



中华人民共和国地方计量技术规范

JJF (冀) 3024-2023

核酸定量荧光计校准规范

Calibration Specification for Fluorescence Meters of
Nucleic Acid

2023-05-31 发布

2023-07-01 实施

河北省市场监督管理局 发布

核酸定量荧光计校准规范

Calibration Specification for
Fluorescence Meters of Nucleic Acid

JJF(冀) 3024-2023

归口单位：河北省市场监督管理局

起草单位：河北省计量监督检测研究院

北京市计量检测科学研究院

天津计量监督检测科学研究院

本规范委托河北省计量监督检测研究院负责解释

本规范主要起草人：

刘红彦（河北省计量监督检测研究院）

史盼敬（河北省计量监督检测研究院）

赵雨佳（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）

参加起草人：

杨 迪（河北省计量监督检测研究院）

梁 亮（北京市计量检测科学研究院）

范培蕾（北京市计量检测科学研究院）

目 录

引 言.....	(II)
1 范围.....	(1)
2 概述.....	(1)
3 计量特性.....	(1)
4 校准条件.....	(1)
4.1 环境条件.....	(1)
4.2 测量标准及其他设备.....	(1)
5 校准项目和校准方法.....	(2)
5.1 示值误差.....	(2)
5.2 测量重复性.....	(2)
6 校准结果表达.....	(2)
7 复校时间间隔.....	(3)
附录 A 校准记录格式（推荐）.....	(4)
附录 B 校准证书内页格式（推荐）.....	(6)
附录 C 示值误差的不确定度评定示例.....	(7)

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》、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》共同构成支撑本规范制修订工作的基础性系列规范。

本规范的制定，参考了 JJF 1836-2020《微量分光光度计校准规范》和 JJF 1828-2020《ATP 荧光检测仪校准规范》相关内容。

本规范为首次发布。

核酸定量荧光计校准规范

1 范围

本规范适用于测量双链 DNA 浓度在 (10~100) ng/ μ L 范围的非扩增型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）的原理是荧光染料和核酸分子特异性结合后在特定波长下发光，发光强度与核酸浓度成正比，根据荧光强度可以推算出样本中的核酸浓度。荧光计由光源、检测仓、控制面板以及数据采集信号处理系统组成

3 计量特性

仪器各项计量特性指标见表 1。

表 1 核酸定量荧光计计量特性指标

计量项目	计量特性
示值误差	不超过 $\pm 20\%$
测量重复性	$\leq 10\%$

注：以上计量特性要求是基于双链 DNA 测量模式得到，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) $^{\circ}$ C。

4.1.2 相对湿度：(15~70) %。

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

4.2 测量标准及其他设备

4.2.1 核酸标准物质：国家有证双链 DNA 标准物质，浓度 (10~100) ng/ μ L，相对扩展不确定度不超过 10% ($k=2$)。

4.2.2 移液器：(1~10) μ L、(20~200) μ L，经计量检定合格。

5 校准项目和校准方法

5.1 示值误差

在(10~100)ng/μL浓度范围内,选择高、低两个浓度的国家有证双链DNA标准物质,每种标物检测3次,按照公式(1)计算。

$$\Delta X = \frac{\bar{X} - X_0}{X_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

ΔX ——示值误差, %;

\bar{X} ——仪器3次测量值的算术平均值, ng/μL;

X_0 ——标准物质的标准值, ng/μL。

5.2 测量重复性

选择1种浓度范围在(10~100)ng/μL的国家有证双链DNA标准物质放入仪器检测,该样品重复检测10次,按照公式(2)计算测量重复性。

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

式中:

RSD——相对标准偏差, %;

\bar{X} ——仪器10次测量值的算术平均值, ng/μL;

X_i ——单次测定值, ng/μL;

n——测定次数;

i——测定的序号, i=1~10。

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

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：					
主要计量标准器					
名称	测量范围	不确定度/准确度等级/ 最大允许误差	检定/校准 证书编号	溯源单位	有效期至

一、示值误差

标准物质 标准值 (ng/μL)	测量值 (ng/μL)			平均值 (ng/μL)	示值误差 (%)	扩展不确定度 ($k=2$)

二、测量重复性

标准物质标准 值 (ng/ μ L)	测量值 (ng/ μ L)			平均值 (ng/ μ L)	重复性 (%)	扩展不确定度 ($k=2$)

校准员：_____

核验员：_____

附录 B

校准证书内页格式（推荐）

校准结果

校准项目	校准结果					
示值误差	标准物质 标准值 (ng/ μ L)	测量值 (ng/ μ L)			示值误差 (%)	扩展不确定度 ($k=2$)
测量重复性	标准物质 标准值 (ng/ μ L)	测量值 (ng/ μ L)			测量重复性 (%)	扩展不确定度 ($k=2$)

校准员：_____

核验员：_____

附录 C

示值误差的不确定度评定示例

C.1 概述

C.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（10~100）ng/μL 浓度范围内的核酸标准物质，重复测量 3 次，计算示值误差。

C.1.2 测量标准

标准物质：国家有证双链 DNA 标准物质，浓度范围（10~100）ng/μL，相对扩展不确定度 $U_{rel} \leq 10\%$ ($k=2$)。

移液器：（1~10）μL、（20~200）μL。

C.2 测量模型

示值相对误差的测量模型为：

$$\Delta X = \frac{\bar{X} - X_0}{X_0} \times 100\% \quad (\text{C.1})$$

式中：

ΔX ——示值误差，%；

\bar{X} ——仪器 3 次测量值的算术平均值，ng/μL；

X_0 ——标准物质的标准值，ng/μL。

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

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

式中，灵敏度系数 $c_1 = \frac{\partial \Delta X}{\partial \bar{X}} = \frac{1}{X_0}$ ，灵敏度系数 $c_2 = \frac{\partial \Delta X}{\partial X_0} = -\frac{\bar{X}}{X_0^2}$ 。

C.3 不确定度来源分析

示值误差校准结果的不确定度来源主要为：

- a) 测量平均值引入的不确定度分量 $u(\bar{X})$ ；
- b) 标准物质的标准值引入的不确定度分量 $u(X_0)$ 。

C.4 各不确定度分量的评定

C.4.1 测量平均值引入的不确定度分量 $u(\bar{X})$

该不确定度分量由测量重复性引入,在(0~100)ng/uL 范围内,选择浓度为 31.4 ng/μL,和 85.7 ng/μL 的国家有证双链 DNA 标准物质,分别重复测量 10 次,数据见表 C.1。按照贝塞尔公式 (C.3) 计算标准偏差,计算得出的标准偏差即为单次测量值的不确定度,实际校准时,仪器示值采用 3 次测量值的平均值,因此测量平均值的标准不确定度按照公式(C.4)计算,计算结果见表 C.1。

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{C. 3})$$

$$u(\bar{X}) = \frac{s}{\sqrt{3}} \quad (\text{C. 4})$$

表 C.1 重复性引入不确定度数据

标准值 (ng/μL)	测量值 (ng/μL)										s (ng/μL)	$u(\bar{X})$ (ng/μL)
31.4	35.4	35.1	35.9	36.0	36.1	35.1	35.0	35.2	34.9	34.5	0.52	0.31
85.7	81.4	82.4	81.8	82.3	82.1	81.4	81.7	81.8	82.2	82.3	0.37	0.22

C.4.2 标准物质的标准值引入的不确定度分量 $u(X_0)$

标准值的不确定度由标准物质证书给出,按照公式(C.5)计算得到标准不确定度 $u(X_0)$,见表 C.2。

$$u(X_0) = X_0 \times \frac{U}{k} \quad (\text{C. 5})$$

表 C.2 标准物质引入的不确定度

标准值 (ng/μL)	相对扩展不确定度 $U_{rel}(k=2)$	标准不确定度 $u(X_0)$
31.4	9.8%	1.54 ng/μL
85.7	3.0%	1.29 ng/μL

C.6 合成标准不确定度

由表 C.3 中标准物质的标准值和两次测量结果的平均值,分别计算得到灵敏度系数 c_1

和 c_2 。按照公式 (C.2) 示值误差测量结果的合成标准不确定度见表 C.3。

表 C.3 合成标准不确定度

标准值 (ng/μL)	测量值 (ng/μL)			平均值 (ng/μL)	c_1	$u(\bar{X})$	c_2	$u(X_0)$	$u(\Delta X)$
	1	2	3						
31.4	35.4	35.1	35.9	35.5	0.032	0.31	-0.036	1.54	5.7%
85.7	81.4	82.4	81.8	81.9	0.012	0.22	-0.011	1.29	1.5%

C.7 扩展不确定度

$$U = u(\Delta X) \times k \quad (\text{C. 6})$$

取包含因子 $k=2$ ，由公式 (C.6) 计算得到示值误差的扩展不确定度见表 C.4。

表 C.4 合成标准不确定度及扩展不确定度

标准值 (ng/μL)	平均值 (ng/μL)	合成标准不确定度	扩展不确定度 ($k=2$)
31.4	35.5	5.7%	11.4%
85.7	81.9	1.5%	3.0%

