



实时荧光定量聚合酶链反应检测试剂盒临床前开发流程与展望*

汪川[△], 李少鹤, 张世融

四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】近年来,实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术凭借其灵敏、快速和实时定量的特性,已成为分子诊断、病原体检测及基因表达分析的关键技术之一。2022年,全球核酸检测相关产品和服务(包括仪器、试剂、耗材和售后服务)的市场规模高达73亿美元,PCR占据其中66.7%的份额,并呈现递增态势。尽管qPCR技术已在多个领域广泛应用,但对于检测试剂盒临床前研究阶段,包括引物设计、反应体系优化等过程,仍然存在着流程不明确、手段不统一、评价不一致的现象。本文旨在通过梳理qPCR检测试剂开发的指导文件、关键资源及标准化流程,为提升检测试剂开发效率与质量控制提供理论参考,并展望qPCR技术在人工智能背景下的发展方向。

【关键词】 实时定量PCR 试剂开发 技术规范 临床前研究 标准化流程

Preclinical Development Process and Prospects of Real-time Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection Kits

WANG Chuan[△], LI Shaohu, ZHANG Shirong. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 In recent years, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technology has become an essential tool for molecular diagnosis, pathogen detection, and gene expression analysis, thanks to its high sensitivity, speed, and real-time quantification capabilities. In 2022, the global market size of nucleic acid testing-related products and services, including instruments, reagents, consumables, and after-sales service support, reached 7.3 billion US dollars, with PCR-based technologies accounting for 66.7% of the market share and exhibiting a consistent growth trend. Although qPCR technology has been widely applied across multiple fields, the preclinical development of diagnostic kits—a process that includes primer design and reaction system optimization—still faces such issues as unclear procedures, non-standardized methods, and inconsistent evaluation criteria. Herein, we reviewed the guidelines, key resources, and standardized processes of qPCR assay reagent development, aiming to provide theoretical support for improving the efficiency and quality control of assay reagent development, and to discuss future directions for the optimizing and improving qPCR technology in the context of artificial intelligence.

【Key words】 Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction Reagent development
Technical specifications Preclinical research Standardized process

实时荧光定量PCR检测试剂研发过程中的临床前研究阶段是指,已研发的试剂在进入正式临床试验或上市申报之前,对其分析性能、稳定性、安全性及适用性进行系统性验证的实验室研究阶段,该阶段对于确保试剂盒性能、指导后续临床试验及支持商业化具有至关重要的作用。在该阶段,研究者常面临指导文件体系繁复、开发过程细节纷乱等问题^[1-2],迫切需要了解标准化流程,以简化qPCR试剂开发的复杂程度,降低研发门槛并提升技术的应用潜力与广度。

1 核酸检测市场的发展现状

全球核酸检测市场规模在2022年达到73亿美元,预计将以12.2%的复合年增长率强劲扩张,到2030年市场价值将增至192亿美元。这一增长主要由持续的传染病防治需求(传染病检测占2022年市场份额的46.4%)、对先进诊断技术的研发投入以及检测方法创新等多种因素驱动。在技术方面,PCR检测占据核酸检测的主导地位,2022年占据66.7%的市场份额,并预计以12.4%的复合年增长率继续领跑。在PCR技术中,qPCR技术是主流^[3-4]。

中国食品药品检定研究院登记在册的核酸体外诊断

* 成都市科技局重大应用示范项目(No. 2022-YF09-00011-SN)资助

[△] 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

出版日期: 2025-09-20

试剂按照检测目标细分可归为9个类别(如表1所示)。国内获批的核酸检测试剂中,针对致病性病原体的产品占比高达89.7%,而qPCR技术是实现此类病原体核酸检测的主流技术。

2 试剂开发与注册申报相关的科学依据与法规

qPCR检测试剂盒的研发与转化需遵循严谨的科学依据与法规要求,以确保方法的可靠性、数据的可比性及产品的合规性。国际通用指南为技术开发提供了科学框架,而中国的法规体系则是本土化研发与注册的依据。表2系统性地梳理了相关重要标准与法规文件。

值得注意的是,国家药品监督管理局已针对不同病原体发布了一系列具体的技术审查指导原则。开发者在立项之初,需深入研读并严格遵守这些要求。以《B群链球菌核酸检测试剂注册技术审查指导原则》(2021年第24号)和《登革病毒核酸检测试剂注册技术审查指导原则》等文件为例,其对特定病原体核酸检测试剂的关键环节均提出了细致且明确的技术规范,涵盖靶基因选择、引物探针设计、主要原材料、分析性能评估(包括检出限、特异性、精密度)、阳性判断值建立、稳定性研究及临床试验方案设计等方面。

3 研发步骤

qPCR检测试剂盒的研发是一个系统性工程,其不仅涉及核心的qPCR反应,亦涵盖了从样本处理到结果判定

的完整流程。因此,开发过程需严格遵循相关法规指南,以确保试剂盒性能的可靠性与质量的稳定性。

3.1 靶标选择与序列分析

研发的首要步骤是基于已有的研究成果,分析并确定目标病原体的保守序列。研究者需从公共基因序列数据库中查找并获取目标序列,为后续的引物与探针设计提供基础。可参考的基因序列数据库有NCBI GenBank、GWAS Catalog等。

3.2 反应体系设计

反应体系的设计是试剂盒开发的核心环节之一,其主要包括标准品的确定、引物与探针的设计及qPCR预混液的选择等。

首先,标准品的确定至关重要。标准品是已知浓度或拷贝数的目标核酸,主要用于构建标准曲线,并据此评估试剂盒的灵敏度、线性范围、扩增效率及重复性等关键性能。标准品的主要类型包括可实现绝对定量的DNA、RNA及经权威机构认证的有证标准物质(certified reference material)等。研究者可根据试剂盒的类型及各类标准品的适用范围进行合理选择。

其次,引物设计需遵循多项原则。一方面,在引物设计过程中,为确保扩增的特异性与效率,设计时应避免形成引物二聚体,引物二聚体是指不同引物之间通过3'末端或其他区域的互补序列形成的双链结构。降低引物二聚体的技术难点在于,即使在引物设计时尽量避免互补序列,但由于引物的复杂性和反应体系的多样性,很难完全杜绝引物二聚体的形成。为此,研究者在引物设计阶段

表 1 核酸体外检测试剂类别及数量

Table 1 Categories and quantities of nucleic acid *in vitro* detection reagents

一级分类名称	风险级别 (管理类别)	检测目标/产品类型概要 (按病原体细分)	主要临床用途/目的	示例数量 及占比
与致病性病原体抗原、抗体以及核酸等检测相关的试剂	III	病毒:(HBV、HCV、HIV、HPV、Flu、RSV、SARS-CoV-2、EBV、CMV、轮状病毒、诺如病毒、登革病毒等)	病毒感染性疾病的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	34(50.00%)
		细菌(A/B群链球菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌/MRSA、淋球菌、沙门菌、嗜肺军团菌、幽门螺旋杆菌等)	细菌感染性疾病的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	15(22.06%)
		支原体/脲原体(肺炎支原体、解脲脲原体、微小脲原体、人型支原体、生殖支原体等)(检测物含抗体、核酸)	支原体/脲原体感染的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	5(7.35%)
		真菌(白色念珠菌、光滑/热带假丝酵母菌、隐球菌等)(检测物含抗原、核酸)	真菌感染性疾病的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	4(5.88%)
		衣原体(肺炎衣原体、沙眼衣原体等)	衣原体感染性疾病的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	2(2.94%)
		原虫/寄生虫(阴道毛滴虫等)(检测物含抗原、核酸)	原虫/寄生虫感染性疾病的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察等	1(1.47%)
与人类基因检测相关的试剂	III	人类遗传物质检测:胎儿游离DNA(染色体非整倍体 T21, T18, T13)	遗传性疾病(如唐氏综合征)的产前辅助判断	1(1.47%)
与肿瘤筛查、诊断、辅助诊断、分期相关的试剂	III	肿瘤标志物检测(miR-21, 25, 92a等)	特定癌症(肝癌、胰腺癌、大肠癌)的辅助诊断或疾病进程/疗效的辅助判断	3(4.41%)
样本处理用产品	I	样本前处理/保存:核酸提取/纯化-甲基化检测前处理-粪便样本保存	为后续临床体外检测准备或保存样本(不含特异性诊断成分)	3(4.41%)

表2 核酸体外检测试剂研发相关的法律法规

Table 2 Laws and regulations related to the research and development of nucleic acid in vitro detection reagents

层级	文件名称与编号	颁布机构	核心内容及与qPCR试剂的相关性
国家法律/条例	《中华人民共和国生物安全法》	全国人民代表大会	根本性法律。约束研发中使用的病原体、质控品和人类遗传资源样本的管理
	《中华人民共和国产品质量法》	全国人民代表大会	根本性法律。确立生产者的质量责任, 规定产品标签、包装和内在质量的底线要求
	《医疗器械监督管理条例》国务院令2021年第739号	国务院	核心行政法规。确立分类管理、注册人制度等基本框架, 是所有器械监管的“宪法”
管理办法	《体外诊断试剂注册与备案管理办法》国家市场监督管理总局令2021年第48号	国家市场监督管理总局	详细规定体外诊断产品注册/备案的流程、资料要求及全生命周期管理
	《医疗器械生产监督管理办法》国家市场监督管理总局令2022年第53号	国家市场监督管理总局	规定了生产许可、质量管理体系和日常监督的核心要求
	《医疗器械经营监督管理办法》国家市场监督管理总局令2022年第54号	国家市场监督管理总局	规范采购、储存、运输(含冷链)和销售等经营环节
	《医疗器械临床试验质量管理规范》国家药监局、国家卫生健康委公告2022年第28号	国家市场监督管理总局	确保试验设计、实施和数据管理的科学性、真实性和可溯源性
	《医疗器械不良事件监测和再评价管理办法》国家市场监督管理总局、国家卫生健康委员会令2018年第1号	国家市场监督管理总局	上市后安全监控的核心要求。强制注册人主动监测、上报不良事件并进行定期风险评价。
规范性文件/技术指导原则	《体外诊断试剂分类规则》国家药监局公告2021年第129号与《体外诊断试剂分类目录》国家药监局公告2024年第58号	国家药品监督管理局	规则提供方法, 目录提供清单, 共同决定产品按二类还是三类管理
	《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求的公告》国家药监局公告2021年第122号	国家药品监督管理局	明确规定申报所需全部资料的内容和格式, 是准备材料的直接依据
	《医疗器械生产质量管理规范附录: 体外诊断试剂》国家食品药品监督管理局公告2015年第103号	国家药品监督管理局	对生产环境、防交叉污染、物料控制等提出极其严格的特殊要求
	《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》国家药监局通告2021年第72号	国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心	详细阐述试验方案设计、样本量、统计分析等, 是满足审评的关键
国际/国内标准/指南	ISO 20395: 2019 Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences - Part 1: qPCR and dPCR	国际标准化组织	规范核酸靶序列定量方法(qPCR/dPCR)的性能评估, 为方法学验证提供系统化框架 ^[5]
	GB/T 42077-2022 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	国家标准化管理委员会	国内规范基于qPCR和dPCR技术进行核酸靶序列定量的方法的性能评价标准
	GB/T 37871-2019 核酸检测试剂盒质量评价技术规范	国家标准化管理委员会	首次在我国建立了试剂盒质量评价规范, 规定了试剂盒的溯源性要求
	MIQE Guidelines	BUSTIN等 ^[6]	规范qPCR实验报告的最低信息要求, 确保实验结果的可比性与可重复性

可使用专业软件, 强制约束3'端连续匹配或预测引物二聚体的形成能, 选择形成能较高(一般要求 > -5.6 kcal/mol)的引物, 降低引物二聚体形成的可能性; 此外, 可在优化反应条件时采取适当提高退火温度、调整引物浓度、实时监测判断引物二聚体的形成情况等方式降低该结构的形成。另一方面, 引物应设计在目标序列的保守区内部, 并需关注靶序列区域内已知的单核苷酸多态性及其他突变, 以确保设计的兼容性或区分能力^[7]。值得注意的是, 尽管多种专业软件可辅助设计, 但在实际应用中, 引物自身二级结构、镁离子浓度及引物浓度等因素均会对Tm值产生复杂影响^[8], 因此必须根据实际反应体系对引物设计进行验证与优化。可辅助设计引物的网站与软件有BLAST、Primer Premier、UNAFold、Geneious等。

探针的设计并非在所有qPCR试剂研发中均为必需环节, 其主要取决于所采用的检测方法。例如, 基于水解探针(如TaqMan探针)qPCR法需要精心设计探针, 而基于核酸染料(如SYBR Green)的方法则无需探针^[9]。探针设计的关键在于选择匹配的荧光基团与淬灭基团组合。

研究者需根据所用仪器平台的兼容性, 选择最佳的荧光基团(如FAM、HEX及ROX等), 并注意淬灭基团(如BHQ1及BHQ2等)的适用范围, 以确保荧光信号的有效产生与淬灭^[10]。探针序列应与目标序列完全互补, 且应避免与引物序列形成二级结构。

最后, 反应体系的构建不仅是简单选择市售预混液(Mix), 更涉及对核心组分的深入理解与筛选。一个典型的qPCR反应体系主要由缓冲液(包含关键的阳离子, 如Mg²⁺)、具有高热稳定性的DNA聚合酶、脱氧三磷酸核苷(dNTPs)、引物、探针(如适用)及模板核酸等构成^[11]。每一个组分的质量与浓度, 以及它们之间的相互作用, 都直接影响qPCR的性能。因此, 研发过程需对这些关键组分进行说明与选择, 并为后续的系统性优化提供支撑。

3.3 反应体系优化

在初步建立反应体系后, 必须对其进行系统性的优化。优化的内容主要包括引物特异性分析、最佳引物筛选、反应温度优化及引物用量优化等。

首先, 引物特异性分析需充分考虑竞争反应与交叉

性干扰。根据所采集的样本类型,应针对可能存在的内源或外源干扰物质进行验证^[12]。其次,通过比较相同靶标浓度下不同引物组合的Ct值,可初步筛选出扩增效率最高的引物,Ct值越低通常表明扩增效率越高。反应温度的优化亦是关键环节,退火温度对引物与模板结合的特异性影响显著。温度过低易导致非特异性扩增,而温度过高则可能降低扩增效率。因此,可通过设置退火温度梯度实验,依据扩增产物的特异性与产量来确定最佳退火温度^[13]。最后,引物用量的优化同样重要。在单重反应中,0.2 μmol/L的引物浓度通常较为合适;而在多重反应中,为降低非特异性扩增风险,宜适当减少引物浓度,最低可至0.1 μmol/L。设计正交实验是确定最佳引物及探针用量的有效方法,通过系统性地改变其浓度组合,并检测不同条件下的扩增性能,可最终确定最优的反应浓度配比^[14]。

除主要优化内容之外,试剂盒的质控体系还需考虑检测步骤的细节对反应体系的影响,包括样本核酸的提取与纯化、样本的处理与储存、配液与加样、试剂与仪器性能、扩增反应的抑制物、交叉污染、靶核酸降解等因素。由于上述因素受实验室环境影响较大,因此需在具体实验中做具体原因的分析与处理。

3.4 性能验证

性能验证是确保试剂盒质量符合预期的必要步骤,为证明生产工艺的稳定性和产品性能的可靠性,所有关键的性能验证项目(尤其是精密度、检出限及稳定性研究等),均应使用至少三批连续生产的合格产品进行检验,并提供完整的实验数据。性能验证主要包括线性、灵敏度、重复性、特异性、阳性判断值、稳定性研究六个方面的验证。

首先需要进行线性验证,该步骤是性能验证的基础。线性验证旨在通过对标准品进行系列稀释,评估检测方法在一定浓度范围内的线性范围和定量准确性。在此过程中,稀释操作的准确性是保证线性的关键之一,通常稀释体积在10 μL及以上时效果较好^[15]。理想的标准曲线斜率应约为-3.32。

在线性范围确定的基础上,开展灵敏度验证可进一步明确方法的检测下限,即确定检出限。对于检出限的定义在不同标准文件中有所差异。MIQE指南将其定义为在给定置信度(通常为95%)下方法能可靠检出的最低组分量^[16]。而GB/T 37 871-2019标准则规定了具体的实验操作,要求使用标准物质重复测定20次,阳性次数大于或等于17次(即≥95%的检出率)所对应的浓度即为检出限。此外,利用数字PCR(dPCR)进行绝对定量,亦是准确

评估qPCR方法灵敏度的有效手段之一。

在明确检测范围与下限后,重复性验证聚焦于评估检测结果的一致性与稳定性。该步骤通常要求在尽可能一致的实验条件下完成,如使用同一批次试剂、同一台仪器及由同一操作人员在短时间内操作等。为确保各反应管间试剂浓度的一致性,所用引物及探针可提前配制成母液后分装^[17]。采用标准曲线法进行重复性验证,可以有效避免因Ct值波动对结果评估产生的影响。

重复性保障了结果的稳定性,而特异性验证则确保检测方法的准确性与专一性,主要包括对交叉反应性与抗干扰性的评估。该验证需采用试剂盒对目标样本以及一系列可能构成干扰的其他核酸样本(如近缘物种的相似基因序列、样本中其他微生物的核酸等)进行检测^[18-19]。若仅目标样本出现特异性扩增,则可证明该检测方法具有良好的特异性。

在确认方法特异性的基础上,阳性判断值的确定为检测结果提供了明确的判定标准,亦是性能验证的核心内容之一。研究中需采用足量的临床或已知背景的阴、阳性样本,通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线等公认的统计学方法,科学、合理地建立用于区分阴性和阳性结果的临界值。如产品设计中存在“灰区”,则同样需要提供详尽的研究资料,明确灰区的定义范围及其结果的处理方式。所有相关的研究方法、数据及统计分析资料均需整理归档。

完成上述方法学性能验证后,稳定性研究最终决定产品的实际应用价值与保质期。该验证主要分为两大部分:首先是试剂稳定性,应包含评估产品有效期的实时稳定性(或称货架有效期)研究、模拟实际使用条件的开瓶(或在机)稳定性研究、运输稳定性研究及反复冻融稳定性研究等^[20]。其次是样本稳定性,需对适用样本类型在不同的采集、运输、处理及储存(冷藏、冷冻)条件下的稳定性进行验证。

通过上述六个维度的系统验证,可全面评估试剂盒的各项关键性能,为产品的质量控制在临床应用提供科学依据。此外,抑制物干扰影响qPCR反应稳定性,需在反应体系优化阶段进行系统性验证与解决。验证时需选取临床常见抑制物,配制覆盖生理及病理浓度范围系列梯度的抑制物,加入到已知浓度的阳性标准品中,对比添加前后的Ct值、扩增效率等指标,确定无显著干扰的最高抑制物浓度;同时采用人工模拟的重度溶血、脂血等异常样本,验证靶标回收率(需在80%~120%之间)。在实际应用过程中可通过优化样本前处理(如磁珠法核酸提取)、纳入内参基因为临床检测提供干扰预警等方法提升

试剂盒在复杂临床样本中的稳健性。

3.5 资料整理

在完成所有研发与验证工作后,资料整理与注册申报是产品走向市场的最后一步^[21]。建议研发人员深入研读国家药品监督管理部门发布的最新版《体外诊断试剂注册与备案管理办法》,以全面理解注册申报的法规框架、流程及各项要求^[22]。在资料撰写阶段,需严格按照法规要求,系统整理并撰写全套注册申报材料。其中,作为核心文件之一的产品技术要求,其编写应严格遵循《医疗器械产品技术要求编写指导原则》,准确、清晰地列明产品的各项性能指标及检验方法。此外,综述资料、主要原材料研究、生产工艺、分析性能评估、阳性判断值确定及稳定性研究等所有环节的完整资料,均是申报文件中不可或缺的组成部分^[23]。

3.6 数据转化

实时荧光定量PCR检测试剂盒的临床前研究阶段与临床试验并非完全割裂的两个阶段,前者的研究数据是后者科学设计的基础。其中样本量的估算以灵敏度与特异度为导向,通过统计学方法计算不同置信水平(通常取95%)和允许误差(如 $\pm 5\%$)下的最低样本量。低流行率靶标需扩大样本量,干扰样本和特定人群亚组需单独设计;此外,可参考临床前稳定性结果、重复性实验方案,设计多中心方案临床试验;临床试验终点需与临床前指标对应,以与金标准的一致性为主要终点,补充梯度浓度样本定量准确性及阴性对照假阳性率等次要终点,形成完整证据链。

4 展望与建议

4.1 试剂盒开发的智能化与自动化

当前qPCR试剂盒的研发可整合人工智能深度学习大模型、大数据处理等前沿领域的研究进展,进行智能化与自动化方向的升级。在实验规划阶段,基于深度学习的AI大模型可依据研究者所输入的研究目的、样本类型和可用资源等要素,依据ISO 20395:2019等标准框架与法规辅助生成定制化的试剂盒开发策略与实验方案;在引物探针设计阶段,可利用AI技术实时追踪全球病毒数据平台(Virus Data Integration Platform, VirusDIP),当发现新变异株时,系统可根据研究人员的实验目的自动优化引物探针设计,确保试剂盒检测灵敏度^[24]。全球首个靶向测序全流程AI智能体系统PrimeGen深度融合了大型语言模型与自动化硬件平台,将传统的引物设计和实验流程进行了技术化整合。PrimeGen采用智能化辅助设计结合实验室工作系统,实现了从用户自然语言输入到AI自主完成序列检索、引物设计、机器人协议生成和实验过

程监控的完整工作流程。相较于传统引物设计工具,PrimeGen的搜索智能体可快速理解用户需求,自动从NCBI等权威数据库中检索目标序列,可降低研究人员的专业门槛。此外,该系统在超高通量条件下,仍然能够保持优异的扩增均匀性,显著降低引物二聚体风险;在仪器设备优化方面,借助AI技术可开发智能温控系统,实时监控并调节仪器温度,依据反应进程动态调控升降温速度,保证每个反应孔温度的均匀性与准确性。

此外,AI赋能的自动化qPCR检测系统,可实现从样本前处理、自动加样、反应体系构建到数据分析的全流程自动化,甚至包括仪器自动校准与维护、智能调整检测参数等高级功能,从而大幅提升操作效率与结果的精准性,并最大限度地减少人为操作误差^[25-26]。同时,AI实时监测仪器运行状态,通过分析各项参数与运行数据可进行故障诊断,判断故障出现的原因并提供维修建议,进而提高设备稳定运行时间与整体工作效率。

4.2 POCT方向突破

qPCR在即时检测(point-of-care testing, POCT)方面的突破是其重要的发展方向之一。传统的PCR仪相对庞大、操作流程较为复杂(常涉及独立的核酸提取、反应体系配制、扩增检测等多个步骤),且整体检测周期较长。难以满足医院急诊、基层医疗及突发公共卫生事件中对于快速现场诊断的需求。而POCT化的qPCR检测设备可有效解决以上缺陷,使检测能够在患者床边、野外现场等场所快速进行,实现检测结果的即时获取,满足急诊治疗、偏远地区医疗等场景需求。

POCT化的qPCR检测设备当前仍然面临若干挑战,主要包括仪器微型化、流程自动化以及试剂稳定性。针对这些挑战,目前已有研究提出了相应的解决方法。首先,针对于仪器微型化的问题,可通过微流控芯片技术集成控温系统与微型互补型金属氧化物半导体(complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS)荧光传感器,进行设备体积的压缩,并提升升降温速率以缩短检测时间至30 min以内^[27];其次,可开发全自动样本处理系统解决流程自动化的问题,将核酸提取、扩增体系构建与检测步骤整合至单一微流控芯片,利用离心力或气动阀驱动实现加样至检出流程的自动化;此外,通过冻干技术可使反应体系长期保存^[28]。但该研究路径目前仍面临较大的实际应用障碍,一方面,微流控芯片的研发需结合微机电加工、化学合成、光学工程及电子工程等多领域学科,技术要求高,开发周期较长,研发成本高;另一方面,在微流控的产业化进程中,由于技术并未成熟,产品缺乏相应的标准化和规范化,目前未实现设计组件的通

用,难以形成上下游公司合作的开发模式,不利于大规模量产^[29-30];此外,冻干试剂的稳定性验证需要根据试剂种类的不同以及冻干工艺的实施条件的不同采取不同的研究步骤与方法,是一个复杂的过程,需耗费较多研究资源与成本。

4.3 物联网实现qPCR仪的远程监控与管理

将qPCR设备整合物联网技术,可实现对实验流程的实时远程监控与数据管理^[31-32]。科研人员和医护人员可以在任何具备网络的地方实时获取设备的运行状态与实验数据,及时对实验条件进行优化调整。同时,借助物联网技术还可以实现设备之间的数据共享和协同工作,促进实验室之间的科研合作^[33]。实现qPCR与物联网技术的结合不仅需要网络技术方面的创新研究,更关键的步骤在于提升qPCR试剂盒临床前开发阶段对于试剂性能的改进。

上述对于试剂盒开发方向的展望不仅是对检测器本身功能维度提升的思考,更具有实际意义的研究目标是在开创检测器新型功能模式背后对于试剂本身性能提升的新方式方法。尽管在qPCR的研究领域已涌现出诸多前沿技术与颇具前景的解决方案,但考虑到整体仪器功能模式创新存在多学科高度交叉融合的内在复杂性,以及临床应用场景对检测结果准确性、可靠性与稳定性的要求,真正实现稳定、普适且低成本的qPCR产品并将其广泛推向市场,仍面临诸多挑战,需要产学研各方持续投入与协同攻关。

* * *

作者贡献声明 汪川负责论文构思、经费获取、研究项目管理、监督指导、初稿写作和审读与编辑写作,李少鹤负责数据审编、调查研究、可视化和审读与编辑写作,张世融负责正式分析、调查研究、验证和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WANG Chuan is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, writing--original draft, and writing--review and editing. LI Shaohe is responsible for data curation, investigation, visualization, and writing--review and editing. ZHANG Shirong is responsible for formal analysis, investigation, validation, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 本文作者汪川是本刊编委会编委。该文在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有作者均声明不存在利益冲突。

Declaration of Conflicting Interests WANG Chuan is a member of the Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the author. Other than this, all authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] TAYLOR S C, NADEAU K, ABBASI M, *et al.* The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(7): 761-774. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002.
- [2] De GONZALO-CALVO D, MARCHESE M, HELLEMANS J, *et al.* Consensus guidelines for the validation of qRT-PCR assays in clinical research by the CardioRNA consortium. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, 24: 171-180. doi: 10.1016/j.omtm.2021.12.007.
- [3] TAN L L, LOGANATHAN N, AGARWALLA S, *et al.* Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Crit Rev Biotechnol*, 2023, 43(3): 433-464. doi: 10.1080/07388551.2022.2037503.
- [4] GOYAL S, SINGH P, SENGUPTA S, *et al.* DNA-aptamer-based qPCR using light-up dyes for the detection of nucleic acids. *ACS Omega*, 2023, 8(49): 47277-47282. doi: 10.1021/acsomega.3c07599.
- [5] BOXMAN I L A, MOLIN R, PERSSON S, *et al.* An international inter-laboratory study to compare digital PCR with ISO standardized qPCR assays for the detection of norovirus GI and GII in oyster tissue. *Food Microbiol*, 2024, 120: 104478. doi: 10.1016/j.fm.2024.104478.
- [6] BUSTIN S A, RUIJTER J M, Van den HOFF M J B, *et al.* MIQE 2.0: revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. *Clin Chem*, 2025; hvaf043. doi: 10.1093/clinchem/hvaf043.
- [7] BUSTIN S, HUGGETT J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*, 2017, 14: 19-28. doi: 10.1016/j.bdq.2017.11.001.
- [8] RODRÍGUEZ-BEJARANO F M, VEGA-RODRÍGUEZ M A, SANTANDER-JIMÉNEZ S. GADPO: genetic algorithm based on dominance for primer optimization. *Expert Systems with Applications*, 2024, 238.
- [9] SUN P, BAI C X, ZHANG D, *et al.* SYBR green-based real-time polymerase chain reaction assay for detection of porcine parvovirus 6 in pigs. *Pol J Vet Sci*, 2020, 23(2): 197-202. doi: 10.24425/pjvs.2020.132766.
- [10] 陈红, 成璐伶, 何淙, 等. 柑橘黄龙病菌和溃疡病菌SYBR Green I 双重 qPCR检测体系的建立. *中国果树*, 2025(8): 93-97. doi: 10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2025.08.012.
- [11] CHEN H, CHENG L L, HE Z, *et al.* Establishment of SYBR Green I -based duplex qPCR detection system for *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Xanthomonas citri subsp.citri*. *China Fruits*, 2025(8): 93-97. doi: 10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2025.08.012.
- [12] ZDENKOVA K, MUKHERJEE S, MARIN M A L, *et al.* Interlaboratory study on real-time PCR detection and quantification of the European anglerfish, pike, and seabream parvalbumin gene. *Eur Food Res Technol*, 2024, 250(11): 2821-2835. doi: 10.1007/s00217-024-04578-w.
- [13] RASO A, MASCELLI S, NOZZA P, *et al.* Troubleshooting fine-tuning procedures for qPCR system design. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25(6): 389-394. doi: 10.1002/jcla.20489.
- [14] ZHAO F, MAREN N A, KOSENTKA P Z, *et al.* An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 179. doi: 10.1038/s41438-021-00616-w.
- [15] BONG D, SOHN J, LEE S V. Brief guide to RT-qPCR. *Mol Cells*, 2024, 47(12): 100141. doi: 10.1016/j.mocell.2024.100141.
- [16] CHARRON M R, YATES M C, HEATH D D. Stomach content DNA (scDNA) detection and quantification for predator diet assessment using high-throughput nanofluidic chip technology: species-specific qPCR assay panel development and validation. *Mol Ecol Resour*, 2025, 25(7): e14106. doi: 10.1111/1755-0998.14106.
- [17] RUSSO S, GIORGIO G, LEO S, *et al.* Validation of IS900- qPCR assay to assess the presence of *Mycobacterium avium subsparuberculosis* in faecal samples according to the OIE procedure. *Prev Vet Med*, 2022, 208: 105732. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105732.
- [18] GRGICAK C M, URBAN Z M, COTTON R W. Investigation of reproducibility and error associated with qPCR methods using Quantifiler® Duo DNA quantification kit. *J Forensic Sci*, 2010, 55(5): 1331-1339. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01460.x.
- [19] KRONENBERGER J A, WILCOX T M, MASON D H, *et al.* eDNA assay: a

- machine learning tool that accurately predicts qPCR cross-amplification. *Mol Ecol Resour*, 2022, 22(8): 2994-3005. doi: 10.1111/1755-0998.13681.
- [19] ZANATTA C B, HOEPERS A M, NODARI R O, *et al.* Specificity testing for NGT PCR-based detection methods in the context of the EU GMO regulations. *Foods*, 2023, 12(23): 4298. doi: 10.3390/foods12234298.
- [20] 安艺婷, 高鸿飞, 翟杉杉, 等. RNAi抗虫作物中RNA成分免提取一步式RT-qPCR快速检测方法的建立. *中国油料作物学报*, 2025: 1-10. doi: 10.19802/j.issn.1007-9084.2024367.
- AN Y T, GAO H F, ZHAI S S, *et al.* Development of a rapid one-step RT-qPCR detection method for RNA components in RNAi crops without extraction. *Chin J Oil Crop Sci*, 2025: 1-10. doi: 10.19802/j.issn.1007-9084.2024367.
- [21] WISSEL M, POIRIER M, SATTERWHITE C, *et al.* Recommendations on qPCR/ddPCR assay validation by GCC. *Bioanalysis*, 2022, 14(12): 853-863. doi: 10.4155/bio-2022-0109.
- [22] 体外诊断试剂注册与备案管理办法. *中华人民共和国国务院公报*, 2021, (33): 76-88.
- [23] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J, *et al.* The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1063-1067. doi: 10.1038/nmeth.2697.
- [24] MENTES A, PAPP K, VISONTAI D, *et al.* Identification of mutations in SARS-CoV-2 PCR primer regions. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18651. doi: 10.1038/s41598-022-21953-3.
- [25] MAUSSION G, THOMAS R A, DEMIROVA I, *et al.* Auto-qPCR: a python-based web app for automated and reproducible analysis of qPCR data. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21293. doi: 10.1038/s41598-021-99727-6.
- [26] MAIRI A, HAMZA L, TOUATI A. Artificial intelligence and its application in clinical microbiology. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2025, 23(7): 469-490. doi: 10.1080/14787210.2025.2484284.
- [27] LIN B, LI B, ZENG W, *et al.* Needle-plug/piston-based modular mesoscopic design paradigm coupled with microfluidic device for point-of-care pooled testing. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(42): e2406076. doi: 10.1002/adv.202406076.
- [28] EMRICH T, STRACKE J O, GUO X, *et al.* Increasing robustness, reliability and storage stability of critical reagents by freeze-drying. *Bioanalysis*, 2021, 13(10): 829-840. doi: 10.4155/bio-2020-0299.
- [29] KULKARNI M B, GOYAL S, DHAR A, *et al.* Miniaturized and IoT enabled continuous-flow-based microfluidic PCR device for DNA amplification. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2022, 21(1): 97-104. doi: 10.1109/TNB.2021.3092292.
- [30] WANG Y, TANG H, HUANG L C, *et al.* Self-play reinforcement learning guides protein engineering. *Nat Mach Intell*, 2023, 5(8): 845. doi: 10.1038/s42256-023-00691-9.
- [31] 谭天晔, 林博. 基于人工智能和微流控液滴芯片的数字PCR芯片识别系统的研究. *功能材料与器件学报*, 2024, 30(6): 341-348. doi: 10.20027/j.gncq.2024.0044.
- TAN T Y, LIN B. Research on the digital PCR chip identification system based on artificial intelligence and microfluidic droplet chips. *J Func Mat Dev*, 2024, 30(6): 341-348. doi: 10.20027/j.gncq.2024.0044.
- [32] CHOI J W, SEO W H, LEE Y S, *et al.* Development of an IoT-integrated multiplexed digital PCR system for quantitative detection of infectious diseases. *Lab Chip*, 2022, 22(20): 3933-3941. doi: 10.1039/D2LC00726F.
- [33] AGALI K, MASROM M, ABDUL RAHIM F, *et al.* IoT-based remote monitoring system: a new era for patient engagement. *Healthc Technol Lett*, 2024, 11(6): 437-446. doi: 10.1049/htl2.12089.

(2025-05-27收稿, 2025-08-19修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*