

PCR 仪性能对检测结果的影响

陶雨风¹, 郭铮蕾^{2*}, 杨晓婷¹

(1. 中国合格评定国家认可委员会, 北京 100062; 2. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026)

摘要: 目的 评价仪器本身性能对 PCR 检测结果的影响。**方法** 使用不同厂家和不同型号的 PCR 仪, 选取特定基因片段进行扩增实验, 通过人为调整 PCR 仪的设定温度, 探究 PCR 仪温度准确性, 样品分别置于仪器上可能出现温度差异的位置进行扩增, 探究 PCR 仪温度均一性, 并探究恒温时间对扩增结果的影响。**结果** 当反应程序整体温度调高或降低 1~2 °C 时, PCR 仪检测弱阳性样本循环阈值(cycle threshold, Ct)值有极显著性差异($P < 0.01$)。实验过程中恒温时间达不到设定要求, 扩增结果会出现极显著性差异($P < 0.01$), 甚至造成扩增失败。**结论** 研究结果提示实验室应通过 PCR 校准和检测过程的质量控制, 确保检测结果的质量。

关键词: 聚合酶链反应; 温度; 准确性; 均一性; 恒温时间

Effect of PCR instrument performance on assay results

TAO Yu-Feng¹, GUO Zheng-Lei^{2*}, YANG Xiao-Ting¹

(1. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 2. China Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the effect of the instrument performance on PCR results. **Methods** The amplification experiments were carried out on different PCR instruments of different manufacturers by selecting specific gene fragments and artificially adjusting the setting temperature of the PCR instrument to investigate the effect of temperature accuracy on the temperature accuracy of PCR instrument, the samples were placed at locations where temperature differences might occur on the instrument for amplification to explore the temperature uniformity of PCR instrument; and the effect of constant temperature time (hold-time) on the amplification results was also investigated. **Results** When the overall temperature of the reaction program was adjusted up or down by 1–2 °C, there was a significant difference in the Ct values of the weakly positive samples detected by the PCR instrument. When the temperature was not set at the required time, the amplification results were significantly different, and even caused amplification failure. **Conclusion** The result shows that laboratories should ensure the quality of the test results through PCR calibration and quality control of the testing process.

KEY WORDS: polymerase chain reaction; temperature; accuracy; homogeneity; hold-time

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFC1603400)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Project of China (2018YFC1603400)

*通信作者: 郭铮蕾, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为实验室检测质量管理及实验室认可体系研究。E-mail: 30674272@qq.com

*Corresponding author: GUO Zheng-Lei, Master, Senior Engineer, China Science and Technology Research Center of China Customs (STRC), Beijing 100026, China. E-mail: 30674272@qq.com

0 引言

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是众所周知的分子生物学技术之一。作为一种通用检测技术,其在食品^[1]、医学^[2]、生物^[3]、环境等诸多领域得到应用,例如基因鉴定、转基因成分检测、传染病病毒检测、肿瘤检测、产前诊断等^[4-9]。对于 PCR 技术检测结果质量的影响因素,目前有很多报道^[10-15]。综合起来,影响因素大致为人员、仪器、方法、环境、试剂 5 个方面。本研究重点探究 PCR 设备本身性能对检测结果的影响^[16-20]。

本研究通过对比不同厂家、不同型号的 PCR 仪,对 PCR 仪温度偏差、温度均匀性和 PCR 仪的恒温时间(hold-time)进行研究分析,实验室应通过 PCR 校准和检测过程的质量控制,确保检测结果的质量。

1 材料与方法

1.1 标准物质

转基因玉米 MON863 标准物质[欧盟标准物质与测量研究所(Institutefor Reference Materials and Measurements, IRMM)]; 肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) DNA 标准品(中国食品药品检定研究院)。

1.2 试剂

转基因玉米 MON863 引物探针: MON863-F、MON863-R、MON863-P(上海生工生物工程技术有限公司); 微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)、Supermix for Probes (no Dntp)、ddPCR Droplet Generation Oil、ddPCR Droplet Reader Oil(美国 BIO-RAD 公司); 羊全基因组 DNA 试剂盒(QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit, 货号: 69504)、PromegaGoTaq Mix 试剂盒(货号: M7438)、新冠病毒基因片段(上海伯杰医疗科技科技有限公司); 细菌 StxI 基因片段试剂盒(货号: JB10103N, 硕世生物科技股份有限公司)。

1.3 仪器

7500FAST 实时荧光 PCR 仪、3730ABI 测序仪(美国 ABI 公司); CFX96™ Real-Time System、QX200™ Droplet Digital PCR 系统(美国 BIO-RAD 公司); II 级生物安全柜、NanoDrop 2000 核酸蛋白测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DHZ-DA 冷冻恒温振荡器(苏州培英实验设备有限公司); Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (96-Well, 0.2 mL)、EppendorfAG 22331 Hamburg (96-Well, 0.2 mL)、BIOER Life ECO (96-Well, 0.2 mL)、Roche 480(瑞士 Roche 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 PCR 仪温度准确性影响的研究

实验方法和结果判定依据参照 SN/T 1196—2018《转基因成分检测 玉米检测方法》。引物探针的选择见表 1。

表 1 引物探针的选择
Table 1 Selection of primer and probes

名称	序列
MON863-F	5'-gttagatcggaagccttggtac-3'
MON863-R	5'-tgttacggcctaataatgctgaact-3'
MON863-P	5'-tggaacacccatccgaacaagtaggtca -3'

使用 MON863 质粒 DNA 浓度为 8×10^9 copies/ μ L, 将 MON863 质粒 DNA 采用 10 倍梯度稀释至实验用浓度 0.8 copies/ μ L。

选取最低检出浓度 0.8copies/ μ L 的质粒 DNA 溶液作为检测样品,各程序温度整体分别调低 1 和 0.5 °C,调高 1 和 2 °C(以下分别简写为-1、-0.5、+1、+2 °C)进行实验,每次测试设置 7 个平行,使用 7500FAST 实时荧光 PCR 仪和 CFX96™ Real-Time System 2 台设备同时测试,即使用 2 个品牌的仪器同时进行控温准确性测试。

1.4.2 PCR 仪温度均一性影响的研究

选取最低检出浓度 0.8 copies/ μ L 的质粒 DNA 溶液作为检测样品,样品放于仪器上可能出现温度差异的位置,摆放位置为 A1、A4、A7、A10、A12、D1、D7、D12、E4、E10、H1、H4、H7、H10、H12(见图 1),使用 7500FAST 实时荧光 PCR 仪和 CFX96™ Real-Time System 仪器同时进行温度均一性测试。

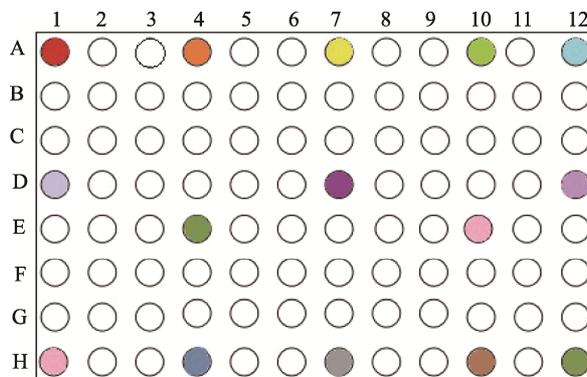


图 1 样品摆放位置图

Fig.1 Sample placement map

1.4.3 PCR 仪恒温时间偏差的影响研究

使用羊全基因组 DNA,采用 QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,提取羊肌肉组织 DNA。反应体系和反应程序按常规 5 步(预变性: 95 °C 5 min, 变性: 95 °C 30 s,

退火: 55 °C 30 s, 延伸: 72 °C 30 s, 终延伸: 10 min, 共 29 个循环)进行。

在 PCR 仪的使用过程中, 可能发生由于 PCR 性能不满足要求, 比如恒温时间(hold-time)与预设时间不一致的情况, 为了验证恒温时间(hold-time)对扩增结果的影响, 分别对 Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler、Eppendorf AG 22331 Hamburg 和 BIOER LifeECO 3 台 PCR 仪“变性-退火-延伸”3 个步骤的恒温时间(hold-time)进行统一调整, 分别调整为 30、28、25、20、15 s, 模拟恒温时间(hold-time)不足的情况。将按照以上常规 5 步反应程序获得的扩增结果进行测序分析。将得到的测序结果与模板序列进行 BLAST 比对, 核查是否有基因错配, 分析扩增产物的序列准确性。

将所制备样本(羊肌肉组织 DNA 提取物)分别在 3 台 PCR 仪的 A1、A4、A7、A10、A12、D1、D7、D12、E4、E10、H1、H4、H7、H10、H12 孔位进行扩增。孔位选择与进行温度检定的孔位一致, 见图 1。

2 结果与分析

2.1 PCR 仪温度准确性影响的研究

实验结果显示, 当实验研究使用的模版浓度较高时, 温度偏差对 PCR 扩增效果的影响不明显。但使用中、低浓度模板时, 温度偏差对 PCR 扩增效果有影响。例如, 在低浓度样品浓度的实验研究中, 将 MON863 质粒 DNA 采用 10 倍梯度稀释至浓度为 0.8 copies/ μ L, 此时标准曲线 r^2 为 0.999, 扩增效率为 104%, 说明该标准曲线具有良好的线性关系, 因此, 选取该浓度水平作为低浓度测试水平。以此为弱阳性样品, 按照 SN/T 1196—2018 规定的扩增程序进行实时荧光 PCR 检测, 对不同温度偏差下的 Ct 进行汇总和统计分析, 结果见表 2~5。

对 7500FAST 仪器而言, 当反应程序整体温度调高 1 °C、整体温度降低 0.5、1 °C 时, 7500FAST 仪器检测弱阳性样本 Ct 值存在显著性差异, 说明当 7500FAST 仪器温度变化时, 弱阳性样本检测 Ct 值受到影响。标准程序温度整体调高 1 °C 至调低 1 °C, 弱阳性样本均检出, 检出率和结果判定未受到影响, 但是弱阳性样本检测 Ct 值受到影响, 说明弱阳性样本的拷贝数在一定范围内时, 7500FAST 仪器的温度整体变化后检出率不受影响, 但是当弱阳性样本的拷贝数降低到某个的临界值时, 7500FAST 仪器的温度整体变化后, 弱阳性样本的检出率将会受到影响。使用 CFX96™ Real-Time System 进行的实验结果, 与上述结论类似。本研究采用其他片段(新冠病毒基因片段、细菌 StxI 基因片段)和仪器(Roche 480)实验后, 对于中、低浓度模板的实验结果也呈现上述趋势。

表 2 7500FAST 仪器控温准确性测试 Ct 值

Table 2 Ct values of the temperature control accuracy test for 7500FAST instrument

整体温度调整/°C	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>F</i>	<i>P</i>
+1	7	35.07±0.50	23.31	<0.01
-1	7	36.23±0.45		
-0.5	7	36.91±0.39		
0	3	35.74±0.21		

注: *n* 为样本数; \bar{x} 为测量均值; *s* 为标准差, *F* 检验中, *P*<0.05 代表有显著性差异; *P*<0.01 代表有极显著性差异, 下同。

表 3 7500FAST 仪器控温准确性测试 Ct 值多重比较差异性

Table 3 Multiple variability comparison of Ct values for the 7500FAST instrument temperature control accuracy test

整体温度调整/°C	整体温度调整/°C			
	+1	-1	-0.5	0
+1	/	有	有	有
-1	有	/	有	无
-0.5	有	有	/	有
0	有	无	有	/

注: “有”表示不同组数据之间进行 *F* 检验, 有显著性差异; “无”表示无显著性差异; “/”表示无此项。

表 4 CFX96 仪器控温准确性测试 Ct 值

Table 4 Ct values of the temperature control accuracy test for CFX96 instrument

整体温度调整/°C	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>F</i>	<i>P</i>
+1	7	33.39±0.71	73.99	<0.01
+2	7	31.41±0.36		
-1	7	31.85±0.21		
0	3	35.71±0.31		

表 5 CFX96 仪器控温准确性测试 Ct 值多重比较差异性

Table 5 Multiple variability comparison of Ct values for the CFX96 instrument temperature control accuracy test

整体温度调整/°C	整体温度调整/°C			
	+1	+2	-1	0
+1	/	有	有	有
+2	有	/	无	有
-1	有	无	/	有
0	有	有	有	/

2.2 qPCR 仪温度均一性影响的研究

表 6 是使用 7500FAST 进行温度均一性测试的结果, 整体来看, A1 的 Ct 值与其他位置相比为最高, H12 次之。

说明板位的 A1、H12 与其他位置相比可能存在温度差异。横向对比来看: A1、A4、A7、A10、A12 中, A1 的 Ct 值最大, A7 次之, 其他位置相近; D1、D7、D12 中, D7 的 Ct 值最小, D1、D12 相近; E4、E10 的 Ct 值相近, 且与 D7 的 Ct 值也相近; H1、H4、H7、H10、H12 中, H12 的 Ct 值最大, H1 次之, 其他位置相近。结果说明位于板位中间位置温度相较于边缘位置可能更均匀。

纵向对比来看: A1、D1、H1 中, A1 的 Ct 值最大, D1、H1 相近; A4、E4、H4 中, A4 的 Ct 值最大, E4、H4 相近; A7、D7、H7 中, A7 的 Ct 值最大, D7、H7 相近; A10、E10、H10 中, A10 的 Ct 值最大, E10、H10 相近; A12、D12、H12 中, H12 的 Ct 值最大, A12、D12 相近。说明纵向来看 3 个反应孔, 中间孔的 Ct 值有更低的趋势, 板位的上方位置(A)样品的 Ct 值相较于其他 2 个位置(D、H)更高, 板位上方位

置(A)温度与其他位置可能存在差异。

实验研究表明, 在温度均匀性方面, 7500FAST 与 CFX96 的 2 种设备的实验结论类似。7500FAST 板位中间温度具有更均匀的趋势, CFX96 板位右下方温度可能与其他位置存在差异, 当然不排除具体机器的差异。对 2 种设备的空间均匀性测试均表明, 反应池不同孔位置存在扩增效果的差异。在实验中应尽量将检测样品置于板位中间位置, 减少仪器所造成的系统误差。

2.3 普通 PCR 仪恒温时间偏差的影响研究

将“变性-退火-延伸”3 个步骤的恒温时间(hold-time)统一调整为 30、28、25、20、15 s 时, Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler、Eppendorf AG 22331 Hamburg、BIOER LifeECO 的实验结果见表 7。

表 6 7500FAST 温度均一性结果($n=15$)
Table 6 Temperature homogeneity results of 7500Fast ($n=15$)

孔位	样品编号	Ct	Ct 平均值	Ct 标准偏差	Ct 相对标准偏差/%
A1	Sample 1	32.96349			
A4	Sample 2	32.30735			
A7	Sample 3	32.52597			
A10	Sample 4	32.30677			
A12	Sample 5	32.1631			
D1	Sample 6	32.15128			
D7	Sample 7	31.872			
D12	Sample 8	32.16901	32.2594	0.2750	0.85
E4	Sample 9	32.09758			
E10	Sample 10	31.97586			
H1	Sample 11	32.14878			
H4	Sample 12	32.06777			
H7	Sample 13	32.12734			
H10	Sample 14	32.42754			
H12	Sample 15	32.58734			

表 7 PCR 仪恒温时间偏差实验结果
Table 7 Results of hold-time deviation experiment for PCR instrument

PCR 仪型号	30 s	28 s	25 s	20 s	15 s
Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	正常	正常	正常	正常	单个孔位有基因错配
Eppendorf AG 22331 Hamburg	正常	正常	正常	单个孔位有基因错配	正常
BIOER LifeECO	单个孔位有基因错配	正常	多个孔位有基因错配	未检出有效扩增结果	未检出有效扩增结果

恒温时间偏差实验研究中使用的是普通 PCR, 实验研究的思路是将退火、延伸时间人为地向下调整为 30、28、25、20、15 s 查看扩增结果有无阴阳性的改变, 并且通过对扩增的目标片段进行测序, 核查有无基因错配情况, 从而揭示恒温时间(hold-time)对扩增结果的影响。从表 7 看出, BIOER LifeECO 型号 PCR 仪在“变性-退火-延伸”3 个步骤的恒温时间(hold-time)统一调节至 25 s 时已经出现明显扩增结果异常, 继续下调至 20、15 s 时出现扩增实验失败。换言之, 当设定温度上的恒温时间(hold-time)明显小于于设定值, 例如按照标准操作程序, 变性、退火及延伸设定值应为 30 s, 实际只有 28、25、20、15 s 时, 即实际实验过程中恒温时间(hold-time)远达不到设定要求, 会影响变性、退火及延伸等相关实验步骤中的聚合酶链式反应, 进而造成实验结果出现不稳定状态(例如多个孔位出现基因突变错误), 甚至造成整板样品的扩增实验失败。但不同类型设备的, 在此方面的敏感性, 也存在差异。表 7 中其他 2 台设备, 随着恒温时间(hold-time)下降至 25 和 20 s 时也陆续出现扩增失败的情况。在实验所使用的 3 种设备中, Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler 抗干扰性最强。

由以上实验结果, 可以得出, PCR 仪器的恒温时间(hold-time)设定值与实际值之间偏差过大会对样品扩增结果的稳定性造成不良影响, 甚至导致扩增实验失败。如果该参数设定值与校准值偏差过大, 需要在后续 PCR 实验过程中通过调整恒温时间(hold-time)来进行补偿。

3 结论与讨论

通过使用玉米基因片段的扩增实验, 对 PCR 仪温度偏差影响的实验研究结果显示, 当反应程序温度偏离时, 不论哪种设备, 都会对扩增效果产生响应。当反应程序整体温度偏差为+1 °C 时, 相较于标准反应程序下相同 DNA 浓度的 Ct 值, 7500FAST、CFX96 都表现为减少, 但影响较小。当反应程序整体温度偏差为+2 °C 时, 相较于标准反应程序下相同 DNA 浓度的 Ct 值, 有些仪器无目标 DNA 扩增, 有些仍然能检出弱阳性样本, 但 Ct 值有显著变化; 当反应程序温度偏差为-1 °C, 实验中涉及的仪器均能检出弱阳性样本。

不同仪器(性能合格)对于温度准确性的响应程度有差异。在本研究中 7500FAST 比 CFX96 控温精度更好。但不论仪器品牌、型号如何, 对反应程序温度准确性都有响应。值得关注的是: 无论是何种设备, 在温度发生 2 或 3 °C 偏差时, 均对扩增结果产生的影响, 有些时候是弱阳性样本不能检出的颠覆性影响。

由此可见, 温度偏离程序设定目标值对 PCR 扩增效果有影响, 对于低含量模板的样品, 此温度偏差可能导致阴阳性结果的改变, 例如目前的新冠病毒核酸检测, 如果

PCR 仪温度偏差太大, 有可能导致弱阳性样品的检测结果出现阴性的情况。因此, 实验室应定期对 PCR 仪反应孔进行温度的校准和期间核查。但影响程度会因 PCR 设备不同厂家、不同型号有所差异。因此, 对于温度偏差, 设定多大数据作为设备校准判定合格与否的临界值, 需根据设备品牌、型号给与不同的考虑。扩增程序如果控温时间整体较短, 程序中温度的因素相对影响不大, 但该结论还需更多的数据支撑。

在反应池各孔的温度均匀性方面, 无论实验中涉及的哪种品牌、哪种型号的设备, 反应板板位中间孔的温度具有更均匀的趋势。

另一方面, 恒温时间(hold-time)方面的实验结果显示, PCR 仪器的恒温时间(hold-time)设定值与实际值之间偏差过大会对样品扩增结果的稳定性产生不良影响, 甚至导致扩增实验未检出目的片段, 或扩增产物发生基因错配, 从而导致实验失败。因此, 提示使用者应同时关注恒温时间(hold-time)及升降温速率对扩增结果的影响。

针对以上研究结论, 提示实验室应通过检测过程的质量控制, 及时发现上述风险, 确保检测结果质量。首先, 对于反应板不同孔间不均匀性的影响, 建议在实验中尽量将检测样品置于板位中间位置, 减少仪器所造成的系统误差。为了监测和降低该风险, 建议在实验中使用弱阳性质控, 即在边缘容易产生温度偏差的孔设置弱阳性对照孔, 监测扩增结果, 对于整个反应板的温度偏离, 同样可采用阳性对照或弱阳性对照的方式进行检测过程的质量控制来监测和降低风险。其次, 对于恒温时间(hold-time)方面的影响, 检测实验室需要关注 PCR 仪校准报告中恒温时间(hold-time)参数, 如果该参数设定值与校准值偏差过大, 需要在后续 PCR 实验过程中通过调整恒温时间(hold-time)来进行补偿。因此, 对于检测实验室, PCR 仪的定期校准和期间核查就显得十分重要。最后, 建议实验室定期对 PCR 仪进行校准和期间核查, 有条件的实验室和进行关键实验之前建议对 PCR 仪的全参数(包括温度、光源、样本等)进行校准, 实验室在获得 PCR 仪校准证书后, 应进行校准结果的确认。即认真阅读和分析各项数据, 结合 PCR 仪日常使用情况, 核查和判断 PCR 仪是否满足使用要求。合理制定 PCR 仪的校准周期。

参考文献

- [1] 邹雨虹, 杨丹妮, 张晓金. PCR 技术在食品微生物检测中的运用[J]. 食品安全导刊, 2021, (9): 187-188.
ZOU YH, YANG DN, ZHANG XJ. The use of PCR technology in food microbiological testing [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021, (9): 187-188.
- [2] 李松播, 王自强, 邵泓, 等. 聚合酶链式反应技术在药品质量控制领域中的应用[J]. 中国药师, 2020, 23(1): 130-133.
LI SB, WANG ZQ, SHAO H, et al. Application of polymerase chain reaction in the field of drug quality control [J]. China Pharm, 2020, 23(1):

- 130–133.
- [3] 张亚旭, 刘紫烟. 荧光 PCR 扩增相关技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(7): 890–899.
ZHANG YX, LIU ZY. Fluorescence PCR amplification related technology [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2021, 37(7): 890–899.
- [4] 黄瑾, 梁涛波, 许恒毅. 数字 PCR 在生物学检测中应用的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(2): 255–264.
HUANG J, LIANG TB, XU HY. Research progress of application of digital PCR in biological detection [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2021, 33(2): 255–264.
- [5] 黄珏, 王正亮, 潘海波, 等. 基于 DNA 检测的动物性水产品鉴别技术的研究进展 [J/OL]. 水产科学: 1–14. [2021-09-15]. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.20104>
HUANG Y, WANG ZL, PAN HB, *et al.* Recent advances on adulteration of fishery animal products based on DNA detection: A review [J]. *Fish Sci*: 1–14. [2021-09-15]. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.20104>
- [6] 郭宏伟, 赵绪永, 李华玮, 等. 数字 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用进展[J]. 动物医学进展, 2021, 42(2): 102–106.
GUO HW, ZHAO XY, LI HW, *et al.* Progress on application of digital PCR in animal disease diagnosis [J]. *Prog Vet Med*, 2021, 42(2): 102–106.
- [7] ROCCHIGIANI AM, TILOCCA MG, PORTANTI O, *et al.* Development of a digital RT-PCR method for absolute quantification of bluetongue virus in field samples [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 170.
- [8] WEI WC, DONG SH, ZHEN JC, *et al.* Development of a droplet digital PCR for detection and quantification of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *J Vet Diag Invest*, 2020, 32(4): 572–576.
- [9] THOMAS L, HELGA R, SIEGRID S, *et al.* Transmission studies of the newly described apple chlorotic fruit spot viroid using a combined RT-qPCR and droplet digital PCR approach [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(11): 1–7.
- [10] 余松林, 王喆, 沈文杰, 等. 聚合酶链式反应分析仪温度校准系统[J]. 计量学报, 2018, 39(5): 659–662.
YU SL, WANG Z, SHEN WJ *et al.* Temperature calibration system for PCR instrument [J]. *Acta Metrol Sin*, 2018, 39(5): 659–662.
- [11] 字立源, 兰晓燕, 黄苏金, 等. 实时荧光定性 PCR 实验室内质控方法的建立及探讨[J]. 系统医学, 2021, 6(1): 38–40.
ZI LY, LAN XY, HUANG SJ, *et al.* The establishment and discussion of real-time fluorescence qualitative PCR laboratory quality control methods [J]. *Syst Med*, 2021, 6(1): 38–40.
- [12] 崔方瑞. 荧光实时定量 PCR 法检测流感病毒核酸的质控效果分析[J]. 中国医疗器械信息, 2021, 27(3): 134–135.
CUI FR. Analysis on quality control effect of flu virus nucleic acid detection by fluorescence real-time quantitative PCR [J]. *China Med Device Inf*, 2021, 27(3): 134–135.
- [13] 李丽莉, 赵慧, 白东亭. 实时荧光定量 PCR 产品质量标准要点分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(8): 1069–1071.
LI LL, ZHAO H, BAI DT. Analysis of the key points of real-time fluorescence quantitative PCR product quality standards [J]. *Chin J Biol*, 2012, 25(8): 1069–1071.
- [14] 梁文, 罗超, 盛舒瑶. 荧光定量 PCR 仪计量校准结果的影响因素分析及控制[J]. 上海计量测试, 2020, 47(1): 2–6.
LIANG W, LUO C, SHENG SY. Analysis and control of influencing factors in the calibration of real-time PCR instrument [J]. *Shanghai Meas Test*, 2020, 47(1): 2–6.
- [15] 黄美芝. 兽医实验室荧光 RT-PCR 质量控制[J]. 兽医科学, 2019, (16): 66–67.
HUANG MZ. Quality control of fluorescent RT-PCR in veterinary laboratories [J]. *Graziery Vet Sci*, 2019, (16): 66–67.
- [16] 毛贺, 赵徐涛. 基因扩增仪温度检测技术研究[J]. 机电一体化, 2021, 27(3): 18–22.
MAO H, ZHAO XT. Study of temperature detection device for polymerase chain reaction system [J]. *Mechatronics*, 2021, 27(3): 18–22.
- [17] 程远霞, 魏燕, 刘宝林, 等. PCR(聚合酶链式反应)仪温度特性的实验研究与分析[J]. 仪表技术与传感器, 2009, 1: 31–34.
CHENG YX, WEI Y, LIU BL, *et al.* Experimental study and analysis on temperature characteristics of PCR processor [J]. *Instrum Technol Sens*, 2009, 1: 31–34.
- [18] 程远霞, 魏燕, 鲁祥友, 等. PCR 温度特性实验研究与分析[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(6): 52–56.
CHENG YX, WEI Y, LU XY, *et al.* Experimental study and analysis on temperature characteristics of PCR performance [J]. *Life Sci Instrum*, 2008, 6(6): 52–56.
- [19] 郑卫东, 袁仕伟. 荧光定量 PCR 仪的边缘效应与实验误差分析[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(2): 113–115.
ZHENG WD, YUAN SW. Edge effect and experiment error of fluorescence quantitative PCR instrument [J]. *Chin Med Equip J*, 2013, 34(2): 113–115.
- [20] SPAN M, VERBLAKT M, HENDRIKX T. Thermocycler calibration and analytical assay validation [J]. *PCR Technol*, 2013. DOI: 10.1201/b14930-13

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介

陶雨风, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为实验室认可体系研究。
E-mail: taoyf@cnas.org.cn

郭铮蕾, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为实验室检测质量管理及实验室认可体系研究。
E-mail: 30674272@qq.com