



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ×××× - ××××

恒温扩增核酸分析仪校准规范

Calibration Specification for Isothermal Amplification Nucleic Acid

Analyzer

(征求意见稿)

××××-××-×× 发布

×××× - ××-×× 实施

国家市场监督管理总局发布

恒温扩增核酸分析仪
校准规范

Calibration Specification

for Isothermal Amplification Nucleic Acid Analyzer

JJF××××—××××

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：

参加起草单位：

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：

参加起草人：

全国生物计量技术委员会

目录

| | |
|--|----|
| 引言..... | II |
| 1 范围..... | 1 |
| 2 引用文件..... | 1 |
| 3 术语和计量单位..... | 1 |
| 3.1 恒温扩增 Isothermal amplification..... | 1 |
| 3.2 指数级扩增拐点时间 Time of exponent amplification crossing point..... | 1 |
| 4 概述..... | 1 |
| 5 计量特性..... | 2 |
| 5.1 温度示值误差..... | 2 |
| 5.2 温度均匀度..... | 2 |
| 5.3 温度稳定性..... | 2 |
| 5.4 平均升温速率..... | 2 |
| 5.5 样本浓度重复性..... | 2 |
| 5.6 样本最低检测限..... | 2 |
| 5.7 光强度检测重复性..... | 2 |
| 5.8 光强度检测线性..... | 2 |
| 6 校准条件..... | 2 |
| 6.1 环境条件..... | 2 |
| 6.2 校准用仪器及试剂..... | 2 |
| 7 校准项目和校准方法..... | 3 |
| 7.1 温度示值误差..... | 3 |
| 7.2 温度均匀度..... | 3 |
| 7.3 温度稳定性..... | 4 |
| 7.4 平均升温速率..... | 4 |
| 7.5 样本检测重复性..... | 4 |
| 7.6 样本最低检测限..... | 5 |
| 7.7 光强度检测重复性..... | 5 |
| 7.8 光强度检测线性..... | 5 |
| 8 校准结果表达..... | 5 |
| 9 复校时间间隔..... | 5 |
| 10 附录..... | 5 |
| 附录 A 恒温扩增核酸分析仪校准记录参考格式..... | 7 |
| 附录 B 校准证书内页推荐格式..... | 9 |
| 附录 C 温度示值误差校准结果的不确定度评定模型..... | 11 |

引言

本规范起草中参考了 GB/T 41407-2022《微流控芯片核酸恒温扩增仪技术要求》、JJF 1030-2010《恒温槽校准规范》、JJF 1527-2015《聚合酶链式反应分析仪校准规范》、JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》等文件，按照 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的要求编制。

本规范为首次发布。

全国生物计量技术委员会

恒温扩增核酸分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于离心管式载体和微流控芯片载体的恒温扩增核酸分析仪的校准。

本规范不适用于周期性变温的聚合酶链反应类扩增仪。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1527-2015 《聚合酶链式反应分析仪校准规范》

GB/T 41407-2022 《微流控芯片核酸恒温扩增仪技术要求》

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，其最新版本适用于本规范。

3 术语和计量单位

GB/T 41407-2022 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 恒温扩增 Isothermal amplification

由常温升温至一固定的扩增高温后,在该固定温度下进行核酸(包括 DNA 和 RNA)体外快速复制放大的过程。

3.2 指数级扩增拐点时间 Time of exponent amplification crossing point

在实时监测核酸样本扩增过程中，扩增产物产生的荧光信号(或浊度引起的光强变化)到达可检测阈值经历的时间。

4 概述

恒温扩增核酸分析仪是由控制系统、电源系统、温控系统和检测系统等组成的测量系统的简称，基于核酸恒温扩增原理，在模板、聚合酶、引物等存在的条件下，借助一固定的扩增高温进行核酸序列的特异性扩增，通过光学系统把激发光汇聚在待测核酸恒温扩增样品上，同时通过光学元件将待测样品中核酸序列特异性扩增产物产生的发射光（荧光或浊度引起的光强变化）接收，成像在 CCD、

CMOS、PMT、光电池、光电二极管和其它光电转换的探测器上，生成模拟信号或数字信号及数据文件，便于进行核酸恒温扩增过程的动态监测与实时光强变化信号分析。

5 计量特性

5.1 温度示值误差

5.2 温度均匀度

5.3 温度稳定性

5.4 平均升温速率

5.5 样本检测重复性

5.6 样本最低检测限

5.7 光强度检测重复性

5.8 光强度检测线性

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 温度：(15~30) °C；

6.1.2 相对湿度：20%~ 85%；

6.1.3 供电电源：电压 (220±22) V，频率 (50±1) Hz；

6.1.4 附近无影响仪器正常工作的电磁场及机械振动；

6.1.5 仪器接地良好。

6.1.6 仪器开机后预热时间不少于 10min。

6.2 校准用仪器及试剂

6.2.1 温度校准装置：由若干个（通常为 3 个、5 个、7 个）精密温度传感器，数据采集分析模块组成，测温范围 (0~120) °C，温度校准装置测量不确定度 ≤ 0.1°C，经计量检定合格。

6.2.2 核酸标准物质：校准时应采用国内外核酸标准物质，特性量值满足校准需求。

6.2.3 电子天平：精度 ≤ 0.01mg，经计量检定合格。

6.2.4 移液器：规格为 10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。

6.2.5 配制校准用标准物质所需超纯水【电阻率不小于 18.2 MΩ·cm(25 °C)】

7 校准项目和校准方法

7.1 温度示值误差

一般选择仪器常用的恒温扩增温度作为校准点。

使用温度测量装置,将温度传感器固定在恒温扩增核酸分析仪的加热模块上,温度传感器均分布,保证温度传感器与加热模块贴合紧密,对于不同加热模块的仪器,可根据实际情况均匀选取测量点,测温点数选取规则如下,恒温扩增核酸分析仪孔位数 48 位-96 位,测温点选 7 个;孔位数 8 位-48 位,测温点选 5 个;孔位数 8 位及以下的,测温点选 3 个。

设定仪器的温度,稳定 3min 及以上,待温度稳定后,读取测温点的温度值,温度示值误差校准结果按公式 (1) 和 (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 —设定温度点,稳定时间不少于 10 s 期间的第 i 个温度传感器记录值, °C。

7.2 温度均匀度

仪器温度设定为常用的恒温扩增温度时工作区域的温度均匀性。

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, °C;

T_{\max} —所有测温传感器测定值的最大值, °C;

T_{\min} —所有测温传感器测定值的最小值, °C。

7.3 温度稳定性

仪器温度设定为常用的恒温扩增温度，待仪器温度稳定后，测量 10 min，隔 1 min 记录一次所有测温点温度传感器测量平均值，这些平均值极差的一半，冠以±号表示温度的稳定性。

温度稳定性校准结果按公式（4）计算：

$$\Delta T_w = \pm \frac{1}{2} (\bar{T}_{\max} - \bar{T}_{\min}) \quad (4)$$

式中：

ΔT_w —温度稳定性，°C；

\bar{T}_{\max} —所有测温传感器测定值的最大值，°C；

\bar{T}_{\min} —所有测温传感器测定值的最小值，°C。

7.4 平均升温速率

参照恒温扩增核酸分析仪说明书设定该仪器的温度控制程序，启动温度校准装置，记录从 30°C 到仪器常用的恒温扩增温度点的整个数据采集过程并保存。

平均升温速率结果按公式（5）计算：

$$V_{UT} = \frac{T_B - T_A}{t_1} \quad (5)$$

式中：

V_{UT} —平均升温速率，°C/s；

T_A —30 °C 温度点测量值，°C；

T_B —恒温扩增温度点测量值，°C；

t_1 —从 T_A 到 T_B 的时间，s。

7.5 样本检测重复性

将核酸样本稀释到一定浓度，按照说明书进行恒温扩增，重复测量 6 次，记录其指数级扩增拐点时间，按公式（6）计算其重复性。

$$RSD_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

RSD_c —指数级扩增拐点时间相对标准偏差，以百分数表示；

C_i —第 i 次样本指数级扩增拐点时间的测定值；

\bar{C} —6 次样本或者指数级扩增拐点时间的平均值。

7.6 样本最低检测限

对核酸样本进行扩增，重复检测 6 次，得到完整指数级扩增荧光信号检测曲线的最低核酸模板浓度，即为样本最低检测限。

7.7 光强度检测重复性

将荧光（或浊度）标准物质稀释到合适浓度，重复测量 6 次，记录其通道的光强度值，按公式（7）计算通道光强度重复性。

$$RSD_I = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_i - \bar{I})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{I}} \times 100\% \quad (7)$$

式中：

RSD_I —光强度相对标准偏差，以百分数表示；

I_i —第 i 次光强度的测定值；

\bar{I} —6 次光强度的平均值。

7.8 光强度检测线性

以系列稀释的荧光（或浊度）标准物质（至少 5 个）测得的光强度与稀释倍数进行线性回归，计算其线性回归系数 r 。

8 校准结果表达

校准记录应尽可能详尽地记载测量数据和计算结果，推荐的校准记录格式见附录 A。示值误差的测量不确定度应按 JJF 1059.1 的要求评定，不确定度评定实例见附录 C。经校准的仪器应出具校准证书，校准证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求，校准证书内页格式见附录 B。

9 复校时间间隔

建议复校时间间隔不超过 1 年。由于复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等着多因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主确定复校时间间隔。

10 附录

本部分主要对校准用标准物质溶液和试剂的配制及使用方法、恒温扩增核酸

分析仪校准记录内容、校准证书内页内容及不确定度评定等进行了具体的描述和规定。

全国生物计量技术委员会

附录 A

恒温扩增核酸分析仪校准记录参考格式

| | | | | | | | |
|----------------|-------|------|-------------------|------|--|---------------|--|
| 送校单位 | | | | 校准地址 | | | |
| 仪器型号 | | | | 仪器编号 | | | |
| 制造厂商 | | | | 检测日期 | | | |
| 环境温度 | | ℃ | | 相对湿度 | | % | |
| 校准人 | | | | 核验人 | | | |
| 技术依据 | | | | | | | |
| 主要 测量 设备 | 名称/型号 | 测量范围 | 不确定度/准确度等级/最大允许误差 | | | 检定/校准证书编号/有效期 | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

A.1 温度示值误差和温度均匀度

| 温度 (°C) | 温度测量值 (°C) | | | | | | | 平均值 (°C) | 示值 误差 (°C) |
|---------------------|------------|---|---|---|---------|---|---|-------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| | | | | | | | | | |
| 扩展不确定度($k=2$)(°C) | | | | | 均匀度(°C) | | | | |

A.2 温度稳定性

| 温度 (°C) | 时间 (min) | | | | | | | | | | ΔT_w (°C) | |
|------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------------------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| | | | | | | | | | | | | |

A.3 平均升温速率

$T_A =$ °C, $T_B =$ °C, $t_1 =$ s。

A.4 样本检测重复性

| 浓度 (copies/ μ L) | 指数级扩增拐点时间 (min) | | | | | |
|----------------------|-----------------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | | | | | | |
| 重复性 | | | | | | |

A.5 样本最低检测限

| 浓度 (copies/ μ L) | 指数级扩增拐点时间 (min) | | | | | |
|-------------------------|-----------------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | | | | | | |

A.6 光强度检测重复性

| 光强度 | 测量值 | | | | | | 重复性 |
|-----|-----|---|---|---|---|---|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | | | | | | | |

A.7 光强度检测线性

| | |
|---------|--|
| 光强度线性系数 | |
|---------|--|

附录 B

校准证书内页推荐格式

B.1 校准证书内页

| 证书编号XXXXXX-XXXX | | | |
|-----------------|------|-------------------|---------------|
| 校准环境条件及地点: | | | |
| 温度 | °C | 地点 | |
| 相对湿度 | % | 其他 | |
| 校准使用的主要设备 | | | |
| 名称/型号 | 测量范围 | 不确定度/准确度等级/最大允许误差 | 检定/校准证书编号/有效期 |
| | | | |

第X页共X页

B.2 校准证书校准结果页

| 证书编号XXXXXX-XXXX | | | | | |
|-----------------|-------------|-----------------------|--------------|-----------------------------|---------|
| 校准结果 | | | | | |
| 被校项目及校准结果: | | | | | |
| 校准项目 | 校准结果 | | | | |
| 温度示值误差 和均匀度 | 设定值 (°C) | 测量 平均 值 (°C) | 示值误差 (°C) | 扩展不确定度 ($k=2$) (°C) | 均匀 度 |
| | | | | | |
| 温度稳定性 | | | | | |
| 平均升温速率 | | | | | |
| 样本检测重复 性 | | | 样本最低检测限 | | |
| 光强度检测重 复性 | | | 光强度检测线性 | | |
| 以下空白 | | | | | |
| 第X页共X页 | | | | | |

附录 C

温度示值误差校准结果的不确定度评定模型

C.1、数学模型

$$\Delta T_d = T_s - \bar{T}_c$$

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。

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 $u_1(\bar{T}_i)$

在各个温度测量时间段内，读取测温探头的数据，计算其标准偏差 S。

根据测量结果计算， $u_1(\bar{T}_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (T_i - \bar{T})^2}{n-1}} \times 100\%$ ，其中 n=6；

(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。

$$u_2(\bar{T}_s) = \frac{u_c}{k}$$

C.4 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 F.2。

| 项目/°C | 来源 | |
|-------|---------------------|---------------------|
| | $u_1(\bar{T}_i)/°C$ | $u_2(\bar{T}_s)/°C$ |
| | | |

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 F.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 $U=k \cdot u(\Delta)$ 计算，结果见表 F.3。

表 F.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 |
|----|--|--------------------------------|------|
| | | | 2 |