



北京市地方计量技术规范

JJF (京) XXXX-XXXX

核酸定量荧光计校准规范

Calibration Specification for Nucleic Acid Fluorescence

Quantitation

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

北京市市场监督管理局 发布

核酸定量荧光计校准规范

Calibration Specification for
Nucleic Acid Fluorescence Quantiation

JJF(京) XXXX-XXXX

归口单位：北京市市场监督管理局

主要起草单位：北京市计量检测科学研究院

参加起草单位：天津计量监督检测科学研究院

河北省计量监督检测研究院

北京良山信诚科技有限公司

本规范委托北京市计量检测科学研究院负责解释

本规范主要起草人：

赵雨佳（北京市计量检测科学研究院）

梁 亮（北京市计量检测科学研究院）

常子栋（天津计量监督检测科学研究院）

刘红彦（河北省计量监督检测研究院）

参加起草人：

范培蕾（北京市计量检测科学研究院）

李 冉（北京市计量检测科学研究院）

刘 然（北京市计量检测科学研究院）

尹金山（北京良山信诚科技有限公司）

目 录

引言.....	(II)
1 范围.....	(1)
2 概述.....	(1)
3 计量性能.....	(1)
4 校准条件.....	(1)
4.1 环境条件.....	(1)
4.2 校准用设备和标准物质.....	(1)
5 校准项目和校准方法.....	(2)
5.1 外观及功能检查.....	(2)
5.2 浓度示值误差.....	(2)
5.3 浓度重复性.....	(2)
5.4 线性相关系数.....	(2)
6 校准结果表达.....	(3)
7 复校时间间隔.....	(3)
附录 A	(5)
附录 B	(6)
附录 C.....	(8)
附录 D.....	(9)

引 言

依据 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》的规定而制定。

本规范为首次发布。

核酸定量荧光计校准规范

1 范围

本规范适用于荧光染料法核酸定量荧光计的校准。

2 概述

核酸定量荧光计（以下简称荧光计）体积小，样品用量少，由光源、检测仓、控制面板以及数据采集信号处理系统组成。原理是基于荧光染料和核酸分子的特异性结合，实现在特定光源照射下对不同波长光的选择性吸收，在低浓度范围内，发光强度与核酸浓度成一定比例，根据荧光强度可以推算出样本中核酸的浓度，实现核酸定量。

3 计量性能

仪器各项计量性能指标见表 1。

表 1 核酸定量荧光计计量性能指标

计量性能要求	技术指标
浓度示值误差	$\pm 30\%$
浓度重复性	$\leq 10\%$
线性相关系数	≥ 0.99

注：以上计量特性要求仅供参考，不作为判定依据

4 校准条件

4.1 环境条件

4.1.1 环境温度：(15~30)℃。

4.1.2 相对湿度： $\leq 70\%$ 。

4.1.3 供电电源：电压 (220 \pm 22) V，频率 (50 \pm 1) Hz。

4.1.4 其他：仪器应安装在平稳无振动的底层地面上，周围无强磁场和电场干扰，无直射光源照射仪器。

4.2 校准用设备和标准物质

4.2.1 核酸标准物质：均为国家有证标准物质，浓度 $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，相对扩展不确定度 $U_{\text{rel}} \leq$

10% ($k=2$)。

4.2.2 移液器：2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL ，经过计量检定或校准。

5 校准项目和校准方法

5.1 外观及功能检查

荧光计应能保持正常工作状态，无影响正常工作和妨碍读数的缺陷以及机械性损伤。

5.2 浓度示值误差

将国家有证标准物质按附录 A 的方法，配制为浓度在 (10~120) $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的工作用标准物质。将配制好的工作用标准物质放入仪器检测，每个浓度检测 3 次，按照公式 (1) 计算浓度示值误差。

$$\delta X = \bar{X} - X_0 \quad (1)$$

式中：

δX ——浓度示值误差， $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；

\bar{X} ——仪器 3 次测量值的算术平均值， $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；

X_0 ——标准物质的标准值， $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

5.3 浓度重复性

将配制好的工作用标准物质放入仪器检测，重复检测 10 次，按照公式 (2) 计算浓度重复性。

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2)$$

式中：

s ——标准偏差；

\bar{X} ——仪器 10 次测量值的算术平均值， $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；

X_i ——单次测定值， $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；

n ——测定次数；

i ——测定的序号， $i=1\sim 10$ 。

5.4 线性相关系数

在低值至高值范围内，对在 (0~120) $\text{ng}/\mu\text{L}$ 浓度范围内的标准物质进行梯度稀释，配置 5 个浓度点 (85.70 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、68.56 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、51.42 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、34.30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 和 17.10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 进行测量，重复测量 3 次，取其平均值。以系列标准物质的标称值和对应的荧光强度值做标准

曲线，按照公式（3）计算相关系数 γ 。

$$\gamma = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - \frac{\sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{N}}{\left(\sum_{i=1}^n X^2 - \frac{\sum_{i=1}^n X^2}{N}\right) \left(\sum_{i=1}^n Y^2 - \frac{\sum_{i=1}^n Y^2}{N}\right)}}{\quad} \quad (3)$$

式中：

γ ——相关系数；

X ——标准物质的标准值，ng/μL；

Y ——对应的荧光度值；

N ——测定次数。

6 校准结果表达

校准结果应在校准证书上反映。校准证书应至少包括以下信息：

- 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) 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) 对校准规范偏离的说明；
- n) 校准证书签发人的签名、职务或等效标识以及签发日期；
- 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。

7 复校时间间隔

建议复校时间间隔一般不超过一年。复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等因素决定，送校单位也可根据实际使用情况自主决定复校时间间隔。如果仪器经维修、更换重要部件或对仪器性能有怀疑时，应重新校准。

附录 A

标准物质的准备及配制

1. 试剂

核酸标准物质或核糖核酸标准物质其特性量值（浓度 $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，相对扩展不确定度 $\leq 10\%$ ）满足校准需求，水为符合 GB/T 6682-2008 规定的一级水。

2. 仪器

移液器规格： $2\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $200\mu\text{L}$ ，经过计量检定或校准。

3. 标准物质系列稀释配制

将标准物质从 -20°C 冰箱中取出，置冰上溶解，然后室温平衡 30min。用经过高温高压灭菌处理的纯水进行稀释配制。用移液器配制系列稀释样品，每步样品配制后要充分震荡混匀。

附录 B

校准记录格式（推荐）

记录编号：		委托单位：			
仪器名称：		型号：			
制造厂：		出厂编号：			
环境温度：	相对湿度：	校准日期：			
校准依据：					
校准使用的标准器：					
名称	测量范围	不确定度/准确度等级/ 最大允许误差	设备编号	检定/校准 证书编号	有效期至

一、仪器外观

符合要求不符合要求

不符合性说明：_____

二、浓度示值误差（ng/μL）

标准物质标称值	被校仪器测量值			被校仪器平均值	浓度示值误差
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		

三、浓度重复性

标准物质标称值 (ng/ μ L)	被校仪器测量值 (ng/ μ L)			被校仪器平均值 (ng/ μ) L	浓度重复性 (%)
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
	第 4 次	第 5 次	第 6 次		
	第 7 次	第 8 次	第 9 次		
	第 10 次				

四、线性相关系数

标准物质标称值 (ng/ μ L)	被校仪器测量值 (ng/ μ L)			被校仪器平均值 (ng/ μ L)	线性 r
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		

校准员: _____

核验员: _____

附录 C

校准证书内页格式（推荐）

一、仪器外观

 符合要求 不符合要求

不符合性说明：_____

二、浓度示值误差（ng/μL）

标准物质标称值	被校仪器测量值			被校仪器平均值	浓度示值误差
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		

三、浓度重复性

标准物质标称值 (ng/μL)	被校仪器测量值 (ng/μL)			被校仪器平均值 (ng/μL)	浓度重复性 (%)
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
	第 4 次	第 5 次	第 6 次		
	第 7 次	第 8 次	第 9 次		
	第 10 次				

四、线性相关系数

 $\gamma =$ _____

附录 D

浓度示值误差的不确定度评定示例

D.1 概述

D.1.1 测量方法

选择 Thermo Fisher 公司的 Qubit4 型核酸定量荧光计进行校准。根据校准规范的要求,通常选择 (10~120) ng/ μ L 浓度范围内的核酸标准物质,重复测量 3 次,计算浓度示值误差。

D.1.2 测量标准

标准物质:选择国家有证标准物质,浓度 ≥ 10 ng/ μ L,相对扩展不确定度 $U_{rel} \leq 10\%$ ($k=2$)。

移液器规格: 2 μ L、10 μ L、100 μ L、20+0 μ L, 经过计量检定或校准。

D.2 测量模型

浓度示值误差

$$\delta X = \bar{X} - X_0 \quad (\text{D.1})$$

式中:

δX ——浓度示值误差, ng/ μ L;

\bar{X} ——仪器 3 次测量值的算术平均值, ng/ μ L;

X_0 ——标准物质的标准值, ng/ μ L。

两个量 \bar{X} 和 X_0 相互独立,那么根据公式(1),示值误差的合成标准不确定度可表示为:

$$u(\Delta X) = \sqrt{c_1^2 u^2(\bar{X}) + c_2^2 u^2(X_0)} = \sqrt{u^2(\bar{X}) + u^2(X_0)} \quad (\text{D.2})$$

式中,灵敏度系数 $c_1 = \frac{\partial \Delta X}{\partial \bar{X}} = 1$, 灵敏度系数 $c_2 = \frac{\partial \Delta X}{\partial X_0} = -1$ 。

D.3 不确定度来源分析

浓度示值误差的不确定度来源主要有以下几个:

- (1) 测量值引入的标准不确定度,包括测量重复性和配制过程中引入的标准不确定度;
- (2) 标准值引入的标准不确定度,包括有证标准物质引入的不确定度。

D.4 标准不确定度评定

以浓度值为 85.7 ng/ μ L, $U_{rel}=3.0\%$ ($k=2$) 的标准物质为例,进行浓度示值误差的不确定度评定:

(1) 测量重复性引入的标准不确定度

对浓度值为 85.7ng/μL 的标准物质重复测量 3 次, 浓度值分别为 82.9、83.1、82.7, 用极差法计算标准偏差 s 。

$$s = \frac{83.1 - 82.7}{4.33} = 0.092$$

$$u_1(\bar{X}) = \frac{0.045}{\sqrt{3}} = 0.052$$

(2) 标准值引入的标准不确定度

标准值的不确定度由有证标准物质证书给出, 具体数据见表 1, 所以标准不确定度为:

$$u(X_0) = \frac{0.03}{2} = 0.015$$

$$u(\Delta X) = \sqrt{u^2(\bar{X}) + u^2(X_0)} = 0.12$$

D.5 合成不确定度

取包含因子 $k=2$, 相应的扩展不确定度为: $U(\Delta X) = k \times u(\Delta X) = 0.24$
