

国家计量技术规范规程制修订

《表面等离子体共振生物分子相互作用
分析仪校准规范》

编制说明

上海市计量测试技术研究院

2023年02月

《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》

编制说明

一、任务来源

根据国家市场监督管理总局国家计量技术法规制修订文件（见市监计量发[2021] 50号），上海市计量测试技术研究院、中国计量科学研究院、中国计量测试学会、上海市食品药品检验所、南京市计量监督检测院、北京英柏生物科技有限公司共同承担《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》的制定工作，归口单位为全国生物计量技术委员会。

二、规范制定的必要性

生物体内分子间的相互作用是维持生命活动的基础，研究人员对分子间相互作用的正确分析是了解生命活动的关键因素。在抗体药物筛选过程中，解离速率决定了抗体的在靶时间，解离速率慢的抗体成药性更好，检测解离速率的快慢完成排序，抓取出想要的候选分子；在抗体体外生物活性检测项目中，亲和力能够作为药物功效及半衰期的预测指标；疫苗研发和生产企业应对工艺流程中的关键质量属性（特别是生物活性）进行实时监测，这些都需要进行生物分子相互作用研究。生物分子相互作用分析仪可以实现对生物分子的分子间结合、结合的快慢、结合的强弱以及结合的机理等所有分子间相互作用的高灵敏度检测和分析，广泛应用于蛋白质组学，癌症研究，酶反应，分子识别，免疫调节，生物材料，食品安全，环境检测等领域，尤其是在疫苗开发过程中有重要的作用。

生物分子相互作用分析仪主要依托表面等离子共振技术（SPR）、等温滴定量热技术（ITC）、石英晶体微天平技术（QCM）、微量热泳动技术（MST）和生物膜干涉技术（BLI）技术等。基于表面等离子共振（SPR）技术的生物分子相互作用分析仪通过测量 SPR 角的改变，进而获得物质量的变化信息，从而计算出该物质的结合速率常数 k_a 、解离速率常数 k_d 以及亲和力，由于无需任何标记，能够直接观测原位、微量、灵敏、快速、动态和实时的定量表征结合的全过程，成为最为经典的生物分子相互作用分析仪，在市场上占有率极高。而且，基于 SPR 的生物分子相互作用检测技术被中国、美国和日本药典收录，也被 FDA 免

疫原性指导原则推荐为抗体筛选方法。目前，基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪在抗体药研发过程中抗体筛选、药物结合物活性综合表征、仿制药一致性评价和质量控制方面发挥着举足轻重的作用。

由于基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪已经广泛的应用于基础生命科学研究和药物研制等领域，使用单位包括了医疗器械检验机构、食品与药品检验机构、生物医药研发单位、科研院所与高校等，检测结果关乎药物安全、生物安全、医疗安全，与大众健康息息相关。尤其在治疗性生物药物的研发中，免疫应答已成为影响安全的关键问题。新冠疫苗研发生产过程中生物分子相互作用分析也起到关键作用。

要保证基于 SPR 的生物分子相互作用分析的准确可靠，其首要前提是量值的溯源性。而目前对此类仪器的量值溯源，国内外尚无通行的方法，我们有必要开展针对基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪量值溯源技术的研究，从而来公正地评价仪器的各项性能指标，保障基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪的产品质量以及测量结果的量值具有溯源性、准确可靠。

三、《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》制定过程

1、2019 年 1 月至 2021 年 6 月，校准规范起草单位组织相关技术人员对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的校准方法进行了研究，研究了国内使用面大的品牌的表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的工作原理及技术参数，对不同条件下测量仪器的计量性能变化有深入的了解，为校准规范的制定不仅积累了相当多的实际经验而且创造了有力的条件。

2、2021 年 7 月，国家市场监督管理总局办公厅批准全国生物计量技术委员关于《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》的立项。上海市计量测试技术研究院和中国计量科学研究院作为主要起草单位，上海市食品药品检验所、南京市计量监督检测院、北京英柏生物科技有限公司参加起草，项目正式启动。上海市计量测试技术研究院迅速抽调 5 名专业技术人员成立规范制定起草团队，全面落实编制工作。起草团队认真制定了详细的编制计划、实施步骤、经费计划、实验方案等。

3、2021 年 7 月至 12 月，起草团队认真查阅国内外相关行业标准 and 文献等资料，

对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的使用情况、主要原理、性能指标等进行了全面调研。

4、2022年1月至5月，起草团队走访了表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪生产厂家美国通用电气医疗（GE）公司、北京英柏生物科技有限公司、赛多利斯（Sartorius）（上海）贸易有限公司以及使用单位上海市食品药品检验所、上海海路生物技术有限公司等企业，进行现场调研。根据调研结果，就规范的架构设定、校准项目等广泛听取了相关专家的建议和意见。专家来自生产厂家、应用客户、仪器维修单位等各方面，提出了许多建设性的意见和建议。同时，起草团队申请立项了上海市市场监督管理局科研项目《生物分子相互作用 SPR 检测计量溯源技术研究》（2022-13），为规范的制修订提供了经费支持。

5、2022年6月，起草团队开展多次讨论，对规范的框架结构、适用范围、技术指标要求等进行研究，形成了《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》（草案）。2022年6月17日邀请了中国计量科学研究院、江苏省计量科学研究院、广州市计量科学研究院、北京英柏生物科技有限公司等专家开展了规范制修订讨论会，与会专家给与了很多建设性的建议与意见，起草团队对《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》（草案）进行修改和完善。

6、2022年7月至2023年2月，起草团队到上海市食品药品检验所、上海海路生物技术有限公司、美国通用电气医疗（GE）公司、北京英柏生物科技有限公司、赛多利斯（Sartorius）（上海）贸易有限公司等10多家单位做现场实验，对测量数据进行分析和处理，分析判断实验方案的可行性，排除不符合要求的试验方法，再制定新的试验方法和改进意见，形成《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》（征求意见稿）。

7、2023年3月至5月，起草团队将形成的《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》（征求意见稿），发送至表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪生产及使用单位、科研院校等单位及相关专家，广泛征求意见。起草团队根据专家意见，对《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》（征求意见稿）进行修改和完善，形成送审稿。

四、规范制定的主要技术依据与原则

（一）、技术依据

《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》的制定参考了 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》等标准，按照 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求编制。

（二）、原则

1、构架

根据 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求，本规范构架上包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录等几个部分。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位、计量特性、通用技术要求与校准项目和校准方法，原则上与 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》和 JJF 1001《通用计量术语及定义》保持一致。

3、计量特性确定原则

表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的理论依据是表面等离子共振（surface plasmon resonance, SPR）随金属表面的折射率变化而变化，而折射率的变化又和结合在金属表面的生物分子质量成正比，如图 1 所示，偏振光以一定角度范围入射到镀在玻璃表面的薄膜上发生全反射，会形成消逝波进入光疏介质，而在光疏介质中又存在等离子波，当符合表面等离子体共振波的激发条件时，两波相遇就可能发生共振（图 1）。入射光的能量被吸收，使反射光能量急剧下降，在反射光谱上出现反射强度最低值，即共振吸收峰，所对应的波长为共振波长，对应的入射角为共振角，当金属薄膜表面介质不同时，共振角或共振波长将改变，由此可获得相关信息。SPR 对附着在金属薄膜表面的介质折射率非常敏感，当表面介质的属性改变或者附着量改变时，共振角会发生变化。因此，SPR 谱（共振角的变化 vs 时间）能够反映与金属膜表面接触的体系的变化。

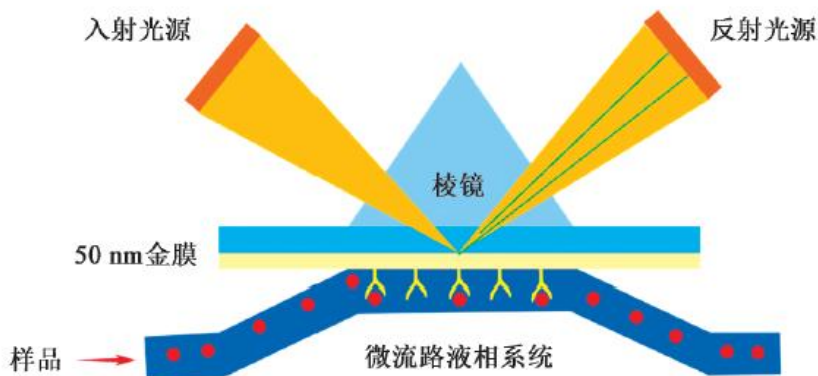


图 1 表面等离子共振 (SPR) 原理图

SPR 生物作用分析仪工作原理是将其中一个反应物 (称为配体) 偶联在传感芯片表面, 含有一个反应物 (称作分析物) 的样品通过微流控控制系统以恒定的流速通过传感芯片表面, 分子间有结合解离反应而导致传感芯片表面分子浓度的变化, 仪器通过测量 SPR 角的改变, 绘制 SPR 谱图, 如图 2 所示, 基线噪声和基线漂移直接影响仪器的检测限, 检测限是仪器的关键计量性能指标; SPR 生物作用分析仪可以作为 ELISA 方法对活性蛋白进行定量分析, 线性相关性和测量重复性直接影响样品定量准确性。因此基线噪声、基线漂移、线性相关性、检测限和测量重复性是表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的关键计量性能指标。在实际的计量校准研究工作当中, 我们结合一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪上的实验, 形成本规范确定的计量特性。

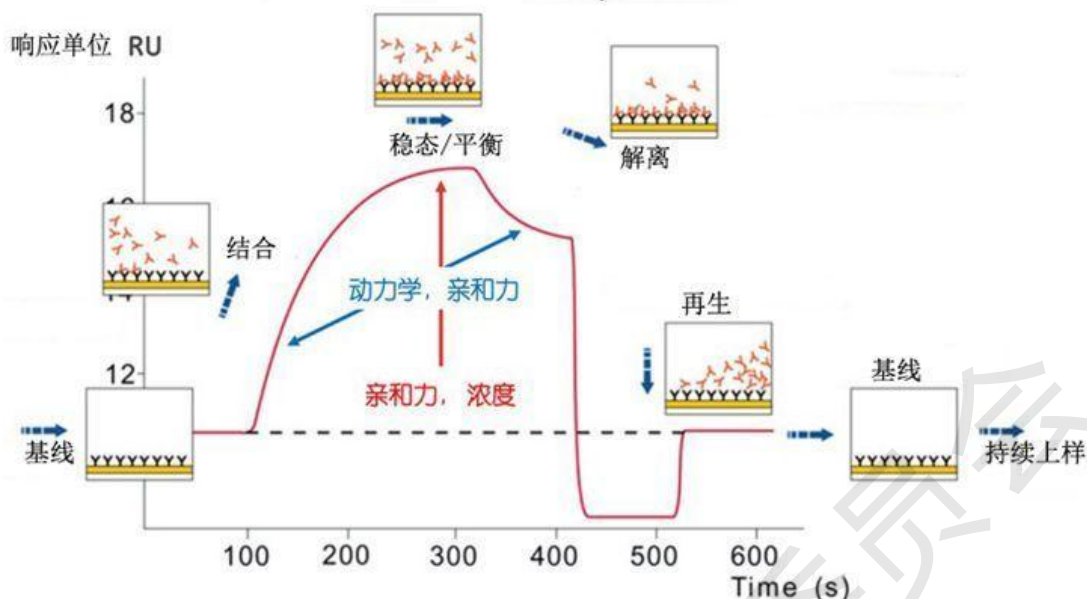


图 2 基于 SPR 的生物分子相互作用分析方法示意图

4、校准用仪器选择的原则

随着 SPR 技术的迅速发展，表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的研制也得到了广泛的关注，已经有了相当成熟的产品。我们调研了国内市场上主流的国内外表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪，厂商主要集中在 GE 公司、Satourius 公司和英柏公司等。表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪测量的是随金属表面的折射率变化而变化，目前我国虽然有 GBW(E)130147~130151、GBW(E)130840~130842 折射率溶液标准物质，但是其以有机物为原料，具有强烈的刺激性气味，会损坏生物传感芯片，而且特性量值是 20℃时的折射率，而客户常用 SPR 生物相互作用分析仪的 25℃进行样品分析，温度不一致，因此，不能用于此类仪器的校准。GE 公司、Satourius 公司和英柏公司均采用蔗糖溶液作为质量控制，目前，我国有系列蔗糖标准物质供选择使用。由于客户进行分析互作分析时，常采用缓冲溶液作为流动液，因此，我们选择 GBW10067 蔗糖纯度标准物质，采用客户最常用的缓冲溶液进行溶解稀释，用做仪器检出限的校准。由于线性相关性校准需要用一系列折射率水平的蔗糖溶液，如果采用 GBW10067 蔗糖纯度标准物质（2g/瓶，450 元/瓶），需要成本高，我们选择分析纯的蔗糖试剂。采用客户最常用的缓冲溶液进行溶解稀释，冷藏保存，使用经过计量校准的阿贝折射仪定值（25℃的折射率）后，用于仪器线性相

关性和重复性的校准。基线漂移和基线噪声的校准采用客户常用系统缓冲液即可，这样可以反映客户的实际使用情况。表 1 列举了该仪器校准用标准物质。

表 1 校准用标准物质

校准项目	校准用标准物质或试剂
基线噪声	客户常用系统缓冲液
基线漂移	
线性相关性	分析纯的蔗糖试剂，采用客户常用系统缓冲液溶解稀释， 用阿贝折射仪定值（25℃折射率）
测量重复性	
检测限	GBW10067 蔗糖纯度标准物质，采用客户常用系统缓冲液 溶解稀释，重量法配制 10 mg/g 蔗糖标准溶液

五、规范制定说明

《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》共分为封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录。其中，封面、扉页和目录三个部分根据 JJF 1071 《国家计量校准规范编写规则》撰写。

（一）、范围

本规范适用于基于表面等离子体共振原理的生物分子相互作用分析仪的校准。

（二）、引用文件

《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》主要参考了 ISBN: 9787030557223 核医学名词完成本规范的制定。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范。

（三）、术语

本部分给出了结合速率常数、解离速率常数及亲和力的定义和解释。

（四）、概述

本部分主要对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的仪器组成和工

作原理进行了简要介绍。

表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪（以下简称分析仪）主要由微流控系统、传感器芯片和光学系统三部分组成，可进行生物分子的分子间结合的特异性、动力学（结合速率常数和解离速率常数）、结合的强弱（亲和力）以及结合的机理等分子间相互作用的高灵敏度检测和分析。

（五）、计量特性

尽管基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪已经得到了广泛应用，但是目前国内尚无通行的计量校准方法，我国尚未出台有关基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪的检定规程或者校准规范，只有仪器生产单位和使用单位对仪器质量控制提出了些许思路：美国通用电气医疗（GE）公司采用 β 球蛋白及其对应抗体作为互作分子对仪器进行性能评价；美国 Fortebio 公司采用甘油对仪器的响应范围进行评价；武汉大学的刘课题组研究了阳离子咪啉与牛血清白蛋白互作系统，对日常实验进行质量控制；清华大学的余课题组设计了生物分子相互作用分析仪的自动控制系统，并提出温度控制的重要性。这些研究工作对定量评价基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪的性能起到了积极的作用。然而，这些工作不足之处在于：使用蛋白及其抗体互作分子对或甘油受到实验条件和试剂本身质量的影响，可靠性和稳定性差，只能作为厂商内部的质量控制使用，无法用于不同厂家间的统一计量校准，而且没有明确的、可校准的计量性能指标。目前市场上主流的基于 SPR 的生物分子相互作用分析仪主要有：美国通用电气医疗（GE）公司的 Biacore T200 和 Biacore 8K 型仪器；德国赛多利斯（Sartorius）公司的 Pioneer、SF3 型仪器；国内英柏生物的 MI-S200D 等型号仪器。目前，表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪广泛用于分子相互作用模式的研究、动力学常数的测定、亲和常数测定及浓度的测量等，主要应用于蛋白质组学研究、癌症研究、**新药研发**、信号传递、分子识别、免疫调节、免疫测定法、**疫苗开发**、瞬时结合、配体垂钓、结合特异性、结构与功能的关系及酶反应等分析领域。

本部分通过对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪主要原理、性能指标等全面调研以及表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪在实际中的使用情况确定了《表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准规范》中的计量特

性。包括：基线噪声、基线漂移、线性相关性、检测限和测量重复性。

1、基线噪声和基线漂移

基线噪声和基线偏移是判断表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪检测性能和微流控流路清洁度和流速稳定性最便捷的方法之一，仪器产生基线噪声和基线偏移也是使用过程中一个正常的变化因素，一般厂家也都会有相应的说明。而且，基线噪声和基线漂移也直接影响仪器的检出限。一般生物分子相互作用都会在 10 分钟内完成，因此，我们采用分析仪系统缓冲溶液为样本，记录基线 10 分钟，考察基线噪声和基线偏移，如图 3 所示。

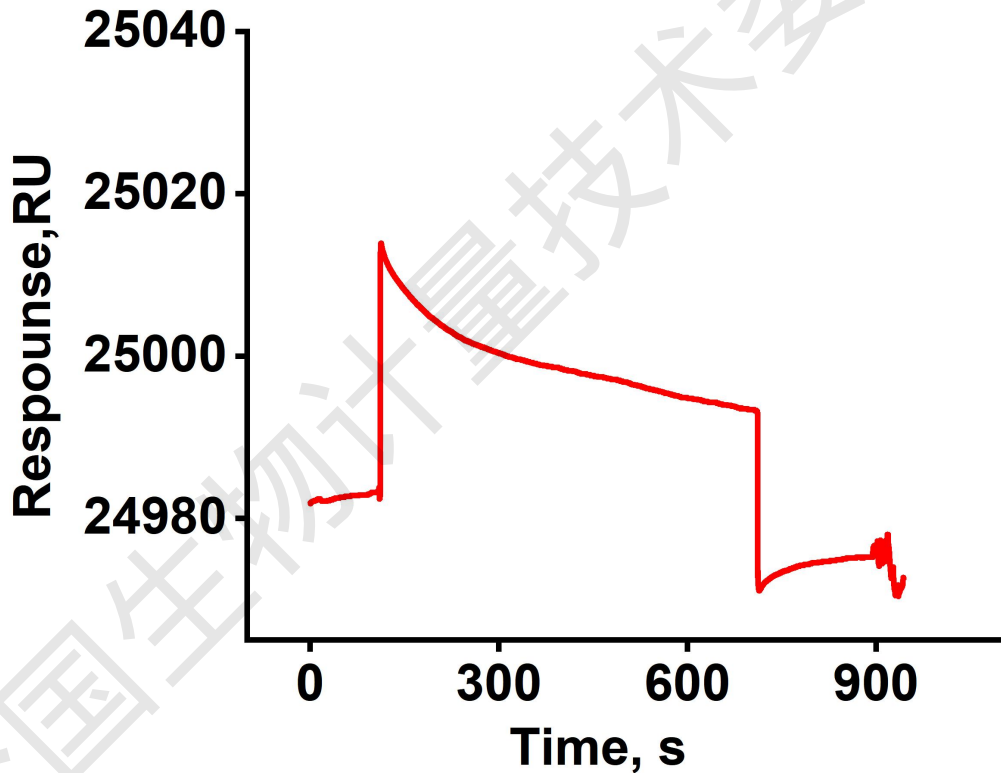


图 3 10 分钟 SPR 谱图基线情况

2、线性相关性

SPR 生物作用分析仪可以作为 ELISA 方法对活性蛋白进行定量分析，线性优良作为 SPR 生物作用分析仪仪器性能最基本最核心的指标，我们采用一系列具有明确折射率值（25℃）的溶液进行校准，得到一系列 SPR 谱图，如图 4 所示，随着折射率的增加，仪器读出的信号逐渐增加，仪器信号值与折射率值呈现

良好的线性关系，如图 5 所示。

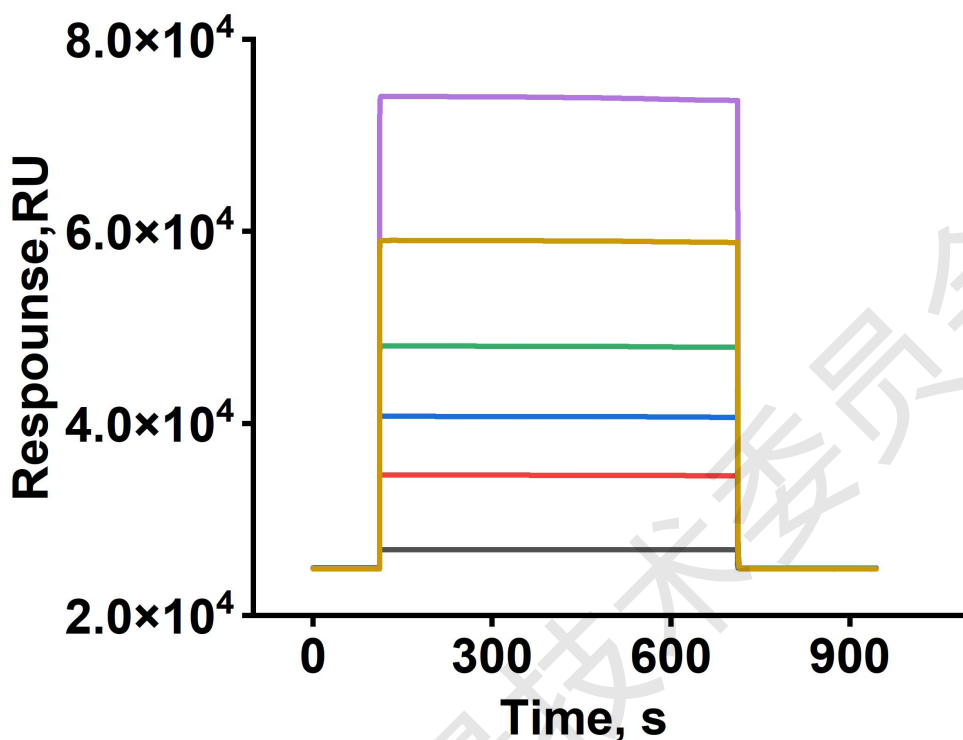


图 4 不同折射率溶液的 SPR 谱图

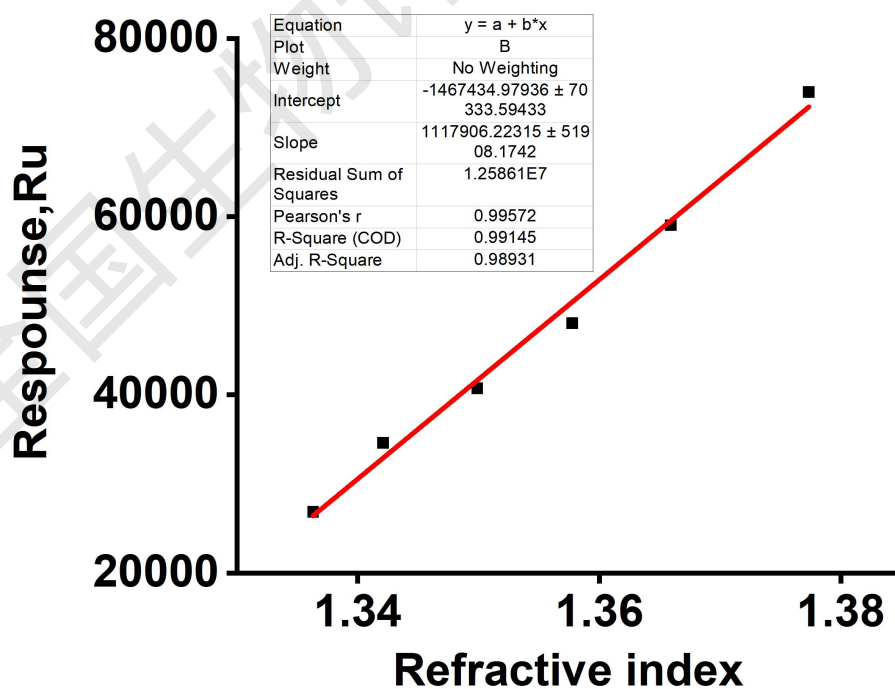


图 5 不同折射率溶液的 SPR 信号与相应的折射率值之间的线性关系

3、检测限

检测限是 SPR 生物分子相互作用分析仪的关键计量性能指标，直接影响亲和力的检测范围。由于仪器直接检测 SPR 随金属表面的**折射率变化而变化**，不同浓度的蔗糖会引起仪器检测信号的变化。由于客户进行分析互作分析时，采用缓冲溶液作为流动液，缓冲溶液本身也由一定的折射率，也会引起仪器信号的增加，因此可以选择蔗糖有证标准物质，采用客户最常用的缓冲溶液进行溶解稀释，作为检测限校准用标准溶液，通过一个完整的 SPR 谱图中蔗糖引起的信号与基线信号来计算检测限。

4、重复性

对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪重复性的校准可以反应仪器的状况，确保检测结果的准确可靠。因此，重复性是表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的一个非常重要的计量性能指标。

（六）、校准条件

本部分主要规定了表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准时需要满足的、对校准结果有影响的环境条件和标准物质。环境条件包括：温度：(15~30)℃；相对湿度：20%~80%；电源电压：(220±22)V；电源频率：(50±1)Hz。

标准物质，主要包括仪器线性相关性校准用标准溶液和仪器检测限校准用标准溶液。

仪器线性相关性校准用标准溶液：折射率溶液标准物质，至少 5 个折射率水平，最小折射率 > 1.330，最高折射率 < 1.400，并且在折射率 (1.330~1.440) 范围内均匀覆盖，相对扩展不确定度 ≤ 0.1%，包含因子 $k=2$ 。或采用分析纯蔗糖配制并采用阿贝折射仪定值，配制和定值方法参考校准规范附录 A。

仪器检测限校准用标准溶液：使用蔗糖纯度标准物质，纯度 ≥ 99.7%，扩展不确定度 ≤ 0.8%，包含因子 $k=2$ ，用分析仪系统缓冲溶液配制成 10 mg/g 的蔗糖标准溶液，配制方法参考校准规范附录 B。

（七）、校准项目和校准方法

主要针对表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪的特点，选择一定数量

的、不同型号的仪器进行试验测试。通过分析在一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪实验数据的基础上,综合表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪在实际应用中的主要功能和性能指标,考虑其具体应用的要求,形成了本规范确定的校准项目和校准方法。

1、校准项目

本部分主要规定了表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准项目包括基线噪声、基线漂移、线性相关性、检测限和测量重复性。

校准方法

(1) 基线噪声和基线漂移

采用分析仪系统缓冲溶液为样本,记录基线 10 min,基线漂移用 10 min 内基线偏离起始点最大信号值(分析仪检测器自身的物理量单位/10min)表示。选取基线中噪声信号的最大值(H_{max} ,分析仪检测器自身的物理量单位),最小值(H_{min} ,分析仪检测器自身的物理量单位),按公式(1)计算基线噪声(N_d)

$$N_d = H_{max} - H_{min} \quad (1)$$

式中:

N_d ——基线噪声,分析仪检测器自身的物理量单位;

H_{max} ——基线中噪声信号的最大值,分析仪检测器自身的物理量单位;

H_{min} ——基线中噪声信号的最小值,分析仪检测器自身的物理量单位。

(2) 线性相关性

采用含有至少 5 个折射率水平的仪器线性相关性校准用标准溶液,按照测试样品的方法,记录仪器信号值(分析仪检测器自身的物理量单位),重复进样 3 次,每次连续进样 1min,取其平均值,将测量结果的平均值与标准物质的标准值(或校准溶液的折射率测定值)进行线性回归,用软件进行线性拟合或按公式

(2) 计算线性相关系数 r 作为线性相关性的表征。

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (2)$$

式中:

r ——线性相关系数;

X_i ——第 i 点标准折射率值;

\bar{X} ——折射率平均值;

Y_i ——第 i 点信号值, 分析仪检测器自身的物理量单位;

\bar{Y} ——平均信号值, 分析仪检测器自身的物理量单位。

(3) 检测限

首先, 采用分析仪系统缓冲溶液连续进样 1 min, 作为基线, 将浓度 (1~10) mg/g 的蔗糖溶液标准物质连续进样 1 min, 作为样品谱图, 重复 3 次, 每次用分析仪自身分析软件记录信号值 (分析仪检测器自身的物理量单位), 计算信号的算术平均值。检测限按公式 (3) 计算。

$$D = \frac{2H_d \times w}{H} \quad (3)$$

式中:

D ——检测限 (最小检测浓度), mg/g;

H_d ——基线噪声, 分析仪检测器自身的物理量单位;

w ——样品的浓度, mg/g;

H ——样品信号值, 分析仪检测器自身的物理量单位。

(4) 测量重复性

将折射率约为 1.340 的折射率溶液标准物质作为样本, 连续测定 6 次, 每次进样 1 min, 记录仪器信号值 (分析仪检测器自身的物理量单位), 按式 (4) 计算分析仪测量重复性。

$$RSD = \frac{1}{\bar{k}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (k_i - \bar{k})^2}{n-1}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

RSD ——相对实验标准偏差, %;

k_i ——第 i 次信号值, 分析仪检测器自身的物理量单位;

\bar{k} ——信号值测量值平均值;

n ——测量次数。

(八)、校准结果表达

本部分规定了表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪校准结果表达的格式、内容等进行了具体的描述和规定。

(九)、复校时间间隔

本部分规定了表面等离子体共振生物分子相互作用分析仪复校时间间隔建议不超过1年。

(十)、附录

本部分主要对仪器线性相关系数校准用溶液和检测限校准用标准溶液的配制方法、校准记录参考格式、校准证书内页推荐格式、检测限测量结果的不确定度评定示例进行了具体的描述和规定。