



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF xxxx—202x

全自动酶联免疫分析仪校准规范

Calibration Specification of Fully Automated Microplate ELISA Analyzers

(征求意见稿)

202x—xx—xx 发布

202x—xx—xx 实施

国家市场监督管理总局发布

全自动酶联免疫分析仪校准规范

Calibration Specification of Fully Automated

Microplate ELISA Analyzers

JJF xxxx—202x

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：河南省计量科学研究院

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范起草人：

目 录

引言.....	(II)
1 范围.....	(1)
2 引用文件.....	(1)
3 术语和计量单位.....	(1)
3.1 CO ₂ 和 O ₂ 的分压.....	(1)
3.2 总血红蛋白浓度.....	(1)
4 概述.....	(1)
5 计量特性.....	(2)
6 校准条件.....	(2)
6.1 环境条件.....	(2)
6.2 测量标准及其他设备.....	(2)
7 校准项目和校准方法.....	(3)
7.1 示值误差.....	(3)
7.2 重复性.....	(4)
7.3 携带污染率.....	(4)
7.4 线性.....	(5)
8 校准结果表达.....	(5)
8.1 校准结果处理.....	(5)
8.2 校准结果的测量不确定度.....	(5)
9 复校时间间隔.....	(5)
附录 A 缩略语.....	(6)
附录 B 气体张力法.....	(7)
附录 C 血气分析仪的测量原理.....	(9)
附录 D 标准溶液配制方法.....	(12)
附录 E 校准原始记录格式.....	(14)
附录 F 校准证书（内页）格式.....	(16)
附录 G 测量不确定度评定示例.....	(17)
附录 H 参考文献.....	(31)

引 言

JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001《通用计量术语及定义》和JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》共同构成支撑本规范制定工作的基础性系列规范。本规范中全自动酶联免疫分析仪检测器部分的计量特性和校准方法主要参考了JJG 861-2007《酶标分析仪检定规程》。

本规范为首次发布。

全自动酶联免疫分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于吸光度测定原理的全自动酶联免疫分析仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJG 861-2007 酶标分析仪

YY/T 1529-2017 酶联免疫分析仪

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 术语和计量单位

JJG 861-2007、YY/T 1529-2017 中界定的及以下术语和定义适用于本规范。

3.1 酶联免疫分析（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）

将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面，通过酶标记抗原或抗体与固相载体表面的抗体或抗原进行免疫反应，实现对目标物进行定性或定量检测的方法。

注：酶联免疫分析通常将抗原或抗体吸附在固相载体上（包被），受检样本（含待测抗原或抗体）和酶标记抗体或抗原，按一定程序与结合在固相载体上的抗原或抗体起反应形成抗原和抗体的复合物，固相载体上被结合的酶标记物的量与样本中待测物的量成一定比例。加入酶反应底物后，底物被酶催化生成有色产物，通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应。颜色反应的深浅与样本中相应抗体或抗原的量成比例。

3.2 全自动酶联免疫分析仪（fully automated microplate ELISA analyzer）

采用酶联免疫分析原理对样本进行定性和定量分析的仪器，其所有分析过程包括样品和试剂的加注、孵育洗板、数据测量、结果计算和输出等都实现了自动化。

4 概述

全自动酶联免疫分析仪（以下简称“分析仪”）通常由液体分配单元、孵育单元、洗板单元、检测单元及计算机系统等核心模块组成。测定时仪器首先通过液体分配单元将受检标本和酶标抗原或抗体按不同的步骤加到包被有抗体或抗原的固相载体（如96孔酶标板）的表面；接着将固相载体转移到孵育单元恒温孵育一定时间；孵育结束后将固相载体转移至洗板单元进行洗涤，将未结合的抗原或抗体洗去；然后加入显色底物并孵育显色，最后采用检测单元测定特定波长下反应液的吸光度，根据吸光度与标本中受检

物质的量成一定的比例的原理进行定性或定量分析。

5 计量特性

全自动酶联免疫分析仪各项计量特性指标见表 1。

表 1 全自动酶联免疫分析仪的主要计量特性指标

序号	计量特性	计量性能指标
1	加液体积示值误差	20 μL : 不超过 $\pm 15\%$
		200 μL : 不超过 $\pm 3\%$
2	加液体积重复性	20 μL : 不超过 10%
		200 μL : 不超过 3%
3	孵育温度示值误差	不超过 $\pm 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$
4	洗涤残留	不超过 5 μL
5	示值稳定性	不超过 ± 0.005
6	吸光度示值误差	不超过 ± 0.03
7	吸光度重复性	不超过 1.0%
8	通道差异	不超过 0.03

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 环境温度: (15~30) $^{\circ}\text{C}$;

6.1.2 相对湿度: $\leq 85\%$ 。

注: 上述条件与制造商的产品规定不一致时, 以产品规定为准。

6.2 测量标准及其他设备

6.2.1 电子天平: 感量 0.01 mg 和 0.1 mg;

6.2.2 水银温度计及温度测量仪: 最大允许误差不超过 $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.2.3 标准物质: 应使用经国家计量行政部门批准颁布的光谱中性滤光片标准物质, 吸光度标称值分别为 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 ($U \leq 0.01$, $k=2$)。

6.2.4 纯水: 电阻率达到 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

7 校准项目和校准方法

全自动酶联免疫分析仪在正常工作条件下先进行仪器自检和清洗, 校准前分析仪应当提前开机预热 30 min 以上。纯水在使用前平衡至室温并超声脱气处理, 用温度计测量纯水温度并从附录 A 中查找到对应的密度。

7.1 加液体积示值误差和加液重复性

将可密封容器 (如 500 μL 带盖离心管) 在感量为 0.01 mg 的电子天平上称量质量,

去盖后放到全自动酶免分析仪板架的合适位置，控制样品针往该容器中加入 20 μL 平衡至室温的脱气纯水，立即盖上容器在电子天平上称量质量。根据公式（1）计算加液体积，重复测量 6 次，根据公式（2）计算加液体积重复性。取后 3 次测量结果根据公式（3）计算 20 μL 校准点的加液体积示值误差。重复上述过程，加液体积改为 200 μL ，计算 200 μL 校准点的加液体积示值误差。

$$V = \frac{m - m_0}{\rho} \quad (1)$$

式中： V ——加液体积，单位微升（ μL ）；

m ——容器和纯水的总质量，单位毫克（ mg ）；

m_0 ——容器质量，单位毫克（ mg ）；

ρ ——室温下水的密度，单位克每毫升（ g/mL ）。

$$E_V = \frac{V_0 - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 V_i}{V_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中： V_0 ——体积设定值，单位微升（ μL ）；

V_i ——后三次加液体积测量值，单位微升（ μL ）；

E_V ——加液体积示值误差，无量纲（%）。

$$RSD_V = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{(n-1)}} \times \frac{1}{\bar{V}} \times 100\% \quad (3)$$

式中： RSD_V ——加液体积重复性，无量纲（%）；

V_i ——第 i 次加液体积测量结果，单位微升（ μL ）；

\bar{V} ——6 次加液体积测量结果平均值，单位微升（ μL ）；

n ——测量次数, $n=6$ 。

7.2 孵育温度示值误差

将酶标仪孵育温度设置为 37.0 °C, 把温度测量仪的传感器放置在酶标板架上并关闭酶标仪仓门, 平衡 30 min 待读数稳定后, 读取酶标板上有代表性的至少 6 孔 (如 B4、B8、B12、G4、G8、G12) 的实际温度, 每孔重复测量 3 次, 根据公式 (4) 分别计算并报告上述代表性孔位的孵育温度示值误差。

$$E_{T,j} = T_0 - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 T_{i,j} \quad (4)$$

式中: j ——酶标板上有代表性的至少 6 孔;

T_0 ——孵育温度设定值, 单位摄氏度 (°C);

$T_{i,j}$ —— j 孔第 i 次温度测量值, 单位摄氏度 (°C);

$E_{T,j}$ —— j 孔孵育温度示值误差, 单位摄氏度 (°C)。

7.3 洗涤残留

取一块 96 孔酶标板, 在感量为 0.1 mg 的电子天平上称量其质量。设定洗涤程序为全板洗涤, 用平衡至室温的脱气纯水逐行或逐列清洗, 每孔清洗用量 300 μ L, 无浸泡时间, 重复清洗 5 次。清洗完成后, 在感量为 0.1 mg 的电子天平上再次称量 96 孔酶标板的质量, 根据公式 (5) 计算洗涤残留:

$$w = \frac{1}{96} \frac{m_1 - m_0}{\rho} \quad (5)$$

式中: w ——洗涤残留, 单位微升 (μ L);

m_1 ——洗涤后酶标板质量, 单位毫克 (mg);

m_0 ——洗涤前酶标板质量, 单位毫克 (mg);

ρ ——纯水密度, 单位克每毫升 (g/mL)。

7.4 示值稳定性 [JJG 861-2007, 5.3.2]

选用 492 nm 波长或仪器特有的专一波长, 将吸光度标称值 1.0 的光谱中性滤光片平放在 96 孔酶标板的空板架上, 以空气为参比, 测量并记录仪器的初始吸光度示值, 5 min 后记录吸收度示值一次, 记录初始值 10 min 后再次记录仪器示值。取后两次吸光度示值与初始值之差绝对值较大者按照公式 (6) 计算示值稳定性 r :

$$r = A - A_0 \quad (6)$$

式中：

r ——示值稳定性，无量纲；

A_0 ——初始时的吸光度，无量纲；

A ——5 min 和 10 min 两次吸光度示值与初始值之差绝对值较大者，无量纲。

7.5 吸光度示值误差 [JJG 861-2007, 5.3.4]

依次选用 405 nm, 450 nm, 492 nm, 620 nm 波长或仪器特有的专一波长，将吸光度标称值分别为 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 的四块光谱中性滤光片同时平放在 96 孔酶标板的空板架上，以空气为参比，连续测量 3 次，依次记录仪器吸光度示值，并计算平均值。吸光度示值误差 ΔA 按公式 (7) 计算：

$$\Delta A = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 A_i - A_s \quad (7)$$

式中： ΔA ——吸光度示值误差，无量纲；

A_i ——第 i 次测量的吸光度值，无量纲；

A_s ——吸光度标准值，无量纲。

逐一报告 405 nm, 450 nm, 492 nm, 620 nm 或仪器特有专一波长下，不同吸光度水平的吸光度示值误差。

7.6 吸光度重复性 [JJG 861-2007, 5.3.5]

选用 450 nm 波长或仪器特有的专一波长，将吸光度标称值为 0.5 或 1.0 的光谱中性滤光片平放在 96 孔酶标板的空板架上，以空气为参比，于固定的某一孔位重复测量 6 次，记录仪器吸光度示值，并计算平均值，按公式 (8) 计算 RSD_A 表征吸光度重复性。

$$RSD_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})^2}{(n-1)}} \times \frac{1}{\bar{A}} \times 100\% \quad (8)$$

式中： RSD_A ——相对标准偏差，无量纲 (%)；

A_i ——第 i 次吸光度测量值，无量纲；

\bar{A} ——6 次吸光度测量结果的平均值，无量纲；

n ——测量次数， $n=6$ 。

7.7 通道差异 [JJG 861-2007, 5.3.7]

选用 450 nm 波长或仪器特有的专一波长,将吸光度标称值为 1.0 的光谱中性滤光片平放在 96 孔酶标板的空板架上,先后置于多个通道的相应位置,以空气为参比,测量并记录每一通道的至少 6 次吸光度值(例如 A 通道可测量 A1-A6 或 A2-A7),多个通道的差异结果报告用全部测量数据的极差值表示,按公式(9)计算通道差异 δ_A :

$$\delta_A = A_{\max} - A_{\min} \quad (9)$$

式中: A_{\max} ——多个通道中测量结果的吸光度最大值,无量纲;

A_{\min} ——多个通道中测量结果的吸光度最小值,无量纲;

δ_A ——通道差异,无量纲。

8 校准结果表达

8.1 校准结果处理

经校准后的全自动酶免分析仪应核发校准证书,校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求,并给出各校准项目名称和测量结果以及扩展不确定度。校准原始记录格式(推荐性表格)见附录 B,校准证书内页格式(推荐性表格)见附录 C。

8.2 校准结果的测量不确定度

全自动酶免分析仪校准结果的测量不确定度按 JJF 1059.1—2012 的要求评定,校准结果测量不确定度评定示例见附录 D。

9 复校时间间隔

由于复校时间间隔的长短是由酶免分析仪的使用情况、使用者、酶免分析仪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间隔,复校时间间隔建议不超过1年。

附录 A

表 A.1 1990 年国际温标纯水密表 (kg/m^3)

$t_{90}(\text{°C})$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
15	999.099	999.084	999.069	999.053	999.038	999.022	999.006	998.991	998.975	998.959
16	998.943	998.926	998.910	998.893	998.876	998.860	998.843	998.826	998.809	998.792
17	998.774	998.757	998.739	998.722	998.704	998.686	998.668	998.650	998.632	998.613
18	998.595	998.576	998.557	998.539	998.520	998.501	998.482	998.463	998.443	998.424
19	998.404	998.385	998.365	998.345	998.325	998.305	998.285	998.265	998.244	998.224
20	998.203	998.182	998.162	998.141	998.120	998.099	998.077	998.056	998.035	998.013
21	997.991	997.970	997.948	997.926	997.904	997.882	997.859	997.837	997.815	997.792
22	997.769	997.747	997.724	997.701	997.678	997.655	997.631	997.608	997.584	997.561
23	997.537	997.513	997.490	997.466	997.442	997.417	997.393	997.396	997.344	997.320
24	997.295	997.270	997.246	997.221	997.195	997.170	997.145	997.120	997.094	997.069
25	997.043	997.018	996.992	996.966	996.940	996.914	996.888	996.861	996.835	996.809
26	996.782	996.755	996.729	996.702	996.675	996.648	996.621	996.594	996.566	996.539
27	996.511	996.484	996.456	996.428	996.401	996.373	996.344	996.316	996.288	996.260
28	996.231	996.203	996.174	996.146	996.117	996.088	996.059	996.030	996.001	996.972
29	995.943	995.913	995.884	995.854	995.825	995.795	995.765	995.753	995.705	995.675
30	995.645	995.615	995.584	995.554	995.523	995.493	995.462	995.431	995.401	995.370
31	995.339	995.307	995.276	995.245	995.214	995.182	995.151	995.119	995.087	995.055
32	995.024	994.992	994.960	994.927	994.895	994.863	994.831	994.798	994.766	994.733
33	994.700	994.667	994.635	994.602	994.569	994.535	994.502	994.469	994.436	994.402
34	994.369	994.335	994.301	994.267	994.234	994.200	994.166	994.132	994.098	994.063
35	994.029	993.994	993.96	993.925	993.891	993.856	993.821	993.786	993.751	993.716

附录 B

表 B.1 校准原始记录格式

仪器名称		环境温度	
仪器型号		环境湿度	
制造厂商		校准日期	
出厂编号		证书编号	
校准地点		原始记录号	
送检单位名称		校准依据	
送检单位地址		送检单位联系电话	
校准人员		核验人员	
计量标准器信息			

B.1 外观检查

B.2 加液体积示值误差和重复性($t=$ _____°C, $\rho=$ _____g/mL)

		1	2	3	4	5	6
20 μL	纯水质量 mg						
	体积 μL						
	平均体积 μL	/	/	/			
	加液体积示值误差%						
	加液体积重复性%						
200 μL	纯水质量 mg						
	体积 μL						
	平均体积 μL	/	/	/			
	加液体积示值误差%						
	加液体积重复性%						

B.3 孵育温度示值误差

温度设定值/°C	测量点	测量值 1/°C	测量值 2/°C	测量值 3/°C	平均值/°C	示值误差/°C
37.0						

B.4 洗涤残留

m_0/mg	
m_1/mg	
$\rho/\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
$w/\mu\text{L}$	

B.5 示值稳定性

	$A_{\text{起始}}$	$A_{5\text{ min}}$	$A_{10\text{ min}}$
r			

B.6 吸光度示值误差

波长 nm	标称 吸光度	标准 吸光度	A_i			\bar{A}	ΔA
			1	2	3		
405	0.2						
	0.5						
	1.0						
	1.5						

450	0.2						
	0.5						
	1.0						
	1.5						
492	0.2						
	0.5						
	1.0						
	1.5						
620	0.2						
	0.5						
	1.0						
	1.5						

B.7 吸光度重复性

n	1	2	3	4	5	6	\bar{A}	RSD_A
A_i								

B.8 通道差异

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

通道差异 $\delta_A =$ _____

附录 C

附录 C.1 校准证书内页格式

校准结果

一、加液体积示值误差

二、加液体积重复性

三、孵育温度示值误差

四、洗涤残留

五、示值稳定性

六、吸光度示值误差

七、吸光度重复性

八、通道差异

备注：

附录 D

吸光度示值误差测量结果的不确定度评定示例

D.1 测量方法

采用全自动酶联免疫分析仪测量光谱中性滤光片标准物质，并与标准物质的标准值进行比较。

D.2 测量模型

吸光度示值误差可由公式 (D.1) 给出：

$$I = \bar{A} - A_s + \delta_s + \delta_D \quad (\text{D.1})$$

式中：

I ——吸光度示值误差，无量纲；

\bar{A} ——全自动酶联免疫分析仪对光谱中性滤光片标准物质三次测量结果的平均值，无量纲；

A_s ——光谱中性滤光片标准物质的标准值，无量纲；

δ_s ——短期稳定性引入的修正值，无量纲；

δ_D ——通道差异引入的修正值，无量纲。

D.3 方差和灵敏系数

依据 $u_c^2(y) = \sum [\partial f / \partial x_i]^2 u^2(x_i)$ ，有 $u_c^2 = \sum c^2(x_i) u^2(x_i)$ ，则由式 (D.1) 得：

$$c_{\bar{A}} = \frac{\partial I}{\partial \bar{A}} = 1 \quad (\text{D.2})$$

$$c_{A_s} = \frac{\partial I}{\partial A_s} = -1 \quad (\text{D.3})$$

$$c_{\delta_s} = \frac{\partial I}{\partial \delta_s} = 1 \quad (\text{D.4})$$

$$c_{\delta_D} = \frac{\partial I}{\partial \delta_D} = 1 \quad (\text{D.5})$$

故输出量估计方差的完整表达式应为：

$$u_c^2 = u_A^2 + u_{A_s}^2 + u_{\delta_s}^2 + u_{\delta_D}^2 \quad (\text{D.6})$$

由式 (D.6) 得：

$$u_c = \sqrt{u_A^2 + u_{A_s}^2 + u_{\delta_s}^2 + u_{\delta_D}^2} \quad (\text{D.7})$$

D.4 不确定度来源

不确定度来源包括：

- a) 全自动酶联免疫分析仪测量重复性引入的标准不确定度 u_A ；
- b) 标准物质引入的标准不确定度 u_{A_s} ；
- c) 短期稳定性即 10 min 之内吸光度测量值的漂移引入的不确定度分量 u_{δ_s} ；
- d) 通道差异引入的不确定度分量 u_{δ_D} 。

下面以一次全自动酶联免疫分析仪检定为例具体分析其测量不确定度。在检定中吸光度标称值为 0.2 的光谱中性滤光片 3 次测量结果的分别为 0.271、0.270、0.269；该标准物质的标准值为 0.271 ± 0.010 ($k=2$)。

D.5 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 D.1。

表 D.1 标准不确定度一览表

标准不确定度分量 $u(x_i)$	不确定度来源	标准不确定度值 $u(x_i)$	$c_i = \partial f / \partial x_i$	$ c_i \times u(x_i) $
$u_{\bar{A}}$	测量重复性	0.00029	1	0.00029
u_{c_s}	标准物质	0.005	-1	-0.005
u_{δ_s}	短期稳定性	0.00058	1	0.00058
u_{δ_D}	通道差异	0.0012	1	0.0012
$u_c = 0.011$				

D.6 标准不确定度分量计算

D.6.1 测量重复性引入的标准不确定度分量 $u_{\bar{A}}$

选定一台全自动酶联免疫分析仪，对光谱中性滤光片标准物质连续测量 10 次，得到一组测量值：0.271、0.269、0.269、0.270、0.271、0.269、0.271、0.270、0.271、0.269。

则单次测量结果的标准差 $s(x_i)$ ：

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \approx 0.00094 \quad (\text{D.8})$$

实际检定时在重复性条件下连续测量 3 次，以 3 次测量的算术平均值作为结果，则由测量重复性引入的标准不确定度分量为：

$$u_{\bar{A}} = s(x_i) / \sqrt{n} = 0.00094 / \sqrt{3} \approx 0.00054 \quad (\text{D.9})$$

在这种测量条件下，仪器的分辨力为 0.001，认为是均匀分布，则由分辨力引起的不确定度分量为：

$$u_r = \frac{0.001}{2\sqrt{3}} = 0.00029 \quad (\text{D.10})$$

由于 $u_{\bar{A}} > u_r$ ，所以忽略由仪器分辨力引入的不确定度分量。

D.6.2 标准物质引入的标准不确定度分量 u_{A_s}

由标准物质引入的不确定度 u_{A_s} 可以根据标准物质证书提供的扩展不确定度 U_{A_s} 和包含因子 k_{A_s} 根据公式 (D.11) 计算：

$$u_{A_s} = \frac{U_{A_s}}{k_{A_s}} \quad (\text{D.11})$$

式中：

u_{A_s} ——光谱中性滤光片标准物质引入的标准不确定度，无量纲；

U_{A_s} ——光谱中性滤光片标准物质的扩展不确定度，无量纲；

k_{A_s} ——标准物质证书提供的包含因子， $k_{A_s}=2$ 。

在检定过程使用的标准物质的标准值为 0.271 ± 0.010 ($k=2$)，则由标准物质引入的标准不确定度分量为：

$$u_{A_s} = \frac{U_{A_s}}{k_{A_s}} = \frac{0.010}{2} = 0.005 \quad (\text{D.12})$$

D.6.3 短期稳定性引入的标准不确定度分量 u_{δ_s}

10 min 内全自动酶联免疫分析仪吸光度测量结果的漂移量为 0.002，则由短期稳定性引入的标准不确定度分量为：

$$u_{\delta_s} = \frac{S}{2\sqrt{3}} = \frac{0.002}{2\sqrt{3}} = 0.00058 \quad (\text{D.13})$$

D.6.4 通道差异引入的标准不确定度分量 u_{δ_b}

全自动酶联免疫分析仪的通道差异为 0.004，则由通道差异引入的标准不确定度分量为：

$$u_4 = \frac{D}{2\sqrt{3}} = \frac{0.004}{2\sqrt{3}} = 0.0012 \quad (\text{D.14})$$

D.7 合成标准不确定度 u_c

由式 (D.7) 可得：

$$u_c = \sqrt{u_A^2 + u_{A_s}^2 + u_{\delta_s}^2 + u_{\delta_D}^2} = 0.0052 \quad (\text{D.15})$$

D.8 扩展不确定度 U

取 $k=2$ ，则 $U = k \times u_c = 0.011$
