

国家计量技术规范规程制修订

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》

编制说明

上海市计量测试技术研究院

中国计量科学研究院

江苏省计量科学研究院

南京市计量监督检测院

上海速创诊断产品有限公司

2023年02月

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》

编制说明

一、任务来源

根据国家市场监督管理总局国家计量技术法规制修订文件（见市监计量发[2021] 50 号），上海市计量测试技术研究院、中国计量科学研究院、江苏省计量科学研究院、南京市计量监督检测院、上海速创诊断产品有限公司共同承担《恒温扩增核酸分析仪校准规范》的制定工作，归口单位为全国生物计量技术委员会。

二、规范制定的必要性

核酸恒温扩增技术是利用特殊的扩增酶和引物，实现在恒温条件下目标 DNA 分子扩增，从而实现高灵敏度的检测。常见的核酸恒温扩增技术有：环介导恒温扩增（LAMP）、重组酶聚合酶扩增（RPA）、滚环恒温扩增（RCA）、核酸序列扩增法（NASBA）以及链置换恒温扩增等。以 LAMP 为例，它是依赖于一种具有链置换特性的 DNA 聚合酶(如 Bst 酶)，一般是利用 1 对外引物（F3 / B3）和 1 对内引物（FIP / BIP）与靶基因的 6 个不同区域退火杂交，使产物自我配对形成一种特殊的哑铃状结构，再通过内引物与哑铃状结构的互补配对引发指数级扩增。在 60 °C~65 °C 等温条件下扩增靶序列，可在 1 h 内实现对目标核酸靶序列指数级($10^9 \sim 10^{10}$)扩增，比 PCR 高出 1~2 个数量级，具有很高的扩增效率。扩增区域由 4~6 条引物识别，比传统 PCR 具有更高的特异性。核酸恒温扩增技术是扩增反应的全过程均在同一温度下进行，不同于 PCR 反应需要经历几十个温度变换的循环过程，故反应时间大大缩短，在即时、快速现场检测方面具有重要的应用价值。例如在新冠病毒核酸检测领域，有多项技术为新冠疫情控制做出了重要贡献：我国成都博奥晶芯生物研制的六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法）（国械注准 20203400178）用于新型冠状病毒快速检测，在 1.5 个小时就能完成所有检测；杭州优思达生物技术有限公司研制的新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒（恒温扩增-实时荧光法）（国械注准 20203400241）也采用了恒温扩增技术；上海仁度生物科技有限公司开发的新冠病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂（国械注准 20203400300），采用 RNA 特异靶标捕

获和转录介导的恒温扩增实时检测技术，在一个反应管中自动化完成核酸提取、扩增步骤，90分钟可出结果，并可实现连续并行检测，提升检测效率等。

随着核酸快速检测需求的提升，恒温扩增核酸分析仪产品应用逐渐普及，涉及到国内外多个生产厂家，如美国 Agdia 恒温扩增新型冠状病毒核酸检测仪用于新冠病毒的快速检测、日本 LT-16alpha、上海速芯生物 MA2000 及 MA2000plus 用于非洲猪瘟的快速检测等、北京博奥生物晶芯 RTisochip™-W 等用于新生儿耳聋基因筛查、西安天隆 Gentier 48S 系列、广州国凯 GK10091、北京金博特 GPT-L08、深圳芬析仪器生产的非洲猪瘟病毒荧光等温扩增检测仪、广州迪澳 Deaou 系列等。与需要温度循环的 PCR 扩增仪相比，恒温扩增核酸仪的温度控制更容易实现。所以，恒温扩增核酸仪更简单，更便宜，加热耗能更少。仪器生产厂家通过与相应的配套试剂结合使用，广泛应用于医学诊断、生命科学、食品安全、农产品检测及畜牧水产等众多领域。

随着恒温扩增方法的快速发展，随之而来的计量溯源需求也就越来越迫切，急需开展计量校准方法研究，为产品质控和结果溯源做好技术支撑。然而，国内外尚无通行的恒温扩增核酸分析仪计量校准方法，我国尚未出台有关恒温扩增核酸分析仪的检定规程或者校准规范，为了提高和保证恒温扩增荧光核酸分析仪分析结果的准确性，实现各品牌型号的恒温扩增核酸分析仪的检测结果的可比性，急需根据恒温扩增核酸检测仪的原理与技术特性，研究其技术指标和校准方法，来公正地评价仪器的各项性能指标，保障我国恒温扩增核酸分析仪测量结果的准确可靠性。

三、《恒温扩增核酸分析仪校准规范》制定过程

1、2019年1月至2020年11月，校准规范起草单位组织相关技术人员对国内市场上主流品牌的恒温扩增核酸分析仪的工作原理及技术参数进行了调研，对不同品牌测量仪器的计量性能变化有了深入的了解，并初步对恒温扩增核酸分析仪的校准方法进行了研究和讨论，为校准规范的制定积累了丰富的经验。

2、2021年12月，由上海市计量测试技术研究院牵头向全国生物计量技术委员会申报了《恒温扩增核酸分析仪校准规范》的起草工作，并进行了立项答辩。

3、2021年7月，国家市场监督管理总局办公厅批准全国生物计量技术委员会关于《恒

温扩增核酸分析仪校准规范》的立项。上海市计量测试技术研究院和中国计量科学研究院作为主要起草单位，江苏省计量科学研究院、南京市计量监督检测院、上海速创诊断产品有限公司参加起草，项目正式启动。上海市计量测试技术研究院迅速抽调专业技术人员成立规范制定起草团队，全面落实编制工作。起草团队认真制定了详细的编制计划、实施步骤、经费计划、实验方案等。

4、2021年7月至12月，起草团队认真查阅国内外相关行业标准和文献等资料，对恒温扩增核酸分析仪的使用情况、主要原理、性能指标等进行了全面调研。

5、2022年1月，起草团队就规范的架构设定、校准项目、具体指标等广泛听取了仪器生产厂家和相关领域专家的建议和意见。同时，起草团队申请立项了上海市市场监督管理局科研项目《恒温扩增核酸测量的计量溯源研究》（2022-12），为规范的制修订提供了经费支持。

6、2022年6月至2023年2月，起草团队到上海速创诊断产品有限公司、上海伯杰医疗科技股份有限公司、上海仁度生物科技有限公司、杭州优思达生物技术有限公司等10多家单位做现场实验，对测量数据进行分析和处理，分析判断实验方案的可行性，排除不符合要求的试验方法，再制定新的试验方法和改进意见，形成《恒温扩增核酸分析仪校准规范》（征求意见稿）。

7、2023年3月至5月，起草团队将形成的《恒温扩增核酸分析仪校准规范》（征求意见稿），发送至相关生产及使用单位、科研院校等单位及相关专家，广泛征求意见。起草团队根据专家意见，对《恒温扩增核酸分析仪校准规范》（征求意见稿）进行修改和完善，形成送审稿。

四、规范制定的主要技术依据与原则

（一）、技术依据

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》的制定参考了 GB/T 41407《微流控芯片核酸恒温扩增仪技术要求》、JJF 1030《恒温槽校准规范》、JJF 1527《聚合酶链式反应分析仪校准规范》、JJF 1001《通用计量术语及定义》和 JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》等标准，按照 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求编制。

（二）、原则

1、构架

根据 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求，本规范构架上包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录等几个部分。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位、计量特性、通用技术要求与校准项目和校准方法，原则上与 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》和 JJF 1001《通用计量术语及定义》保持一致。

3、计量特性确定原则

根据恒温扩增核酸分析仪的结构特点以及该仪器在实际中的应用和仪器生产厂家提供的信息，确定恒温扩增核酸分析仪的计量特性；计量特性的确定过程中也参照了现行有效的 JJF 1527-2015《聚合酶链式反应分析仪校准规范》的计量特性，以及国家推荐标准 GB/T 41407-2022《微流控芯片核酸恒温扩增仪技术要求》中的仪器性能要求。

由于恒温扩增核酸分析仪绝大部分用来定性检测，并且通过实验发现各家仪器样本检测线性不佳，因此选用样本最低检测限而不用样本线性来评价仪器性能。计量特性最终确认为温度示值误差、温度均匀度、温度稳定性、平均升温速率、样本浓度重复性、样本最低检测限、光强度检测重复性、光强度检测线性。

4、校准用仪器及标准物质选择的原则

根据选择的计量特性，规范中给出了不同的计量器具。

针对温度性能，GB/T 41407-2022《微流控芯片核酸恒温扩增仪技术要求》中仪器控温精度规定不大于 0.5 °C，选择的温度校准装置测量不确定度应 \leq 0.1 °C，测温范围为 (0~120) °C，考虑到多通道的温度均匀度测量，最好选择由若干个（通常为 3 个、5 个、7 个）精密温度传感器和数据采集分析模块组成的温度测量装置，并且经计量检定合格。

对于核酸标准物质的选择，应该根据被校准仪器的恒温扩增原理选择合适的

国内外有证核酸标准物质，并且特性量值满足校准需求，一般核酸标准物质的特性量值相对扩展不确定度小于或等于 15% ($k=2$)。

对于荧光标准物质的选择，应该根据被校准仪器的激发/发射波长选择合适的荧光标准物质。

五、规范制定说明

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》共分为封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录。其中，封面、扉页和目录三个部分根据 JJF 1071 《国家计量校准规范编写规则》撰写。

（一）、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。

（二）、引用文件

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》主要参考了 JJF 1527 《聚合酶链式反应分析仪校准规范》和 GB/T 41407 《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。

（三）、术语

本部分给出了恒温扩增和指数级扩增拐点时间的定义和解释。

（四）、概述

本部分主要对恒温扩增核酸分析仪的仪器组成和工作原理进行了简要介绍。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。

（五）、计量特性

在计量特性部分，主要针对恒温扩增核酸分析仪的特点，选择一定数量的、不同型号的仪器进行试验测试。通过分析在一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的恒温扩增核酸分析仪实验数据的基础上，综合恒温扩增核酸分析仪在实际应用中的主要功能和性能指标，考虑其具体应用的要求，确定了《恒温扩增核酸分析仪校准规范》中的计量特性。包括：温度示值误差、温度均匀度、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。

（六）、校准条件

本部分主要规定了恒温扩增核酸分析仪校准时需要满足的、对校准结果有影响的环境条件和标准物质。环境条件包括：温度：（15~30）℃；相对湿度：20%~85%；电源电压：电压（220±22）V，频率（50±1）Hz；为保证仪器的稳定性，仪器开机后预热时间不少于 10min。

标准物质，校准时应采用国内外有证核酸标准物质，其特性量值满足校准需求。

（七）、校准项目和校准方法

以下校准项目应在恒温扩增核酸分析仪经过开机预热、仪器达到正常工作条件后进行，校准前应当确保仪器工作状态正常，参照附录 A 进行校准原始数据记录。

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，℃；

T_s —温控装置工作区域内设定温度值，℃；

\bar{T}_c —所有测温传感器测量值的平均值，℃；

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，℃。

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，℃；

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 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，℃；

\bar{T}_{\max} —所有测温传感器测定值的最大值，℃；

\bar{T}_{\min} —所有测温传感器测定值的最小值，℃。

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℃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，℃/s；

T_A —30℃温度点测量值，℃；

T_B —恒温扩增温度点测量值，℃；

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_1 —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 。

（八）、校准结果表达

本部分规定了恒温扩增核酸分析仪校准结果表达的格式、内容等进行了具体的描述和规定。

（九）、复校时间间隔

本部分规定了恒温扩增核酸分析仪复校时间间隔建议不超过 1 年。

（十）、附录

本部分主要对校准记录参考格式、校准证书内页推荐格式、温度示值误差校准结果的不确定度评定模型进行了具体的描述和规定。

《恒温扩增核酸分析仪校准规范》制定起草小组

2023 年 02 月