

免疫印迹分析仪校准方法探讨

黄彦捷^{1*}, 赖贵琦¹, 郑智杰¹, 吴明凯¹, 熊文峰², 张吉²

¹广东省计量科学研究院, 广东 广州

²深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司, 广东 深圳

收稿日期: 2025年6月13日; 录用日期: 2025年7月17日; 发布日期: 2025年9月3日

摘要

针对免疫印迹分析仪的校准方法展开探讨, 通过与已有免疫原理的体外诊断仪器比较, 论证了开展校准方法的必要性。通过分析仪器的结构和工作原理, 提出了校准所需的环境条件和设备要求, 重点研究了全自动和半自动免疫印迹分析仪的计量特性、校准条件及校准方法, 并详细阐述了进样体积示值误差、重复性以及泵流量稳定性等关键校准项目的实施步骤。研究旨在当前缺乏国家计量技术规范的情况下提供校准指导指南, 为仪器的计量溯源提供技术参考, 确保检测结果的准确性和可比性。

关键词

免疫印迹, 校准, 计量

Exploration of Calibration Method for Immunoblot Analyzer

Yanjie Huang^{1*}, Guiqi Lai¹, Zhijie Zheng¹, Mingkai Wu¹, Wenfeng Xiong², Ji Zhang²

¹Guangdong Provincial Institute of Metrology, Guangzhou Guangdong

²Shenzhen YHLO Biotech Co. Ltd., Shenzhen Guangdong

Received: Jun. 13th, 2025; accepted: Jul. 17th, 2025; published: Sep. 3rd, 2025

Abstract

This article explores the calibration methods for immunoblot analyzers and demonstrates the necessity of conducting calibration methods by comparing them with existing in vitro diagnostic instruments based on immunological principles. By analyzing the structure and working principle of the instrument, the environmental conditions and equipment requirements for calibration were

*通讯作者。

文章引用: 黄彦捷, 赖贵琦, 郑智杰, 吴明凯, 熊文峰, 张吉. 免疫印迹分析仪校准方法探讨[J]. 仪器与设备, 2025, 13(3): 350-358. DOI: 10.12677/iae.2025.133044

proposed. The metrological characteristics, calibration conditions, and calibration methods of fully automatic and semi-automatic immunoblotting analyzers were studied in detail, and the implementation steps of key calibration items such as injection volume indication error, repeatability, and pump flow stability were elaborated. The research aims to provide calibration guidance guidelines in the current lack of national metrological technical specifications, provide technical references for instrument metrological traceability, and ensure the accuracy and comparability of test results.

Keywords

Immunoblot, Calibration, Metrology

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

免疫印迹又称蛋白质印迹, 是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的特定蛋白的方法。通过特异性抗体对细胞或生物组织样品进行标记, 进而分析标记物的位置与信号强度, 从而获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。体外诊断领域, 免疫印迹分析仪是一种临床检验器械, 广泛应用于医疗机构和实验室中, 应用领域及对象包括: 疾控中心、医院、血液中心/血站、卫生保健中心、生物科技类企业, 第三方检测机构、试剂厂商, 食品与化妆品行业及大学研究院所等[1][2]。主要功能是通过检测人体血液中的特定抗体或抗原, 来诊断和监测各种疾病的发展情况, 主要用于诊断感染疾病(HIV、乙肝、梅毒)、自身免疫性疾病检测(风湿性关节炎、自身免疫肝病)及过敏原检测(吸入性和食物性过敏原)等[3][4]。特别是过敏原项目, 基于抗原抗体的特异性结合可实现对检测复杂样品如人体血液中的特异性过敏源 IgE 抗体定量检测。

本文主要针对目前体外诊断领域基于免疫印迹原理的蛋白质分析仪的校准。免疫印迹仪的工作原理是通过将抗原包被到硝酸纤维素膜上, 通过抗原抗体作用捕获血清中特异性抗体, 最后利用针对人抗体的标记二抗与抗体结合定量抗体含量。根据自动化程度的不同分为全自动免疫印迹分析仪和半自动免疫印迹分析仪两种。全自动免疫印迹分析仪主要由控制系统(包括蠕动泵模块、加样模块、温控模块)、检测系统、应用软件系统组成。半自动免疫印迹分析仪主要由检测系统、应用软件系统组成。目前我国还未制定免疫印迹分析仪的国家校准规范或检定规程, 因此, 开展全自动免疫印迹分析仪校准方法探讨, 有助于解决仪器溯源关键问题, 促进检测结果的一致性和可比性, 保证检验结果准确可靠。

2. 国内同类型仪器校准方法比较

国内关于蛋白质测定类的仪器, 除了 2 类适用于具体某一品种蛋白质的如 JJF 1841-2020《糖化血红蛋白分析仪校准规范》[5]及 JJF 2057-2023《C 反应蛋白分析仪校准规范》外, 不同原理的蛋白质测定仪器包括: 目前已发布的 JJF 1752-2019《全自动封闭型发光免疫分析仪校准规范》[6][7]、JJF 2035-2023《斑点酶联免疫分析仪校准规范》、JJF 2089-2023《全自动酶联免疫分析仪校准规范》[8]、JJF 2116-2024《特定蛋白分析仪校准规范》、JJF 2202-2025《便携式荧光免疫分析仪校准规范》及 JJF 2201-2025《胶体金免疫分析仪校准规范》等 6 类, 已报审或已立项的有《时间分辨荧光免疫分析仪校准规范》[9]。

与上述 7 类仪器设备相比, 免疫印迹分析仪的原理、结构、结果判读方式及应用领域均有较大差异, 如表 1 所示。因此开展免疫印迹分析仪校准方法探讨十分必要。在计量特性的设置上, 拟对进样体积的

相对示值误差和进样体积的重复性、泵流量设定值允许误差及稳定性、温度示值误差、检测器分辨率、重复性及线性范围、临床项目示值误差等进行校准。其中设置线性、重复性及示值误差是蛋白免疫分析类仪器常考察的计量特性,可借鉴现有免疫类仪器的国家计量技术规范在校准方法进行研究[6][8]。进样体积及流动泵流量则充分考察了全自动免疫印迹分析仪的自动化性能,温度则是对免疫反应的重要环境保障,具体可借鉴现有的液相色谱等国家计量技术规范在校准方法进行研究[10]。

Table 1. Comparison of *in vitro* diagnostic instruments based on immune principles

表 1. 基于免疫原理的体外诊断仪器比较

序号	仪器名称	仪器原理	计量特性	应用领域
1	免疫印迹分析仪	蛋白质印迹原理,用电转移的方法将蛋白转移到固相膜上,根据显色情况判断	进样体积的相对示值误差和进样体积的重复性,泵流量设定值允许误差及稳定性,温度示值误差、检测器分辨率,重复性及线性范围,临床项目示值误差	诊断感染疾病、自身免疫性疾病检测及过敏原检测
2	全自动封闭型发光免疫分析仪	化学发光或电化学发光免疫原理,将发光反应发出的光信号转变为数字信号,由数据处理系统经过计算得出浓度值	重复性,示值误差,线性,携带污染率	传染性疾病、优生优育初筛、自身抗体筛查,肿瘤标志物
3	斑点酶联免疫分析仪	酶联免疫原理,获取微孔反应板上孔内斑点图像,然后通过显示系统进行斑点统计,得到该孔内斑点总数	斑点计数示值误差,重复性	酶联免疫斑点及病毒斑、菌落、克隆斑等微生物斑点
4	全自动酶联免疫分析仪	酶联免疫原理,获取微孔反应板上孔内斑点图像,然后通过显示系统进行斑点统计,得到该孔内斑点总数	加液体积示值误差和重复性,孵育温度示值误差,洗涤残留,吸光度示值误差、示值稳定性、重复性、通道差异和线性	酶联免疫斑点及病毒斑、菌落、克隆斑等微生物斑点
5	特定蛋白分析仪	散射光比浊原理,利用抗原与抗体在特殊反应体系中反应形成复合物,在促聚作用下出现浊度,通过散射光或透射光强度得到样品中特定蛋白的浓度	加液体积示值误差和重复性,温度偏差、稳定性,特定蛋白测量示值误差、重复性,携带污染率,线性相关性	免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM
6	时间分辨荧光免疫分析仪	免疫荧光原理,将时间分辨荧光信号转变为数字信号,由数据处理系统经过计算得出浓度值	检测限,线性,重复性,温度示值误差、波动度,分析项目浓度示值误差、重复性	甲状腺功能、性腺激素、肿瘤、感染性疾病指标、心脑血管疾病
7	便携式荧光免疫分析仪	免疫层析原理,通过传感器将检测试剂卡的反射率信号转为光电信号,通过校准信息将光电信号转为相应的浓度值或阈值,对检测物进行分析	重复性(T线、C线),示值误差,线性	甲状腺功能、性腺激素、肿瘤、感染性疾病指标、心脑血管疾病

续表

8	胶体金免疫分析仪校准规范	免疫层析原理, 采用免疫分析方法检测样本中特定靶标的分析仪器, 可按照设定的程序自动、完成加样、孵育、检测等整个分析过程, 通过检测免疫反应时产生的化学发光或电化学发光信号实现特定靶标定量检测	重复性, 示值误差线性	感染性疾病、心脑血管疾病、肾脏疾病、糖尿病及优生优育项目
---	--------------	--	-------------	------------------------------

3. 校准条件

为了开发适用于基于蛋白质印迹原理的免疫印迹分析仪的校准, 依据现有类似仪器的国家计量技术规范[5]-[10], 对免疫印迹分析仪校准过程中的环境、设备等条件做出规定, 设置免疫印迹分析仪的计量特性考察指标(表 2), 将详细规定用于校准这些计量特性指标的标准器、标准物质、温度测量装置、秒表、电子天平及配套计量器具的计量性能要求, 计量特性指标的校准步骤和方法。

Table 2. Metrological characteristics of immunoblot analyzer
表 2. 免疫印记分析仪计量特性

序号	计量特性	计量特性指标
1	进样体积的相对示值误差*	4%
2	进样体积的重复性*	2%
3	泵流量设定值允许误差*	5%
4	泵流量设定值稳定性*	3%
5	检测器分辨率*	/
6	检测器重复性	3%
7	检测器线性	$R \geq 0.99$
8	温度示值误差*	$\pm 1.5^{\circ}\text{C}$
9	临床项目示值误差	20%

注: ① 以上技术指标不用于合格判别, 仅供参考, 计量性能指标可参照分析仪制造厂商给出的技术要求。② “*” 项目仅仅适合于全自动免疫印迹分析仪的校准, 不适用于半自动免疫印迹分析仪的校准。

3.1. 环境条件

校准的环境温度范围为(15~30) $^{\circ}\text{C}$; 湿度要求小于等于 85% RH。室内应具备良好的防尘措施, 为防止干扰, 仪器应远离振动、电磁干扰。

3.2. 设备条件

校准使用的标准物质应是经国家计量行政部门批准颁布的具有互换性的 IgE 抗体标准物质(户尘螨、蒿属花粉免疫球蛋白 E 等), 扩展不确定度不大于 20%, $k=2$ 。由于免疫分析存在基质效应, 校准示值误差时不建议将有证标准物质稀释使用, 否则可能影响互换性[11] [12]。

校准过程中所使用的电子天平的分度值应为 0.01 mg, 准确度等级为①级; 温度计及温度测量仪的最大允许误差不超过 0.1 $^{\circ}\text{C}$; 秒表的最小分度值不大于 0.1 s; 标准灰度卡应不少于 5 个灰度, 且反射比 ρ 测

量结果范围均匀分布在 0.121~0.778, $Ur \leq 1.0\%$ ($k=2$)。

为保证数据的可靠性, 上述所用到的设备都需要经过计量检定或校准, 且处于有效期内。

4. 校准项目及方法

4.1. 进样体积的相对示值误差和进样体积的重复性

根据设定体积对应的实验温度下纯水的质量, 换算为进样体积, 计算示值误差及重复性。

将可密封容器在分度值为 0.01 mg 的电子天平上称量质量, 去盖后放到分析仪板架的合适位置, 控制样品针往该容器中加入 10 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 10 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 1000 μL , 计算 1000 μL 校准点的加液体积示值误差。每一根加液针都按上述方法进行校准, 并分别报告结果。

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

式中:

V ——加液体积, μL ;

m ——容器和纯水的总质量, mg;

m_0 ——容器质量, mg;

ρ_t ——实验温度下水的密度, g/cm^3 。

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

式中:

R_V ——加液体积重复性, %;

\bar{V} ——6 次加液体积测量结果平均值, μL ;

n ——测量次数, $n=6$ 。

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

式中:

V_0 ——体积设定值, μL ;

V_i ——第 i 次加液体积测量结果, μL ;

E_V ——加液体积相对示值误差, %。

4.2. 泵流量设定值允许误差及稳定性

按要求设定流量, 启动仪器, 压力稳定后, 在流动相出口处用事先称重过的洁净容量瓶收集流动相, 同时用秒表计时, 收集规定时间流出的流动相, 在分析天平上称重, 按公式(4)计算流量实测值 F_m 按公式(5)、公式(6)计算 S_s 和 S_R 。每一设定流量, 重复测量 3 次。

$$F_m = \frac{m - m_0}{\rho_t \times t} \quad (4)$$

式中:

- F_m ——流量实测值, mL/min;
- m ——容器和纯水的总质量, g;
- m_0 ——容器质量, g;
- ρ_t ——实验温度下水的密度, g/cm³;
- t ——收集流动相的时间, min。

$$S_s = \frac{\bar{F}_m - F_s}{F_s} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

- S_s ——泵流量设定值相对误差, %;
- \bar{F}_m ——同一设定流量 3 次测量值的算术平均值, mL/min;
- F_s ——流量设定值, mL/min。

$$S_R = \frac{F_{\max} - F_{\min}}{\bar{F}_m} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

- S_R ——泵流量稳定性, %;
- F_{\max} ——同一设定流量 3 次测量值的最大值, mL/min;
- F_{\min} ——同一设定流量 3 次测量值的最小值, mL/min。

4.3. 检测器分辨率

将分辨率测试标准图卡置于拍摄腔内拍摄成像, 直接保存成像结果, 通过软件读出分辨率。

4.4. 检测器重复性

选取中间反射比值的标准灰阶卡, 将标准灰阶卡放置在检测模块上, 直接使用分析仪测定此时的测量值 x_i , 重复测定 6 次, 记录仪器示值, 并计算平均值, 按公式(7)计算相对实验标准偏差, 作为分析仪的重复性结果。

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

- x_i ——标准灰阶卡第 i 次测量值;
- \bar{x} ——标准灰阶卡强度平均值;
- n ——重复测量次数, $n = 6$;
- s_r ——检测器重复性, %。

4.5. 检测器线性

在低值至高值范围内, 对至少 5 个反射比值的标准灰阶卡进行测量, 重复测量 3 次, 取均值作为测量值, 各被分析项目均得到一组不同浓度的测量值(y_i)。在各被分析项目不同浓度的测量值(y_i)和其对应的不同浓度的标准值(x_i)之间, 按公式(8)计算线性相关系数(r)作为线性的表征。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (8)$$

式中:

- r ——线性相关系数;
- x_i ——各标准灰阶卡的标准值;
- \bar{x} ——各标准灰阶卡标准反射比值的平均值;
- y_i ——各标准灰阶卡的测量值;
- \bar{y} ——各标准灰阶卡的测量值的平均值;
- n ——被分析各标准灰阶卡的个数。

4.6. 温度示值误差

将分析仪温度设置为 37.0℃或仪器常用反应温度,把温度计或温度测量仪的传感器放置在反应模块上,平衡 30 min 待读数稳定后,根据公式(9)分别计算并报告上述代表性孔位的孵育温度示值误差。

$$E_T = T_0 - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 T_i \quad (9)$$

式中:

- T_0 ——孵育温度设定值,℃;
- T_i ——第 i 次温度测量结果,℃;
- E_T ——孵育温度示值误差,%。

4.7. 临床项目示值误差

示值误差的校准宜采用 IgE 抗体有证标准物质等标准物质。通常情况下,检测项目的校准点至少应当包括 1 个低值点 1 个高值点,低值点和高值点至少应相差一个数量级,且低值点和高值点应覆盖客户要求的校准点或校准区间;当客户要求时,也可进行单点校准。

分别测量选定检测项目的校准点,每个校准点分别重复测量 3 次,计算 3 次测量结果的平均值。根据公式(9)计算示值误差:

$$\Delta c = \bar{c} - c_s \quad (10)$$

式中:

- Δc ——示值误差;
 - \bar{c} ——3 次测量结果的平均值;
 - c_s ——标准值。
- 注:单位与标准物质标准值的单位一致。

5. 不确定度评定

以临床项目示值误差为例,不确定度来源包括:免疫印记分析仪测量重复性引入的标准不确定度 $u(\bar{c})$ 及标准物质引入的标准不确定度 $u(c_s)$ 。下面以一次免疫印记分析仪校准为例具体分析其测量不确定度,在校准中选用 GBW(E)090941 户尘螨特异性 IgE 抗体血清(液体)标准物质,其标准值为 (28.4 ± 5.4) IU/mL ($k=2$)。

对该标准物质连续测定 10 次测定的结果分别为(单位: IU/mL): 30.4、30.6、31.9、32.3、29.5、31.0、

29.4、31.2、30.4 和 29.5，则单次测量结果的标准偏差为：

$$s(c_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}{n-1}} \times 100\% \approx 1.0 \text{ (IU/mL)} \quad (11)$$

实际校准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： $u(\bar{c}) = s(c_i) / \sqrt{3} = 0.6 \text{ (IU/mL)}$ 。

由标准物质引入的不确定度分量 $U(c_s)$ 可以根据标准物质证书提供的扩展不确定度 $U(c_s)$ 和包含因子 k ，则：

$$U(c_s) = \frac{U(c_s)}{k} = 2.7 \text{ (IU/mL)} \quad (12)$$

合成标准不确定度： $u(c) = \sqrt{u(\bar{c})^2 + u(c_s)^2} = 2.8 \text{ (IU/mL)}$ 。扩展不确定度 $U = 5.6 \text{ IU/mL}$ ($k = 2$)。

6. 总结与展望

根据免疫印迹分析仪的测量特性，参照国内外通用做法及国内实际情况，制定合理的校准方法，保证仪器能够有效溯源，探索了计量特性的校准方法和校准用标准物质的选择，规范了校准用标准计量器具的技术要求，建立了免疫印迹分析仪的校准方案。

未来随着免疫印迹校准规范颁布和宣贯，国内省市计量院及第三方计量机构将建立起相关仪器的计量标准，相关人员经过培训后，即可掌握免疫印迹分析仪的校准方法，从而满足当前临床检测行业产品质量检测技术发展的需要，使之符合国家相关技术标准的要求，保证量值统一、可靠，保证检测结果互认，带来广泛的社会效益及间接经济效益。

基金项目

广东省省级科技计划项目(2023A1111120024)、广东省市场监督管理局科技项目(2024ZZ03、2025ZJ01)、国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK093)。

参考文献

- [1] 李红梅, 龙明望, 付雪, 等. 免疫印迹法检测抗可提取性核抗原抗体室内质控品自制及性能评估[J]. 延边大学学报, 2025, 48(5): 136-138.
- [2] 张旭东, 向莉, 李启亮, 等. 荧光酶联免疫法和免疫印迹法检测过敏原特异性免疫球蛋白 E 一致性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2024, 31(1): 151-156+175.
- [3] 朱菊英, 贺爱平, 尹梅丹, 等. 免疫印迹法检测过敏原用于过敏性皮肤病诊断的价值[J]. 实用医技杂志, 2023, 30(7): 508-511.
- [4] 胡传玺, 刘灵燕, 李漫. 间接免疫荧光法、线性免疫印迹法、化学发光法单项和联合检测抗核抗体的临床价值[J]. 检验医学, 2024, 39(11): 1072-1077.
- [5] 李晶晶, 赵海波, 翟睿, 等. 糖化血红蛋白(HbA1c)检测技术与标准化研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(6): 837-846.
- [6] 全国生物计量技术委员会. JJF 1752-2019 全自动封闭型发光免疫分析仪[S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 2019.
- [7] 武利庆, 金有训, 黄志凡, 等. JJF1752-2019《全自动封闭型发光免疫分析仪校准规范》解读[J]. 中国计量, 2022(3): 131-133.
- [8] 全国生物计量技术委员会. JJF 2089-2023 全自动酶联免疫分析仪校准规范[S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 2023.
- [9] 周瑾艳, 武利庆, 黄彦捷, 等. 时间分辨荧光免疫分析仪的校准方法研究[J]. 中国测试, 2024, 50(S1): 305-310.

- [10] 全国物理化学计量技术委员会. JJG 705-2014 液相色谱仪[S]. 北京: 国家质量监督检验检疫总局, 2014.
- [11] 孙江漫, 李增心, 邵燕, 等. 具有溯源性和互换性的总蛋白标准物质在常规系统中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2024, 31(7): 1333-1337.
- [12] 全国标准物质计量技术委员会. 检验医学标准物质互换性评估要求: JJF 2155-2024 [S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 2024.