



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF 1527—2015

聚合酶链反应分析仪校准规范

Calibration Specification for Polymerase Chain Reaction Analyzers

2015-06-15 发布

2015-09-15 实施



国家质量监督检验检疫总局 发布

聚合酶链反应分析仪校准规范

Calibration Specification

for Polymerase Chain Reaction Analyzers

JJF 1527—2015

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：上海市计量测试技术研究院

广东省计量科学研究院

天津市计量监督检测科学研究院

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

高运华（中国计量科学研究院）

参加起草人：

张丽萍（上海市计量测试技术研究院）

尹 强（广东省计量科学研究院）

田 昀（天津市计量监督检测科学研究院）

保志娟（广东省计量科学研究院）

吴建英（上海市计量测试技术研究院）

目 录

引言	(II)
1 范围	(1)
2 引用文件	(1)
3 术语	(1)
3.1 聚合酶链反应	(1)
3.2 聚合酶链反应分析仪	(1)
4 概述	(1)
5 计量特性	(1)
6 校准条件	(2)
6.1 校准设备及标准物质	(2)
7 校准项目和校准方法	(2)
7.1 校准条件	(2)
7.2 温度示值误差、温度均匀性校准	(2)
7.3 升降温速率校准	(4)
7.4 定量 PCR 仪样本示值误差、样本线性的校准	(5)
8 校准结果表达	(6)
9 复校时间间隔	(6)
附录 A 标准物质的准备及配制	(7)
附录 B PCR 反应体系的配制	(9)
附录 C 温度示值误差校准结果的不确定度评定模型	(10)
附录 D 样本示值误差结果的不确定度评定模型	(12)
附录 E 校准原始记录参考格式	(14)
附录 F 校准证书 (内页) 参考格式	(15)

引 言

本规范的编制基于聚合酶链反应分析仪主要技术参数实验测试，参考了 JJF 1030—2010《恒温槽校准规范》、SN/T 2102.1—2008/ISO 22174：2005《食源性病原体 PCR 检测技术规范 第 1 部分：通用要求及定义》、SN/T 2102.2—2008/ISO 20836：2005《食源性病原体 PCR 检测技术规范 第 2 部分：PCR 性能试验要求》、YY/T 1173—2010《聚合酶链反应分析仪》等文件。

本规范为首次发布。



聚合酶链反应分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于模块加热的聚合酶链反应（PCR）分析仪计量性能的校准，对于其他类型的 PCR 仪，可参照本规范执行。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

GB/T 6682—2008 分析实验室用水国家标准

YY/T 1173—2010 聚合酶链反应分析仪

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

3.1 聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR [YY/T 1173—2010 3.1]

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。

3.2 聚合酶链反应分析仪 polymerase chain reaction analyzer [YY/T 1173—2010 3.2]

基于 PCR（聚合酶链反应）技术原理，模拟 DNA 或 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。

4 概述

聚合酶链反应分析仪是基于 PCR 技术原理，模拟 DNA 或 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，包括定性 PCR 仪和定量 PCR 仪两类。定性 PCR 通常由样品载台、热循环部件、控制部件和电源部件等部分组成。定量 PCR 仪主要由样品载台、热循环部件、控制部件、光学检测部件、电源部件、计算机及应用软件等部分组成。

5 计量特性

计量特性见表 1。

表 1 聚合酶链反应分析仪计量特性

项目	定性 PCR 仪	定量 PCR 仪
温度示值误差	+	+
温度均匀度	+	+
平均升温速率	+	+

表 1 (续)

项目	定型 PCR 仪	定量 PCR 仪
平均降温速率	+	+
样本示值误差	—	+
样本线性	—	+
注：+ 为校准项目；— 为非校准项目。		

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 校准设备及标准物质

6.1.1 温度校准装置

由若干个（通常为 15 个）精密温度传感器、数据采集分析模块组成，测温范围（0~120）℃，温度校准装置测量不确定度 ≤ 0.1 ℃，且需要通过计量检定。

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 $\geq 10^9$ copies/ μ L，相对扩展不确定度 $\leq 5\%$ ）。

6.1.3 电子天平

精度 ≤ 0.01 mg，且需要通过计量检定。

6.1.4 移液器

规格：2 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L，且需要通过计量检定。

校准前按照附录 A 配制校准时使用的溶液。

7 校准项目和校准方法

7.1 校准条件

校准前需将 PCR 仪开机预热 30 min。

7.2 温度示值误差、温度均匀性校准

7.2.1 将 PCR 仪及温度校准装置各部件连接完好，在温度传感器表面上涂抹适量的导热油，按图 1 所示将温度传感器置于 PCR 仪（96 孔）加热模块设定孔中，其他型号的 PCR 仪可参照图 1 进行测试。

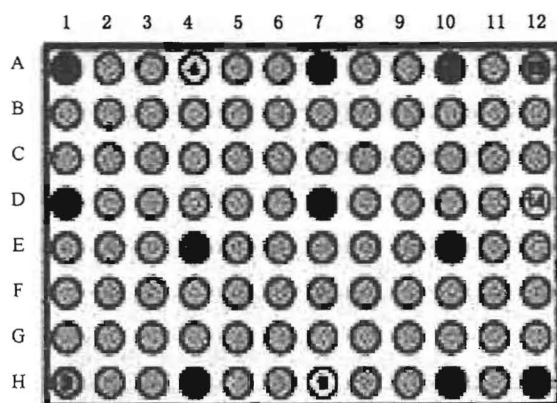


图 1 温度传感器布点示意图

7.2.2 参照送校单位提供的 PCR 仪说明书设定温度控制程序, 如表 2 所示, 不能设定 30 °C 为温控程序起点的 PCR 仪, 温控程序参照表 2 进行设定。

表 2 PCR 仪温度控制程序标准程序表

步骤	设定温度点	设定温度持续时间
1	30 °C	1 min
2	95 °C	3 min
3	30 °C	2 min
4	90 °C	3 min
5	50 °C	3 min
6	70 °C	3 min
7	60 °C	3 min
8	30 °C	1 min

7.2.3 启动温度校准装置, 记录整个数据采集过程并保存。

7.2.4 温度示值误差校准结果按公式 (1) 和公式 (2) 计算:

$$\Delta T_d = T_s - \bar{T}_c \quad (1)$$

$$\bar{T}_c = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n T_i \quad (2)$$

式中:

ΔT_d —— 温控装置工作区域内温度示值误差, °C;

T_s —— 温控装置工作区域内设定温度值, °C;

$\bar{T}_c$ —— 所有测温传感器测量值的平均值, °C;

T_i —— 第 i 个温度传感器测定值, °C。

7.2.5 温度均匀度校准结果按公式 (3) 计算:

$$\Delta T_u = T_{\max} - T_{\min} \quad (3)$$

式中：

- ΔT_u ——温度均匀度，℃；
- $T_{\max}$ ——所有测温传感器测定值的最大值，℃；
- $T_{\min}$ ——所有测温传感器测定值的最小值，℃。

7.3 升降温速率校准

7.3.1 参照送校单位提供的 PCR 仪说明书设定该 PCR 仪的温度控制程序，如表 3 所示。启动温度校准装置，记录整个数据采集过程并保存。

表 3 PCR 仪温度控制程序标准程序表

步骤	设定温度点	设定温度持续时间
1	45 ℃	3 min
2	95 ℃	3 min
3	45 ℃	3 min

7.3.2 记录仪器显示温度达到设定温度恒温 10 s 后，取 50 ℃温度点，温度记为 T_A ，取 90 ℃温度点，温度记为 T_B ，从 T_A 到达 T_B 的时间记为 t ，按图 2 所示模式取点计算平均升温速率。

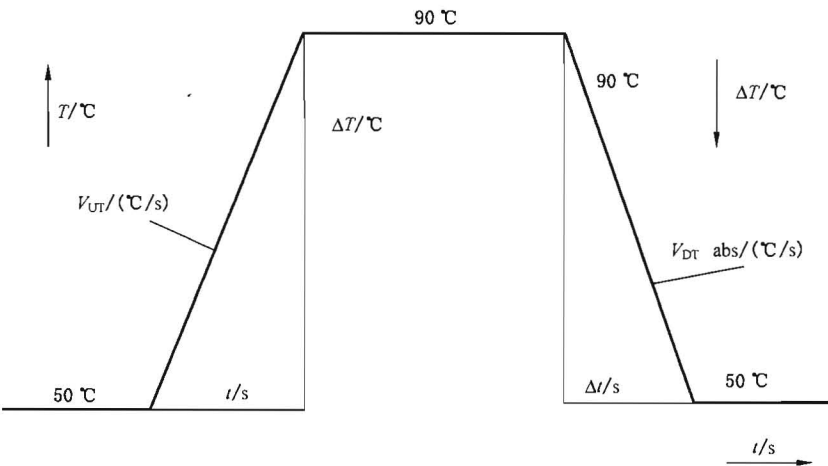


图 2 升降温速率计算模式

按公式 (4) 计算平均升温速率：

$$V_{UT} = \frac{T_B - T_A}{t} \tag{4}$$

式中：

- V_{UT} ——平均升温速率，℃/s；
- T_A ——50 ℃温度点测量值，℃；
- T_B ——90 ℃温度点测量值，℃；
- t ——从 T_A 到达 T_B 的时间，s。

7.3.3 平均降温速率校准结果按公式 (5) 计算：

取 90 °C 温度点, 温度记为 T_A , 取 50 °C 温度点, 温度记为 T_B , 从 T_A 到达 T_B 的时间记为 t , 按图 2 所示模式取点计算平均降温速率。

按公式 (5) 计算平均降温速率:

$$V_{DT} = \frac{T_B - T_A}{t} \quad (5)$$

式中:

V_{DT} ——平均降温速率, °C/s;

T_A ——50 °C 温度点测量值, °C;

T_B ——90 °C 温度点测量值, °C;

t ——从 T_A 到达 T_B 的时间, s。

7.4 定量 PCR 仪样本示值误差、样本线性的校准

7.4.1 标准物质的配制

标准物质配制方法见附录 A。

7.4.2 校准板的制备

用经过计量校准的移液器, 将配制好的 PCR 反应体系加入到反应板中, 按图 3 所示准备 96 孔校准板, 其他型号的仪器可参照本示例准备。PCR 反应体系的配制方法见附录 B。

	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 3 PCR 仪样本示值误差、样本线性误差和检测限校准用 96 孔反应板

7.4.3 参照送校单位提供的 PCR 仪说明书设定该 PCR 仪的温度控制程序, 如表 4 所示。

表 4 定量 PCR 仪校准温度控制程序

步骤	设定温度点	设定温度持续时间	循环数
1	50 ℃	2 min	1
2	95 ℃	10 min	1
3	95 ℃	30 s	45
4	60 ℃	1 min	

7.4.4 分析参数的设置

参照送校单位提供的 PCR 仪说明书设定 PCR 仪的数据分析参数。

7.4.5 样本示值误差

按公式 (6) 计算样本示值误差

$$\Delta c = \bar{c}_c - c_s \quad (6)$$

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 。

7.4.6 样本线性

以系列稀释的标准物质（至少 5 个）扩增 C_t 值与浓度对数值进行线性回归，计算其线性回归系数 r 。

8 校准结果表达

经校准后的聚合酶链反应分析仪应填发校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求，参照附录 F 给出校准项目名称、测量值以及扩展不确定度。

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 1 年。

附录 A

标准物质的准备及配制

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。

2. 仪器

电子天平，精度 ≤ 0.01 mg；移液器，规格：100 μL 、1 000 μL ，且需要通过计量检定。

3. 标准物质系列稀释配制

将标准物质从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出，置冰上溶解，然后室温平衡 30 min。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 标准物质系列稀释配制

mg

项目	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	H_2O	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

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（0.01 mg）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 未知样品的配制

mg

项目	S_3	U_1	H_2O	终浓度 (copies/ μ L)
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

1. 试剂

ddH₂O、10 × PCR buffer、25 mmol/L MgCl₂、dNTPs、10 μmol/L Probe、10 μmol/L Primer 1、10 μmol/L Primer 2、5 U/μL Taq enzyme、DNA。

2. 仪器

移液器。规格：2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，且需要通过计量检定。

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
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	4 μL
10 μmol/L Probe	0.2 μmol/L	1 μL
10 μmol/L Primer 1	0.4 μmol/L	2.0 μL
10 μmol/L Primer 2	0.4 μmol/L	2.0 μL
5 U/μL Taq enzyme	0.04 U/μL	0.4 μL
DNA		10.0 μL
total		50 μL
注：		
1 如果 Mg ²⁺ 、dNTPs 和 Taq enzyme 已经在 10×PCR buffer 中，不需再加，如果使用 2×PCR buffer，调整加样体积使终浓度合适。		
2 ddH ₂ O 为灭菌双蒸水，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

温度示值误差校准结果的不确定度评定模型

C.1 测量模型

$$\Delta T_d = T_s - \overline{T_c}$$

式中：

ΔT_d ——温控装置工作区域内温度示值误差，℃；

T_s ——温控装置工作区域内设定温度值，℃；

$\overline{T_c}$ ——所有测温传感器测量值的平均值，℃。

C.2 不确定度来源

(1) 测量重复性引入的不确定度。

(2) 标准温度传感器引入的不确定度。

C.3 不确定度分量的计算

(1) 重复性引入的不确定度 $u_1(\overline{T_i})$

在各个温度测量时间段内，读取 15 个测温探头的数据，见表 C.1，计算其标准偏差 s 。

表 C.1 重复性引入不确定度数据

℃

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	SD
30	30.57	30.53	30.50	30.69	30.08	30.56	30.65	30.05	30.68	30.69	30.15	30.69	30.79	30.57	30.80	0.3
50	49.98	49.99	49.90	50.06	49.78	50.02	50.20	49.89	50.20	50.37	50.03	50.30	50.45	50.34	50.32	0.2
60	59.58	59.70	59.53	59.67	59.69	59.64	59.88	59.90	59.89	60.14	60.08	60.00	60.13	60.18	59.97	0.3
70	69.16	69.46	69.21	69.30	69.69	69.38	69.62	69.93	69.63	69.95	70.17	69.75	69.96	70.13	69.63	0.4
90	88.69	89.23	88.87	88.91	89.83	89.04	89.34	90.17	89.38	89.78	90.42	89.39	89.63	90.07	89.13	0.6
95	93.49	94.17	93.80	93.83	94.95	94.04	94.30	95.28	94.31	94.81	95.57	94.29	94.57	95.05	93.87	0.6

根据测量结果计算，

$$u_1(\overline{T_i}) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (T_i - \overline{T})^2 / n - 1}$$

(2) 标准温度传感器引入的不确定度

标准温度传感器校准不确定度由标准温度传感器校准证书得到。

$$u_2(\overline{T_s}) = u_c / k = 0.090 / 2 = 0.045 \text{ } ^\circ\text{C}$$

C.4 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 C.2。

表 C.2 标准不确定度一览表

项目	来源	
	$u_1(\bar{T}_i) / ^\circ\text{C}$	$u_2(\bar{T}_s) / ^\circ\text{C}$
30	0.3	0.045
50	0.2	0.045
60	0.3	0.045
70	0.4	0.045
90	0.6	0.045
95	0.6	0.045

C.5 合成不确定度

合成不确定度用公式 $u(\Delta) = \sqrt{u_1^2(\bar{T}_i) + u_2^2(\bar{T}_s)}$ 计算得到, 结果见表 C.3。

C.6 扩展不确定度

取 $k=2$, 则仪器示值误差的扩展不确定度用 $U=2u(\Delta)$ 计算, 结果见表 C.3。

表 C.3 合成和扩展不确定度结果

项目	合成不确定度 $u(\Delta) / ^\circ\text{C}$	扩展不确定度 $U / ^\circ\text{C}$	包含因子 k
30	0.25	0.5	2
50	0.21	0.5	2
60	0.22	0.5	2
70	0.32	0.7	2
90	0.51	1.1	2
95	0.60	1.2	2

附录 D

样本示值误差结果的不确定度评定模型

D.1 测量模型

$$\Delta C = \bar{C}_c - C_s$$

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 。

D.2 不确定度来源

(1) 测量重复性引入的不确定度。

(2) 标准物质引入的不确定度。

D.3 不确定度分量的计算

(1) 重复性引入的不确定度 $u_1(\bar{C}_i)$

计算未知样 1 和未知样 2 的定量结果的相对标准偏差 RSD，测量数据及计算结果见表 D.1。

表 D.1 定量重复性引入的不确定度 ($\times 10^5$ copies/ μL)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	RSD
U ₁	5.1	5.3	4.8	5.2	5.1	4.7	5.1	5.2	4.3%
	5.2	4.7	4.9	5.1	5.4	5.1	5.3	5.2	
	4.8	4.9	5.2	5.3	5.2	4.9	5.5	4.9	
U ₂	2.4	2.3	2.5	2.4	2.5	2.6	2.3	2.3	4.4%
	2.5	2.4	2.6	2.4	2.3	2.4	2.5	2.7	
	2.4	2.5	2.5	2.4	2.6	2.4	2.5	2.5	

$$u_1(\bar{C}_i) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 / n - 1}$$

(2) 标准物质引入的不确定度

由标准物质证书得到。

$$u_2(\bar{C}_s) = u_c / k = 4.3\% / 2 = 2.2\%, k = 2.$$

D.4 相对标准不确定度一览表

相对标准不确定度一览表见表 D.2。

表 D.2 相对标准不确定度一览表

项目	来源	
	$u_1(\bar{C}_i)$	$u_2(\bar{C}_s)$
U ₁	4.3%	2.2%
U ₂	4.4%	2.2%

D.5 合成相对标准不确定度

合成相对标准不确定度用公式 $u(\Delta C) = \sqrt{u_1^2(\bar{C}_i + u_2^2(C_s))}$ 计算得到, 结果见表 D.3。

D.6 扩展标准不确定度

扩展不确定度用公式 $U = 2u(\Delta) \times \bar{C}_i$ 计算得到, 结果见表 D.3。

表 D.3 合成和扩展不确定度结果

项目	$\bar{C}_i$ copies/ μ L	合成不确定度 $u(\Delta C)$	扩展不确定度 U copies/ μ L	包含因子 k
U_1	5.1×10^5	4.9%	5.0×10^4	2
U_2	2.4×10^5	5.0%	3.0×10^4	2

附录 E

校准原始记录参考格式

送检单位: _____ 校准日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

仪器名称: _____ 制 造 厂: _____

型 号: _____ 出厂编号: _____

证书编号: _____

环境温度: _____ °C 相对湿度: _____ % 气压: _____ kPa

1. 温度示值误差和温度均匀度

设定温度 °C	A ₁	A ₄	A ₇	A ₁₀	A ₁₂	D ₁	D ₇	D ₁₂	E ₄	E ₁₀	H ₁	H ₄	H ₇	H ₁₀	H ₁₂
30.0															
50.0															
60.0															
70.0															
90.0															
95.0															

2. 平均升温速率

 $T_A =$ _____ °C, $T_B =$ _____ °C, $t =$ _____ s。

3. 平均降温速率

 $T_A =$ _____ °C, $T_B =$ _____ °C, $t =$ _____ s。

4. 样本示值误差

项目	测量值 copies/ μ L									
U ₁										
U ₂										

5. 样本线性

校 准 员: _____ 核 验 员: _____

附录 F

校准证书（内页）参考格式

1. 温度示值误差

设定温度 ℃	$\bar{T}_c$ ℃	ΔT_d ℃	不确定度 ℃ ($k=2$)
30.0			
50.0			
60.0			
70.0			
90.0			
95.0			

2. 温度均匀度

设定温度/℃	极差/℃
30.0	
50.0	
60.0	
70.0	
90.0	
95.0	

3. 平均升温速率

4. 平均降温速率

5. 样本示值误差

项目	标准值 copies/ μ L	测量值 copies/ μ L	示值误差 copies/ μ L	不确定度 copies/ μ L ($k=2$)
U_1				
U_2				

6. 样本线性

校准员：_____ 核验员：_____

中 华 人 民 共 和 国
国 家 计 量 技 术 规 范
聚 合 酶 链 反 应 分 析 仪 校 准 规 范

JJF 1527—2015

国家质量监督检验检疫总局发布

*

中国质检出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

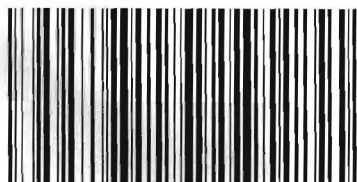
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 30 千字
2015年10月第一版 2015年10月第一次印刷

*

书号: 155026·J-3050 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



JJF 1527-2015

打印日期: 2015年12月10日 D120A