

JJF (皖)

安徽省地方计量技术规范

JJF (皖) 165—2023

实时荧光定量PCR仪校准规范

Calibration Specification for Real-Time Fluorescent Quantitative
Polymerase Chain Reaction Analyzer

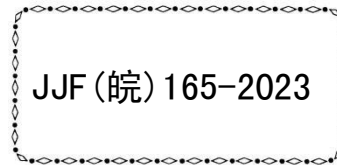
2023-08-03发布

2023-10-01实施

安徽省市场监督管理局 发布

实时荧光定量 PCR 仪校准规范

Calibration Specification for Real-
Time Fluorescent Quantitative
Polymerase Chain Reaction Analyzer



归 口 单 位：安徽省医化计量技术委员会

主要起草单位：安徽省计量科学研究院

安徽医科大学第一附属医院

参加起草单位：北京林电伟业电子有限公司

本规范委托安徽省医化计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

徐 俊（安徽省计量科学研究院）

王 成（安徽医科大学第一附属医院）

汪鹏飞（安徽医科大学第一附属医院）

何淑莲（安徽省计量科学研究院）

贾雪怡（安徽省计量科学研究院）

参加起草人：

贺晓辉（安徽省计量科学研究院）

吕 吉（安徽省计量科学研究院）

李 征（北京林电伟业电子技术有限公司）

目 录

引言	(III)
1 范围	(1)
2 引用文件	(1)
3 术语和计量单位	(1)
3.1 聚合酶链反应	(1)
3.2 聚合酶链反应分析仪	(1)
3.3 实时荧光定量聚合酶链反应分析仪	(1)
3.4 温度示值误差	(1)
3.5 温度均匀度	(1)
3.6 温度波动度	(2)
3.7 温度最大过冲量	(2)
3.8 平均升温速率	(2)
3.9 平均降温速率	(2)
3.10 荧光染料	(2)
3.11 荧光强度精密度	(2)
3.12 阈值循环数	(2)
3.13 阈值循环数精密度	(2)
3.14 溶解温度	(2)
3.15 溶解曲线	(2)
3.16 熔解温度漂移	(2)
3.17 峰值强度	(3)
3.18 通道峰值强度一致性	(3)
3.19 线性灵敏系数	(3)
3.20 熔解温度比	(3)
3.21 样本示值误差	(3)
3.22 样本线性	(3)

4	概述.....	(3)
5	计量特性.....	(4)
6	校准条件.....	(5)
6.1	测量标准及其他设备.....	(5)
7	校准项目和校准方法.....	(6)
7.1	校准项目.....	(6)
7.2	校准方法.....	(6)
8	校准结果表达.....	(12)
9	复校时间间隔.....	(13)
附录 A	标准物质的准备及配制.....	(14)
附录 B	PCR 反应体系的配制.....	(16)
附录 C	测量不确定度评定示例.....	(17)
附录 D	校准原始记录格式.....	(23)
附录 E	校准证书内页格式.....	(28)

引 言

JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》共同构成了支撑本规范编制工作基础性系列文件。

校准方法及计量特性等主要参考了 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》、YY/T 1173-2010 聚合酶链反应分析仪、JJF 1101-2019《环境试验设备温度、湿度参数校准规范》。

本规范为首次发布。

实时荧光定量PCR仪校准规范

1 范围

本规范适用于实时荧光定量PCR仪的校准，其他类型PCR仪相同原理部分可参照本规范执行。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1527 聚合酶链反应分析仪校准规范

YY/T 1173 聚合酶链反应分析仪

JJF 1101 环境试验设备温度、湿度参数校准规范

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范；凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 术语和计量单位

3.1 PCR（聚合酶链反应） polymerase chain reaction

PCR即聚合酶链反应是一种对特定的DNA或RNA片段在体外进行快速扩增的方法，由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成。（YY/T 1173-2010）

3.2 PCR仪（聚合酶链反应分析仪） polymerase chain reaction analyzer,PCR analyzer

基于PCR技术原理，模拟DNA或者RNA的复制过程，在模板、引物、聚合酶等存在的条件下，特异扩增已知序列，对其进行检测分析的仪器设备。（YY/T1173-2010）

3.3 实时荧光PCR real-time polymerase chain reaction PCR

在PCR过程中利用荧光染料释放的荧光能量的变化直接反映出PCR扩增产物量的变化，荧光信号变量与扩增产物变量成正比，并通过对荧光的采集和分析以达到对原始模板量进行分析的PCR。（YY/T 1173-2010）

注：在每个循环中监测扩展产物是否可被检测。

3.4 温度示值误差 temperature indication error

荧光定量聚合酶链反应分析仪均热块设定温度值与实际温度平均值的差。单位：摄氏度，符号：℃。

3.5 温度均匀度 temperature uniformity

均热块内所有采样测量孔温度孔温度平均值的最大值与最小值之差。单位：摄氏度，符号：℃。

3.6 温度波动度 temperature volatility

在被检设备稳定的状态下, 在规定的时间内, 均热块所有采样点中任意一点温度随时间的变化量。冠以“±”号。单位: 摄氏度, 符号: °C。

3.7 温度最大过冲量 temperature maximum overshoot

均热块温度升高或降低至设定值过程中, 所有采样测量孔温度超出(高于或低于)设定值的最大幅度。单位: 摄氏度, 符号: °C。

3.8 平均升温速率 mean heating rate

升温过程中模块单位时间内上升的平均温度度数。单位: 摄氏度每秒, 符号: °C/s。
(YY/T 1173-2010)

3.9 平均降温速率 mean cooling rate

降温过程中模块单位时间内下降的平均温度度数。单位: 摄氏度每秒, 符号: °C/s。
(YY/T 1173-2010)

3.10 荧光染料 fluorochrome

由短波长激发光激发, 释放出可见光的试剂。(YY/T1173-2010)

3.11 荧光强度精密度 precision of fluorescence intensity

对多个检测孔在同一荧光条件下重复荧光强度检测, 其检测值的一致性。(YY/T 1173-2010)

3.12 阈值循环数 C_t (C_p) cycle threshold, crossing point

实时监测扩增过程中, 反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前3~15个循环的荧光值的10倍标准差为阈值, 当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数(C_t)。(YY/T 1173-2010)

3.13 阈值循环数精密度 precision of cycle threshold

均热块不同测量孔在同一荧光条件下阈值循环数重复测量的一致性。

3.14 熔解温度 melt temperature (T_m)

总的DNA双螺旋结构降解一半时的温度称为熔解温度, 简称 T_m 值, 不同序列的DNA, T_m 值不同。单位: 摄氏度, 符号: °C。

3.15 熔解曲线 melt curve

PCR过程中均热块测量孔的荧光强度(纵坐标)与温度(横坐标)形成的曲线。

3.16 熔解温度漂移 melt temperature (T_m) bias

根据熔解曲线计算的熔解温度值与光学标准器熔解温度设定值之差。单位: 摄氏

度, 符号: °C。

3.17 峰值强度 peak intensity

熔解曲线上熔解温度对应的荧光强度。

3.18 通道峰值强度一致性 channel peak intensity consistency (CPHC)

熔解曲线上, 所有采样测量孔峰值强度的变化趋势。

峰高的差异表明荧光定量PCR仪的光路、光学、光学检测和灵敏度的差异, 理想的荧光定量PCR仪, CPHC为1.00。

3.19 线性灵敏系数 linear sensitivity factor (LSF)

同一熔解温度下, 表征熔解曲线线性变化灵敏程度的比率。

理想的荧光定量PCR仪, 线性灵敏度应该是1.00。LSF在0.80和1.20之间, 溶解曲线呈现基本线性;

$LSF < 0.80$: 在高荧光强度下线性降低, 注意信号饱和;

$LSF > 1.20$: 在低荧光强度下线性降低, 注意最小信号检测和灵敏度。

3.20 熔解温度比 ratio of melt temperature (RT_m)

同一熔解温度下, 表征熔解温度漂移因素的比率。

RT_m 在0.80到1.20之间: 相同产品熔解温度不同, 差异仅基于控温模块特性, 熔解峰漂移与温度不均匀直接相关;

$RT_m > 1.20$: 相同产品熔解温度不同, 差异是由控温模块、光学和光学检测系统不准确共同导致的;

$RT_m < 0.80$: 相同产品熔解温度不同, 差异是与光学、光学检测系统及分析软件直接相关。

3.21 样本示值误差 error of sample's indication

被测仪器测量平均值与标准物质标称值之差。单位: 拷贝数/微升, 符号: copyies/ μ L。

3.22 样本线性Samples of the linear

系列稀释标准物质扩增 C_t 值对浓度对数值的线性回归系数。

4 概述

实时荧光定量PCR仪, 全称为实时荧光定量聚合酶链反应分析仪 (real-time fluorescent quantitative PCR analyzer, RFQ-PCR, 以下简称实时荧光定量PCR仪) 是在PCR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, 同时通过标准曲线对扩增基因进行定量分析的仪器。标记有荧光染料的探针与模板基因混合后,

完成高温变性、低温复性和适温延伸的热循环后，与模板基因互补配对的探针被切断，荧光染料游离于反应体系中，在特定光激发下荧光染料发出荧光，随着循环次数的增加，被扩增的目的基因片段呈指数规律增长，通过实时检测与之对应的随扩增而变化的荧光信号强度，既可对待测扩增基因进行定量分析。

实时荧光定量 PCR 仪均热块一般有 32 孔板、48 孔板、96 孔板和 384 孔板等几种类型，其中 96 孔板应用最为广泛。如图 1 所示，其主要由温度控制模块、微量荧光检测模块、均热块、电脑控制系统、计算机及应用软件组成。

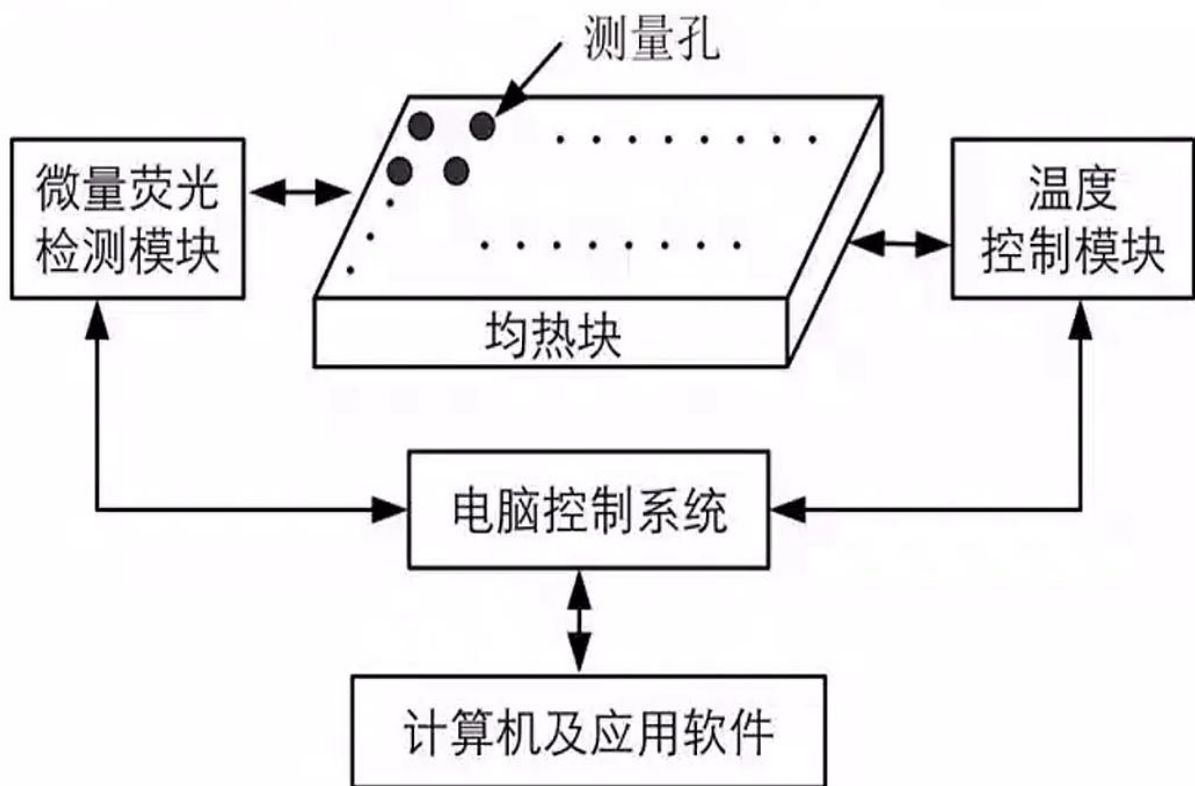


图1 实时荧光定量PCR仪结构示意图

5 计量特性

一般情况下，实时荧光定量 PCR 仪计量性能指标如表 1 所示。

表1 实时荧光定量PCR仪计量性能指标

序号	项目		技术指标	备注
1	温度示值误差	30℃ 50℃ 60℃ 70℃ 90℃ 95℃	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	温度项目
2	温度均匀度		$\leq 1.0^{\circ}\text{C}$	
3	温度波动度		$\leq 0.2^{\circ}\text{C}$	
4	温度最大过冲量		$\leq 3.0^{\circ}\text{C}$	
5	平均升温速率	50℃→90℃	$\geq 1.5^{\circ}\text{C/s}$	
6	平均降温速率	90℃→50℃	$\geq 1.5^{\circ}\text{C/s}$	
7	阈值循环数示值误差		± 2.5	光学系统 物理项目
8	阈值循环数均匀度		≤ 5	
9	阈值循环数精密度		$\leq 10\%$	
10	通道峰值强度一致性		± 0.2	
11	线性灵敏系数		± 0.2	
12	熔解温度漂移		$\pm 1^{\circ}\text{C}$	
13	熔解温度比		± 0.2	
14	样本示值误差		$\pm 15\%$	光学系统 生物化学 项目
15	样本线性相关系数		≥ 0.980	

6 校准条件

仪器使用允许的环境条件，测量过程中应测量和记录环境的温度、相对湿度。

6.1 测量标准及标准物质

6.1.1 光学标准器

光学标准器集成了温度传感器和发射光发生器两部分，该两部分可以为集成装置。其温度测量范围为（0~120）℃，最大允许误差为 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ；发射光发生器的波长范围为（360~780）nm，相对光辐射强度在（10%~100%）范围内可调。

6.1.2 标准物质

校准时应采用国内外有证标准物质，包括：质粒DNA标准物质、核糖核酸标准物质，其特性量值（拷贝数 $\geq 10^9\text{copies}/\mu\text{L}$ ，相对扩展不确定度 $\leq 5\%$ ）。

6.1.3 电子天平

精度 $\leq 0.01\text{mg}$ ，且需要计量检定合格。

6.1.4 移液器

规格： $2\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1000\ \mu\text{L}$ ，且需要计量检定合格。校准前按照附录A配置校准时使用的溶液。

7 校准项目和校准方法

7.1 校准项目

校准项目主要分为温度项目和光学系统项目两大类，具体项目见表1。可根据客户要求与实际选择光学系统物理校准方法或光学系统生物化学校准方法中的一种方法对荧光定量PCR仪光学系统进行校准。

7.2 校准方法

7.2.1 校准前的准备工作

PCR仪均热块孔数少于96孔时，测量点为12个，布点图（以48孔为例）如图2所示。PCR仪均热块孔数大于或等于96点时，测量点为15个，布点图如图3所示。也可以根据被测PCR仪说明书或客户要求，增加或减少测量点数量，并图示说明。

校准前将PCR仪预热30min。

将仪器及光学标准器各部件连接完好，在光学标准器下部的温度传感器表面上涂抹适量导热油，以确保其与均热块测量孔接触良好。将光学标准器分布于均热块测量孔中。标准物质的准备与配置按照附录A执行。PCR反应体系的配置按照附录B执行。

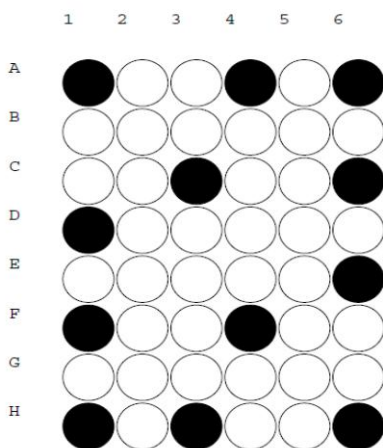


图2 12个光学标准器位置分布示意图

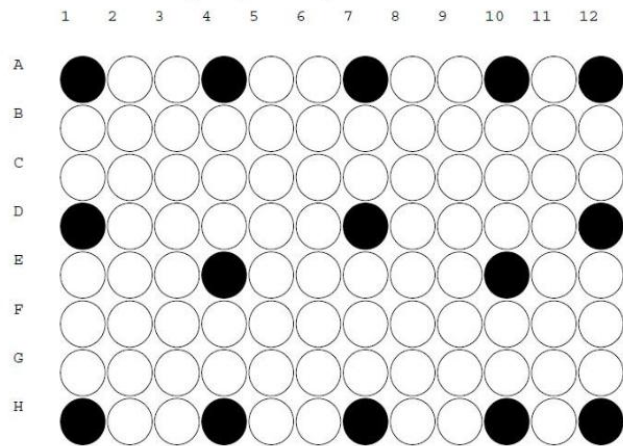


图3 15个光学标准器位置分布示意图

7.2.2 校准过程

温度项目校准时，典型的校准设置程序如表2步骤4~11所示（其中平均升、降温速率的测量数据分别来源于步骤4到步骤5和步骤5到步骤6；温度示值误差的测量数据

来源于步骤5~11；温度均匀度、温度波动度、温度最大过冲量的测量数据来源于步骤5~10。光学系统采用物理校准方法时，典型的校准设置程序如表2步骤12~16所示（步骤12和步骤13之间设定程序循环32次）。光学系统采用生物化学校准方法时，典型的校准设置程序如表3所示。也可以根据被测PCR仪说明书或客户要求，参照表2或表3进行设定，并说明具体参数校准时所选取的温度值。

表2 温度校准控制程序

步骤	设定温度点	持续时间	备注
1	30℃	60s	预热
2	95℃	60s	
3	30℃	60s	
4	30℃	60s	温度控制
5	95℃	180s	
6	30℃	120s	
7	90℃	180s	
8	50℃	180s	
9	70℃	180s	
10	60℃	180s	
11	30℃	60s	
12	85℃	10s	模拟光学扩增过程重复32个循环
13	60℃	30s	
14	95℃	15s	扩增变性
15	60℃	30s	熔解曲线分解
16	85℃	10s	

表3 光学系统采用生物化学校准方法的校准设置程序

步骤	设定温度点	持续时间	循环数
1	50℃	120s	1
2	95℃	600s	1
3	95℃	30s	45
4	60℃	60s	

7.2.3 温度项目校准

7.2.3.1 温度示值误差

温度达到设定温度30s后开始记录测量值，记录5s，最少均匀记录5组数据。温度示值误差的计算按照公式（1）计算：

$$\Delta T = T_s - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \bar{T}_i \quad (1)$$

式中：

ΔT ——温度示值误差， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_s ——设定温度值， $^{\circ}\text{C}$ ；

\bar{T}_i ——第*i*个温度传感器测量值平均值， $^{\circ}\text{C}$ ；

n ——温度传感器数量。

7.2.3.2 温度均匀度

温度达到设定温度30s后开始记录测量值，记录5s，最少均匀记录5组数据。温度均匀度的计算按照公式（2）计算：

$$\Delta T_u = \bar{T}_{max} - \bar{T}_{min} \quad (2)$$

式中：

ΔT_u ——温度均匀度， $^{\circ}\text{C}$ ；

\bar{T}_{max} ——所有测温传感器测定值平均值的最大值， $^{\circ}\text{C}$ ；

\bar{T}_{min} ——所有测温传感器测定值平均值的最小值， $^{\circ}\text{C}$ 。

7.2.3.3 温度波动度

温度达到设定温度30s后开始记录各点量值，记录60s，最少均匀记录10组数据。温度波动度为实测最高温度与最低温度之差的一半，冠以“ \pm ”号。按照公式（3）计算：

$$\Delta T_f = \pm \max[(T_{jmax} - T_{jmin})/2] \quad (3)$$

式中：

ΔT_f ——温度波动度， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_{jmax} ——测量点*j*温度传感器在*m*次测量中的最高温度， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_{jmin} ——测量点*j*温度传感器在*m*次测量中的最低温度， $^{\circ}\text{C}$ 。

7.2.3.4 温度最大过冲量

温度过冲量的计算按照公式（4）计算：

$$\Delta T_t = |T_{t\max} - T_S| \quad (4)$$

式中:

ΔT_t ——温度最大过冲量, °C;

$T_{t\max}$ ——上升或下降达到设定温度后, 所有温度传感器测得的温度最高或最低测量值, °C;

T_S ——设定温度值, °C。

7.2.3.5 平均升温速率

被测实时荧光PCR定量仪从 $(50 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 升温至 $(90 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 时, 平均升温速率的计算按照公式 (5) 计算:

$$\Delta T_{\text{ah}} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{T_{bi} - T_{ai}}{t_{hi}}}{n} \quad (5)$$

式中:

ΔT_{ah} ——平均升温速率, °C/s;

T_{ai} —— $(50 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 温度点第 i 个采样测量孔的测量值, °C;

T_{bi} —— $(90 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 温度点第 i 个采样测量孔的测量值, °C;

t_{hi} ——从 T_{ai} 到达 T_{bi} 的时间, s;

n ——温度测量点的个数。

7.2.3.6 平均降温速率

被测实时荧光定量PCR仪从 $(90 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 降温至 $(50 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 时, 平均降温速率的计算按照公式 (6) 计算:

$$\Delta T_{\text{ac}} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{T_{bi} - T_{ai}}{t_{ci}}}{n} \quad (6)$$

式中:

ΔT_{ac} ——平均降温速率, °C/s;

t_{ci} ——从 T_{bi} 到达 T_{ai} 的时间, s。

7.2.4 光学系统物理校准法

7.2.4.1 阈值循环数示值误差、均匀度和精密度

阈值循环数 C_t 示值误差的计算按照公式(7)计算,均匀度的计算按照公式(8)计算,精密度按照公式(9)计算 C_t 值的相对实验标准偏差,以其作为 C_t 值精密度的表征。

$$\Delta C_{ti} = C_{tqi} - C_{ts} \quad (7)$$

$$\Delta C_{tu} = C_{tqmin} - C_{tqmin} \quad (8)$$

$$RSD_{C_t} = \frac{1}{\frac{\sum_{i=1}^n C_{tqi}}{n}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(C_{tqi} - \frac{\sum_{i=1}^n C_{tqi}}{n} \right)^2}{n-1}} \times 100\% \quad (9)$$

式中:

ΔC_{ti} ——第*i*个采样测量点阈值循环数 C_t 示值误差;

C_{tqi} ——第*i*个采样孔荧光信号达到阈值时的实时荧光定量PCR仪的阈值循环数;

C_{ts} ——荧光信号达到阈值时光学标准器实际经历的循环数;

ΔC_{tu} ——阈值循环数均匀度;

ΔC_{tqmax} ——所有采样孔荧光信号达到阈值时的阈值循环数最大值;

ΔC_{tqmin} ——所有采样孔荧光信号达到阈值时的阈值循环数最小值;

RSD_{C_t} ——阈值循环数精密度;

n ——光学标准器数量。

7.2.4.2 通道峰值强度一致性、线性灵敏系数

当DNA循环扩增从最大荧光强度(100%)减弱到20%时,仪器理论上所接受到的荧光强度也线性递减。计算熔解曲线上熔解温度(T_m)附近的温度点对应的荧光强度,得到通道峰值强度一致性(CPHC)和线性灵敏系数(LSF),分别由公式(10)、公式(11)计算:

$$CPHC_i = \frac{B_i - C_i}{B - C} \quad (10)$$

$$LSF_i = \frac{A_i - B_i}{B_i - C_i} \quad (11)$$

式中:

$CPHC_i$ ——通道峰值强度一致性

B_i —— $T_m - 2^\circ\text{C}$ 时,第*i*个采样孔对应的荧光强度;

C_i —— $T_m + 2^\circ\text{C}$ 时, 第*i*个采样孔对应的荧光强度;

\bar{B} —— $T_m - 2^\circ\text{C}$ 时, 所有采样孔对应的荧光强度平均值;

\bar{C} —— $T_m + 2^\circ\text{C}$ 时, 所有采样孔对应的荧光强度平均值;

A_i ——第*i*个采样孔测量熔解曲线上温度 T_m 对应的荧光强度。

LSF_i ——线性灵敏系数;

7.2.4.3 熔解温度漂移和熔解温度比

熔解温度漂移的计算按照公式(12)计算, 熔解温度比的计算按照公式(13)计算。

$$\Delta T_{m_i} = T_{m_i} - T_{m_s} \quad (12)$$

$$RTm = \frac{T_{m_{\max}} - T_{m_{\min}}}{T_{\max} - T_{\min}} \quad (13)$$

式中:

ΔT_{m_i} ——第*i*个采样测量孔熔解温度漂移, $^\circ\text{C}$;

T_{m_i} ——实时荧光定量PCR仪实测 T_m 值, $^\circ\text{C}$;

T_{m_s} ——光学标准器 T_m 值, $^\circ\text{C}$;

RTm ——熔解温度比;

$T_{m_{\max}}$ ——所有采样测量孔实时荧光定量PCR仪的 T_m 最大值, $^\circ\text{C}$;

$T_{m_{\min}}$ ——所有采样测量孔实时荧光定量PCR仪的 T_m 最小值, $^\circ\text{C}$;

T_{\max} ——光学标准器设定 T_m 时所有测温传感器测定值的最大值, $^\circ\text{C}$;

T_{\min} ——光学标准器设定 T_m 时所有测温传感器测定值的最小值, $^\circ\text{C}$ 。

7.2.5 光学系统化学校准法

7.2.5.1 标准物质的配置

标准物质配制方法见附录A。

7.2.5.2 校准板的制备

用经过计量校准的移液器, 将配制好的实时荧光定量PCR仪反应体系加入到反应板中, 按图4所示准备96孔校准板, 其他型号的仪器可参照本示例准备, 被校实时荧光定量PCR仪反应体系的配制方法见附录B, 温度控制程序参照表3。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1
B	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1	U NIM U1
C	S NIM S1	S NIM S1	S NIM S1	S NIM S1	S NIM S1	S NIM S1	S NIM S2	S NIM S2	S NIM S2	S NIM S2	S NIM S2	S NIM S2
D	S NIM S3	S NIM S3	S NIM S3	S NIM S3	S NIM S3	S NIM S3	S NIM S4	S NIM S4	S NIM S4	S NIM S4	S NIM S4	S NIM S4
E	S NIM S5	S NIM S5	S NIM S5	S NIM S5	S NIM S5	S NIM S5	S NIM S6	S NIM S6	S NIM S6	S NIM S6	S NIM S6	S NIM S6
F	S NIM S7	S NIM S7	S NIM S7	S NIM S7	S NIM S7	S NIM S7	N NIM NTC	N NIM NTC	N NIM NTC	N NIM NTC	N NIM NTC	N NIM NTC
G	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2
H	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2	U NIM U2

图4 实时荧光定量 PCR 仪样本示值误差、样本线性校准用 96 孔反应板

样本示值误差按公式 (16) 计算, 样本线性按公式 (17) 计算。

$$\Delta c = \bar{c}_c - c_s \quad (16)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (Ct_i - \bar{Ct})(\ln c_i - \overline{\ln c})}{\sum_{i=1}^n (Ct_i - \bar{Ct})^2 \sum_{i=1}^n (\ln c_i - \overline{\ln c})^2} \quad (17)$$

式中:

Δc ——样本示值误差, copies/ μL ;

\bar{c}_c ——仪器测量平均值, copies/ μL ;

c_s ——标准物质标称值, copies/ μL ;

r ——线性相关系数;

Ct_i ——系列稀释标准物质的第 i 个扩增 Ct 值;

\bar{Ct} ——系列稀释标准物质的 Ct 平均值;

$\ln c_i$ ——系列稀释标准物质的第 i 个浓度的对数值;

$\overline{\ln c}$ ——系列稀释标准物质浓度对数值的平均值。

8 校准结果表达

校准结果应在校准证书(报告)上反应, 校准证书(报告)应至少包括以下信息:

- 标题, 如“校准证书”;
- 实验室名称和地址;

- c) 进行校准的地点（如果与实验室的地址不同）；
 - d) 证书或报告的唯一性标识（如编号），每页及总页数的标识；
 - e) 客户的名称和地址；
 - f) 被校对象的描述和明确标识；
 - g) 进行校准的日期，如果与校准结果的有效性和有关时，应说明被校对象的接收日期；
 - h) 如果与校准结果的有效性和应用有关时，应对被校样品的抽样程序进行说明；
 - i) 对校准所依据的技术规范的标识，包括名称及代号；
 - j) 本次校准所用测量标准的溯源性及有效性说明；
 - k) 校准环境的描述；
 - l) 校准结果及其测量不确定度的说明；
 - m) 对校准规范的偏离的说明；
 - n) 校准证书和校准报告签发人的签名、职务或等效标识；
 - o) 校准结果仅对被校对象有效的声明；
 - p) 未经实验室书面批准，不得部分复制证书或报告的声明。
- 校准原始记录格式见附录D，校准证书（报告）内页格式见附录E。

9 复校时间间隔

根据实际使用情况，用户可自行确定仪器复校时间间隔，建议不超过 12 个月。

附录A

标准物质的准备及配制

A.1 试剂

质粒DNA标准物质或核糖核酸标准物质其特性量值（拷贝数 $\geq 10^9$ copies/ μL ，相对扩展不确定度 $\leq 5\%$ ）满足校准需求，水为符合GB/T 6682-2008规定的一级水。

A.2 仪器

电子天平，精度 $\leq 0.01\text{mg}$ ；移液器，规格 $100\mu\text{L}$ 、 $1000\mu\text{L}$ ，且需要通过计量检定。

A.3 标准物质系列稀释配制

将标准物质从 -20°C 冰箱中取出，置冰上熔解，然后室温平衡 30min 。用经过高温高压灭菌处理的纯水进行稀释配制，并定为阴性对照样本。用电子天平配制系列稀释样品，其中 S_0 为浓度为 1×10^9 copies/ μL 的标准物质， S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_6 、 S_7 为 S_0 系列稀释后的样品，每步样品配制后要充分震荡混匀，详细配制方法见表A.1。

表A.1 标准物质系统稀释配制

项目	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	H_2O	mg	终浓度 (copies/ μL)
S_1	100								900		1×10^8
S_2		100							900		1×10^7
S_3			100						900		1×10^6
S_4				100					900		1×10^5
S_5					100				900		1×10^4
S_6						100			900		1×10^3
S_7							100		900		1×10^2

A.4 未知样品的配制

以配制好的 S_3 为起点，用经过校准的天平（ 0.01mg ）配制未知样品1(U_1)和未知样品2(U_2)，样品配制后要充分震荡混匀，详细配制方法见表A.2。

表A.2 标未知样品的配制

mg

项目	S ₃	U ₁	H ₂ O	终浓度 (copies/μL)
U ₁	500		500	5.0×10 ⁵
U ₂		350	350	2.5×10 ⁵

附录B

PCR反应体系的配制

B.1 试剂

ddH₂O、10×PCR buffer、25mmol/L MgCl₂、dNTPs、10μmol/L Probe、10μmol/L Primer 1、10μmol/L Primer2、5U/μL Taq enzyme、DNA。

B.2 仪器

移液器，规格2μL、10μL、100μL、2000μL、1000μL，且需要通过计量检定。

B.3 PCR反应体系的配制

参照表B.1进行PCR反应体系溶液的配制。

表B.1 PCR反应体系的配制

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O	/	20.6 μL
10×PCR buffer	1×	5 μL
25mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	4 μL
10μmol/L Probe	0.2 μmol/L	1 μL
10μmol/L Primer 1	0.4 μmol/L	2.0 μL
10μmol/L Primer2	0.4 μmol/L	2.0 μL
5U/μL Taq enzyme	0.04 U/μL	0.4 μL
DNA	/	10.0 μL
total	/	50 μL

注：
 1 如果Mg²⁺、dNTPs和Taq enzyme已经在10×PCR buffer中，不需要加，如果使用2×PCR buffer，调整加样体积使浓度合适。
 2 ddH₂O为灭菌双蒸馏水，Probe为荧光标记探针，Primer为引物，Taq enzyme为热启动酶，buffer为缓冲溶液，dNTPs为四种脱氧核糖核苷-磷酸混合物。

附录C

温度示值误差和阈值循环数示值误差测量结果的不确定度评定示例

C.1 温度测量结果不确定度评定

C.1.1 测量方法

将实时荧光定量PCR仪及PCR扩增光学标准器各部件连接完好，在PCR扩增光学标准器的温度传感器表面上涂抹适量导热油，将15个温度传感器置于仪器加热模块中，并确保与加热模块接触良好。按照仪器说明书或用户要求或推荐使用的温度控制程序，并运行该程序，同时启动PCR扩增光学标准器进行温度数据采集。温度示值误差的计算按照公式(C.1)进行计算。

C.1.2 测量模型

$$\Delta T = T_s - \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} T_i \quad (\text{C.1})$$

式中：

ΔT ——采样测量孔内温度示值误差， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_s ——仪器设定温度值， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_i ——第*i*个温度传感器测定值， $^{\circ}\text{C}$ 。

C.1.3 不确定度来源

根据上述数学模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下三个方面：

- a) 测量重复性引入的标准不确定度分量 u_1 ；
- b) 温度传感器分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' ；
- c) 温度传感器准确度引入的标准不确定度分量 u_2 ；

C.1.4 测量不确定度评定

C.1.4.1 重复性测量引入的不确定度分量 u_1

以95 $^{\circ}\text{C}$ 为例，对同一台仪器，在相同的测量条件下，重复测量10次，温度稳定后读取温度测量值，15个温度传感器的重复测量数据见表C.1。

表 C.1 温度测量结果

次数 测量点	不同测量点温度传感器测量结果 (°C)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	95.01	94.98	95.01	94.95	94.98	94.98	95.01	95.04	95.01	94.98
A4	95.22	95.22	95.25	95.25	95.28	95.22	95.19	95.22	95.19	95.22
A7	94.93	94.93	94.93	94.96	94.93	94.96	94.93	94.99	94.91	94.96
A10	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.29	95.26	95.29	95.26
A12	95.49	95.40	95.40	95.49	95.46	95.52	95.46	95.46	95.52	95.46
D1	95.03	95.15	95.09	95.09	95.03	95.12	95.06	95.09	95.09	95.06
D7	94.90	94.87	94.87	94.82	94.93	94.90	94.87	94.84	94.87	94.87
D12	95.37	95.26	95.29	95.29	95.32	95.20	95.29	95.29	95.35	95.29
E4	94.94	94.85	94.85	94.85	94.85	94.94	94.88	94.85	94.97	94.91
E10	95.37	95.28	95.34	95.28	95.34	95.37	95.31	95.28	95.34	95.31
H1	95.47	95.47	95.50	95.47	95.50	95.50	95.47	95.47	95.47	95.50
H4	95.03	95.12	95.06	95.06	95.03	95.09	95.06	95.06	95.09	95.06
H7	95.03	95.00	95.03	95.00	95.00	95.00	95.00	95.06	95.00	95.00
H10	95.25	95.28	95.25	95.31	95.31	95.25	95.28	95.25	95.25	95.28
H12	95.01	94.98	95.01	94.98	94.95	94.98	95.01	94.95	95.03	95.01

合并样本标准偏差按公式 (C.2) 计算:

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (y_{kj} - \bar{y}_j)^2}{m(n-1)}} \quad (\text{C.2})$$

式中:

m ——测量点的数量;

n ——每个测量点测量次数;

y_{kj} ——第 j 个测量点第 k 次的测量值, °C;

\bar{y}_j ——第 j 个测量点测量值的平均值, °C;

通过 (C.2) 计算出合并样本标准偏差如下:

$$S_p = 0.0313^\circ\text{C}$$

由于每个点测量5次取平均值, 因此重复测量引入的不确定度分量 u_1 为:

$$u_1 = \frac{S_p}{\sqrt{5}} = 0.0134^\circ\text{C}$$

C.1.4.2 温度传感器分辨力引入的不确定度 u_1'

温度传感器的分辨力为 0.01°C , 分散区间半宽为 0.005°C , 按均匀分布计算, $k =$

$\sqrt{3}$ ，则 u_1' 为：

$$u_1' = \frac{0.005}{\sqrt{3}} \text{ } ^\circ\text{C} = 0.003 \text{ } ^\circ\text{C}$$

由于重复测量引入的标准不确定度分量 u_1 大于分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' ，两者具有一定的相关性，因此在不确定度计算时不考虑由读数分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' 。

C.1.4.3 温度传感器准确度引入的标准不确定度分量 u_2 ；

温度传感器的最大允许误差 $\pm 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ，按均匀分布计算，则：

$$u_2 = \frac{0.1}{\sqrt{3}} \text{ } ^\circ\text{C} = 0.058 \text{ } ^\circ\text{C}$$

C.1.5 合成标准不确定度 u_c

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.06 \text{ } ^\circ\text{C}$$

C.1.6 扩展不确定度 U

取 $k=2$ ，则：

$$U = k \times u_c = 0.12 \text{ } ^\circ\text{C}$$

C.2 阈值循环数测量结果的不确定度评定

C.2.1 测量方法

将实时荧光定量PCR仪及光学标准器各部件连接完好，将光学标准器的置于仪器加热模块中，并确保与加热模块接触良好。按照仪器说明书或用户要求或推荐设置光学扩增程序，并运行该程序，同时启动 PCR 扩增光学标准器进行温度和光学数据采集。示值误差的计算按照公式 (C.3) 计算。

C.2.2 测量模型

$$\Delta C_{ti} = C_{tqi} - C_{ts} \quad (\text{C.3})$$

式中：

ΔC_{ti} —— 阈值循环数示值误差；

C_{tqi} —— 被测设备第 i 个采样孔的阈值循环数；

C_{ts} —— 光学标准器第 i 个采样孔的阈值循环数；

C.2.3 不确定度来源

根据上述数学模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下三个方面：

- a) 测量重复性引入的标准不确定度分量 u_1 ;
- b) 光学标准器分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' ;
- c) 标准器具引入的标准不确定度 u_2 ;

C.2.4 测量不确定度评定

C.2.4.1 重复性测量引入的不确定度分量 u_1

对同一台设备, 在相同的测量条件下, 使用光学标准器按照推荐的光学扩增程序对其阈值循环数进行 10 次重复测量, 对重复测量结果进行分析, 测量结果表 C.2 所示:

表 C.2 阈值循环数测量结果

次数 测量点		阈值循环数测量结果									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
实时 荧光 定量 PCR 仪	A1	11.34	11.37	11.23	11.56	11.56	11.64	11.73	11.76	11.28	11.77
	A4	11.55	11.75	11.56	11.24	11.84	11.38	11.42	11.36	11.37	11.35
	A7	11.50	11.24	11.24	11.63	11.73	11.37	11.57	11.37	11.54	11.57
	A10	11.23	11.73	11.64	11.25	11.53	11.56	11.35	11.36	11.69	11.37
	A12	11.78	11.27	11.25	11.07	11.65	11.37	11.33	11.83	11.53	11.74
	D1	11.33	11.75	11.73	11.84	11.24	11.87	11.73	11.55	11.48	11.35
	D7	11.45	11.23	11.24	11.25	11.26	11.38	11.29	11.58	11.37	11.38
	D12	11.77	11.89	11.57	11.64	11.52	11.97	11.29	11.38	11.46	11.46
	E4	11.24	11.64	11.85	11.28	11.73	11.63	11.78	11.47	11.36	11.56
	E10	11.96	11.86	11.95	11.84	11.37	11.68	11.73	11.29	11.74	11.37
	H1	11.75	11.22	11.35	11.34	11.74	11.25	11.47	11.28	11.26	11.66
	H4	11.35	11.45	11.67	11.66	11.27	11.37	11.67	11.78	11.73	11.33
	H7	11.76	11.76	11.24	11.63	11.83	11.42	11.36	11.56	11.38	11.34
	H10	11.32	11.55	11.11	11.32	11.55	11.53	11.37	11.37	11.33	11.37
H12	11.77	11.34	11.74	11.77	11.44	11.62	11.83	11.83	11.11	11.38	
光 学 标 准 器	A1	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
	A4	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
	A7	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
	A10	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
	A12	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
	D1	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50

D7	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
D12	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
E4	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
E10	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
H1	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
H4	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
H7	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
H10	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
H12	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50

合并样本标准偏差 按公式 (C.2) 计算:

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (y_{kj} - \bar{y}_j)^2}{m(n-1)}} \quad (\text{C.4})$$

式中:

m —— 测量点的数量;

n —— 每个测量点测量次数;

y_{kj} —— 第 j 个测量点第 k 次的测量值, $^{\circ}\text{C}$;

\bar{y}_j —— 第 j 个测量点测量值的平均值, $^{\circ}\text{C}$;

通过 (C.4) 计算出仪器的 Ct 值合并样本标准偏差 S_{pq} 和 PCR 扩增光学模拟器的 Ct 值合并样本标准偏差 S_{ps} 如下:

$$S_{pq} = 0.0421^{\circ}\text{C} \quad S_{ps} = 0$$

因此重复测量引入的不确定度分量 u_1

$$u_1 = 0.0421$$

C.2.4.2 光学标准器分辨力引入的不确定度分量 u_1'

PCR 扩增光学标准器的分辨力为 0.01, 分散区间半宽为 0.005, 按均匀分布计算, 则

$$u_1' = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.003$$

由于重复测量引入的标准不确定度分量 u_1 大于分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' , 两者具有一定的相关性, 因此在不确定度计算时不考虑由读数分辨力引入的标准

不确定度分量 u_1' 。

C.2.4.3 标准器具引入的不确定度 u_2

针对光学标准器，需要考虑其温度传感器最大允许误差引入的不确定度分量 u_T 和发射光发生器发光强度测量不确定度引入的不确定度分量 u_L 。

光学标准器温度传感器的最大允许误差 ± 0.1 °C，最小温度测量点 30 °C 时引入的不确定度最大，光学标准器的测量平均值为 11.5，按均匀分布计算：

$$u_T = \frac{0.1}{\sqrt{3} \times 30} \times 11.5 = 0.022$$

光学标准器发射光发生器的发光强度可溯源至分光光度计，通过查询，分光光度计在波长范围 (380~860) nm 内发光强度的扩展不确定度 $U_p = 9.5\% (k = 2)$ ，光学标准器的测量平均值为 11.5，则：

$$u_L = \frac{9.5\%}{2} \times 11.5 = 0.546$$

由于 u_T 和 u_L 之间相互独立，则

$$u_2 = \sqrt{u_T^2 + u_L^2} = 0.546$$

C.2.5 合成标准不确定度

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.548$$

C.2.6 扩展不确定度 U

取 $k = 2$ ，则：

$$U = k \times u_c = 1.1$$

附录D

校准原始记录参考格式

实时荧光定量PCR仪校准原始记录参考格式

证书编号: XXXXXX-XXXX

基本信息					
委托单位名称:		委托单位地址:			
制造厂商:		仪器名称:			
规格型号:		出厂编号:			
校准依据:					
环境温度: °C			环境湿度: %RH		
校准员:			核验员:		
标准器信息					
计量标准(器)名称					
计量标准证书号		有效期至			
计量标准器证书号		有效期至			
测量范围		准确度等级			
标准物质信息					
标准物质名称	型号规格	批号	量值特性/不确定度	证书编号	有效日期

一、温度示值误差、温度均匀度

次数 \ 测量点	1	2	3	4	5
A1					
A4					
A7					
A10					
A12					
D1					
D7					
D12					
E4					

E10					
H1					
H4					
H7					
H10					
H12					

设定温度点 (°C)		30	50	60	70	90	95
测量点 实测 温度 平均值 (°C)	A1						
	A4						
	A7						
	A10						
	A12						
	D1						
	D7						
	D12						
	E4						
	E10						
	H1						
	H4						
	H7						
	H10						
H12							
平均值 (°C)							
实测最高温度 (°C)							
实测最低温度 (°C)							
温度示值误差 (°C)							
温度均匀度 (°C)							

二、温度波动度

次数 测量点	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1										
A4										
A7										
A10										
A12										
D1										
D7										
D12										
E4										
E10										
H1										
H4										
H7										
H10										
H12										

设定温度点 (°C) $T_{\max}-T_{\min}$	30	50	60	70	90	95
测量点 (°C)	A1					
	A4					
	A7					
	A10					
	A12					
	D1					
	D7					
	D12					
	E4					
	E10					
	H1					
	H4					

	H7						
	H10						
	H12						
温度波动度 (°C)							

三、温度最大过冲量、平均升温速率和平均降温速率

设定温度点 (°C)	30	50	60	70	90	95
最低或最高测量值 (°C)						
温度最大过冲量 (°C)						
平均升温速率 (°C/s)						
平均降温速率 (°C/s)						

四、阈值循环数 (C_t 值) 示值误差、均匀度、精密度 (光学系统物理项目)

类别		实时荧光定量 PCR 仪	光学标准器
光学标准器 不同分布位置测量的 阈值循环数	A1		
	A4		
	A7		
	A10		
	A12		
	D1		
	D7		
	D12		
	E4		
	E10		
	H1		
	H4		
	H7		
	H10		
H12			
阈值循环数示值误差			
阈值循环数均匀度			
阈值循环数精密度			

五、通道峰值强度一致性 ($CPHC$)、线性灵敏系数 (LSF)、溶解温度漂移 (ΔT_m)、熔解温度比 (RT_m) (光学系统物理项目)

T_m 设定值 ($^{\circ}\text{C}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)	A	B	C	A-B	B-C	$CPHC$	LSF	RT_m
光学 标准 器分 布位 置	A1									
	A4									
	A7									
	A10									
	A12									
	D1									
	D7									
	D12									
	E4									
	E10									
	H1									
	H4									
	H7									
	H10									
H12										
平均值										

六、样本示值误差、样本线性相关系数 (光学系统生物化学项目)

样本示值误差:

项目	测量值copies/ μL									
U_1										
U_2										

样本线性系数:

附录E

校准证书（内页）参考格式

设定温度点 (°C)	30	50	60	70	90	95
温度示值误差 (°C)						
温度均匀度 (°C)						
温度波动度 (°C)						
温度最大过冲 (°C)						
平均升温速率 (°C/s)	50°C→90°C					
平均降温速率 (°C/s)	90°C→50°C					
阈值循环数示值误差						
阈值循环数均匀度						
阈值循环数精密度						
通道峰值强度一致性						
线性灵敏系数						
熔解温度漂移						
熔解温度比						
样本示值误差						
样本线性相关系数						

温度校准结果的扩展不确定度:

阈值循环数校准结果的扩展不确定度:

说明:

根据客户要求和校准文件的规定, 通常情况下____个月校准一次。

声明:

1. 仅对加盖“XXXXX校准专用章”的完整证书负责。
2. 本证书的校准结果仅对本次所校准的计量器具有效。

校准员:

核验员:

第X页 共X页