

国家计量技术规范规程制修订

# 《自动核酸合成仪性能测试技术规范》

(征求意见稿)

编制说明

上海市计量测试技术研究院

2023年10月

# 《自动核酸合成仪性能测试技术规范》

## 编制说明

### 一、任务来源

根据国家质量监督检验检疫总局 2021 年国家计量技术法规制修订计划立项，由上海市计量测试技术研究院和中国计量科学研究院共同承担《自动核酸合成仪性能测试技术规范》的制定工作。

### 二、规范制定的必要性

自动核酸合成仪是基于固相亚磷酰胺法原理的寡核苷酸（DNA 或 RNA）自动化合成仪器，是一套由计算机控制的试剂递送系统。按照计算机控制程序，A、T、C、G 不同碱基经过解封、活化、偶联、戴帽、氧化步骤后被依次添加到固体支持物上（通常是可控孔径玻璃），最终寡核苷酸从固相载体上切下，并去除保护基，人工合成得到目标核酸。核酸化学合成技术的建立和发展对现代分子生物学产生了不可估量的影响。化学合成的寡核苷酸作为引物、探针、接头、基因合成子等构成了各种分子生物学实验的基础。正是由于核酸化学合成的发展，才使 PCR 技术成为可能，同时也为反义药物从设想到实现奠定了物质基础。

由于自动核酸合成仪的应用领域关系到疾病诊断、人身安全、工业生产及人们的日常生活，同其它的计量器具一样，自动核酸合成仪性能测试的准确可靠非常重要。国内外尚无通行的自动核酸合成仪的校准方法，各检测实验室采用自校验或厂家校验的方式对自动核酸合成仪进行校准，校验条件、校验项目、校验方法、校验结果的处理各不相同。我们有必要制定自动核酸合成仪的校准方法，从而来公正地评价仪器的各项性能指标，保障自动核酸合成仪的产品质量以及测量结果的量值具有溯源性、准确可靠。

### 三、《自动核酸合成仪性能测试技术规范》制定过程

1、2017 年 1 月至 2017 年 6 月，校准规范起草单位组织相关技术人员对自动核酸合成仪的校准方法进行了研究，研究了国内使用面大的品牌的自动核酸合成仪的工作原理及技术参数，对不同条件下测量仪器的计量性能变化有深入的了解，

并开展了该类仪器的计量校准服务超过 30 台次，服务用户达 10 余家次，解决了华东地区自动核酸合成仪计量校准难以实现的困境，为校准规范的制定不仅积累了相当多的实际经验而且创造了有力的条件。

2、2021 年 7 月，国家市场监督管理总局批准全国生物计量技术委员关于《自动核酸合成仪性能测试技术规范》的立项。上海市计量测试技术研究院承担，中国计量科学研究院、广东省计量科学研究院、中国科学院上海高等研究院、江苏硕世生物科技股份有限公司参加起草，项目正式启动。上海市计量测试技术研究院迅速抽调 5 名专业技术人员成立规范制定起草小组，全面落实编制工作。起草小组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。按计划购买了实验设备和所需要的化学试剂。

3、2021 年 8 月至 12 月，起草小组认真查阅国内外相关行业标准 and 文献等资料，对自动核酸合成仪的使用情况、主要原理、性能指标等进行了全面调研。

4、2022 年 1 月至 6 月，起草小组走访了自动核酸合成仪生产厂家上海仪铂生物科技有限公司、江苏领坤生物科技有限公司、寡核苷酸合成公司上海百力格生物有限公司、苏州金唯智生物科技有限公司，进行现场调研。根据调研结果，就规范的架构设定、校准项目等广泛听取了相关专家的建议和意见。专家来自生产厂家、应用客户、仪器维修单位等各方面，提出了许多建设性的意见和建议。

5、2022 年 7 月至 12 月，起草小组到上海百力格生物有限公司、江苏硕世生物科技股份有限公司、苏州金唯智生物科技有限公司、生工生物工程(上海)股份有限公司、中国科学院上海高等研究院、上海交通大学医学院附属仁济医院等 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。

6、2023 年 1 月至 6 月，起草小组开展多次讨论，对规范的框架结构、适用范围、技术指标要求等进行研究，形成了《自动核酸合成仪性能测试技术规范》（征求意见稿）。发送征求意见稿至自动核酸合成仪生产及使用单位、科研院校等单位及相关专家，广泛征求意见。

#### 四、规范制定的主要技术依据与原则

## （一）、技术依据

《自动核酸合成仪性能测试技术规范》的制定参考了 GB/T 34797-2017 核酸引物探针质量技术要求、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》等标准，按照 JJF 1071-2010《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 1071-2010《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、术语和计量单位、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 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》和 JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》保持一致。

### 3、计量特性确定原则

考虑自动核酸合成仪在实际应用中的主要功能和性能指标，并结合一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的自动核酸合成仪上的实验，形成本规范确定的计量特性。

### 4、校准用仪器及试剂选择的原则

计量特性确定的实验研究过程中使用了压力标准器、分析天平，液质联用飞行时间质谱仪（TOF），可以市场购买并经相关计量单位进行计量校准合格；乙腈为分析纯试剂，市场购买即可。

## 五、规范制定说明

《自动核酸合成仪性能测试技术规范》共分为封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语和计量单位、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 JJF1071-2010《国家计量校准规范编写规则》撰写。

### （一）、范围

本规范适用于基于固相亚磷酰胺法合成寡核苷酸的自动核酸合成仪性能测试。

### （二）、引用文件

《自动核酸合成仪性能测试技术规范》主要参考了 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》和《GB/T 34797-2017 核酸引物探针质量技术要求》完成本规范的制定。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范。

### （三）、概述

本部分主要对自动核酸合成仪的仪器组成部分和应用情况进行了简要介绍。

自动核酸合成仪是基于固相亚磷酰胺法原理的寡核苷酸（DNA 或 RNA）自动化合成仪器，是一套由计算机控制的试剂递送系统。按照计算机控制程序，A、T、C、G 不同碱基经过解封、活化、偶联、戴帽、氧化步骤后被依次添加到固体支持物上（通常是可控孔径玻璃），最终寡核苷酸从固相载体上切下，并去除保护基，人工合成得到目标核酸。核酸化学合成技术的建立和发展对现代分子生物学产生了不可估量的影响。化学合成的寡核苷酸作为引物、探针、接头、基因合成子等构成了各种分子生物学实验的基础。正是由于核酸化学合成的发展，才使 PCR 技术成为可能，同时也为反义药物从设想到实现奠定了物质基础。

### （四）、计量特性

本部分通过对自动核酸合成仪主要原理、性能指标等全面调研以及自动核酸合成仪在实际中的使用情况确定了《自动核酸合成仪性能测试技术规范》中的计量特性。包括：压力示值误差、进样量示值误差、进样量重复性、气密性测试和合成核酸相对分子质量相对误差。

#### 1、压力示值误差

自动核酸合成仪是通过控制试剂泵的压力和合成腔中的压力，来控制不同试剂的递送和合成反应的进行。因此，自动合成仪试剂泵的压力和合成腔中的压力

控制，直接关系着核酸合成仪中碱基的添加和合成反应的顺利进行。因此，对仪器考察压力表压力示值误差，具有重要意义。

## 2、进样量示值误差

自动核酸合成仪的试剂进样体积，直接关系着合成反应是否有足够的原料，进行合成反应。合成原料的体积准确性决定了合成反应的成功与否，也决定了合成产物的纯度和合成序列的准确性。因此，进样量示值误差是自动核酸合成仪的一个非常重要的计量性能指标。

## 3、进样量重复性

自动核酸合成仪的试剂进样体积的重复性，也就是合成反应的原料的加入量的重复性。在核酸合成过程中，A、T、C、G 四种碱基需要不断的加入，每次加入的原料体积应该一致，这样合成反应的序列准确度和每批次合成寡核苷酸的质量，才具有可靠性，因此，通过评价仪器的进样量重复性可以评价仪器的性能稳定性。

## 4、气密性测试

自动核酸合成仪的合成反应是在合成腔中进行，整个合成反应在惰性气体的包围中进行。合成腔良好的气密性可以保证合成反应没有氧气的干扰，保证合成核酸的纯度。良好的气密性也可以为使用企业节省惰性气体的消耗。但由于操作难度较大，部分仪器是通过不断进气达到合成腔中惰性气体压力的平衡，因此本节仅适用于仪器合成腔有保压功能的情况。

## 5、合成核酸相对分子质量相对误差

自动核酸合成仪的功能是合成序列正确的目标寡核苷酸分子。对合成寡核酸产物的考察，是对核酸合成仪的综合考察，也是核酸合成仪的功能体现。通过使用液质联用飞行时间质谱仪测定合成的寡核苷酸分子量，可以判定核酸合成仪的功能是否正常，是其使用性能的集中体现。

## (六)、校准条件

本部分主要规定了自动核酸合成仪校准时需要满足的、对校准结果有影响的

环境条件、校准设备和标准物质。环境条件包括：温度：（15~30）℃；相对湿度：≤80%；供电电源：电压（220±22）V，频率（50±1）Hz；附近无影响仪器正常工作的电磁场及机械振动；仪器接地良好。

校准用仪器及试剂，主要包括：压力标准器，压力标准器最大允许误差绝对值应不大于被检压力仪表最大允许误差绝对值的 1/4；分析天平，天平准确度为①级，分度值不大于 0.1 mg；液质联用飞行时间质谱仪（TOF），可以市场购买并经相关计量单位进行计量校准合格；乙腈为分析纯试剂；其他仪器和辅助设备，压力泵，用于辅助不带加压功能的压力标准器。

### （七）、校准项目和校准方法

主要针对自动核酸合成仪的特点，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、不同厂家生产的自动核酸合成仪实验数据的基础上，综合自动核酸合成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，形成了本规范确定的校准项目和校准方法。

#### 1、校准项目

本部分主要规定了自动核酸合成仪校准项目包括压力示值误差、进样量示值误差、进样量重复性、气密性测试和合成核酸相对分子质量相对误差

#### 2、校准方法

##### （1）压力示值误差

用胶管、压力标准器和待测压力仪表相连，若压力标准器不含加压功能，需要配备压力泵等压力发生器。在待测压力仪表规定的测量范围内（或工作压力点附近），均匀选取不少于 3 个示值误差测量点。测量时，由零点均匀缓慢加压至所选的最小测量点，记录读数，如此依次测量直至最大测量点，再依次逐点降压测量直至零位。

按公式（1）计算压力表的示值误差。

$$\Delta p = p - p_s \quad (1)$$

式中：  $\Delta p$  —— 压力示值误差，kPa；

$p$  ——待测压力表示值, kPa;

$p_s$  —— 压力标准器示值, kPa。

## (2) 进样量示值误差

将仪器各部分连接好, 以乙腈的进样管道为例, 设定进样量为 200  $\mu\text{L}$ (或其他仪器常用进样量作为校准点), 启动仪器, 在进样管道出口用事先称重过的洁净离心管收集乙腈, 收集完成之后, 在分析天平上称重, 根据实验时乙腈的密度, 将所进样乙腈的质量换算成体积, 该测定重复 3 次。按公式 (2) 计算进样量实测值  $V$ , 按公式 (3) 计算进样量的示值误差  $\Delta V$ 。

$$V = (W_2 - W_1) / \rho_t \quad (2)$$

式中:

$V$  ——进样量实测值,  $\mu\text{L}$ ;

$W_2$  ——离心管+液体的质量, g;

$W_1$  ——离心管的质量, g;

$\rho_t$  ——实验温度下乙腈的密度,  $\text{g}/\text{cm}^3$ , 不同温度下乙腈的密度参见附录 A。

$$\Delta V = V_s - \bar{V} \quad (3)$$

式中:

$\bar{V}$  ——同一设定进样量 3 次测量值的算术平均值,  $\mu\text{L}$ ;

$V_s$  ——进样量设定值,  $\mu\text{L}$ 。

## (3) 进样量重复性

按 (2) 中的测量方法重复进样和检测 6 次, 按照公式 (4) 计算进样量的重复性。

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{V}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:



RSD——相对标准偏差，%；

$V_i$ ——第  $i$  次体积的测量值， $\mu\text{L}$ ；

$\bar{V}$  —— $n$  次体积测量的平均值， $\mu\text{L}$ ；

$n$ ——检测次数。

#### (4) 气密性测试（本节仅适用于仪器合成腔有保压功能的情况）

给仪器的合成腔充压，使合成腔气压达到仪器正常工作时的气压，断开进气，持续 1 分钟，通过观察合成腔压力表的变化量来评价合成腔的气密性  $S$ 。

$$S = \frac{\delta}{t} \quad (5)$$

式中：

$S$ ——压力泄漏速率， $\text{kPa}/\text{min}$ ；

$\delta$ ——气密性测试 1 min 压力值的变化量， $\text{kPa}$ ；

$t$ ——时间，此处为 1 min。

#### (5) 合成核酸相对分子质量相对误差

核酸合成仪合成寡核苷酸序列 AAAATTTTCCCCGGGGATCG，经过脱盐处理后，使用液质联用飞行时间质谱仪测定合成的寡核苷酸分子量。采用 ESI 源电离喷雾技术，负离子模式，具体实验条件参见 GB/T 34797 附录 B，并按式 6 计算合成核酸的分子量，单位用道尔顿。再按式 7 计算合成核酸的相对分子质量相对误差。

$$\text{MW}=(\text{A}\times 313.21)+(\text{G}\times 329.21)+(\text{C}\times 289.19)+(\text{T}\times 304.19)-61.94 \quad (6)$$

式中：

$\text{MW}$ ——分子量；

$\text{A}$ ——腺嘌呤含量；

$\text{G}$ ——鸟嘌呤含量；

$\text{C}$ ——胞嘧啶含量；

$\text{T}$ ——胸腺嘧啶含量；

$$\text{ME}=\frac{|\text{TM}-\text{OM}|}{\text{TM}} \quad (7)$$

式中：

$\text{TM}$ ——目标值；

$\text{OM}$ ——观测值；

ME——误差。

#### (八)、校准结果表达

本部分规定了自动核酸合成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

本部分规定了自动核酸合成仪复校时间间隔不超过 1 年。

#### (十)、附录

本部分主要对不同温度下乙腈的密度、自动核酸合成仪校准记录参考格式、示值误差结果的不确定评定、校准证书内页推荐格式进行了具体的描述和规定。

全国生物计量技术委员会