吉林省地方计量技术规范

JJF（吉）XXX—2023

荧光定量PCR仪校准规范

Calibration Specification for Fluorescence Quantitative PCR Systems

（报批稿）

2023-XX -XX 发布　　2023-XX -XX 实施

吉林省市场监督管理厅 发布

荧光定量PCR仪
校准规范

Calibration Specification for
Fluorescence Quantitative PCR Systems

JJF（吉）XX- 2023

归　口 单 位：　吉林省市场监督管理厅

主要起草单位：　吉林省计量科学研究院

参加起草单位：　吉林省疾病预防控制中心

长春市计量检定测试技术研究院

本规范由吉林省计量科学研究院负责解释

本规范主要起草人：

吴明岳　（吉林省计量科学研究院）

杨　尧　（吉林省疾病预防控制中心）

刘　丹　（长春市计量检定测试技术研究院）

参加起草人：

宋　鸽　（吉林省计量科学研究院）

王宇航　（吉林省计量科学研究院）

目　录

引言……（II）

1　范围……（1）

2　引用文件……（1）

3　术语……（1）

4　概述……（3）

5　计量特性……（4）

6　校准条件……（5）

7　校准项目和校准方法……（5）

8　校准结果表达……（12）

9　复校时间间隔……（12）

附录 A　校准原始记录格式……（13）

附录 B　校准证书内页格式……（16）

附录 C　温度示值误差测量不确定度评定示例……（17）

附录 D　阈值循环数示值误差测量不确定度评定示例 ……（20）

引　言

JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》、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》共同构成支撑本校准规范制定工作的基础性系列规范。

校准方法及计量特性等主要参考了JJF 1527-2015 《聚合酶链反应分析仪校准规范》、YY/T 1173-2010《聚合酶链反应分析仪》、GB/T 42753-2022《实时荧光定量PCR仪性能评价通则》编制。

本规范为首次制定。

荧光定量 PCR 仪校准规范

1 范围

本规范适用于实时荧光定量聚合酶链式反应分析仪（以下简称 PCR 仪）的校准，其他基于聚合酶链式反应原理定量或定性分析靶核酸片段的装置可参照本规范执行。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1527-2015 聚合酶链反应分析仪校准规范

YY/T 1173-2010 聚合酶链反应分析仪

GB/T 42753-2022 实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则

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（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 术语

3.1 聚合酶链反应 polymerase chain reaction

PCR 即聚合酶链反应是一种对特定的 DNA 或 RNA 片段在体外进行快速扩增的方法，由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成。[YY/T 1173-2010,术语和定义 3.1]

3.2 聚合酶链反应分析仪 polymerase chain reaction analyzer PCR analyzer

基于 PCR 技术原理，模拟 DNA 或者 RNA 的复制过程，在模板、引物、聚合酶等存在的条件下，特异扩增已知序列，对其进行检测分析的仪器设备。[YY/T 1173-2010,术语和定义 3.2]

3.3 实时荧光定量 PCR 仪 quantitative real-time polymerase chain reaction analyzer

基于聚合酶链式反应原理，通过温度变化循环程序进行靶核酸片段的体外扩增，同时对循环过程中荧光信号进行实时采集和处理，定量或定性分析靶核酸片段的仪器。[GB/T 42753-2022,术语和定义 3.1]

3.4 恒温阶段 thermostatic process

仪器孔位平均温度达到设定值（偏差 ± 0.5℃以内）且保持该温度的一段时间。[GB/T

42753-2022,术语和定义 3.3]

3.5 温度示值误差 temperature indication error

温度控制模块（如均热块）的设定值与所有采样孔实际温度平均值之差。

3.6 温度均匀度 temperature uniformity

仪器恒温阶段中，各孔位之间的温度一致性。[GB/T 42753-2022,术语和定义 3.5]

3.7 温度波动度 temperature volatility

仪器恒温阶段中，孔位的温度变化幅度。[GB/T 42753-2022,术语和定义 3.4]

3.8 温度最大过冲量 temperature maximum overshoot

均热块温度升高或降低至设定值过程中，所有采样测量孔温度超出（高于或低于）设定值的最大幅度。

3.9 平均升温速率 mean heating rate

升温过程中模块单位时间内上升的平均温度值。

3.10 平均降温速率 mean cooling rate

降温过程中模块单位时间内下降的平均温度值。

3.11 荧光染料 fluorochrome

由短波长激发光激发，释放出可见光的试剂。[YY/T 1173-2010,术语和定义 3.12]。

3.12 荧光强度精密度 precision of fluorescence intensity

对多个检测孔在同一荧光条件下重复荧光强度检测，其检测值的一致性。

3. 13 阈值循环数 *C*t (*C*p) Cycle threshold value

每个 PCR 反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环次数。[GB/T 42753-2022,术语和定义 3.2]。

3. 14 阈值循环数精密度 precision of threshold cycle

均热块不同测量孔在同一荧光条件下，阈值循环数重复测量的一致性。

3. 15 熔解温度 melt temperature, T_m

全总 DNA 双螺旋结构降解一半时的温度称为熔解温度。

3.16 熔解曲线 melt curve

PCR 过程中均热块测量孔的荧光强度（纵坐标）与温度（横坐标）形成的曲线。

3.17 熔解温度漂移 melt temperature bias

根据熔解曲线计算的熔解温度值与光学标准器熔解温度设定值之差。

3.18 峰值强度 peak intensity

熔解曲线上熔解温度对应的荧光强度。

3.19 通道峰值强度一致性 channel peak height consistency, *CPHC*

熔解曲线上，所有采样测量孔峰值强度的变化趋势。

注：峰高的差异表明荧光定量 PCR 仪的光路、光学、光学检测和灵敏度的差异，理想的荧光定量 PCR 仪 ，CPHC 为 1.00。

3.20 线性灵敏系数 linear sensitivity factor, *LSF*

同一熔解温度下，表征熔解曲线线性变化灵敏程度的比率。

注：理想的荧光定量 PCR 仪，线性灵敏度应该是 1.00。 *LSF* 在 0.80 和 1.20 之间，溶解曲线呈现基本线性；*LSF* <0.80 ：在高荧光强度下线性降低，注意信号饱和；*LSF*>1.20：在低荧光强度下线性降低，注意最小信号检测和灵敏度。

3.21 熔解温度比 ratio of melt temperature, RT_m

同一熔解温度下，表征熔解温度飘移因素的比率。

注：RT_m 在 0.80 到 1.20 之间：相同产品熔解温度不同，差异仅基于控温模块特性，熔解峰漂移与温度不均匀直接相关；RT_m >1.20：相同产品熔解温度不同，差异是由控温模块、光学和光学检测系统不准确共同导致的；RT_m <0.80：相同产品熔解温度不同，差异是与光学、光学检测系统及分析软件直接相关。

3.22 样本示值误差 error of sample’s indication

测得的 DNA 标准物质浓度对数值与标称浓度的对数值的误差。

3.23 样本线性 sample's linearity

系列稀释标准物质扩增 *Ct* 值对浓度对数值的线性回归系数。

4 概述

实时荧光定量 PCR 仪，是在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，同时通过标准曲线对扩增基因进行定量分析的仪器。标记有荧光染料的探针与模板基因混合后，完成高温变性、低温复性和适温延伸的热循环后，与模板基因互补配对的探针被切断，荧光染料游离于反应体系中，在特定光激发下荧光染料发出荧光，随着循

环次数的增加，被扩增的目的基因片段呈指数规律增长，通过实时检测与之对应的随扩增而变化的荧光信号强度，即可对待测扩增基因进行定量分析。

实时荧光定量 PCR 仪均热块一般有 32 孔板、48 孔板、96 孔板等几种类型。其主要由样品载台、软件控制系统、温度控制模块、荧光检测模块、均热块检测孔组成，详细结构如图 1 所示。

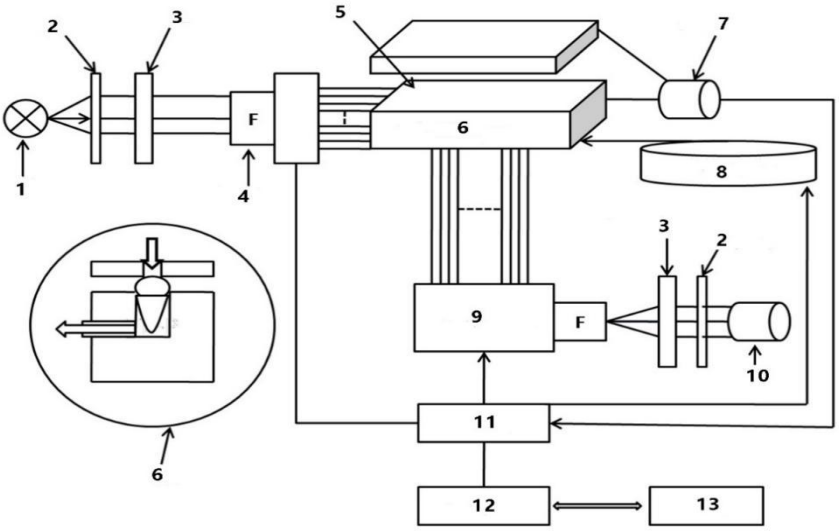

图 1　实时荧光定量 PCR 仪结构示意图

1—光源　2—滤光片　3—准直器　4—光导束　5—样品　6—均热块检测孔　7—温度传感器　8—加热制冷供电　9—光开关阵列　10—光敏器　11—电控装置　12—通讯接口　13—计算机

5　计量特性

5.1 实时荧光定量 PCR 仪计量性能指标如表 1 所示。

表 1　实时荧光定量 PCR 仪计量性能指标

序号	项目		技术指标	备注
1	温度示值误差	30℃，50℃，60℃，70℃，90℃，95℃。	±0.5℃	温度项目
2	温度均匀度		≤1.0℃	
3	温度波动度		≤±0.2℃	
4	温度最大过冲量		≤3.0℃	
5	平均升温速率	50℃→90℃	≥1.5℃/s	
6	平均降温速率	90℃→50℃	≥1.5℃/s	
7	阈值循环数示值误差		±2.5	光学系统

8	阈值循环数均匀度	≤5	物理项目
9	阈值循环数精密度	≤10%	
10	通道峰值强度一致性	1±0.2	
11	线性灵敏系数	1±0.2	
12	熔解温度飘移	±1℃	
13	熔解温度比	1±0.2	
14	样本示值误差	±15%	光学系统化学项目
15	样本线性相关系数	≥0.980	
注：1、以上所有指标不适用于合格性判别，仅供参考。 2、标准物质的准备与配置以及PCR反应体系的建立应尽可能参考JJF1527-2015附录A、B中的要求。			

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 温度：（15～30）℃；相对湿度：不大于80%；

6.1.2 其它：符合仪器额定供电电压和频率；电源电压波动不超出±22 V，交流频率的变化在±1 Hz范围内。仪器应远离振动、电磁干扰。

6.2 测量标准及其他设备

6.2.1 温度与光学校准装置

温度与光学校准装置集成了温度传感器和发射光发生器两部分。其温度测量范围为（0～120）℃，最大允许误差为±0.1℃，采样时间间隔不超过0.5s；发射光发生器的波长范围为（360～780）nm，相对光辐射强度在10%～100%范围内可调。（表格化）

也可用满足上述技术要求的其他标准器。

6.2.2 标准物质

校准时应采用国内外有证标准物质，包括：质粒DNA标准物质或核糖核酸标准物质，其特性量值（拷贝数量≥10^9copies/μL，Ur≤5%,k=2）。

6.2.3　移液器

规格：2μL、10μL、100μL、200μL、1000μL，经计量检定合格。

7　校准项目和校准方法

7.1　校准项目

校准项目主要分为温度项目和光学系统项目两大类，具体项目见表 1。

7.2　校准方法

7.2.1　校准前的准备工作

校准光学系统项目时，可根据客户要求与实际情况选择光学系统物理校准方法或光学系统生物化学校准方法中的一种方法进行校准。

实时荧光定量 PCR 仪均热块孔数少于 96 孔时，测量点为 12 个，布点图（以 48 孔为例)如图 2 所示，均热块孔数为其他数量时，可参照图 2 布点。实时荧光定量 PCR 仪均热块孔数等于或大于 96 孔时，测量点为 15 个，布点图如图 3 所示，均热块孔数为其他数量时，可参照图 3 布点。也可以根据被测实时荧光定量 PCR 仪说明书或客户要求，增加或减少测量点数量并图示说明。

校准前将实时荧光定量 PCR 仪预热 30min。

将仪器及光学标准器各部件连接完好，在光学标准器下部的温度传感器表面上涂抹适量导热油，以确保其与均热块测量孔接触良好。将光学标准器分布于均热块测量孔中。

标准物质的准备与配置参照 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》附录 A 执行。PCR 反应体系的配置参照 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》附录 B 执行。

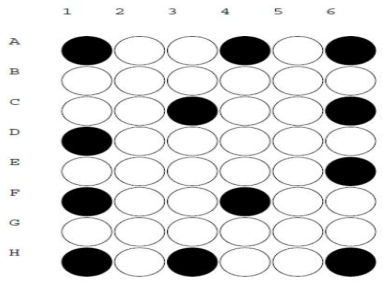

图 2 12 个光学标准器位置分布示意图

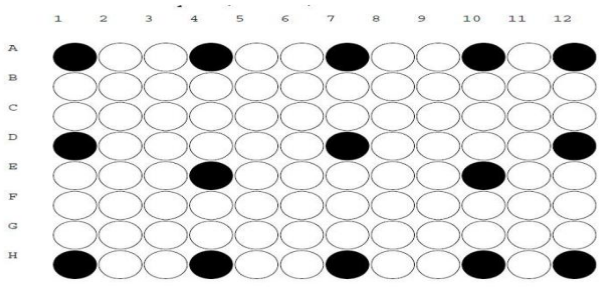

图 3 15 个光学标准器位置分布示意图

7.2.2　校准过程

温度项目校准时，典型的校准设置程序如表 2 步骤 4～11 所示（其中平均升、降温速率

的测量数据分别来源于步骤 4～5 和步骤 5～6;温度示值误差的测量数据来源于步骤 5～11;温度均匀度、温度波动度、温度最大过冲量的测量数据来源于步骤 5～10）。光学系统采用物理校准方法时，典型的校准设置程序如表 2 步骤 12～16 所示（步骤 12 和步骤 13 之间设定程序循环 32 次）。光学系统采用生物化学校准方法时，典型的校准设置程序如表 3 所示。也可以根据被测实时荧光定量 PCR 仪说明书或客户要求，参照表 2 或表 3 进行设定，并说明具体参数校准时所选取的温度值。

表 2　温度项目、光学系统物理项目典型的校准设置程序

步骤	设定温度点（℃）	持续时间（s）	备注
1	30	60	预热程序
2	95	60	
3	30	60	
4	30	60	温度技术指标校准程序
5	95	180	
6	30	120	
7	90	180	
8	50	180	
9	70	180	
10	60	180	
11	30	60	
12	85	10	模拟光学扩增程序：在 85℃/60℃之间循环 32 次，
13	60	30	
14	95	15	扩增变性程序
15	60	30	熔解曲线分解过程
16	95	15	

表 3　光学系统生物化学项目典型的校准设置程序

步骤	设定温度点（℃）	持续时间（s）	循环数
1	50	120	1
2	95	600	1
3	95	30	45
4	60	60	

7.2.3　温度项目校准

a）温度示值误差

温度达到设定温度 30s 后开始记录测量值，记录 5s，最少均匀记录 5 组数据。温度示值误差的计算按照公式（1）计算：

$$\Delta T = \overline{T_s} - \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\overline{T_i} \qquad (1)$$

式中：

ΔT——温度示值误差，℃；

$\overline{T_s}$ ——设定温度值，℃；

$\overline{T_i}$ ——第i个温度传感器测量值平均值，℃；

n ——温度传感器数量。

b) 温度均匀度

温度达到设定温度 30s 后开始记录测量值，记录 5s，最少均匀记录 5 组数据。温度均匀度的计算按照公式（2）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{u}} = \overline{T}_{\max} - \overline{T}_{\min} \qquad (2)$$

式中：

ΔT_{u}——温度均匀度，℃；

$\overline{T}_{\max}$——所有测温传感器测定值平均值的最大值，℃；

$\overline{T}_{\min}$——所有测温传感器测定值平均值的最小值，℃。

c) 温度波动度

温度达到设定温度 30s 后开始记录各点量值，记录 60s，最少均匀记录 10 组数据。按照公式（3）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{f}} = \pm\max[(T_{j\max} - T_{j\min})/2] \qquad (3)$$

式中：

ΔT_{f} ——温度波动度，℃；

$T_{j\max}$——测量点j温度传感器在 m次测量中的最高温度，℃；

$T_{j\min}$——测量点j温度传感器在 m次测量中的最低温度，℃。

d) 温度最大过冲量

温度过冲量的计算按照公式（4）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{t}} = \left|T_{t\max} - T_{\mathrm{s}}\right| \qquad (4)$$

式中：

ΔT_{t} ——温度最大过冲量，℃；

$T_{t\max}$ ——上升或下降达到设定温度后，所有温度传感器测得的温度最高或最低测量值，℃；

T_{s} ——设定温度值，℃。

e) 平均升温速率

被测实时荧光定量 PCR 仪从 50℃升温至 90℃时，平均升温速率的计算按照公式（5）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{ah}} = (\sum_{i=1}^{n} \frac{T_{\mathrm{b}i} - T_{ai}}{t_{\mathrm{h}i}}) / n \qquad (5)$$

式中：

ΔT_{ah} ——平均升温速率，℃/s；

T_{ai} ——50℃温度点第 i 个采样测量孔的测量值，℃；

$T_{\mathrm{b}i}$ ——90℃温度点第 i 个采样测量孔的测量值，℃；

$t_{\mathrm{h}i}$ ——从 T_{ai} 到达 T_{bi} 的时间，s；

n ——温度测量点的个数。

f) 平均降温速率

仪器从 90℃降温至 50℃时，平均降温速率的计算按照公式（6）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{ac}} = (\sum_{i=1}^{n} \frac{T_{\mathrm{b}i} - T_{\mathrm{a}i}}{t_{ci}}) / n \qquad (6)$$

式中：

ΔT_{ac} ——平均降温速率，℃/s；

t_{ci} ——从 $T_{\mathrm{b}i}$ 到达 T_{ai} 的时间，s。

7.2.4 光学系统物理校准法

a) 阈值循环数示值误差、均匀度和精密度

阈值循环数 *Ct* 示值误差的计算按照公式（7）计算，均匀度的计算按照公式（8）计算，精密度按照公式（9）计算 *Ct* 值的相对实验标准偏差，以其作为 *Ct* 值精密度的表征。

$$\Delta Ct_i = Ct_{\mathrm{q}i} - Ct_{\mathrm{s}} \qquad (7)$$

$$\Delta Ct_{\mathrm{u}} = Ct_{\mathrm{qmax}} - Ct_{\mathrm{qmin}} \tag{8}$$

$$RSD_{Ct} = \frac{m}{\sum_{i=1}^{n} Ct_{\mathrm{q}i}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Ct_{\mathrm{q}i} - \frac{\sum_{i=1}^{n} Ct_{\mathrm{q}i}}{n} \right)^2}{m-1}} \times 100\% \tag{9}$$

式中：

ΔCt_i ——第 i 个采样测量点阈值循环数 Ct 示值误差；

$Ct_{\mathrm{q}i}$ ——第 i 个采样孔荧光信号达到阈值时的实时荧光定量 PCR 仪的阈值循环数；

Ct_{s} ——荧光信号达到阈值时光学标准器实际经历的循环数；

ΔCt_{u} ——阈值循环数均匀度；

Ct_{qmax} ——所有采样孔荧光信号达到阈值时的阈值循环数最大值；

Ct_{qmin} ——所有采样孔荧光信号达到阈值时的阈值循环数最小值；

RSD_{Ct} ——阈值循环数精密度；

m ——光学标准器数量。

b) 通道峰值强度一致性、线性灵敏系数

当 DNA 循环扩增从最大荧光强度 100%减弱到 20%时，仪器理论上所接受到的荧光强度也线性递减。计算熔解曲线上熔解温度（T_m）附近温度点对应的荧光强度，得到通道峰值强度一致性（$CPHC$）和线性灵敏系数(LSF)，分别由公式（10）、公式（11）计算：

$$CPHC_i = \frac{B_i - C_i}{\overline{B} - \overline{C}} \tag{10}$$

$$LSF_i = \frac{A_i - B_i}{B_i - C_i} \tag{11}$$

式中：

$CPHC_i$——通道峰值强度一致性；

B_i ——（T_m −2）℃时，第 i 个采样孔对应的荧光强度；

C_i ——（T_m +2）℃时，第 i 个采样孔对应的荧光强度；

$\overline{B}$ ——（T_m −2）℃时，所有采样孔对应的荧光强度平均值；

$\overline{C}$ ——（T_m+2）℃时，所有采样孔对应的荧光强度平均值；

A_i ——第i个采样孔测量熔解曲线上温度T_m对应的荧光强度；

LSF_i ——线性灵敏系数。

c) 熔解温度漂移和熔解温度比

熔解温度漂移的计算按照公式（12）计算，熔解温度比的计算按照公式（13）计算。

$$\Delta T_{\mathrm{m}i} = T_{\mathrm{m}i} - T_{\mathrm{ms}} \tag{12}$$

$$RT\mathrm{m} = \frac{T_{t\max} - T_{t\min}}{T_{\max} - T_{\min}} \tag{13}$$

式中：

$\Delta T_{\mathrm{m}i}$——第i个采样测量孔熔解温度漂移，℃；

$T_{\mathrm{m}i}$ ——实时荧光定量 PCR 仪实测T_{m}值，℃；

T_{ms} ——光学标准器 T_{m}值，℃；

$RT\mathrm{m}$——熔解温度比；

$T_{t\max}$ ——所有采样测量孔实时荧光定量 PCR 仪的T_m最大值，℃；

$T_{t\min}$ ——所有采样测量孔实时荧光定量 PCR 仪的T_m最小值，℃；

$T_{\max}$ ——光学标准器设定T_{m}时所有测温传感器测定值的最大值，℃；

$T_{\min}$ ——光学标准器设定 T_{m}时所有测温传感器测定值的最小值，℃。

7.2.5 光学系统化学校准法

该部分校准可参照 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》7.4 执行。

校准时，可按照 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》附录 A 方法配置标准物质，并按照 JJF 1527-2015《聚合酶链反应分析仪校准规范》附录 B 方法配置 PCR 反应体系，也可以按照被校实时荧光定量 PCR 仪的型号或技术要求，使用已经配置好的附有证书的标准物质反应板进行校准。

使用已经配置好的附有证书的标准物质反应板进行校准前，应震荡混匀。

样本示值误差按公式（14）计算

$$\Delta c = \overline{c_{\mathrm{c}}} - c_{\mathrm{s}} \tag{14}$$

式中：

Δc ——样本示值误差，copies/μL

$\overline{c_c}$ ——仪器测量平均值，copies/μL

c_s ——标准物质标称值，copies/μL

样本线性按公式（15）计算

$$r=\frac{\sum_{i=1}^{n}(Ct_i-\overline{Ct})(\ln c_i-\overline{\ln c})}{\sum_{i=1}^{n}(Ct_i-\overline{Ct})^2\sum_{i=1}^{n}(\ln c_i-\overline{\ln c})^2} \qquad (15)$$

式中：

r ——线性相关系数；

Ct_i ——系列稀释标准物质的第 i 个扩增 Ct 值；

$\overline{Ct}$ ——系列稀释标准物质的 Ct 平均值；

$\ln c_i$——系列稀释标准物质的第 i 个浓度的对数值；

$\overline{\ln c}$ ——系列稀释标准物质浓度对数值的平均值。

8 校准结果表达

校准结果应在校准证书（报告）上反映，校准证书（报告）应至少包括以下信息：

a) 标题：如“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) 证书或报告的唯一性标识（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) 对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) 校准证书和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，不得部分复制证书或报告的声明。

校准原始记录格式见附录 A，校准证书（报告）内页格式见附录 B。

9 复校时间间隔

由于复校时间间隔的长短由仪器的使用情况、使用者和仪器本身质量等诸多因素决定，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。

为了确保实时荧光定量 PCR 仪在其规定的技术性能下使用，建议复校时间间隔不超过 1 年。

附录 A

校准原始记录格式

记录编号：　　第 X 页共 X 页

基本信息	
委托单位名称：	委托单位地址：
仪器名称：	制造厂商：
规格型号：	出厂编号：
校准依据：	
标准器信息	

计量标准（器）名称			
计量标准证书号		有效期至	
计量标准器证书号		有效期至	
测量范围		准确度等级	

标准物质信息					
标准物质名称	型号规格	批号	量值特性/不确定度	证书编号	有效日期

环境温度：　　℃	环境湿度：　　%RH
校准员：	核验员：

一、温度示值误差、温度均匀度

设定温度点（℃）		30	50	60	70	90	95
测量点实测温度平均值（℃）	A1						
	A4						
	A7						
	A10						
	A12						
	D1						
	D7						
	D12						
	E4						
	E10						
	H1						
	H4						
	H7						
	H10						
	H12						
平均值（℃）							
实测最高温度（℃）							
实测最低温度（℃）							
温度示值误差（℃）							
不确定度（℃）							
温度均匀度（℃）							

二、温度波动度

设定温度点（℃） T_{max}-T_{min}		30	50	60	70	90	95
	A1						

测量点（℃）	A4						
	A7						
	A10						
	A12						
	D1						
	D7						
	D12						
	E4						
	E10						
	H1						
	H4						
	H7						
	H10						
	H12						
温度波动度（℃）							

三、温度最大过冲量、平均升温速率和平均降温速率

设定温度点（℃）	30	50	60	70	90	95
最低或最高测量值（℃）						
温度最大过冲量（℃）						
平均升温速率（℃/s）						
平均降温速率（℃/s）						

四、阈值循环数（Ct 值）示值误差、均匀度、精密度（光学系统物理项目）

阈值循环数示值误差		
不确定度		
阈值循环数均匀度		
阈值循环数精密度		

五、通道峰值强度一致性（ $CPHC$ ）、线性灵敏系数（ LSF ）、熔解温度漂移（ ΔT_{m} ）、熔解温度比（ RT_{m} ）（光学系统物理项目）

T_{m} 设定值（℃）		$T_{\mathrm{m}i}$（℃）	$\Delta T_{\mathrm{m}i}$（℃）	A_i	B_i	C_i	A_i-B_i	B_i-C_i	$CPHC$	LSF	RT_{m}
光学标准器分布位置	A1										
	A4										
	A7										
	A10										
	A12										
	D1										
	D7										
	D12										
	E4										
	E10										
	H1										
	H4										
	H7										
	H10										
	H12										
平均值											

六、样本示值误差、样本线性相关系数（光学系统生物化学项目）

样本值：

项目	测量值（copies/μL）									
U_1										
U_2										

样本示值误差：　　样本线性系数：

附录 B

校准证书内页格式

校 准 结 果

设定温度点（℃）	30	50	60	70	90	95
温度示值误差（℃）						
温度均匀度（℃）						
温度波动度（℃）						
温度最大过冲量（℃）						
平均升温速率（℃/s）	50℃→90℃					
平均降温速率（℃/s）	90℃→50℃					
阈值循环数示值误差						
阈值循环数均匀度						
阈值循环数精密度						
通道峰值强度一致性						
线性灵敏系数						
熔解温度漂移（℃）						
熔解温度比						
样本示值误差（copies/μL）						
样本线性相关系数						

温度校准结果的扩展不确定度：

阈值循环数校准结果的扩展不确定度：

附录 C

温度示值误差测量不确定度评定示例

C.1 测量方法

将实时荧光定量 PCR 仪及 PCR 扩增光学标准器各部件连接完好，在 PCR 扩增光学标准器的温度传感器表面上涂抹适量导热油，将 15 个温度传感器置于仪器温度控制模块中，并确保与温度控制模块接触良好。按照仪器说明书或用户要求或推荐使用的温度控制程序，并运行该程序，同时启动 PCR 扩增光学标准器进行温度数据采集。温度示值误差的计算按照公式（C.1）进行计算。

C.2 测量模型

$$\Delta T = T_s - \frac{1}{15}\sum_{i=1}^{15} T_i \qquad (C.1)$$

式中：

ΔT —— 采样测量孔内温度示值误差，℃；

T_s ——仪器设定温度值，℃；

T_i ——第 i 个温度传感器测定值，℃。

C.3 不确定度来源

根据上述数学模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下三个方面：

a)测量重复性引入的标准不确定度分量 u_1；

b)温度传感器分辨力引入的标准不确定度分量 u_1'；

c)温度传感器准确度引入的标准不确定度分量 u_2。

C.4 测量不确定度评定

C.4.1 重复性测量引入的不确定度分量 u_1

以 95℃为例，对同一台仪器，在相同的测量条件下，重复测量 10 次，温度稳定后读取温度测量值，15 个温度传感器的重复测量数据见表 C.1。

合并样本标准偏差 按公式（C.2）计算：

$$s_{\mathrm{p}}=\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{m}\sum_{k=1}^{n}(y_{kj}-\overline{y_j})^2}{m(n-1)}} \qquad (C.2)$$

式中：

m —— 测量点的数量；

n —— 每个测量点测量次数；

y_{kj}—— 第 j 个测量点第 k 次的测量值，℃；

$\overline{y_j}$—— 第 j 个测量点测量值的平均值，℃；

表 C.1 温度测量结果

次数 / 测量点	不同测量点温度传感器测量结果（℃）									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	95.01	94.98	95.01	94.95	94.98	94.98	95.01	95.04	95.01	94.98
A4	95.22	95.22	95.25	95.25	95.28	95.22	95.19	95.22	95.19	95.22
A7	94.93	94.93	94.93	94.96	94.93	94.96	94.93	94.99	94.91	94.96
A10	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.29	95.26	95.29	95.26	95.26
A12	95.49	95.40	95.40	95.49	95.46	95.52	95.46	95.46	95.52	95.46
D1	95.03	95.15	95.09	95.09	95.03	95.12	95.06	95.09	95.09	95.06
D7	94.90	94.87	94.87	94.82	94.93	94.90	94.87	94.84	94.87	94.87
D12	95.37	95.26	95.29	95.29	95.32	95.20	95.29	95.29	95.35	95.29
E4	94.94	94.85	94.85	94.85	94.85	94.94	94.88	94.85	94.97	94.91
E10	95.37	95.28	95.34	95.28	95.34	95.37	95.31	95.28	95.34	95.31
H1	95.47	95.47	95.50	95.47	95.50	95.50	95.47	95.47	95.47	95.50
H4	95.03	95.12	95.06	95.06	95.03	95.09	95.06	95.06	95.09	95.06
H7	95.03	95.00	95.03	95.00	95.00	95.00	95.00	95.06	95.00	95.00
H10	95.25	95.28	95.25	95.31	95.31	95.25	95.28	95.25	95.25	95.28
H12	95.01	94.98	95.01	94.98	94.95	94.98	95.01	94.95	95.03	95.01

通过公式 C.2 计算出合并样本标准偏差如下：

$$s_{\mathrm{p}}=0.0313℃$$

由于每个点测量 5 次取平均值，因此重复测量引入的不确定度分量 u_1 为：

$$u_1=\frac{s_{\mathrm{p}}}{\sqrt{5}}=0.0134℃$$

C.4.2 温度传感器分辨力引入的不确定度 $u_1^{'}$

温度传感器的分辨力为 0.01℃，分散区间半宽为 0.005℃，按均匀分布计算，

$k=\sqrt{3}$，则$u_1^{'}$为：

$$u_1^{'}=\frac{0.005}{\sqrt{3}}=0.003℃$$

由于重复测量引入的标准不确定度分量u_1大于分辨力引入的标准不确定度分量$u_1^{'}$，两者具有一定的相关性,因此在不确定度计算时不考虑由读数分辨力引入的标准不确定度分量$u_1^{'}$。

C.4.3　温度传感器准确度引入的标准不确定度分量u_2；

温度传感器的最大允许误差±0.1℃，按均匀分布计算，则：

$$u_2=\frac{0.1}{\sqrt{3}}=0.058℃$$

C.5　合成标准不确定度u_c

$$u_c=\sqrt{u_1^{\ 2}+u_2^{\ 2}}=0.06℃$$

C.6　扩展不确定度 U

取$k=2$，则：

$$U=k\times u_c=0.12℃$$

附录 D

阈值循环数示值误差测量不确定度评定示例

D.1　测量方法

将实时荧光定量 PCR 仪及光学标准器各部件连接完好，将光学标准器置于仪器温度控制模块中，并确保与温度控制模块接触良好。按照仪器说明书或用户要求或推荐设置光学扩增程序，并运行该程序，同时启动 PCR 扩增光学标准器进行温度和光学数据采集。

示值误差的计算按照公式（D.1）计算。

D.2　测量模型

$$\Delta Ct_i = Ct_{\mathrm{q}i} - Ct_{\mathrm{s}} \qquad (D.1)$$

式中：

ΔCt_i——阈值循环数示值误差；

$Ct_{\mathrm{q}i}$ ——被测设备第 i 个采样孔的阈值循环数；

Ct_{s} ——光学标准器第 i 个采样孔的阈值循环数；

D.3　不确定度来源

根据上述数学模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下三个方面：

a)测量重复性引入的标准不确定度分量 u_1；

b)光学标准器分辨力引入的标准不确定度分量 $u_1^{'}$；

c)光学标准器准确度引入的标准不确定度 u_2；

D.4　测量不确定度评定

D.4.1　重复性测量引入的不确定度分量 u_1

对同一台设备，在相同的测量条件下，使用光学标准器按照推荐的光学扩增程序对其阈值循环数进行 10 次重复测量，光学标准器设定值为 11.50，对重复测量结果进行分析，测量结果表 D.1 所示。

合并样本标准偏差 按公式（D.2）计算。

表 D.1　阈值循环数测量结果

次数 / 测量点		阈值循环数测量结果									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
实时荧光定量PCR仪	A1	11.34	11.37	11.23	11.56	11.56	11.64	11.73	11.76	11.28	11.77
	A4	11.55	11.75	11.56	11.24	11.84	11.38	11.42	11.36	11.37	11.35
	A7	11.50	11.24	11.24	11.63	11.73	11.37	11.57	11.37	11.54	11.57
	A10	11.23	11.73	11.64	11.25	11.53	11.56	11.35	11.36	11.69	11.37
	A12	11.78	11.27	11.25	11.07	11.65	11.37	11.33	11.83	11.53	11.74
	D1	11.33	11.75	11.73	11.84	11.24	11.87	11.73	11.55	11.48	11.35
	D7	11.45	11.23	11.24	11.25	11.26	11.38	11.29	11.58	11.37	11.38
	D12	11.77	11.89	11.57	11.64	11.52	11.97	11.29	11.38	11.46	11.46
	E4	11.24	11.64	11.85	11.28	11.73	11.63	11.78	11.47	11.36	11.56
	E10	11.96	11.86	11.95	11.84	11.37	11.68	11.73	11.29	11.74	11.37
	H1	11.75	11.22	11.35	11.34	11.74	11.25	11.47	11.28	11.26	11.66
	H4	11.35	11.45	11.67	11.66	11.27	11.37	11.67	11.78	11.73	11.33
	H7	11.76	11.76	11.24	11.63	11.83	11.42	11.36	11.56	11.38	11.34
	H10	11.32	11.55	11.11	11.32	11.55	11.53	11.37	11.37	11.33	11.37
	H12	11.77	11.34	11.74	11.77	11.44	11.62	11.83	11.83	11.11	11.38

$$s_{\mathrm{p}}=\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{m}\sum_{k=1}^{n}(y_{kj}-\overline{y_j})^2}{m(n-1)}} \qquad \text{（D.2）}$$

式中：

m—— 测量点的数量；

n —— 每个测量点测量次数；

y_{kj}—— 第 j 个测量点第 k 次的测量值；

$\overline{y_j}$—— 第 j 个测量点测量值的平均值；

通过公式（D.2）计算出仪器的 *Ct* 值合并样本标准偏差 s_{pq} 和 PCR 扩增光学模拟器的 *Ct* 值合并样本标准偏差 s_{ps} 如下：

$$s_{\mathrm{pq}}=0.0421 \qquad s_{\mathrm{ps}}=0$$

因此重复测量引入的不确定度分量u_1：

$$u_1 = 0.0421$$

D.4.2　光学标准器分辨力引入的不确定度分量$u_1^{'}$

PCR 扩增光学标准器的分辨力为 0.01，分散区间半宽为 0.005，按均匀分布计算，则

$$u_1^{'} = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.003$$

由于重复测量引入的标准不确定度分量 u_1大于分辨力引入的标准不确定度分量$u_1^{'}$,两者具有一定的相关性,因此在不确定度计算时不考虑由读数分辨力引入的标准不确定度分量$u_1^{'}$。

D.4.3　光学标准器准确度引入的不确定度u_2

针对光学标准器，需要考虑阈值循环数赋值引入的不确定度分量u_T和发射光发生器发光强度测量不确定度引入的不确定度分量u_L。由于阈值循环数给定值不确定度分量影响u_T很小，可以忽略不计。

光学标准器发射光发生器的发光强度可溯源至分光光度计，通过查询，分光光度计在波长范围（380～860）nm 内发光强度的扩展不确定度$U_{\mathrm{r}} = 9.5\%(k=2)$，光学标准器的测量平均值为 11.5，则：

$$u_2 = \frac{9.5\%}{2} \times 11.5 = 0.546$$

D.5　合成标准不确定度

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.548$$

D.6　扩展不确定度 *U*

取$k=2$，则：

$$U = k \times u_{\mathrm{c}} = 1.1$$

JJF（吉）XX -2023

吉林省地方计量技术规范

荧光定量 PCR 仪校准规范

JJF(吉) XX—2023

吉林省市场监督管理厅发布

*

版权所有　不得翻印

297 ㎜×210 ㎜ A4 纸

202X 年 X 月第 X 版　　202 X 年 X 月第 X 次印刷