ICS 11.040.55
CCS C 44

中华人民共和国国家标准

GB/T 41521—2022

多指标核酸恒温扩增检测微流控芯片通用技术要求

General technical requirement of microfluidic chip for multi-index nucleic acid isothermal amplification and detection

2022-07-11 发布　　2022-07-11 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　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。

本文件由全国生物芯片标准化技术委员会(SAC/TC 421)归口。

本文件起草单位：博奥生物集团有限公司、北京博奥晶典生物技术有限公司、四川大学华西医院、首都医科大学附属佑安医院、北京大学人民医院、清华大学。

本文件主要起草人：潘良斌、邢婉丽、李为民、高占成、程京、辛娟。

多指标核酸恒温扩增检测微流控芯片 通用技术要求

1 范围

本文件规定了多指标核酸恒温扩增检测微流控芯片的分类和命名，要求，试验方法，标志、标签和说明书，包装、运输和贮存的要求。

本文件适用于以微流控芯片为载体的多指标核酸恒温扩增检测产品。

本文件不适用于含其他生物功能模块的微流控芯片产品，如包含核酸提取、核酸纯化等功能的微流控生物芯片产品。

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 21415—2008 体外诊断医疗器械 生物样品中量的测量 校准品和控制物质赋值的计量学溯源性

GB/T 29791.1 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第1部分：术语、定义和通用要求

3 术语和定义

GB/T 21415—2008、GB/T 29791.1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微流控芯片 microfluidic chip

以硅、玻璃、金属材料、高分子聚合物等材料为芯片基材，利用微纳加工、精密注塑等加工技术加工而成，其中包括一个或多个微管道、微阀、微反应池等功能单元，能够完成芯片内液体流动的精准操控，从而实现某种特定生化反应功能的生物芯片。

[来源：GB/T 27990—2011，2.2.2，有修改]

3.2

多指标核酸恒温扩增检测 multi-index nucleic acid isothermal amplification and detection

某种方法或产品可对一份样品中的多个(通常为2个以上)待检测核酸靶序列在恒定的温度下同时进行扩增和检测。

注：待检测核酸靶序列来自细菌、病毒、寄生虫、真菌等某一类别中的多个核酸靶序列，或者来自多个类别中的多个核酸靶序列。

3.3

多指标核酸恒温扩增检测微流控芯片 microfluidic chip for multi-index nucleic acid isothermal amplification and detection

设计有多个并列的微反应池(通常为5个以上)以及连接这些微反应池的微管道，并在微反应池内

包埋可与特定待检靶核酸序列进行特异性结合的引物或(和)探针,加入含有待检样本的反应液后,在恒定的温度下,微反应池内可完成多个(通常为 2 个以上)待检测核酸靶序列扩增和检测的微流控芯片。

3.4

阳性质控 positive control

用来质控整个检测过程(如核酸提取、核酸扩增反应等)是否正常的试剂。

注:一般包括阳性对照、内参对照。阳性对照通常包含一段与待检样本无关的核酸制品及可与该核酸制品进行特异性结合的引物或(和)探针,置于芯片上的微反应池内,用于监测核酸扩增过程是否正常。内参对照通常为可与特定样本来源(如人体细胞)靶序列进行特异性结合的引物或(和)探针,置于芯片上的微反应池内,用来监测样本核酸提取等前处理过程是否正常。

3.5

生物相容性 biocampatibility

材料与生物试剂之间相互作用后产生的各种复杂的生物、物理、化学等反应及其对生物反应过程和反应结果的影响的一种性能。

3.6

透光性 light transmission

特定波段的光谱透过芯片材质的能力。

3.7

光强度检测重复性 repeatability of light intensity detection

对相同种类、质量或体积的同一份标准荧光(或浊度)物质进行多次重复检测,其荧光信号(或浊度引起的光强变化)检测值的一致性。

3.8

标准荧光物质 normal fluorochrome

由短波长激发光激发,可以释放出可见光的试剂。

示例:常见的标准荧光物质有 FAM、HEX、VIC、Cy3、ROX、纳米材料、量子点等。

3.9

密封性 leak tightness

芯片及其附属材料防止内装物溢出或其他物质进入的特性。

3.10

准确性 accuracy

测量结果与被测量真值之间的一致性程度。

[来源:GB/T 21415—2008,3.1]

3.11

特异性 specificity

能专一检测被测物的试验能力,即当样本中不存在目标核酸时则不会被检出,实际验证中采用假阳性率进行考核。

3.12

检测限 detection limit; limit of detection

最低检测限 minimum detected concentration

样本中以一定概率可被检测到的与零有差异的被测量的最低值。

注:本文件中的检出限为区别于零的样本不低于 95%检出的最低浓度值。

[来源:YY/T 1182—2020,3.3,有修改]

3.13

重复性 repeatability

在相同测量条件下,在芯片内对多份相同种类、质量或体积的标准核酸样本进行核酸扩增检测,连

续多次测量所得结果之间的一致性。

3.14

实时稳定性　stability of real-time aging

长期稳定性　long term stability

芯片及试剂在生产企业规定界限内真实贮存条件下保持其质量特性的能力，超过此期限即认为失效。

注 1：稳定性适用于芯片、生物试剂和参考品的生产、运输、保存和使用。

注 2：芯片的稳定性通常用时间量化。

3.15

包装运输稳定性　stability of packing and transporting

芯片及试剂在生产企业规定的包装条件下，在指定运输流通过程中保持其质量特性的能力。

4　分类和命名

4.1　分类

按照检测技术可分实时荧光法、终点荧光法、浊度法、显色法检测微流控芯片等；按照样本通量可分为单样本芯片、二样本芯片、多样本芯片，按照待检靶核酸序列来源，可分为细菌、病毒、寄生虫、真菌核酸检测微流控芯片等。

4.2　命名

具体产品命名由检测方法和待检靶核酸名称组成，例如，实时荧光法细菌核酸检测微流控芯片、终点荧光法病毒核酸检测微流控芯片。

5　要求

5.1　外观

5.1.1　芯片及芯片产品外观清洁、无影响产品质量特征的明显划痕、破损等可见缺陷，特别是功能结构区域。

5.1.2　芯片产品包装应外观清洁、无泄漏、无破损，标志、标签字迹清楚。

5.2　微反应池数量及容积

一张芯片上应设置一个或多个样本检测单元，用来检测一个或多个样本。一个样本检测单元内应至少包含 5 个微反应池，各个微反应池的容积可相同或不同，所容纳的液体体积应为 0.8 μL～30 μL。

5.3　芯片材质透光性

芯片微反应池检测窗口位置对检测波长的光谱的透过性，应不小于芯片自身材料光谱透过率的 80%。

5.4　光强度检测重复性

对于荧光检测的芯片，用同一份标准荧光（或浊度）物质进行连续重复性测定，各检测微反应池最后 10 次连续荧光信号测量值的变异系数 CV 应不大于 10%。

5.5 生物相容性

在正常试验条件下，芯片及其附属材料应不影响生物性能检测结果。

5.6 准确性

用阳性参考品和(或)阳性标准品进行测定，相应检测指标的检测结果应为阳性，相应检测指标外的其他检测指标的检测结果应为阴性。

5.7 特异性

特异性应满足以下要求：

a) 用阴性参考品进行测定，检测指标的检测结果应为阴性；

b) 用阳性参考品进行测定，相应检测指标的检测结果应为阳性，相应检测指标外的其他检测指标的检测结果应为阴性。

5.8 检测限

用检测限参考品进行测定，检出率应不低于95%。

5.9 重复性

用重复性参考品(一份或多份)进行测定，同一批生产的芯片10次平行检测结果一致性应达到100%且结果准确；3批芯片的30次平行检测结果一致性应达到100%且结果准确。

5.10 密封性

用重复性参考品或标准荧光物质进行测定，检测后各芯片应密封性良好，各独立腔室试剂无相互串扰、无泄露。

5.11 工作温度耐受性

芯片及其附属材料在使用工作温度±2 ℃范围内，且试验时间不少于1.2倍的正常试验条件工作时间，外观应无形变、无破损，各独立腔室试剂无相互串扰、无泄露，特异性、检测限和重复性的检测结果应符合相应5.7、5.8、5.9要求。

5.12 质控设置

每个样本检测单元的微反应池应至少设置阳性质控(1个阳性对照、1个内参对照)和1个阴性对照，阳性质控和阴性对照的检测结果应准确且符合使用要求。

5.13 实时稳定性

生产企业应规定产品的有效期，对芯片产品进行真实存储条件下保存至有效期后的实时稳定性。在有效期内规定的时间间隔对3批芯片成品进行测定，检测结果应符合5.6、5.7、5.8、5.9要求；测试后的各芯片应密封性良好，各独立腔室试剂无相互串扰、无泄露。

5.14 包装运输稳定性

生产企业应基于对产品实际运输条件的认知，进行最差条件(最长运输时间、极冷或者极热温度、冲击与振荡)下的模拟试验，检测结果应分别符合5.1、5.6、5.7、5.8、5.9要求；测试后的各芯片应密封性良好，各独立腔室试剂无相互串扰、无泄露。

6 试验方法

6.1 工作条件

芯片产品性能测试所用仪器应为该类型芯片配套专用检测仪器，要求控温精度不低于±0.5 ℃，额定电压为 220 V±22 V，大气压力为 85.0 kPa～106.0 kPa，环境温度为 15 ℃～30 ℃，环境相对湿度为 20%～85%，工作试验流程按照生产企业标称的产品执行。

注：上述工作条件与生产企业标称的产品规格不一致时，以产品规格为准。

6.2 外观

目视检查。

6.3 微反应池数量及容积

用影像测量仪、高度规等测量工具测定微反应池 X、Y、Z 方向的尺寸，根据微反应池的结构形状以及相应数学公式计算其可容纳的液体体积。

6.4 芯片材质透光性

将被检测芯片的微反应池检测窗口放于分光光度计或者光功率计（使用光谱响应满足检测波长要求的检测仪器）的检测窗，根据所用核酸染料的激发和发射光谱特性设定适宜的波长波段，检测芯片微反应池的光透过率。

6.5 光强度检测重复性

在常温条件下，将同一份标准荧光（或浊度）物质注入芯片微反应池通道中，用芯片配套专用检测仪器激发光检测 10 min，分别记录各个独立微反应池通道最后 10 次连续荧光（或浊度）信号测量数据 $I_i(i=1,2,\cdots n)$，分别计算每份样本或每个微反应池通道的平均值 $I_{平均}$ 和标准差 SD，按照公式（1）计算变异系数 CV。

$$CV = SD/I_{平均} \times 100\% \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

CV ——变异系数；

SD ——标准差；

$I_{平均}$——测量值的平均值。

6.6 生物相容性

保持芯片及其附属材料与核酸扩增检测试剂接触时间不少于正常试验条件的工作时间，然后取阳性参考品、检测限参考品或者重复性参考品，进行 6.8～6.10 特异性、检测限或重复性试验。

6.7 准确性

取阳性参考品和（或）阳性标准品注入抽检的芯片产品中，然后用配套专用检测仪器对加样后的芯片产品进行正常试验条件下的测定，统计每次的芯片检测结果并与预期结果做比对。每种阳性参考品和（或）阳性标准品应至少测试 1 次。

注：阳性参考品和（或）阳性标准品是单份样品或者是由多份样品混合组成的混合样品；由单个或多个待检指标组成；阳性参考品、阳性标准品对应指标的检测结果均为阳性。

6.8 特异性

6.8.1 取阴性参考品注入抽检的芯片产品中，然后用配套专用检测仪器对加样后的芯片产品进行正常试验条件下的测定，统计每次的芯片检测结果，并与预期结果做比对。每种阴性参考品应至少测试1次。

6.8.2 取阳性参考品注入抽检的芯片产品中，然后用配套专用检测仪器对加样后的芯片产品进行正常试验条件下的测定，统计每次的芯片检测结果，并与预期结果做比对。每种阳性参考品应至少测试1次。

6.9 检测限

取检测限参考品注入抽检的芯片产品中，然后用配套专用检测仪器对加样后的芯片产品进行正常试验条件下的测定，各待检指标重复测试20次，统计每次的芯片检测结果，并与预期结果做比对，计算各指标的阳性检出率。

注：检测限参考品由单个或多个待检指标组成。

6.10 重复性

对连续生产的3批芯片产品进行抽检，每批抽检10张芯片。取重复性参考品(一份或多份)注入抽检的芯片产品中，然后用配套专用检测仪器对加样后的芯片产品进行正常试验条件下的平行测定，统计每次的芯片检测结果，并与预期结果做比对，统计同一批芯片的10次平行检测结果；统计3批芯片的30次平行检测结果。

6.11 密封性

本试验宜在加热烘箱或芯片配套专用检测仪器中进行，试验温度设置应高于正常试验条件温度的10%，试验时间设置应不少于1.2倍的正常试验条件工作时间。从同一批芯片产品中抽检至少5张芯片，将一定量的重复性参考品或标准荧光物质注入芯片中，通过系列适宜的操作使测试试剂置于微反应池内，芯片封进出样口后置于上述条件的加热烘箱或芯片配套专用检测仪器中进行测定。

6.12 工作温度耐受性

分别采用阳性参考品、检测限参考品、重复性参考品对抽检的芯片进行特定工作温度和工作时间条件下的特异性、检测限、重复性测定；每次试验结束后，目视检查芯片外观及芯片各腔室内试剂情况，根据检测结果判定芯片及其附属材料的工作温度耐受性。

6.13 质控设置

按照芯片指标排布顺序生产3批芯片，然后进行特异性、重复性测定。

6.14 实时稳定性

定期对实际贮存条件下的至少3批芯片产品进行准确性、特异性、检测限和重复性测定，并目视检查测试后芯片的外观及芯片各腔室内试剂情况。如果产品有效期为一年或一年以内，实时稳定性应每月检测一次；若产品有效期超过一年，第一年内应每隔三个月检测一次，第二年内应每隔六个月检测一次，第三年开始宜每年检测一次。

6.15 包装运输稳定性

取正常存储条件下有效期内的芯片产品3批，按照制定的模拟试验条件进行试验，目视检查芯片试

验前后的外观变化及芯片各腔室内试剂情况，然后进行准确性、特异性、检测限和重复性测定。

注：模拟试验条件制定的前提是生产企业充分考虑了实际销售运输过程中如运输路线、交通工具、距离、时间、条件（温度、湿度、振动情况等）、产品包装情况（外包装、内包装等）、产品放置情况和监控器情况（温度监控器的数量、位置等）等对芯片产品性能的影响。

7 标志、标签和说明书

7.1 标志、标签

芯片产品的包装箱（盒）的标志和标签应符合 GB/T 191、GB/T 29791.1 的有关规定，如应用于医疗器械产品，标签方面的有关要求见《医疗器械说明书和标签管理规定》。

7.2 说明书

应用于医疗器械产品的说明书的有关要求见《医疗器械说明书和标签管理规定》，应用于体外诊断试剂的说明书的有关要求见《体外诊断试剂说明书编写指导原则》。

8 包装、运输和贮存

8.1 包装

应根据产品贮存条件选择包装容器。

8.2 运输

应按照产品说明书的规定进行运输，避免产品包装在长途运输过程中受到自然损坏导致泄漏。

8.3 贮存

应根据产品包装标签规定的要求进行贮存。

参 考 文 献

[1] GB/T 27990—2011 生物芯片基本术语

[2] YY/T 1182—2020 核酸扩增检测用试剂(盒)

[3] 医疗器械说明书和标签管理规定(国家食品药品监督管理总局令第6号,2014年)

[4] 体外诊断试剂说明书编写指导原则(国家食品药品监督管理总局第17号通告,2014年)

[5] 黄国亮,田浩,等.痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究[J].光学学报,2012,32(2):0217003 1-8.

[6] HUANG Guoliang, HUANG Qin, XIE Lan, et al. A rapid, low-cost, and microfluidic chip-based system for parallel identification of multiple pathogens related to clinical pneumonia[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):6441.

[7] XING Wanli, LIU Yingying, WANG Huili,et al. A high-throughput, multi-index isothermal amplification platform for rapid detection of 19 types of common respiratory viruses including SARS-CoV-2[J]. Engineering, 2020, 6:1130-1140.

[8] WANG Fang, LI Ran, SHANG Ying, et al. A Pilot Study of Quantitative Loop-mediated Isothermal Amplification-guided Target Therapies for Hospital-acquired Pneumonia[J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129(002):181-186.

[9] WANG Tongzhou, ZHANG Ye, HUANG Guoliang, et al. Detect early stage lung cancer by a LAMP microfluidic chip system with a real-time fluorescent filter processor[J]. Science China Chemistry, 2012, 055(004):508-514.

[10] ZHOU Qianjin, WANG Lei, CHEN Jiong, et al. Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 104:26-35.