

JJF(浙)

浙江省地方计量技术规范

JJF(浙) 1124—2016

**基因扩增仪（聚合酶链反应分析仪）
校准规范**

Calibration Specification of Polymerase Chain Reaction Analyzer

2016-3-16 发布

2016-4-20 实施

浙江省质量技术监督局 发布

基因扩增仪 (聚合酶链反应分析仪)

JJF (浙) 1124-2016

Calibration Specification of
Polymerase Chain Reaction Analyzer

归口单位：浙江省质量技术监督局

主要起草单位：浙江省计量科学研究院

参加起草单位：温州市计量技术研究院

北京林电伟业电子科技有限公司

本规范由浙江省计量科学研究院负责解释

本规范主要起草人：

崔超 （浙江省计量科学研究院）

熊玉亭 （浙江省计量科学研究院）

吕玲 （浙江省计量科学研究院）

参加起草人：

林雁 （温州市计量技术研究院）

薛诚 （北京林电伟业电子科技有限公司）

王杰 （浙江省计量科学研究院）

目 录

引 言	1
1 范围	2
2 引用文件	2
3 名词	2
3.1 聚合酶链反应	2
3.2 聚合酶链反应分析仪 (PCR 仪)	2
3.3 温度偏差	3
3.4 热盖温度偏差	3
3.5 温度均匀度	3
3.6 超调温度	3
3.7 升温速率	3
3.8 降温速率	3
4 概述	3
5 计量特性	4
5.1 外观及标志	4
5.2 推荐技术指标	4
6 校准条件	5
6.1 环境条件	5
6.2 校准设备	5
7 校准项目和校准方法	5
7.1 校准项目	5
7.2 校准方法	5
8 校准结果表达	10
9 复校时间间隔	11
附录 A	12
附录 B	13
附录 C	14

引 言

《基因扩增仪（聚合酶链反应分析仪）校准规范》是基于聚合酶链反应分析仪主要技术参数实验测试的基础上进行编制的，并参考了现行的聚合酶链反应分析仪相关技术标准：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》；JJF 1030-2010《恒温槽校准规范》；YY/T1173-2010《聚合酶链反应分析仪》；GB/T 5170.1-2008《电工电子产品环境试验设备检验方法总则》。本校准规范的格式符合JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的规定。

基因扩增仪（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定性基因扩增仪（也称聚合酶链反应分析仪 Polymerase Chain Reaction Analyzer，以下简称PCR仪）计量性能的校准，对于其他类型的PCR仪，如荧光实时定量PCR仪，若可作为普通PCR仪使用的，则可参照本规范校准其温度相关项目。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1030-2010 恒温槽技术性能测试规范

JJF 1071-2010 国家计量校准规范编写规则

GB/T 5170.1-2008 电工电子产品环境试验设备检验方法 总则

YY/T1173-2010 聚合酶链反应分析仪

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

凡是注明日期的引用文件，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 名词

3.1 聚合酶链反应

体外扩增DNA或RNA片段的酶促反应过程。

3.2 聚合酶链反应分析仪（PCR 仪）

运行PCR反应温度转换程序的装置。

3.3 温度偏差

同一循环中, 恒温计时开始10s内到计时结束之间, 某一规定时刻点温控装置工作区域内的设定温度值与各测量点测得的温度平均值之差。

3.4 热盖温度偏差

设定的热盖温度与实际测得的热盖温度之差。

3.5 温度均匀度

同一循环中, 恒温计时开始10s内到计时结束之间, 取第30s时刻点温控装置工作区域内的不同样品孔之间实测最高温度与最低温度的之差。

3.6 超调温度

温控装置工作区域内升温或降温至规定温度时, 工作区域内实际温度超出规定温度的温度值。

3.7 升温速率

设定程序段中温差最大的一段升温过程中测得的单位时间上升的平均温度数。(通常为30℃升至95℃, 根据设定温度程序段的不同, 也可为50℃升至90℃。)

3.8 降温速率

设定程序段中温差最大的一段降温过程中测得的单位时间下降的平均温度数。(通常为95℃降至30℃, 根据设定温度程序段的不同, 也可为90℃降至50℃)

4 概述

PCR仪是一种DNA聚合酶在指定的温度场条件下使特定基因片段发生快速扩增的仪器, 其基本原理为: 加热使双链DNA解开螺旋, 在退火温度条件下引物同模板DNA杂交, 在Taq DNA聚合酶, dNTPs, Mg²⁺和合适pH缓冲液存在条件下延伸引物, 重复“高温变性(90~95)℃→低温退火(50~65)℃→适温延伸(70~75)℃”过程, 使待测样本中的核酸呈指数级扩增。因此, PCR仪工作的关键是温度控制。

PCR仪由主要由控制系统、电源系统、温控系统、检测系统和电源部件等部分组成。广泛应用于基础科学研究、疾病研究、考古研究、医学临床诊断、司法刑事鉴定、出入境检验检疫、环境监测以及药物研发等诸多方面。

5 计量特性

5.1 外观及标志

5.1.1 PCR 仪上应有以下标志和符号：产品名称、型号、制造厂名称、制造日期、电源电压、出厂编号和实验用试管尺寸。

5.1.2 面板上图形符号和文字应准确、清晰、均匀、不得有划痕。

5.1.3 紧固件连接应牢固可靠，不得有松动。

5.1.4 运动部件应平稳，不应卡住、突跳及显著空回，键组回跳应灵活。

5.2 推荐技术指标

表1规定了定性PCR仪的各项主要技术指标，供校准时参考。

表1 定性 PCR 仪的技术指标

项目	温度点	技术指标	备注
温度偏差	30℃	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	(1) 所列出的技术指标为 PCR 仪恒温计时开始 10s 内到计时结束之间，某一规定的时刻点的技术指标（如 5s 或 30s 时刻点）。也可以参照 PCR 仪本身的技术指标；
	50℃	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	
	60℃	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	
	70℃	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	
	90℃	$\pm 0.6^{\circ}\text{C}$	
	95℃	$\pm 0.8^{\circ}\text{C}$	
热盖温度偏差	105℃	$\pm 3^{\circ}\text{C}$	(2) 校准温度点可以根据客户实际使用的程序来确定，并不一定与给出的温度点一致；
温度均匀度	30℃	$\leq 1.0^{\circ}\text{C}$	
	50℃	$\leq 1.0^{\circ}\text{C}$	
	60℃	$\leq 1.0^{\circ}\text{C}$	
	70℃	$\leq 1.0^{\circ}\text{C}$	
	90℃	$\leq 1.5^{\circ}\text{C}$	
	95℃	$\leq 1.5^{\circ}\text{C}$	
超调温度	50℃	$\leq 5.0^{\circ}\text{C}$	(3) 超调温度包含最大超调温度与平均超调温度；
	95℃	$\leq 6.0^{\circ}\text{C}$	
升温速率	从 30℃~95℃	$\geq 1.5^{\circ}\text{C/s}$	(4) 校准项目还应该包含升温速率、降温速率，可以参照 PCR 仪本身的技术指标。
降温速率	从 95℃~30℃	$\geq 1.5^{\circ}\text{C/s}$	

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 环境温度：(15~30)℃。

6.1.2 环境湿度：(10~75)%RH。

6.1.3 大气压力：(86~106)kPa。

6.1.4 电源条件：符合设备相关的电源要求。

6.1.5 设备周围无强电磁场干扰、无振动、无对流风、洁净无灰尘。

6.2 校准设备

基因扩增仪温度校准装置：由若干个精密温度传感器、数据采集分析模块等组成。要求温度传感器能与PCR仪孔板接触良好，且温度采样频率不低于2Hz。温度测量标准器的测量范围为(0~120)℃，最大允许误差不低于 $\pm 0.01^\circ\text{C}$ ，分辨力不低于 0.01°C 。温度校准装置整体的最大允许误差不低于MPE： $\pm 0.15^\circ\text{C}$ 。

7 校准项目和校准方法

7.1 校准项目

PCR仪的计量性能校准项目为：最高温度、最低温度、平均温度、温度偏差、热盖温度偏差、最大超调温度、平均超调温度、温度均匀度、升温速率和降温速率。

7.2 校准方法

7.2.1 校准前的准备工作

7.2.1.1 校准前需将PCR仪开机调整后预热30min。

7.2.1.2 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导热油，48孔和96孔的PCR仪按图1所示将温度传感器置于PCR仪加热模块中，并确保与加热模块接触良好。具有顶盖加热功能的PCR仪应在顶盖下方中心放置薄膜状温度传感器，用于校准顶盖温度。48孔的PCR仪配有12只温度传感器，96孔的PCR仪配有15只温度传感器。其他型号PCR仪可根据测温孔数和样品载台的形状放入适量的散线型温度标准器进行校准（如图2所示）。

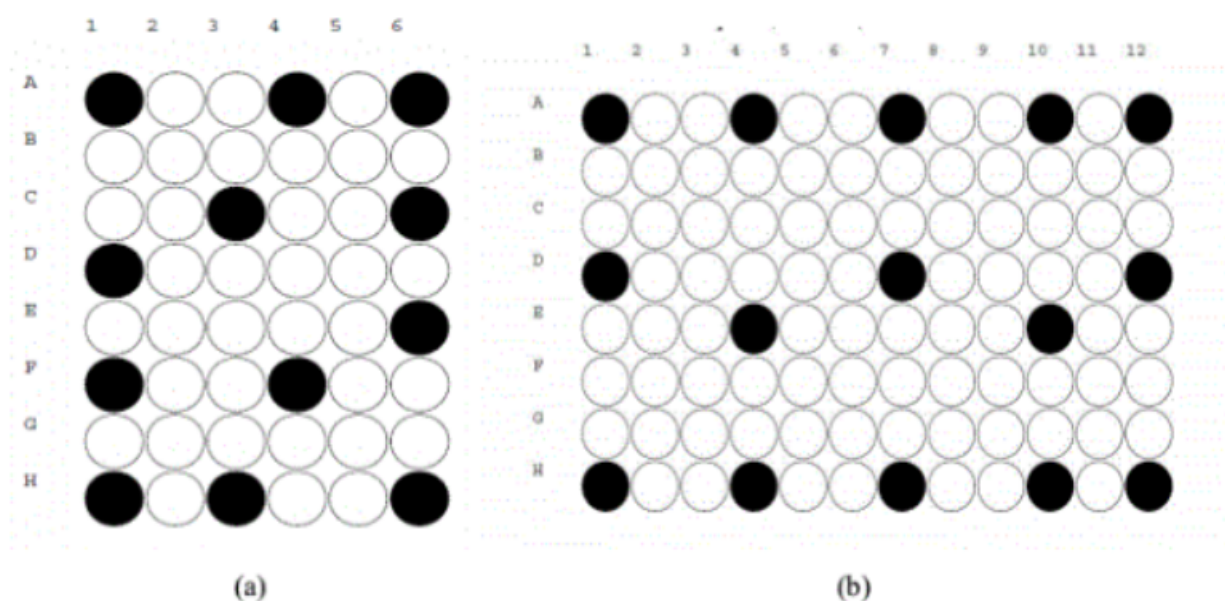


图1 (a)48孔和(b)96孔PCR仪温度传感器布点示意图

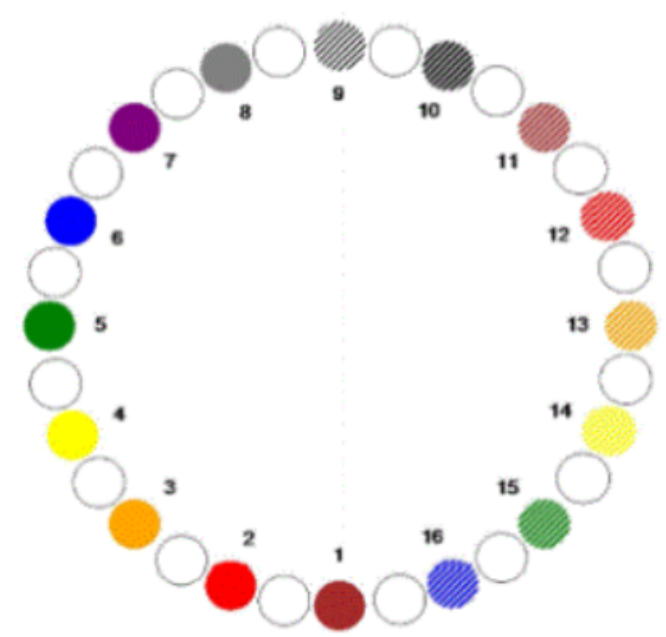


图2 特殊型号PCR仪温度传感器布点示意图

7.2.1.3 参照送检单位提供的PCR仪产品使用说明书设定该PCR仪的温度控制程序，并将温度检测系统设定为相同温控程序，表2为控制程序标准示例。后文的校准项目均在96孔PCR仪上按照该程序计算。具有顶盖加热功能的PCR仪，应设置好常用的顶盖温度（通常为95℃~105℃）

7.2.1.4 启动温度校准装置，记录整个数据采集过程并保存。

表2 PCR仪温度控制程序示例

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

7.2.2 最高温度

同一循环中,PCR仪达到某一设定温度点稳定后,恒温计时开始10s内到计时结束之间,取某一规定时刻点(如第30s时刻点)每个温度标准器测得的温度值中的最大值,为该设定温度点的模块最高温度。

7.2.3 最低温度

同一循环中,PCR仪达到某一设定温度点稳定后,恒温计时开始10s内到计时结束之间,取某一规定时刻点(如第30s时刻点)每个温度标准器测得的温度值中的最小值,为该设定温度点的模块最低温度。

7.2.4 平均温度

同一循环中,PCR仪达到某一设定温度点稳定后,恒温计时开始10s内到计时结束之间,取某一规定时刻点(如第30s时刻点)所有温度标准器测得的温度值的平均值,为该设定温度点的模块平均温度。平均温度计算公式见式(1):

$$\bar{T}_c = \frac{\sum_{i=1}^{15} t_i}{15} \quad (1)$$

式中:

\bar{T}_c ——所有测温传感器测量值的平均值,℃;

t_i ——第*i*个温度标准器第30s时刻点测得的温度值,℃。

7.2.5 温度偏差

温度偏差计算公式见式 (2):

$$\Delta T_d = T_s - \overline{T_c} \quad (2)$$

式中:

ΔT_d ——温控装置工作区域内温度偏差, °C;

T_s ——温控装置工作区域内设定温度值, °C。

7.2.6 热盖温度偏差

热盖温度偏差计算公式见式 (3):

$$\Delta T_{\text{cover}} = T_{cs} - \overline{T_{\text{cover}}} \quad (3)$$

式中:

ΔT_{cover} ——热盖温度偏差, °C。

T_{cs} ——热盖温度设定值, °C。

$\overline{T_{\text{cover}}}$ ——整个实验过程中热盖温度的平均值, °C。

7.2.7 最大超调温度

95℃点的最大超调温度为PCR仪从30℃升温至95℃的过程中, 15个温度标准器测得的超调温度最大值。95℃点温度超调量如图3(a)所示。

30℃点的最大超调温度为PCR仪从95℃降温至30℃的过程中, 15个温度标准器测得的超调温度最大值。30℃点温度超调量如图3(b)所示。

其他温度点以此类推。

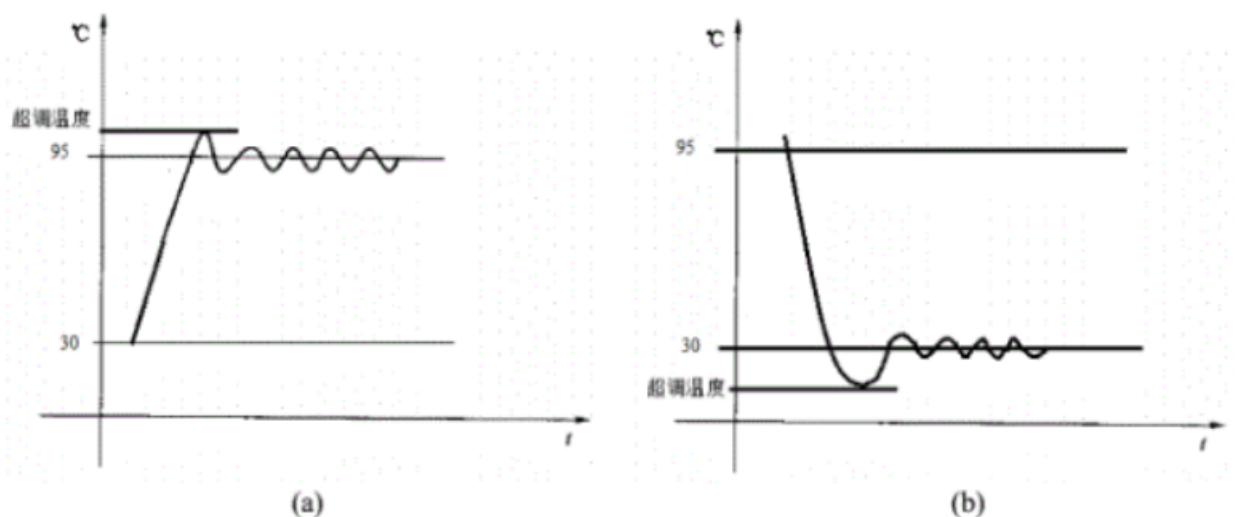


图3 (a)95℃和(b)30℃温度超调量示意图

7.2.8 平均超调温度

PCR仪工作区域内升温或降温至规定温度时, 15个温度标准器测得的温度超调量的平均值。

7.2.9 温度均匀度

温度均匀度计算公式见式 (4):

$$\Delta T_u = T_{j\max} - T_{j\min} \quad (4)$$

式中: ΔT_u : 温度均匀度, °C;

$T_{j\max}$: 各测量点在第j次测量中的实测最高温度, °C;

$T_{j\min}$: 各测量点在第j次测量中的实测最低温度, °C。

7.2.10 升温速率

PCR仪从30℃升温至95℃的升温速率计算公式 (5):

$$\Delta t_u = (T_m - T_n) / t \quad (5)$$

式中: Δt_u : 从第n点升温到第m点的升温速率, °C/s;

T_m : 第m点 (95℃) 的温度值, °C;

T_n : 第n点 (30℃) 的温度值, °C。

t : 从第n点温度升高到第m点温度的时间, s。

7.2.11 降温速率

PCR仪从95℃降温至30℃的降温速率计算公式见式(6)

$$\Delta t_d = (T_x - T_y) / t \quad (6)$$

式中: Δt_d : 从第x点降温到第y点的降温速率, °C/s;

T_x : 第x点(95℃)的温度值, °C;

T_y : 第y点(30℃)的温度值, °C。

t : 从第x点温度降低到第y点温度的时间, s。

8 校准结果表达

经校准的 PCR 仪出具校准证书, 校准结果应在校准证书上反映。校准证书应包括以下信息:

- a) 标题: “校准证书”;
- b) 实验室名称和地址;
- c) 进行校准的地点 (如果与实验室的地址不同);
- d) 证书的唯一性标识 (如编号), 每页及总页数的标识;
- e) 客户的名称和地址;
- f) 被校对象的描述和明确标识;
- g) 进行校准的日期, 如果与校准结果的有效性和应用有关时, 应说明被校对象的接收日期;
- h) 如果与校准结果的有效性和应用有关时, 应对被校样品的抽样程序进行说明;
- i) 校准所依据的技术规范的标识, 包括名称及代号;
- j) 本次校准所用测量标准的溯源性及有效性说明;
- k) 校准环境的描述;
- l) 校准结果及其测量不确定度的说明;
- m) 对校准规范的偏离的说明;
- n) 校准证书或校准报告签发人的签名、职务或等效标识;
- o) 校准结果仅对被校对象有效的声明;

p)未经实验室书面批准,不得部分复制证书的声明。

9 复校时间间隔

PCR仪的复校时间间隔的长短是由仪器使用情况、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。建议复校时间间隔不超过1年,使用特别频繁时应适当缩短,更换重要部件、维修或对仪器性能有怀疑时,应及时校准。

附录 A

PCR仪校准原始记录格式

仪器名称_____样品标识号_____证书编号_____

型号_____器号_____环境温度_____℃ 相对湿度_____% 大气压_____kPa

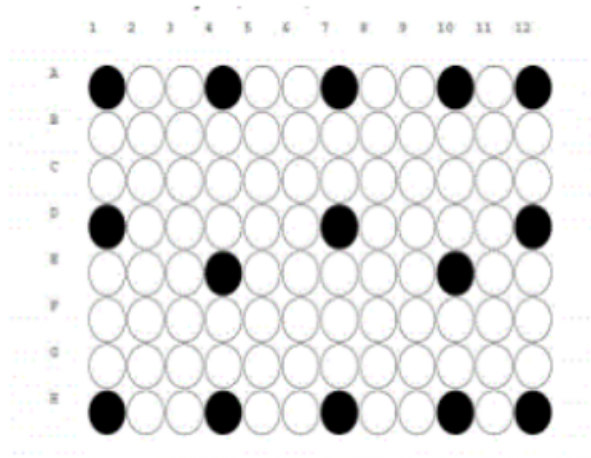
委托单位_____委托单位地址_____制造单位_____

校准前状态：☐外形完好☐_____校准后状态：☐外形完好☐_____

校准设备_____编号：_____不确定度：_____/证书号：_____

有效日期：_____/状态：使用前☐正常☐使用后☐正常☐/量值溯源单位：_____校准地点：_____

1、温度校准点布点图



2、校准时的控制程序：

步骤	设定温度点	设定温度持续时间
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

3、校准结果

设定点 (℃)						
最高温度 (℃)						
最低温度 (℃)						
平均温度 (℃)						
温度偏差 (℃)						
最大超调温度 (℃)						
平均超调温度 (℃)						
温度均匀度 (℃)						
热盖温度偏差 (℃)						
升温速率 (℃/s)						
降温速率 (℃/s)						

备注：(1) 校准过程中各测量点的实时记录数据见附件。

(2) 校准过程中的异常现象及偏离情况记录：

(3) 选择某项属性以在该属性文字前的“☐”中打“√”表示。

校准：_____核验：_____校准日期：_____

附录 C

温度偏差测量结果的不确定度评定

C.1 测量方法

首先按照被测 PCR 仪的温度控制程序将基因扩增仪温度检测系统设定至相同的温度程序段,一般温度范围为 (30~95)℃, 被测 PCR 仪开机预热 30min 后, 将标准温度传感器放置于 PCR 仪加热模块中, 当温度达到并稳定在某一温度点 30s 后, 标准温度传感器的 15 只探头同时采集即时温度数据, 取 15 个温度传感器测量值的平均值和设定温度的差值即为温度偏差。

C.2 测量模型

$$\Delta T_d = T_s - \bar{T}_c - t_{\text{修}} \quad (\text{C.1})$$

式中:

ΔT_d ——温度偏差;

\bar{T}_c ——15 个温度传感器测量值的平均值;

$t_{\text{修}}$ ——标准器修正值

T_s ——设定温度。

C.3 灵敏系数和方差

C.3.1 灵敏系数

对 (C.1) 式各分量求偏导, 得 T_s 分量的灵敏系数 $c_1=1$; \bar{T}_c 分量的灵敏系数 $c_2=-1$; $t_{\text{修}}$ 分量的灵敏系数 $c_3=-1$ 。

C.3.2 方差

由 T_s 、 \bar{T}_c 、 $t_{\text{修}}$ 引入的标准不确定度分量分别为 u_1 、 u_2 和 u_3 , 它们彼此独立, 因此方差可表示为:

$$u_c^2 = (c_1 u_1)^2 + (c_2 u_2)^2 + (c_3 u_3)^2 \quad (\text{C.2})$$

C.4 输入量的标准不确定度评定

C.4.1 输入量 T_s 的标准不确定度 u_1 的评定C.4.1.1 PCR 仪分辨力引入的不确定度 u_1

采用标准不确定度的 B 类评定。

$$\text{PCR 仪分辨力 } 0.1^\circ\text{C 时, } u_1 = 0.05^\circ\text{C} / \sqrt{3} = 0.029^\circ\text{C} \quad (\text{C.3})$$

C.4.2 输入量 \bar{T}_c 的标准不确定度 u_2 的评定C.4.2.1 标准温度传感器测量平均值的重复性引入的不确定度 u_{21}

采用标准不确定度的 A 类评定。

以温度偏差最大的 95℃ 为例, 对同一台 PCR 仪, 在相同的测量条件下, 使用推荐的温度程序

运行 10 个循环, 得到的温度稳定后第 30s 时数据见表 C1。

表 C1 温度传感器 10 个循环的 95℃点 30s 时测量值

测量次数 传感器测量值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
传感器 1	94.89	95.02	94.99	94.84	94.75	94.82	94.71	94.78	94.76	94.98
传感器 2	95.01	95.01	95.15	94.94	94.96	94.97	94.91	94.92	94.97	94.98
传感器 3	94.78	94.77	94.90	94.67	94.73	94.69	94.67	94.64	94.69	94.73
传感器 4	95.20	95.19	95.31	95.10	95.12	95.12	95.09	95.10	95.09	95.15
传感器 5	95.33	95.32	95.62	95.34	95.41	95.34	95.37	95.35	95.38	95.32
传感器 6	94.93	94.93	95.19	94.90	94.94	94.89	94.90	94.92	94.90	94.91
传感器 7	95.24	95.24	95.40	95.17	95.16	95.19	95.17	95.19	95.18	95.23
传感器 8	95.41	95.48	95.85	95.53	95.59	95.48	95.50	95.49	95.56	95.49
传感器 9	94.64	94.66	94.94	94.67	94.74	94.67	94.66	94.66	94.73	94.66
传感器 10	95.43	95.42	95.41	95.32	95.34	95.35	95.30	95.27	95.31	95.40
传感器 11	95.10	95.04	95.25	95.07	95.16	95.07	95.09	95.07	95.11	95.05
传感器 12	94.65	94.63	94.81	94.60	94.64	94.60	94.63	94.62	94.62	94.60
传感器 13	95.45	95.44	95.40	95.24	95.23	95.27	95.23	95.28	95.20	95.38
传感器 14	95.03	95.03	95.16	94.96	94.95	94.96	94.95	94.97	94.96	94.99
传感器 15	94.53	94.60	94.68	94.51	94.48	94.47	94.44	94.47	94.48	94.54
平均值	95.04	95.05	95.20	94.99	95.01	94.99	94.97	94.98	95.00	95.03

10 个循环的 10 个平均温度值的标准偏差为:

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{10} (x_j - \bar{x})^2}{10-1}} = 0.067^{\circ}\text{C}$$

取 15 个传感器的测量平均值作为实验结果, 故: $u_{21} = \frac{s_p}{\sqrt{15}} = 0.017^{\circ}\text{C}$

C.4.2.2 标准温度传感器短期稳定性引入的不确定度 u_{22}

采用标准不确定度的 B 类评定。

在短时间内 (3 分钟) 标准温度传感器变化估计为 $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$, 按均匀分布处理, 则

$$u_{22} = 0.01 / \sqrt{3} = 0.0058^{\circ}\text{C}$$

C.4.2.3 u_{21} 和 u_{22} 相互独立, 故 $u_2 = \sqrt{u_{21}^2 + u_{22}^2} = 0.0108^{\circ}\text{C}$

C.4.3 输入量 t_n 的标准不确定度 u_3 的评定

C.4.3.1 标准温度传感器校准不确定度 u_3

采用标准不确定度的 B 类评定。

由标准温度传感器校准证书得到:

$$u_3 = U/k = 0.13^\circ\text{C}/2 = 0.065^\circ\text{C} \quad (\text{C.4})$$

C.5 合成标准不确定度的评定

C.5.1 输入量的标准不确定度分量汇总如表 C2 所示。

C.5.2 合成标准不确定度的计算

输入量 \bar{T}_c 、 t_{95} 、 T_s 彼此相互独立, 因此

$$u_c = \sqrt{(c_1 \cdot u_1)^2 + (c_2 \cdot u_2)^2 + (c_3 \cdot u_3)^2} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2} = 0.074^\circ\text{C} \quad (\text{C.5})$$

表 C2 标准不确定度分量汇总表

标准不确定度分量 u_i	不确定度来源	标准不确定度 ($^\circ\text{C}$)	灵敏系数 c_i	不确定度分量 $ c_i u_i$
u_1	PCR 仪分辨力引入的不确定度	0.029	1	0.029 $^\circ\text{C}$
u_2		取 0.018	-1	0.018 $^\circ\text{C}$
u_{21}	标准温度传感器测量平均值的重复性	0.017		
u_{22}	标准温度传感器短期稳定性	0.0058		
u_3	标准温度传感器校准不确定度	0.065	-1	0.065 $^\circ\text{C}$

C.6 扩展不确定度的评定

取 $k=2$, 则扩展不确定度为 $U=u_c \times k=0.074 \times 2=0.15^\circ\text{C}$