影响扩增效率； Mg^{2+} 是DNA聚合酶发挥活性必需的辅助因子。

6.1.2 引物

引物宜针对模板序列保守区域进行设计，应同时考虑长度、结构、GC含量、 T_m 值等因素，使正向引物与探针距离近且不重叠、扩增产物片段大小适中，以获得高特异性与高扩增效率。引物本身及引物之间不应存在互补序列。

6.1.3 荧光化学物质

实时荧光PCR技术使用的荧光物质主要分为荧光探针和荧光染料，前者特异性较高，后者则会导致非特异性结果。目前临床中以荧光探针最为常用，其具有高特异性、高信噪比等优势，可用于多重PCR反应。荧光探针设计应考虑长度、GC含量、 T_m 值等因素。现有探针类型包括：水解探针、分子信标、双杂交探针等。

6.1.4 热稳定DNA聚合酶

实时荧光PCR技术常采用热稳定DNA聚合酶，宜根据热稳定性、延伸速率、保真性等性能参数要求进行选择。其中Taq酶最为常用，具有良好的持续合成能力和高效的延伸速率；Tth酶耐热性高，兼具反转录活性，可实现在同管中进行逆转录和扩增。对具特殊要求的该技术检测项目，还可选择其他类型聚合酶，例如：反转录酶、热启动聚合酶、高保真聚合酶等。

6.1.5 dNTP

实时荧光PCR体系中包含dATP、dCTP、dGTP和dTTP四种扩增原料，其浓度应为 $50 \mu\text{mol/L} \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 。浓度过低会降低PCR产物的量，浓度过高则易与 Mg^{2+} 结合，影响酶活性。四种dNTP应等量。

6.1.6 模板

实时荧光PCR仅需微量模板，样本来源的其他物质可能会抑制PCR反应。为减少对PCR反应的影响，应考虑模板的最适加入量。

6.1.7 Mg²⁺及其浓度

在实时荧光PCR体系中，Mg²⁺浓度以1.5 mmol/L~2.0 mmol/L为宜。Mg²⁺浓度过高时，酶活性过强，易出现非特异性扩增，降低反应特异性；Mg²⁺浓度过低则会降低酶活性，使反应产物减少。商品化试剂盒的预混液中多含有固定预设浓度的MgCl₂，必要时实验室可对Mg²⁺浓度进行优化，优化后应进行相应的性能确认。

6.1.8 扩增体系配置

扩增反应体系配制完成后应在试剂盒推荐时间内使用，以防止体系变质（酶失活和探针淬灭）。开展临床基因定性及定量检测项目宜采用商品化试剂盒，试剂盒就扩增体系各组份常采用预混液形式，应根据说明书要求进行配置，必要时可进行优化。

6.2 扩增反应

6.2.1 初始变性

反应温度升高至95℃，孵育2分钟~5分钟，确保双链DNA（dsDNA）被分离成单链DNA（ssDNA）以进行后续扩增。

6.2.2 变性

反应温度升高至95℃，破坏dsDNA互补碱基间的氢键，形成ssDNA。变性温度不宜过高、时间不宜过长，以免影响Taq DNA聚合酶活性、损害反应体系中dNTP。

6.2.3 退火

反应温度降低至较引物T_m低5℃~10℃，以促进引物与模板的结合。引物T_m的常用计算公式如下：

$$T_m (\text{℃}) = 2(N_A + N_T) + 4(N_G + N_C) \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- N_A——引物序列中腺嘌呤（A）的个数；
- N_T——引物序列中胸腺嘧啶（T）的个数；
- N_G——引物序列中鸟嘌呤（G）的个数；
- N_C——引物序列中胞嘧啶（C）的个数。

反应中引物的长度、碱基组成及其浓度是影响退火温度选择的主要原因。适宜的退火温度是保证PCR扩增特异性的重要前提。为提升扩增特异性，可在推荐的T_m值范围内，选择较高温度进行退火反应，以减少引物和模板间的非特异性结合。

6.2.4 延伸

延伸反应阶段的温度应根据DNA聚合酶的最佳活性温度设置，温度过高不利于引物和模板结合。延伸反应时间应根据扩增片段的长度选择，延伸时间过长易出现非特异性扩增。对于低浓度模板的扩增反应，宜适当延长延伸反应时间。

6.2.5 循环次数

本标准第6.2.2至第6.2.4条的变性、退火和延伸过程需重复循环，循环次数由起始模板量决定。循环次数设定在30~40次为宜，应注意非特异性产物的量亦随循环反应次数而相应增多。

7 污染预防和控制

7.1 污染来源

7.1.1 实时荧光PCR技术检测灵敏度高，样本和目标序列产物对检测环境与反应体系的污染可造成假阳性结果。实验室应注重污染对结果的影响，规范试验操作行为预防污染。

7.1.2 发生在该技术应用过程中的污染根据不同情况，可分为以下几类：

- a) 根据污染核酸片段来源可分为：基因组核酸、扩增产物、试剂质控及标准品来源的合成性核酸序列污染。
- b) 根据污染播散形式可分为：携带污染、气溶胶污染。
- c) 根据被污染对象可分为：样本间交叉污染、试剂污染、扩增体系配制污染。

7.1.3 样本间交叉污染多表现为个别样本假阳性，试剂与扩增体系配制污染多表现为批次假阳性。

7.2 污染的预防

7.2.1 实验室分区

7.2.1.1 开展实时荧光 PCR 检测时宜就实验室设置分区，试剂耗材储存及检测流程中的试剂配制、样本制备、扩增反应及产物分析宜分别在相对独立的区域内进行。分子病理实验室宜设置独立的样本前处理区，包括切片区和脱蜡区，用于组织切片、脱蜡、水化、染色等。脱蜡、水化及染色操作应在通风设施中进行。如使用一体式自动分析仪进行样本检测，可根据设备实际功能，对分区进行合并。

7.2.1.2 分区设计可因地制宜，根据所使用的技术平台及检测项目适当调整区域设置，满足生物安全与分子实验室污染控制要求即可。

7.2.1.3 应就各区域设计单向工作流程，以减少污染发生。

7.2.1.4 各区域内配备专用实验服、手套、移液器、一次性用品等。出入各区时对具潜在污染可能的防护装备予以更换，以降低污染风险。

7.2.1.5 应注意实验室分区间气流流向，保证潜在可能污染物控制在特定区域内。

7.2.2 分装试剂

7.2.2.1 为预防污染，可对试剂进行分装。

7.2.2.2 配制或分装试剂所用的物品、去离子水和缓冲液均应做去核酸酶处理。

7.2.2.3 试剂配制或分装应在试剂贮存和准备区进行。

7.2.2.4 实验室可根据各类试剂的稳定性制定分装方案，确保试剂质量。

7.2.3 检测注意事项

7.2.3.1 实验室在工作前、工作后均应进行去核酸处理，包括：

- a) 紫外线照射；
- b) 使用 0.5%~1%次氯酸钠或 75%乙醇擦拭或其他方式处理；
- c) 运用商品化核酸去除剂；
- d) 保持实验室良好通风。
- e) 因次氯酸钠具有较强腐蚀性，不可用次氯酸钠直接处理仪器设备。实验室应根据检测规模决定使用频率，使用次氯酸钠进行去核酸处理后应保持通风，降低实验室空气中的余氯含量。

7.2.3.2 检测操作过程中应重视以下要点：

- a) 开盖处理根据样本风险，可在生物安全柜内进行；
- b) 实验应使用带滤芯的一次性加样吸头；
- c) 移液器应定期进行去核酸处理；
- d) 样本开盖前应离心、静置，有条件时可采取冰浴方式降低气溶胶污染风险；
- e) 操作过程中应防止样本间交叉污染。

7.2.3.3 不宜选用浓度过高的质控品。质控品和标准品经启用后不能继续存放于试剂贮存和准备区，丢弃时应闭管以防止泄露。

7.2.3.4 使用过的离心管、吸头宜用 0.5%~1%次氯酸钠溶液浸泡后按医疗废弃物处理。扩增产物应采用医疗废弃物包装袋包装，按医疗废弃物管理要求统一处理。

7.2.4 预防扩增产物污染

7.2.4.1 宜就扩增反应管的密闭性进行验证。

7.2.4.2 去除扩增产物残留污染可采用尿嘧啶-DNA 糖基水解酶(uracil-DNA glycosylase, UDG)法。

7.3 污染监测

7.3.1 试剂监测

7.3.1.1 利用未添加任何核酸模板的扩增反应液直接进行扩增，如结果阳性则表明试剂污染。

7.3.1.2 实验室应对各批次试剂及试剂分装过程进行监测，防止使用已被污染的试剂。

7.3.2 操作过程监测

7.3.2.1 开展日常临床检测时，应合理设置阴性对照（可采用阴性质控品，或以无菌水替代）监测核酸检测全程。

7.3.2.2 阴性对照不应出现目标片段扩增，若检测结果为阳性则表明实验过程中存在交叉污染或气溶胶污染。

7.3.3 环境监测

7.3.3.1 环境监测可通过以下方法进行：取容器盛装无菌水，开盖置于实验室工作台面、生物安全柜台面及核酸提取仪舱内过夜，再与临床样本一起进行检测，如结果阳性则提示实验室存在气溶胶污染；亦可取拭子擦拭实验室不同物品表面采集环境监测样本，置于含无菌水或样本保存液的试管中，混匀后按临床样本进行检测。

7.3.3.2 依据实验室的检测规模及阴性室内质控结果制定环境监测频率。

7.4 污染的处理与控制

7.4.1 待测样本处理

7.4.1.1 如根据污染监测结果发现存在污染或污染可能时，应先停止检测工作与报告发布，分析并明确污染原因和严重程度后决定检测结果是否可报告。

7.4.1.2 当确认污染系个别样本交叉污染或环境中轻微气溶胶污染时：对于报告阴性或阳性的检测项目，结果为阴性的样本可正常报告，结果为阳性的样本应排除污染再次复检后方可报告；对于报告基因多态性的检测项目，需排除污染原因后复检。

7.4.2 查找原因

7.4.2.1 实验室应制定失控处理流程与措施，分析阴性质控或环境监测样本失控的原因。

7.4.2.2 应通过试剂监测、操作过程监测及不同区域环境监测明确污染来源。

7.4.2.3 如疑似扩增产物污染，可选用另一种与原扩增试剂无交叉反应的扩增试剂进行验证。

7.4.3 清除污染

7.4.3.1 如因样本产生气溶胶污染，应停止使用实验室。

7.4.3.2 无论何原因引起的实验室污染，均应按一定程序进行去核酸处理。宜先用 75%乙醇、纯净水或核酸清除剂（不含腐蚀性成分）沉降气溶胶，再经紫外灯消毒 30 分钟~60 分钟，然后用核酸清除剂或 0.5%~1%次氯酸钠溶液处理实验操作台、加样器和地面，部分检测器具可采用浸泡冲洗，最后予持续通风处理。

7.4.3.3 每次按上述程序处理直至污染消除后再恢复实验室的使用。

8 质量管理

8.1 人员管理

8.1.1 应具备相应分子生物学知识背景，接受过专门技术培训，取得 PCR 上岗证书。

8.1.2 实验室应制定相关程序对人员进行管理，保存所有人员记录，以证明各类资格、资质和培训考核等满足要求。

8.2 实验室管理

应满足《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》要求，并取得所在省/市指定部门的技术审核合格证书方可开展相应的临床基因检验工作。

8.3 设备管理

8.3.1 实验室应制定设备选择、购买和管理的文件化程序。

8.3.2 实验室应配备其开展实时荧光 PCR 检测所需的全部设备，包括样本采集、处理、检测和保存环节等。每台设备应有唯一标识。

8.3.3 PCR 实验室各物理分区中的设备为专用，应设置有明确标示，以避免设备未经妥善处置即从原所在分区移动至另一分区，造成不同工作区域间的交叉污染。

8.3.4 设备应始终由经培训的授权人员操作。实验室应有设备安全操作、转运、保存和使用的程序，以防止设备污染或损坏。

8.3.5 实验室应保存每台设备检测性能的记录，包括证明设备纳入实验室时最初可接受使用的记录、校准记录、维护维修记录等。

8.3.6 设备检定和校准

8.3.6.1 属于国家规定应接受强制检定的计量器具的设备，应按相关文件要求进行检定。

8.3.6.2 实验室应评估每台设备对结果有效性和计量溯源性的影响，合理地确定是否需要校准。对不需要检定和校准的设备，实验室应核查其状态是否满足使用要求。

8.3.6.3 对需要校准的设备，实验室应建立校准方案，方案中应包括该设备校准的参数、范围、不确定度和校准周期等，以便送校时提出明确的、针对性的要求。

8.3.6.4 设备校准参数应能满足实验室所用实时荧光 PCR 检测项目的需求。实验室应根据校准证书的信息，判断设备是否满足方法要求。如果校准数据中包含修正因子，实验室应确保该修正因子得到适当的更新和应用，以满足规定要求。

8.3.6.5 以下实时荧光 PCR 检测相关设备应定期进行校准：全自动核酸检测系统、核酸提取仪、核酸扩增仪、移液器、天平、温度计、水浴箱、恒温金属浴、离心机、生物安全柜、分杯仪和自动液体工作站。其中核酸提取仪具体校准参数及要求见 JJF 1874，核酸扩增仪校准参数及要求见 JJF 1527。

8.3.7 设备维护与维修

8.3.7.1 实验室应制定文件化的预防性维护程序，该程序至少应遵循制造商说明书的要求。

8.3.7.2 当发现设备故障时，应停止使用并清晰标示。实验室应确保故障设备已经修复并验证，当其满足规定的可接受标准后方可使用。实验室应检查设备故障对之前检测的影响，并采取应急措施或纠正措施。

8.3.7.3 在设备投入使用前、维修前后或报废前，实验室应采取适当措施对设备去污染。

8.4 方法性能验证

8.4.1 验证计划制定

检测方法用于临床前，实验室应独立进行方法性能验证。验证时，实验室可通过获取客观证据（以性能特征形式）证实检验程序的性能与试剂盒的声明相符，同时应满足临床对检测结果预期用途的要求。

8.4.2 样本选择

宜选择受检者真实样本，尽量与试剂盒建立性能指标时所用材料一致。当目标样本不易获得时，可考虑使用稳定的质控品、标准品或参考物质。当一份样本需进行多次试验时，宜对其进行分装并低温保存，避免反复冻融。

8.4.3 定性方法的验证

8.4.3.1 总体要求

定性检测项目验证指标宜包括方法符合率、检出限、抗干扰能力等。

8.4.3.2 符合率

通过与参比方法进行比较。参比方法包括但不限于：金标准方法、行业公认方法、经验证性能符合要求满足临床预期用途的方法（例如：通过ISO15189认可实验室使用的相同检测方法）。通常按照受检者样本检验程序，采用参比方法和候选方法平行检测。将所有检测结果按四格表汇总填表，计算阳性符合率、阴性符合率和总符合率。

8.4.3.3 检出限

如试剂使用说明书有检出限的声明，在有标准物质或以定量形式表达定性结果时，所用检测方法应进行检出限的验证。验证时，将定值参考物质（例如：国际参考品、国家参考品、试剂盒参考品）样本梯度稀释至试剂盒声明的检出限浓度，重复测定，按照90%或95%置信区间统计。稀释液可根据情况选用试剂盒提供的稀释液或阴性血清，该阴性血清除被验证的目标物应阴性外，所含干扰物质浓度应在试剂盒声明的范围之内。

8.4.3.4 抗干扰能力

PCR检测常见的干扰物质主要包括血红蛋白、肝素、苯酚、乙醇、异丙醇、乙酸钠等。实验室可根据临床需求、试剂盒声明和样本特点（实际可能存在的干扰物质及达到的浓度）选择需要验证的干扰物质及浓度。实验室可就抗凝剂和样本保存液等试剂对实时荧光PCR检测结果的影响单独进行评估。

8.4.4 定量方法的验证

8.4.4.1 总体要求

定量检测项目分析性能验证指标宜包括测量正确度、测量精密度（含重复性和中间精密度）、抗干扰能力、定量限、线性区间、可报告区间、核酸提取效率、扩增效率等。

8.4.4.2 正确度

对测量正确度的评价，首选方法是分析定值参考物质，其次选择使用实验室能力验证的正确度验证数据。推荐的参考物质为具有互换性的有证参考物质及具有溯源性及互换性的正确度验证物质。参考物质至少选择2个浓度水平，至少其中一个水平为医学决定水平。使用受检者样本进行正确度验证时首选参考方法，参考方法不易获得时，可选择已得到临床验证的常规方法。如果是更新试剂盒，应与现在使用的试剂盒进行比较。

8.4.4.3 测量精密度

应同时验证重复性和中间精密度。用于精密度验证的样本应具有很好的稳定性和均一性。至少含两个浓度水平，应尽可能与试剂盒精密度评价时所用样本浓度一致，宜确定医学决定水平处的精密度。

8.4.4.4 抗干扰能力

见本标准第8.4.3.4条，验证在特定种类和浓度水平干扰物质存在的条件下，检测结果仍然符合检测方法规定的要求。

8.4.4.5 定量限

定量限是指在一定实验条件下，检测系统能够得到可靠结果的被测物最低浓度，其总误差符合实验室预期要求（临床可接受），是定量分析方法实际能可靠测定的某组分的下限。建立定量限宜根据临床需求和试剂盒选定的性能规范的允许误差来设定准确度目标，最常见的是设定总误差目标值。并预先确定预期的定量限的目标浓度，在该浓度下制备多个低浓度水平样本。

8.4.4.6 线性区间

所用样本应尽可能与受检者样本相似，不含有说明书上指出的干扰物，受检者样本是线性验证的理想样本。可利用高、低浓度的样本配制不同浓度样本，高、低浓度值应在试剂盒声明的线性区间上下限附近。若不易获得高浓度样本，可通过向受检者样本中添加测定物（加入量小于总体积10%）获得；若不易获得低浓度样本，可通过已验证不含被测物的受检者样本稀释阳性受检者样本获得。

8.4.4.7 可报告范围

当验证的线性范围上限不能满足临床需求时，应进行可报告范围验证。定量分析方法的报告范围是临床实验室发布检测报告的依据之一，可报告范围的验证包括可报告低限（定量下限）与可报告高限（定量上限×样本最大稀释倍数）。选择在线性范围内高值样本，用试剂盒配套或指定的稀释液分别做10、100和1000倍等比稀释，稀释后的理论值不应低于定量下限，每份样本至少测定2次取平均值，计算各稀释度的理论值与实测值对数值的差值，差值（例如偏差）应满足实验室和行业的质控要求。

8.4.4.8 核酸提取效率

当怀疑核酸提取效率存在问题，应就核酸模板提取质量进行验证，见本标准第5.5.6条。

8.4.4.9 核酸扩增效率

当怀疑PCR扩增系统存在问题，应进行扩增效率验证。扩增效率包括样本和标准品的扩增效率两部分，仅在两者扩增效率良好且一致时，定量结果才准确。

8.4.5 临床验证

临床检测方法在启用前后，实验室均宜选取临床明确诊断的受检者样本，进行方法学性能评价，以验证检测方法达到临床应用的规定标准要求。评价指标可包括：临床灵敏度和特异性、阳性和阴性预测值、阳性和阴性似然比等。

8.5 室内质量控制

8.5.1 总体要求

8.5.1.1 实验室应建立内部质量控制程序以验证达到预期的结果质量。

8.5.1.2 实验室应使用与受检者样本组分和基质相似的质控品，定期检测质控品，检测频率应基于检验程序的稳定性和错误结果对受检者危害的风险而确定。

8.5.1.3 实验室宜选择医学决定水平或与其值接近的质控品浓度，以保证决定值的有效性。

8.5.1.4 根据质控品性质决定是否参加抽提，室内质控宜覆盖从抽提至实时荧光PCR检测的全过程。

8.5.2 核酸提取的质量控制

8.5.2.1 总体要求

在实时荧光PCR检测过程中，可通过设立内对照进行核酸提取的质量控制。如果本批实验无内对照扩增，则提示样本内存在抑制物/干扰物，可通过重新抽提核酸清除或减少抑制物/干扰物。

8.5.2.2 内源性内对照常采用人体细胞中的管家基因。内源性内对照既可以监测采样质量，又可以监测核酸提取到产物分析全过程的有效性。

8.5.2.3 外源性内对常常用人工合成的假病毒或质粒，在核酸提取前掺入样本中，与目标序列同时提取和扩增，可监测从核酸提取到产物分析全过程的有效性，但不能反映采样质量。

8.5.3 扩增反应的质量控制

8.5.3.1 定性检测项目，每次实验应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控品。

8.5.3.2 定量检测项目，每次实验应设置阴性、弱阳性和阳性质控品。

8.5.3.3 如为基因突变、基因多态性或基因型检测，则应包括最能反映检测情况的突变或基因型样本，每批检测的质控至少应有一种基因突变或基因型。宜设置某一时间周期，令周期内各批次检测所设置质控品监测位点合计可覆盖该检测项目所包含的所有位点。

8.5.3.4 扩增反应的质量控制至少涵盖提取的核酸模板质量、反应体系（酶浓度与活性、离子活度、升降温控制等）、阴性和阳性（特别是临界弱阳性）对照设置等方面。

8.5.3.5 对于定量测定，除阴、阳性质控符合要求外，还应考虑每次实验的扩增效率（斜率、截距、相关系数）符合规定。

8.5.4 质控结果的判读

8.5.4.1 实验室应建立质量控制程序以保证检测结果的稳定性和可靠性。

8.5.4.2 当违反质控规则，且检测结果可能存在明显错误时，应拒绝接受结果，在纠正并验证性能合格后重新检测受检者样本。

8.5.4.3 发现失控后，应对操作、试剂、仪器、人员、污染等环节进行全过程分析，查找失控原因。失控实验室还应评估最后一次成功质控活动之后受检者样本的检测结果。

8.5.5 质控数据处理

8.5.5.1 实验室应定期评审质控数据，以发现可能提示检测系统问题的检测性能变化趋势。

8.5.5.2 发现此类趋势时应采取预防措施并记录。

8.5.5.3 宜尽量采用统计学和非统计学过程控制技术连续监测检测系统的性能，通常绘制室内质控图，每月或间隔特定周期对室内质控进行总结和记录。

8.6 实验室间比对

8.6.1 总体要求

8.6.1.1 实验室应参加实验室间比对计划（例如：外部质量评价计划或能力验证计划），监控实验室间比对计划的结果，以保证实验室间检测结果的可比性。

8.6.1.2 当不符合预定的评价标准时，实验室应实施纠正措施。

8.6.1.3 室间质量结果评价可参考 WS/T 414 执行。

8.6.1.4 当无实验室间比对计划可利用时，实验室应采取其他方案并提供客观证据确定检测结果的可接受性。

8.6.1.5 实验室应建立参加实验室间比对的程序，该程序包括职责规定、参加说明，以及任何不同于实验室间比对计划的评价标准。

8.6.1.6 实验室选择的实验室间比对计划应尽量提供贴近临床实际的、模拟受检者样本的比对试验，尽可能覆盖包括分析前和分析后程序的全部检测过程。

8.6.2 替代方案

8.6.2.1 当无实验室间比对计划可利用时，实验室可寻找其他有相关检测资质的实验室，按照上述方法定期进行实验室间比对，每年不宜少于 2 次；或采取其他方案并提供客观证据确定检测结果的可接受性，这些方案应尽可能使用适宜的物质。

8.6.2.2 适宜物质包括：有证标准物质/标准样本；以前检测过的样本；细胞库或组织库中的物质；与其他实验室的交换样本；实验室间比对计划中日常测试的质控品。

8.6.3 检测结果的可比性

8.6.3.1 当实验室所开展检测项目就检验程序、设备、地点、人员中任一情况存在不同时，应规定比较程序和所用设备及方法，并建立临床适宜区间内受检者样本结果可比性的方法。

8.6.3.2 实验室应对比较的结果进行整理、记录，适当时，迅速采取纠正措施。应对发现的问题或不足采取纠正措施并保存所实施措施的记录。

9 结果判读和报告

9.1 结果判读

9.1.1 判读结果前应先查看下列情况的样本扩增曲线形态，并根据项目 SOP 设定各荧光信号通道判读阈值：

- a) 查看标准品扩增曲线是否正常，曲线参数是否在试剂说明推荐范围内。
- b) 查看阳性质控品扩增曲线是否正常，Ct 值是否在试剂说明推荐范围内。
- c) 如设置有内对照，查看其扩增曲线是否正常，Ct 值是否在试剂说明推荐范围内，以确保核酸提取的有效性。
- d) 查看阴性质控品扩增曲线是否正常，仅在其未见明显扩增且阴阳性质控检测结果均满足实验室要求时，才可判读并发布该批次检测结果报告。

9.1.2 定性项目依据试剂盒声明的判断标准进行结果判读；定量检测项目根据分析测量范围下限和上限报告定量检测结果，当结果超出分析测量范围时宜直接报告超出上限。鉴于 PCR 对稀释误差的指数级放大效应，不宜进行样本稀释检测。

9.2 可疑结果的判读与处理

9.2.1 出现可疑结果时应进行复核。

9.2.2 结果复核应充分考虑分析前和分析中各因素的影响。必要时可通过多次、多部位采样降低样本采集对结果的影响，也可换用其他检测试剂进行复核。

9.2.3 如检测结果怀疑样本中存在有抑制物，应考虑进行稀释验证。当样本稀释后，检测到的信号持续变强，提示有抑制物存在。需注意样本稀释后核酸模板同时被稀释，应确保稀释过程中核酸模板浓度仍保持在具有临床检测意义的范围之内。

9.3 检测方法局限性

9.3.1 检测报告中宜对检测方法的局限进行充分说明。

9.3.2 基于已知序列信息的分型方法可能检测不到新的等位基因，或者无法与已知等位基因相区别，为避免漏检新的等位基因，可采用多种引物组合，以提高检测到新等位基因的可能性。

9.4 结果报告基本要素

9.4.1 内容应科学、规范和准确。实验室宜与检测申请者共同商定检测报告的格式与内容。

9.4.2 至少包括受检者姓名和唯一标识、检测方法、报告项目中文和/或英文名称、计量单位（应尽可能使用 SI 单位）、样本采集日期和时间、实验室接收样本的时间、报告发布日期和时间、检测者和报告者姓名和实验室信息。

9.5 结果报告的程序

9.5.1 实验室应制定结果报告程序以确保检测结果准确及时地发送至检测申请者或授权可接受检测报告的人员。

9.5.2 当检测结果采用多种方式发送（例如：电话、邮件等），应对每种报告方式设置明确规定，避免受检者隐私受到侵犯。

9.5.3 结果报告程序应符合相应法律法规和卫生行政主管部门的要求。

9.6 检测结果解释

- 9.6.1 检测报告单宜提供结果解释，帮助报告接收者正确解读检测报告。
- 9.6.2 宜包括对检测报告单中所呈现内容的解读，如报告中出现的专业性术语、定义或计量单位。
- 9.6.3 可对检测方法学性能、临床性能、干扰因素以及方法学局限性进行说明。
- 9.6.4 可就后续检验提供参考性建议。

10 实验室生物安全

- 10.1 实验室应在卫生行政主管部门进行生物安全备案。
- 10.2 实验室所属机构应成立生物安全委员会，建立生物安全管理体系。实验室应落实实时荧光 PCR 检测工作开展过程中的生物安全风险评估、负责工作人员健康监测、组织生物安全培训与考核、监督定期报告等工作制度。
- 10.3 实验室应对实时荧光 PCR 检测活动中涉及的致病性生物因子、涉及致病性生物因子的检测活动、感染性废弃物处置过程中的风险、从事检验工作人员的健康状况和安全知识水平、实验室设备和应急处理措施进行风险评估，并依据风险评估结论采取相应的风险控制措施。
- 10.4 实验室生物安全管理可参考 WS 233 以及相应法律法规。

11 临床适用范围

- 11.1 在疾病的临床诊疗工作中，实时荧光 PCR 技术可针对人体组织、血液、其他体液等样本中所含有的人源性及病原微生物核酸序列，就特定核酸片段、单核苷酸多态性、小片段缺失/插入、基因融合、甲基化修饰等基因片段信息进行定性及定量检测，从核酸序列、复制、转录等水平对其进行分析。
- 11.2 当临床诊疗决策所涉及分子片段变异信息明确时，宜采用实时荧光 PCR 技术检测；当分子片段信息尚不明确或变异度较大时，宜采用测序技术检测，对经测序获得的分子片段信息，可采用实时荧光 PCR 技术进行验证。
- 11.3 经实时荧光 PCR 检测获得的基因片段信息，可用于感染性疾病、肿瘤性疾病、先天性及遗传性疾病及个体化用药、移植配型等，指导疾病的筛查、诊断、分期、分型、用药、疗效评价、耐药监测及预后评估等，详见本标准附录 B。

附录 A (资料性附录) 常用实时荧光 PCR 技术方法

A.1 实时荧光定量PCR技术

A.1.1 实时荧光定量PCR技术（荧光探针法）

基于荧光探针的实时荧光定量PCR技术目前在临床广泛被使用。该技术在反应体系中加入了一段荧光标记的特异性寡核苷酸探针，探针的5'和3'端分别标记有报告荧光基团（Reporter, R）和淬灭荧光基团（Quencher, Q）。探针完整时R基团所发射的荧光能量被Q基团吸收，不发出荧光。探针与模板特异性结合后，在延伸阶段，Taq DNA聚合酶的5'-3'核酸外切酶活性会将探针5'端连接的报告荧光基团水解，报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而发出荧光。检测到的荧光强度与PCR产物量成正比，从而可推算出目的片段的起始量。实时荧光定量PCR技术扩增后无需开管操作，可降低污染风险。此外，实时荧光定量PCR技术还具有特异性高、定量准确、实验耗时短、兼容性好等优势，已被广泛应用于临床工作中。

A.1.2 实时荧光定量PCR技术（荧光染料法）

该技术在反应体系中加入荧光染料，荧光染料不与ssDNA链结合，且在游离状态下不发出荧光。染料随扩增反应的延伸循环掺入dsDNA，与小沟结合后发出荧光，荧光信号强度与产物的数量呈正相关。荧光染料包括饱和荧光染料和非饱和荧光染料，目前应用最广泛的染料是SYBR Green I。尽管荧光染料法的特异性低于探针法，但由于其成本更低，易于普及应用。

A.1.3 多重荧光PCR技术

多重荧光PCR技术指在同一个PCR反应体系中，使用多对引物/探针，对多种目标序列同时进行扩增的方法。多重PCR技术既兼有单一反应PCR的高特异性和灵敏度，同时具有高效和经济的特点，可同时检测多种目标序列，例如多种耐药基因、多种病原体基因，尤其适用于珍贵样本。然而多重荧光PCR技术对反应体系的平衡有更高要求，例如荧光标记间、多对引物及探针间的相互干扰，宜不断进行优化，以减少存在多种靶标时可能出现的扩增偏好性。

A.1.4 扩增阻滞突变系统PCR技术（amplification refractory mutation system PCR, ARMS-PCR）

扩增阻滞突变系统PCR技术亦称等位基因特异性PCR，用于对已知突变基因进行检测。该技术设计有两个5'端引物，一个与野生型互补，一个与突变型互补。对于纯合性突变，分别加入两种5'端引物及3'端引物进行平行PCR，只有与突变完全互补的引物才可延伸并得到扩增产物。如错配位于引物的3'端则导致延伸反应无法进行。ARMS-PCR法检测灵敏度高，可检测肿瘤细胞中突变比例为1%甚至更低的突变基因。

A.1.5 高分辨率熔解曲线技术（high resolution melting, HRM）

高分辨率熔解曲线技术是一种基于实时荧光PCR的新方法，可用于检测基因突变、基因分型、单核苷酸多态性以及甲基化修饰等。该方法在反应体系中加入新型饱和染料，通过实时监测升温过程中荧光染料与扩增产物的结合情况，根据不同熔解曲线形状和位置来判断是否存在基因突变或SNP。

A.2 其他

基于实时荧光PCR技术的原理，目前还衍生有多种其他类型技术。对于RNA样本，可采用反转录实时荧光PCR，通过反转录酶将RNA反转录为cDNA，再进行后续扩增。临床上，反转录聚合酶链反应（reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）技术通常用于RNA病毒检测（例如丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒等）以及疾病相关mRNA转录产物的分析（例如非霍奇金淋巴瘤、白血病和肉瘤等伴随的基因易位等）。此外，甲基化特异性PCR技术（methylation specific PCR, MSP）也在临床疾病诊治中有相关应用。同时，随着技术的不断发展，新一代实时荧光PCR技术例如数字PCR技术（digital PCR, dPCR）、微流控PCR技术、PCR技术阵列芯片等发展迅速，但在临床应用上仍处于探索阶段。

附 录 B
(资料性附录)
实时荧光 PCR 技术临床适用范围

B.1 感染性疾病中的应用

B.1.1 总体原则

B.1.1.1 实时荧光PCR技术可直接检测病原微生物特异性核酸序列,以此判断样本中是否含有可疑病原微生物,具灵敏、特异、简便、快捷的优势,有利于疾病的早期快速诊断。

B.1.1.2 该技术除用于提供病原学感染的实验室证据外,还可用于病原微生物定量、分型、耐药基因、基因突变等检测,为临床诊疗决策、流行病学监测、院感防控等提供指导。

B.1.1.3 在感染性疾病应用过程中应做好鉴别现症感染、既往感染;污染、定植、条件致病菌等情况,并结合其他检测结果及临床实际,为病原学确诊提供分子依据。

B.1.2 病毒感染性疾病

B.1.2.1 病毒定性检测

实时荧光PCR技术可检测病毒特异性核酸序列,以明确样本中是否含有相关病毒。多重实时荧光PCR技术可同步检测多种病毒,提高呼吸道、消化道等感染症候群的诊断效率。

B.1.2.2 病毒定量检测

结合特定定值标准品参考体系,实时荧光PCR检测结果可用于评价样本中的病毒含量。在临床诊疗中可用于临床病情评估、治疗决策、疗效评价、耐药监测与鉴定等。

B.1.2.3 病毒基因型鉴定

实时荧光PCR技术可针对病毒特异性基因的高度可变区,根据不同基因型核酸序列的特异性目的片段特点设计引物和探针,在特定反应体系和反应条件下,通过检测特异性目的片段进行病毒基因型鉴定。该技术较中和试验、血凝抑制试验等传统免疫学方法血清型鉴定更为准确、便捷。病毒基因型信息可指导疾病治疗决策、风险评估、分子流行病学监测。

B.1.2.4 病毒耐药监测

实时荧光PCR技术可检测病毒耐药基因相关核苷酸位点,识别或监测治疗过程中的获得性耐药。宜用于感染初始评价,以及慢性、反复、迁延性病毒感染的治疗监测。

B.1.3 细菌感染性疾病

B.1.3.1 细菌种属鉴定

实时荧光PCR技术可针对细菌16S rRNA基因保守序列及菌种特异性基因靶点设计引物和探针,其中保守区域序列可帮助判断样本中是否含有细菌核酸片段,可变区种属特异性序列可帮助鉴定病原菌种属。该方法可直接检测临床样本中难以培养的细菌,也可对已培养的细菌进行种属鉴定和基因分型,可用于指导临床决策、分子流行病学监测。

B.1.3.2 细菌定量检测

结合特定定值标准品参考体系,实时荧光PCR检测结果可用于评价原始样本(例如血液等可进行定量的样本类型)中的细菌含量,为临床病情评估、治疗监测、院感防控等提供参考。

B.1.3.3 细菌耐药监测

实时荧光PCR技术可检测细菌耐药基因相关位点,识别或监测治疗过程中的获得性耐药。宜用于感染初始评价,以及慢性、反复、迁延性细菌感染的治疗监测。该技术检测所得核酸序列信息可提示细菌耐药机制,指导治疗药物决策。

B. 1.4 其他病原生物感染

B. 1.4.1 真菌菌种鉴定

实时荧光PCR技术可针对真菌核糖体DNA内转录间隔区序列、18S及26S rRNA基因的高度变异区（D1/D2区）以及特定菌种特异性基因靶点核酸序列设计特异性引物，帮助判断样本中是否有真菌并鉴定菌种。

B. 1.4.2 寄生虫感染诊断

实时荧光PCR技术可针对寄生虫的基因组特异性序列进行检测，较传统镜检、血清学检测方法具更高灵敏度、特异性。

B. 1.4.3 支原体、衣原体、脲原体感染诊断

实时荧光PCR技术可针对支原体、衣原体、脲原体基因组特异性序列进行检测。

B. 2 肿瘤性疾病中的应用

B. 2.1 总体原则

实时荧光PCR技术可检测人体组织、细胞、血液、其他体液样本中与肿瘤发生发展过程相关的特异性核酸序列多态性、异常甲基化、miRNA等肿瘤分子标志物，所获得的细胞恶性演变各阶段特征性基因型及表型协助预示肿瘤的存在或发生风险，用于肿瘤筛查与早期诊断、分子分型、伴随诊断、治疗随访、复发监测、疗效评价、提示预后转归等诊疗决策。

B. 2.2 肿瘤辅助诊断

实时荧光PCR可用于肿瘤相关分子标志物检测，其定性或定量结果可作为判断肿瘤有无或肿瘤负荷的辅助诊断指标。

B. 2.3 肿瘤伴随诊断

实时荧光PCR检测可用于与肿瘤靶向药物相关的基因诊断。临床应用时宜考虑外周血cfDNA及ctDNA抽提技术、恶性肿瘤异质性等因素所导致的技术局限性。

B. 2.4 肿瘤易感、预后评价与治疗监测

实时荧光PCR技术对肿瘤易感、预后评估与治疗监测具有指导作用。

B. 3 遗传性疾病中的应用

B. 3.1 总体原则

实时荧光PCR技术可用于胚胎植入前、产前、新生儿、儿童、成人等阶段的遗传病筛查与诊断。通过直接检测基因变异筛查或辅助诊断相关遗传病。

B. 3.2 单基因遗传病

单基因遗传病的发生主要受一对等位基因控制，利用实时荧光PCR技术对患者及亲属进行检测可协助揭示相关致病变异，利于遗传病的预防、早期诊断和治疗。

B. 3.3 线粒体病

实时荧光PCR技术可通过检测线粒体DNA点突变、缺失/插入等遗传缺损，识别因线粒体代谢酶缺陷所引起的以ATP合成障碍、能量来源不足为特点的线粒体遗传性病变。

B. 4 药物相关基因多态性检测中的应用

B. 4.1 总体原则

实时荧光PCR技术可对药物代谢相关基因进行分析，指导临床合理选择用药及调整给药剂量。

B. 4.2 药物代谢及转运相关基因多态性检测

发生在药物相关代谢酶、转运蛋白、作用蛋白的编码基因序列多态性及表达水平差异可造成相应药物在个体的代谢清除能力与作用效果差异，影响个体治疗疗效与副作用的发生。根据所获得检测基因的多态性结果可指导临床个体化用药，协助药物发挥最佳疗效。

B. 4.3 药物毒副作用相关基因检测

基因多态性与药物不良反应相关，服用药物前明确毒副作用相关基因型等可避免或减少药物毒副作用的发生，指导临床合理用药。

B. 5 其他

随着实时荧光PCR衍生技术的进步，其临床适用范围也逐渐扩大。在临床应用过程中应密切结合临床实际情况，关注检测技术的固有优缺点及局限性，掌握临床适应症、样本类型的正确选择，正确、合理、适当的结果解读等，选择合适的人群、应用合适的方法、在最佳时机进行实时荧光PCR检测，获得临床应用的最大收益。

参 考 文 献

- [1]中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室分子诊断领域认可指南:CNAS-GL050:2021. 2021.
- [2]中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-GL039:2019. 2019.
- [3]《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发〔2010〕194号)
- [4] 李金明. 实时荧光PCR技术. 第2版. 北京:科学出版社, 2016:134-165.
- [5] 李艳, 李金明. 临床分子诊断分析前与分析后. 北京: 科学出版社, 2017: 108 - 217.
- [6] 康凤凤, 王治国. IS015189:2012与临床检验定量检测方法确认和性能验证. 临床检验杂志, 2013, 31(12):881-884.
- [7] Li M, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017, 19(1):4-23.
-