

国家计量技术规范规程制修订

《荧光酶标分析仪校准规范》  
(征求意见稿)  
编制说明

2023年10月

# 《荧光酶标分析仪校准规范》（征求意见稿）

## 编制说明

### 一、任务来源

根据《国家市场监督管理总局办公厅关于征集 2021 年国家计量技术规范制修订和宣贯计划项目的通知》，由中国计量科学研究院牵头，联合广东省计量科学研究院、南京市计量监督检测院、江苏省计量科学研究院、上海市计量测试技术研究院、上海市质量监督检验技术研究院和黑龙江省计量检定测试研究院等 6 家单位申报《荧光酶标分析仪校准规范》的制定工作并获得批准立项。

### 二、规范制定的必要性

酶标仪是一种用途广泛的生物检验与体外诊断设备，广泛用于医院、防疫站、生物制品等部门，用于临床检验、微生物学、流行病学、免疫学、内分泌学以及农林科学等领域的定性定量检测。在进行酶标记免疫分析时，根据酶催化底物的不同，产生的物理信号变化也就不同。根据吸光度改变进行定性定量分析的，称之为酶联标记免疫分析，使用能够测量吸光度变化的酶标分析仪进行测量；根据底物产生的化学发光信号进行定性定量分析的，称之为化学发光酶联免疫分析，使用能够测量发光信号强度的微孔板化学发光分析仪进行测量；根据底物产生的荧光信号进行定性定量分析的，称之为荧光酶联免疫分析，需要使用能够测量荧光信号强度的荧光酶标分析仪进行测量。与传统的酶联标记免疫分析相比，化学发光酶联免疫分析和荧光酶联免疫分析通常具有更高的灵敏度。

为了保证酶联免疫分析结果的准确可比，原质检总局已经于 2007 年颁布实施了 JJG 861-2007《酶标分析仪》，对基于吸光度测定的酶标分析仪的计量特性指标，如示值稳定性、示值误差、重复性、灵敏度、通道差异、波长准确度和重复性等，规定了检定方法。随着荧光和化学发光酶标分析仪的应用，以及具有吸光度、荧光和化学发光同时分析的多功能酶标分析仪的出现，荧光和化学发光酶标分析仪的计量控制被提到日程上来。国家市场监督管理总局于 2020 年颁布实施了 JJF 1849-2020《微孔板化学发光分析仪校准规范》，实现了微孔板化学发光分析仪的计量控制。相关计量技术规范的起草制定，有效保证了相关仪器检测结果的准确可靠。

到目前为止，仅剩荧光酶标分析仪尚未制定计量技术规范，使得荧光酶联免疫分析成为计量控制上的一个“真空地带”，不利于检测结果的准确可比。因此，起草制定荧光酶标分析仪的校准规范，将有助于填补这项空白，保证临床等领域荧光酶联免疫分析结果的准确可靠。

### 三、《荧光酶标分析仪校准规范》的制定过程

1. 2021 年由中国计量科学研究院牵头，联合广东省计量科学研究院、南京市计量监督检测院、上海市计量测试技术研究院、江苏省计量科学研究院、上海市质量监督检验技术研究院和黑龙江省计量检定测试研究院等 6 家单位，向全国生物计量技术委员会提交了《荧光酶标分析仪校准规范》的制定申请并获得批准立项。

2. 2021-2022 年规范制定任务下达后，由中国计量科学研究院牵头，成立了规范起草小组。起草小组对国内外主要荧光酶标分析仪厂家、型号和使用情况等做了调研，确定了规范拟测量的主要技术指标，并同步展开了相关的测试和验证实验。

3. 2023 年，起草小组完成《荧光酶标分析仪校准规范（征求意见稿）》。

### 四、规范制定的主要技术依据及原则

#### （一）依据

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。校准方法及计量特性等主要参考了 JJG 537-2006《荧光分光光度计》。

#### （二）原则

##### 1、架构

根据 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的要求，本规范架构上包括封面、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、校准结果表达、复校时间间隔、附录几个部分。

##### 2、计量特性确定原则

根据荧光酶标分析仪的结构及特点、荧光酶标分析仪的检测目的等，确定荧光酶标分析仪的计量特性；计量特性确定过程中也参照了现行有效的 JJG 537-2006 荧光分光光度计，GB/T 32267-2015 分析仪器性能测定术语。

### 3、标准物质选则的原则

考虑到荧光酶标分析仪检测目的和量值溯源传递的需求，选用了硫酸奎宁、荧光素、罗丹明等标准物质，荧光酶标分析仪计量校准板、光纤光谱仪、标准汞灯、板式光谱仪、板式荧光模拟器等计量标准器。

## 五、规范制定说明

《荧光酶标分析仪校准规范》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、校准结果表达、复校时间间隔以及附录几个部分，根据 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》撰写。

### 1、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。校准方法及计量特性等主要参考了 JJG 537-2006《荧光分光光度计》。本规范为首次发布。

### 2、范围

本规范适用于各类板式荧光酶标分析仪、多功能酶标分析仪中荧光分析模块（不包含时间分辨荧光分析模块）的校准。

### 3、引用文件

本规范引用了 JJG 537-2006《荧光分光光度计》和 GB/T 32267-2015《分析仪器性能测定术语》两个规范。

### 4、概述

荧光酶标分析仪是利用酶标记抗体等方式，进行免疫分析后，将没有荧光活性的底物经过酶催化转化成具有荧光活性的标记物，在合适波长的激发光作用下发出荧光，其荧光强度与被分析物的含量相关，通过检测荧光强度分析待测物的仪器。荧光酶标分析仪一般由微孔板支架、温控装置、分光装置、光子检测装置、电源部分、计算机及软件组成。仪器采用光电倍增管（PMT）检测单光子信号，传输至放大器并经过模数转换后传输给电脑加以计算，得出检测结果。

### 5、计量特性

本规范选择了：激发波长示值误差、发射波长示值误差、重复性、线性和检出限五个计量特性。

## 6、校准条件

### 6.1 环境条件：

6.1.1 环境温度：(10~30) °C。

6.1.2 相对湿度：≤85%。

注：若制造商为设备规定了工作温、湿度范围，则应在制造商规定的温湿度范围内试验。

### 6.2 校准用的标准物质及其他设备

#### 6.2.1 荧光标准溶液

根据仪器的荧光通道类型，选择具有合适发射和激发波长的荧光物质（硫酸奎宁、荧光素、罗丹明等），配制为合适浓度的荧光标准溶液。

#### 6.2.2 荧光酶标分析仪计量校准板

测量范围为 1%~100%，扩展不确定度不大于 5% ( $k=2$ )；输出光谱峰值波长范围为 (200~800) nm，也可根据仪器的波长范围选择其他合适波长范围的计量校准板，最大允许误差±1nm。

#### 6.2.3 光纤光谱仪

测量范围 (200~800) nm，最大允许误差为±1nm。

#### 6.2.4 标准汞灯

测量范围 (250~900) nm，最大允许误差为±1nm。

#### 6.2.5 板式光谱仪

波长测量范围 (400~800) nm，最大允许误差±1nm。

#### 6.2.6 板式荧光模拟器

输出光谱峰值波长范围 (450~650) nm，最大允许误差±1nm；输出光亮度可调节，10%~100%亮度范围内线性度不低于 0.999。

注：可根据实际情况配备荧光酶标分析仪计量校准板、光纤光谱仪、标准汞灯、板式光谱仪中的一种或多种标准器。

## 7、校准项目和校准方法

### 7.1 激发波长示值误差

对于滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器激发光路侧卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{ex, i}$ ，重复三次取其平均值，根据式 (1) 计算激发波长示值误差。

对于光栅式分光的荧光酶标分析仪，选择合适的光纤及接头，连接激发光路与光纤光谱仪，或将光纤接在开孔的酶标板上，从酶标分析仪控制软件上设置所需校准的激发波长，在光纤光谱仪上选择光谱扫描模式，从低于设定激发波长 20 nm 处开始扫描，至高于设定激发波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（1）计算激发波长示值误差。

也可以使用板式光谱测量仪进行测量。将板式光谱仪置于微孔板架上，从酶标分析仪控制软件上设置所需校准的激发波长，从低于设定激发波长 20 nm 处开始扫描，至高于设定激发波长 20 nm 处为止，通过板式光谱仪的软件读出峰值波长  $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（1）计算激发波长示值误差。

$$\Delta w_{ex} = w_{ex} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{ex,i} \quad (1)$$

式中：

$\Delta w_{ex}$  —— 激发波长示值误差，nm；

$w_{ex}$  —— 激发波长滤光片标称值或激发波长设定值，nm；

$w_{ex,i}$  —— 第  $i$  次激发波长滤光片峰值波长测量值或激发光谱峰值波长测量值，nm。

## 7.2 发射波长示值误差

对于滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器发射光路侧卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（2）计算发射波长示值误差。

$$\Delta w_{em} = w_{em} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{em,i} \quad (2)$$

式中：

$\Delta w_{em}$  —— 发射波长示值误差，nm；

$w_{em}$  —— 发射波长滤光片标称值或设定值，nm；

$w_{em,i}$  —— 第  $i$  次发射波长滤光片峰值波长测量值，nm；

对于光栅式荧光酶标分析仪，选择合适的光纤及接头连接低压汞灯标准光源（或计量标准板）与荧光酶标分析仪的发射光路，打开低压汞灯（或计量标准板）

至稳定，在校准点附近选择低压汞灯（或计量标准板）的一条或几条特征谱线。在荧光酶标分析仪上选择发射光谱扫描模式，从低于汞灯标准波长（或计量标准板）20 nm 处开始扫描，至高于汞灯标准波长（或计量标准板）20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（3）计算发射波长示值误差。

也可以使用板式荧光模拟器进行测量。将板式荧光模拟器置于微孔板架上，控制其输出特定波长的标准光源。在荧光酶标分析仪上选择发射光谱扫描模式，从低于标准波长 20 nm 处开始扫描，至高于标准波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（3）计算发射波长示值误差。

$$\Delta w_{em} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{em,i} - w_{em,s} \quad (3)$$

式中：

$\Delta w_{em}$  ——发射波长示值误差，nm；

$w_{em,s}$  ——荧光酶标分析仪计量标准板波长标准值或标准汞灯值，nm；

$w_{em,i}$  ——标准波长 3 次测量平均值，nm。

### 7.3 重复性

选择合适浓度的标准溶液或荧光酶标分析仪计量标准板或板式荧光模拟器置于微孔板架上，重复测量 6 次，根据式（4）计算相对标准偏差 RSD 作为仪器重复性。

$$RSD = \frac{1}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (F_i - \bar{F})^2}{6-1}} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

RSD ——相对标准偏差，%；

$F_i$  ——第  $i$  次荧光强度的测定值，cps 或无量纲；

$\bar{F}$  ——6 次荧光强度测定结果平均值，cps 或无量纲；

$i$  ——测量序号。

### 7.4 线性

在低值至高值范围内，配制至少 5 个浓度的标准溶液（系列溶液浓度值至少相差两个数量级），每个溶液均重复测量 3 次，测量结果的平均值与标准溶液的

标准值进行线性回归，按公式（5）计算相关系数  $r$ 。

也可使用板式荧光模拟器、计量校准板等标准器进行线性测量。将板式荧光模拟器或计量校准板等标准器置于微孔板架上，先设置其标准光源的工作波长，然后分别设定其亮度为 10%、20%、40%、80%、100%（如果设定亮度超过荧光酶标分析仪的测量量程，可适当调整光源亮度），用荧光酶标分析仪测量板上中心区域校准孔荧光强度，每种亮度下重复测量 3 次，取其平均值。将测量结果的平均值与板式荧光模拟器或计量校准板等标准器的相对光强进行线性回归，按公式（5）计算相关系数。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(F_i - \bar{F})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}} \quad (5)$$

式中：

$r$ ——线性相关系数；

$x_i$ ——标准溶液的浓度值（或板式荧光模拟器等标准器光强度值）；

$\bar{x}$ ——标准溶液的浓度值（或板式荧光模拟器等标准器光强度值）的平均值；

$F_i$ ——标准溶液荧光强度（或板式荧光模拟器等标准器）的测量值；

$\bar{F}$ ——标准溶液荧光强度（或板式荧光模拟器等标准器）的测量值的平均值；

$n$ ——浓度水平（或光强度水平）的个数。

## 7.5 检出限

在荧光板中心区域选择 10 个孔内加入 0.05 mol/L 硫酸溶液做空白溶液，另 10 个孔内加入等体积  $1 \times 10^{-7}$  g/mL 硫酸奎宁标准溶液，加入的溶液体积为单孔容量的 2/3。设置仪器激发波长 350 nm、发射波长 450 nm。扫描荧光板，得到 10 个空白溶液的荧光强度和 10 个标准溶液的荧光强度。根据公式（7）-（9）计算仪器的检出限。

$$\bar{F} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_{i1} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_{i0} \quad (7)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}{n - 1}} \quad (8)$$



$$DL = \frac{C}{\bar{F}} \times 2s \quad (9)$$

式中：

$\bar{F}$  ——平均荧光强度，cps或无量纲；

$F_{i1}$  ——i次检测标准溶液的荧光强度，cps或无量纲；

$F_{i0}$  ——i次检测空白溶液的荧光强度，cps或无量纲；

$n$  ——测量次数；

$s$  ——单次测量的标准偏差，g/mL；

$DL$  ——检出限，g/mL；

$C$  ——标准溶液的浓度，g/mL。

## 8、校准结果的表达和复校时间间隔

### 8.1 校准结果处理

经校准后的荧光酶标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 A，校准证书内页格式（推荐性表格）见附录 B。

### 8.2 校准结果的测量不确定度

荧光酶标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 C。

## 9、附录

附录部分包括了：校准原始记录格式（推荐性表格）附录 A，校准证书内页格式（推荐性表格）附录 B 和校准结果测量不确定度评定示例附录 C。

《荧光酶标分析仪校准规范》起草组

2023 年 10 月