

国家计量技术规范规程制订

《分子杂交仪校准规范》

(征求意见稿)

编制说明

2025 年 9 月

《分子杂交仪校准规范》（征求意见稿）

编写说明

一、任务来源

根据国家市场监管总局 2024 年国家计量技术法规计划立项，南京计量监督检测院、中国计量科学研究院为规范主要起草单位，江苏省省级机关医院为参与起草单位。

二、规范制定的必要性

分子杂交仪是采用核酸分子杂交技术检测待测基因组中是否含有已知基因序列的设备，灵敏度高，特异性好，广泛地使用于克隆基因的筛选、酶切图谱的制作、基因组中特定基因序列的定性、定量检测和疾病的诊断等方面。因而它不仅在分子生物学领域中具有广泛地应用，而且在临床诊断上的应用也日趋增多。在医学上，目前已用于多种遗传性疾病的基因诊断、恶性肿瘤的基因分析、传染病病原体的检测等领域中。

目前国内没有相关的计量检定规程或校准规范，也无专门的国标、行标、国际标准可参考，但是这类仪器在各医疗机构、分子诊断实验室已被广泛使用，为保证测量数据的准确可靠和保障人民的生命安全，对此类仪器开展校准是非常必要且具有现实意义的。

常见的分子杂交仪按自动化程度可以分为三大类：1）普通分子杂交仪：一般为封闭式恒温箱式结构，另加上振荡或旋转式可动机构，控制系统实现温度控制、转速等实验参数的控制和调整。2）半自动分子杂交仪：除一般功能外，还能在人工干预下进行杂交后的其他实验步骤，如孵育、显色等。3）全自动分子杂交仪：目前主要应用于基因芯片产品，可以实现整个杂交过程的自动化。

目前针对分子杂交仪开展的检测工作主要参照 JJF 1101-2019《环境试验设备温度、湿度校准规范》，重点关注其温度控制性能和转速控制性能。但随着半自动和全自动分子杂交仪在临床分子诊断上的推广使用，仅关注温度参数和转速参数显然是不充分的，因此急需根据半自动和全自动分子杂交仪的产品技术特点及使用需求研究制定适宜的校准项目和性能指标，为计量机构提供科学准确的校准依据。除一般的物理参数校准，也需要对半自动或全自动分子杂交仪的整体性能提出一个综合评价方法

三、《分子杂交仪校准规范》制定过程

1、2024 年 2 月 国家市场监督管理总局计量司批准全国生物计量技术委员会关于《分子杂交仪校准规范》的立项，南京市计量监督检测院、中国计量科学研究院为主要起草单位，江苏省省级机关医院参加起草，项目正式启动。

2、2024 年 4 月 南京计量监督检测院《分子杂交仪校准规范》起草组就规范的架构设定、校准项目、具体指标等开展了相关调研，完成了人员、设备和参考资料的准备工作，制定工作计划。

3、2024 年 4 月-12 月 规范起草小组开展相关实验，得到实验数据印证技术要求和校准方法的合理性。

3、2025 年 1 月 规范起草小组完成规范初稿的编写。

4、2025 年 2 月-9 月 规范起草小组归纳总结试验情况，结合国内相关技术资料，对规范初稿进行修订，形成征求意见稿，广泛征求意见。

四、规范制定的主要技术依据及原则

4.1 技术依据

本规范制定以国内实际情况为出发点，力求充分体现科学性、合理性、先进性、实用性。本次规范的制定主要参考和引用了 JJF 1101—2019《环境试验设备温度、湿度参数校准规范》。

4.2 制定原则

4.2.1 架构

架构上按照 JJF1071—2010《国家计量校准规范编写规则》的要求，分为引言、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、校准结果表达、复校时间间隔 10 个部分制定《分子杂交仪校准规范》。

4.2.2 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保持一致。

术语方面，JJF 1101—2019 中界定术语和定义适用于本规范。另外规范给出了关于分子杂交的术语定义，关于分子杂交，暂没有其他标准明确给出过相关定义，规范给出的定义是根据分子生物学上的一般性理解进行总结而成。

计量单位方面，分子杂交仪校准涉及的物理量包括温度、转速、振动频率，分别对应法定计量单位：摄氏度（℃）、转每分（r/min）、赫兹（Hz）。

4.2.3 计量特性选择

随着分子杂交技术的不断发展，分子杂交仪演化出了多种类型和结构，以适应各类杂交实验的实际需求。如表 1 所示，目前常见的分子杂交仪类型有原位分子杂交仪、分子杂交箱、自动核酸分子杂交仪等，它们采用不同的结构设计，适用于各类应用场景。

表 1 不同种类分子杂交仪的对比

类型	原位分子杂交仪	分子杂交箱（分子杂交炉）	自动核酸分子杂交仪
结构特点	平板式结构，样品承载为“载玻片架”，部分型号带缓慢振荡功能（促进杂交液与样本充分接触，避免局部浓度不均）；能够精准控制温度（杂交温度、变性温度）、湿度（80%~95% RH，防止原位样本干燥导致非特异性结合）和反应时间。	密闭的、温度精确控制的保温腔体结构，内部有一个由电机驱动的旋转轴（转子）。转子上配有专用夹具，用于固定杂交管或杂交袋。工作时将含有膜和杂交液的杂交袋或专用杂交管固定在转子上，转子缓慢旋转，带动内部的杂交液在膜表面持续、均匀地滚动。部分型号在箱体内部的底部还额外集成一个振荡平台，可用于放置酶标板或杂交袋。	集温控、液体处理和软件控制于一体的集成化设备，核心部件包括温控孵育腔、自动化液体处理系统、机械传动与传感器等。对于全自动化设备，用户只需准备好膜、探针和试剂，并将它们放置到指定位置（如试剂瓶、杂交盒），然后在触摸屏上选择或编辑预设程序，仪器自动执行预杂交、杂交、洗膜显色等。半自动的杂交仪，一般不具有全自动化的液体处理系统，需要过程干预，液体的添加或移除依赖人工。半自动杂交仪简化了一部分人工操作，相对全自动设备又保留了手动操

			作的灵活性。
应用 场景	实现核酸在原位样本（如组织切片、细胞涂片）中的特异性定位，观察目标核酸的空间分布（如肿瘤细胞中特定基因表达位置、染色体上基因定位）。	主要应用于 Southern blot、Northern blot 等经典的核酸膜杂交实验。	主要用于临床分子诊断实验室：如地中海贫血、遗传性耳聋的遗传病基因检测；HPV（人乳头瘤病毒）分型检测、结核分枝杆菌鉴定等传染病检测。
典型 产品	Thermo Brite 杭州奥盛 TDH-500 汗诺 LF-2000	启前 QQLF-III 汗诺 LF-IIIIN 沪析 HZL-240	亚能 HR4800 凯普 HB-2012A（半自动） 凯普 HBHM-9000A 安必平 LBP-3696

根据分子杂交仪在实际应用中的主要功能，参考产品说明书中给出的性能指标，并结合一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的分子杂交仪上的实验，形成本规范确定的计量特性。

首先分子杂交仪的可设置物理参数主要有温度、杂交时间，有振荡或旋转功能的杂交仪还可以对振动频率或旋转速度进行设定，此外，对于有自动化液体处理系统的杂交仪还可以对液体的加液量、吸液量进行设定。

1) 温度：温度是影响杂交效率的关键因素之一。不同的核酸序列具有特定的解链温度和复性温度，分子杂交仪可以将温度控制在较为精确的范围内，保证杂交反应既能够充分进行，又不会因为温度过高导致核酸变性过度，或者温度过低导致非特异性杂交的发生。根据调研，杂交仪的温控范围有：室温+5℃~99℃或 20℃~55℃或室温+5℃~50℃，温度分辨率一般为 0.1℃，温控精度为±(0.5~1.0)℃，部分可达±0.3℃。

2) 振荡/旋转速度：是分子杂交箱需要精确控制的参数之一。适当的振荡能够使杂交液均匀地分布在杂交膜表面，促进核酸分子之间的充分接触和杂交反应的快速进行。不同的实验对振荡速度有不同要求，分子杂交箱可以根据具体需求进行灵活调整。根据相关产品说明书，旋转速度以（5~20）r/min 为主，精度±0.5 r/min，适配膜杂交和杂交管实验；振荡速度覆盖 0~200 r/min，精度±

(5%~10%)，适合批量处理和复杂样本。

3) 杂交时间：杂交时间的长短也会对实验结果产生影响。如杂交时间过长可能导致非特异性结合增加，而时间过短则可能降低信号强度。但考虑到杂交反应通常在 2 到 24 小时内完成，是一个相对较长的时间，对于全自动设备，各反应步骤也在几十分钟左右，且目前电气设备采用的电子计时模块一般具有较高的准确性，其计时误差完全能够满足对杂交反应时间的控制。

4) 加液/吸液量：全自动设备可以自动实现杂交过程中杂交液、洗涤液的处理，根据某全自动杂交仪说明书，其单次液体处理量为 2.5 ml，CV 可达 $\pm 5\%$ ，但在实际试验中发现，由于全自动杂交仪的结构设计和运行特点，不具备采用称量法测试的条件，在正常使用条件下，难以实现对加液/吸液量准确测量。

5) 样本检测准确率：目前全自动设备基本上都是用于临床分子诊断，如地中海贫血、遗传性耳聋的遗传病基因检测、HPV（人乳头瘤病毒）分型检测等传染病检测，杂交仪设备与试剂盒需配套使用，部分全自动设备还具有显色结果自动扫描、判读的功能。为了对设备整机性能进行评估，考察设备的温控性能、液体处理效果、结果判读能力等因素的综合影响，可以使用对应的已知阳性、阴性样品对设备进行验证。

故在计量特性选择过程中，对仪器的可设置参数温度、振荡/旋转速度，以及样本检测准确率作为计量特性。

4.2.4 校准设备

根据选择的计量特性，规范中给出了不同的计量器具。

1) 温度测量装置：可至少同时采集 9 组温度数据，测量范围 (0~100) °C，最大允许误差： ± 0.3 °C。

2) 转速测量装置：测量范围 0~100 r/min，最大允许误差： $\pm 3\%$ 。

3) 振动频率测量装置：测量范围 0~500 Hz，最大允许误差： $\pm 3\%$ 。

4) 核酸标准物质和试剂：人乳头瘤病毒（HPV）有证标准物质，或客户要求的其他检验项目的有证标准物质，相对扩展不确定度 $\leq 30\%$ 。

配套试剂盒。

其中，温度、转速、振动频率测量装置测量范围覆盖分子杂交仪参数设定范围，装置最大运行误差按照 1/3 原则进行确定。

人乳头瘤病毒（HPV）分型检测是目前全自动分子杂交仪的重要应用之一，相关厂家均推出了 HPV 杂交方法的试剂盒。因此规范提出可以使用人乳头瘤病

毒（HPV）有证标准物质对这类全自动分子杂交仪进行样本检测准确率的验证。若被校全自动设备用于其他基因或传染病的检测，应使用相对应的标准物质或质控进行测试。

4.2.5 环境条件

1) 环境温度（10~30）℃，相对湿度不大于 80%。这是分子杂交仪的使用环境条件的一般要求。

2) 周围无剧烈振动，无强电磁干扰。

五、规范主要制定内容

《分子杂交仪校准规范》共分为引言、范围、引用文献、术语、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔 10 个部分

5.1 范围

本规范适用于普通分子杂交仪、半自动分子杂交仪和全自动分子杂交仪的校准。

5.2 引用文献

本规范引用了下列文件：

JJF 1101—2019 环境试验设备温度、湿度参数校准规范

5.3 术语和计量单位

JJF 1101—2019 中界定的及以下术语和定义适用于本规范。

5.3.1 分子杂交 molecular hybridization

具有一定同源序列的两条核酸单链（DNA 或 RNA），在一定条件下按碱基互补配对原则，经过退火形成异质双链的过程。该过程是高度特异性的，由此可以根据所使用的已知序列探针进行核酸分子的特异性检测。

在计量单位方面，本规范使用的主要计量单位都是常规单位，不需要特殊说明。

5.4 概述

在概述部分，主要对分子杂交仪的用途、原理、分类和结构组成进行了简要介绍。

5.5 计量特性

在计量特性部分，主要针对分子杂交仪的特点，参考相关产品说明书声称，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、不同厂家生产的分子杂交仪实验数据的基础上，形成本规范确定的计量项目，包括注液体积误差、注液体积重复性、浸泡时间误差、洗涤残留。

表 1 分子杂交仪的计量特性指标

计量特性	计量特性指标
温度偏差	±1.0 °C
温度均匀度	≤1.0 °C
温度波动度	±1.0 °C
转速（或振荡频率）示值误差	±10%
样本检出准确率	100%

注：以上技术指标不用于合格性判别，仅供参考。

5.6 校准条件

在校准的环境条件部分，规定了相关的使用环境条件，并规定了校准用计量标准器。

5.7 校准项目和校准方法

5.7.1 温度偏差、温度均匀度、温度波动度

1) 校准点

在杂交仪温度设定范围内均匀的选择高、中、低三点，或根据用户的实际需求设置温度校准点。

2) 测量布点

将温度测量装置的传感器探头均匀布置在杂交仪的箱体内部或反应平台上。校准箱式结构的杂交仪时，温度测量点设置于箱体内部的 8 个角和中心位置，温度传感器应不与箱内壁、振荡或旋转机构等部位接触。校准平板加热式结构的杂交仪时，温度测量点设置于反应平台的 4 个角和中心位置，温度传感器应尽量与加热模块紧密贴合。

3) 校准方法

将杂交仪设定到待校准温度，开启仪器运行，显示温度达到设定值 10 min 后开始记录数据，每 2 min 记录一次，30 min 内共记录 16 组数据。按公式（1）计算各测量点 16 次测量中的最高温度与设定温度的差值，即为温度上偏差；按公式（2）计算各测量点 16 次测量中的最低温度与设定温度的差值，即为温度下偏差。

$$\Delta t_{\max} = t_{\max} - t_s$$

(1)

$$\Delta t_{\min} = t_{\min} - t_s \quad (2)$$

式中：

$\Delta t_{\max}$ ——温度上偏差，℃；

$\Delta t_{\min}$ ——温度下偏差，℃；

$t_{\max}$ ——各测量点 16 次测量中的最高温度，℃；

$t_{\min}$ ——各测量点 16 次测量中的最低温度，℃；

t_s ——杂交仪设定温度，℃。

按公式（3）计算每组测量中实测最高温度与最低温度差值中的最大值，即为温度均匀度。

$$\Delta t_u = \max(t_{i\max} - t_{i\min}) \quad (3)$$

式中：

Δt_u ——温度均匀度，℃；

$t_{i\max}$ ——各测量点在第 i 次测得的最高温度，℃；

$t_{i\min}$ ——各测量点在第 i 次测得的最低温度，℃。

各测量点实测最高温度与最低温度之差的一半，冠以“±”号，取全部测量点中变化量的最大值，即为杂交仪 30 min 内温度波动度的校准结果，按公式（4）计算。

$$\Delta t_f = \pm \max[(t_{j\max} - t_{j\min})/2] \quad (4)$$

式中：

Δt_f ——温度波动度，℃；

$t_{j\max}$ ——测量点 j 在 n 次测量中的最高温度，℃；

$t_{j\min}$ ——测量点 j 在 n 次测量中的最低温度，℃。

5.7.2 转速（或振荡频率）示值误差

对具有旋转或振荡功能的杂交仪进行该项目的校准。

1) 校准点

在可调范围内均匀选取高、中、低三个值作为杂交仪转速或振荡频率的校准点，或选择其他有实际需求的转速或频率作为校准点。

2) 校准方法

使用转速测量装置或振荡频率测量装置进行测量。设定杂交仪转速或振荡频率，启动设备，平稳运行 5 min 后开始测量，测量时间间隔为 1 min，共测量 3 次，按式（5）（6）计算转速或振荡频率示值误差。

$$\bar{r} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 r_i \quad (5)$$

$$\Delta r = \frac{r_s - \bar{r}}{\bar{r}} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

$\bar{r}$ ——平均转速或振荡频率，r/min 或 Hz；

r_i ——转速或振荡频率的单次测量值，r/min 或 Hz；

Δr ——转速或振荡频率示值误差，%；

r_s ——转速或振荡频率设定值，r/min 或 Hz。

5.7.3 样本检出准确率

对用于相关项目检测的自动分子杂交仪进行样本检出准确率的校准。

使用对应检测项目的有证标准物质，按照试剂盒使用说明书进行杂交实验，加入标准物质时，可根据实际情况均匀选取 5~8 个样本孔位加入标准物质，另外选取 1~2 个孔位加入纯水作为空白样本。杂交实验完成后，记录阳性样本检出数量和阴性样本检出数量，根据式（7）计算样本检出准确率。

$$TR = \frac{x_{TP} + x_{TN}}{x} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

TR——样本检出准确率，%；

x_{TP} ——阳性样本检出数量；

x_{TN} ——阴性样本检出数量；

x ——样本总数。

5.8 校准结果表达

经校准后的杂交仪应填发校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求，并给出各校准项目名称和测量结果以及扩展不确定度。推荐的校准原始记录格式见附录 A。校准证书应包括的信息及推荐的校准证书的内页格式见附录 B。

校准结果的不确定度按 JJF 1059.1—2012 的要求评定，校准不确定度评定示例见附录 C。评定示例分别对温度偏差和转速示值误差的不确定度进行了评定，包括了测量方法、测量模型、不确定度来源、不确定度分量的估算、标准不确定度一览、合成标准不确定度、扩展不确定度等主要内容。

5.9 复校时间间隔

建议分子杂交仪复校准间隔一般不超过 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、仪器本身质量等诸因素所决定的，因此，送校单位可

根据实际使用情况自主决定复校时间间隔。如果在使用过程中对仪器测量结果产生怀疑或更换主要部件应及时校准。

5.10 附录

附录 A 校准原始（推荐）记录格式

附录 B 校准证书（内页）推荐格式

附录 C 测量不确定度评定示例

《分子杂交仪校准规范》规范制定起草小组

2025 年 9 月