FUJIFILM
Value from Innovation

Wako

ELISA A to Z

若林克己
群马大学名誉教授

由富士胶片和光翻译和制作

ELISA — A to Z —

目　录

序论——关于免疫分析

A. 何谓检测 ---- 4

B. 评估检测方法 ---- 5

C. 何谓免疫分析法? ---- 6

D. 免疫分析的有效性? ---- 14

I. ELISA入门 ---- 17

ELISA如何使用抗体?

Shibayagi使用的酶和显色底物

最后步骤——检测吸光度

II. ELISA的实操

A. Shibayagi试剂盒操作指南 ---- 20

1. 孔板、标准溶液、样品溶液、试剂溶液恢复至室温后再进行添加、分注
2. 试剂溶液的制备法
3. 抗体固相化孔板的结构和使用方法
4. 孔板的清洗方法
5. 标准溶液与样品的移液和添加方法
6. 试剂溶液的添加方法
7. 搅拌操作
8. 酶标仪和吸光度检测
9. 为什么不能每个孔加入一种样品?
10. 试剂盒使用的注意事项

B. 移液器的种类与注意事项 ---- 29

C. 移液器的精确度与检测精确度的关系——ELISA的优势 ---- 32

D. 废液等试剂的处理方法 ---- 33

III. 更多关于ELISA的信息

A. 关于误差 ---- 34

1. 偶然误差/随机误差
2. 系统误差
3. 严重错误

B. 分析方法验证项目的要求 ---------- 35
C. ELISA中的标准曲线与检测值的计算 ---------- 36
1. ELISA的指标
2. 如何在ELISA中计算检测值
3. 标准曲线的验证
4. ELISA的吸光度偏差如何反映在检测值中
5. 模拟结合量与标准曲线
D. 精确度（precision）相关的参数与计算 ---------- 51
1. 重复性（repeatability）和室内再现性（intermediate precision）的计算
2. 室间再现性（reproducibility）
E. 评估准确度（accuracy、trueness）的实用实验方法 ---------- 54
1. 稀释线性测试（研究血液成分是否有影响）（dilution linearity test）
2. 加标回收测试（recovery test，spike recovery test）
3. 与其他检测系统的相关性测试
F. 检测样品的稳定性 ---------- 56
G. 检测系统的稳健性（robustness） ---------- 58
H. 精确度管理——通过控制图对每次检测进行评估 ---------- 58
I. 改善ELISA的性能 ---------- 60
1. 关于样品重复次数（Replicate）和检测平均值的可靠性
2. 边缘效应（Edge effect）和解决方案
3. 样品中血清 成分的影响和解决方案
4. 关于血液样品的pH
5. 移液器和移液时的注意事项
6. 关于样品与试剂盒的适应性测试
7. 通过改善清洗方法，降低空白的非特异性吸附导致的吸光度增加
8. ELISA操作的注意事项总结
9. 通过能力测试提升操作技巧

IV. 附录

附录1：血液样品的采集方法 ---------- 65
附录2：关于肽溶液与试剂溶液的制备 ---------- 65

ELISA — A to Z —

序论——关于免疫分析

A. 何谓检测

1. 定性检测：最简单的方法，用于判断有无

这种方法只能获得“+”或“-”的结果（“有”或“无”）。因此，在统计处理结果时只能分析出现率，信息量极少。

2. 定量检测：可用数量表示绝对量、相对量和活性

这种方法除了获得“有”或“无”的信息外，还能获得“有多少”的信息。
因此可进行多种统计处理，并从各方面进行评估。

Measurement：广义指测量“尺寸、大小、范围、长度、厚度、深度、数量”，也指通过测量得到的数值。

Assay：本意为

1. 矿石检测。检测金银的含量。
2. 分析或评估。表示分析结果中的含量。
   也指矿石检测、分析评估、分析物、待测定的物质、（测定）分析表等等。

在医学、生物学、化学中，Dorland’s Medical Dictionary中的定义是：
Determination of the purity of a substance or the amount of any particular constituent of a mixture.
即指，“测定物质的纯度或混合物中任何特定成分的含量”。这需要配合物质分离方法，或高特异性的检测系统。

3. 绝对量和相对量的检测

绝对量的模糊定义是指“事物的固有量（见日语词典《広辞苑》）”。例如，可以用“克”表示质量。当提到“克”，就能联想到是物质的重量。

检测的目的就是使用克（mg、μg、ng）等单位来表示待测物质，但这并不适用于所有情况。

例如，有时我们会遇到不得不用“效价”（potency），“活性”（activity）或其他必须用“单位”（unit）来表示的情况。这些被称为相对量。若不了解这些相对量的定义，则难以理解其含义。

可用绝对量表示的物质：例如，可获取100%纯度的类固醇，甲状腺激素，组胺等小分子物质，其拥有稳定的生物活性，所以能够放心地用重量（质量）来表示。

只能用相对量表示的物质：例如，难以获取100%纯度的蛋白激素、酶等大分子物质。最近，大分子物质也出现了合成品和纯化品，也会使用重量来表示。但是，这类物质具有生理活性，不同种类的分子其效价可能不同，还可能会有失活的情况发生，出现以上情况时使用重量等绝对量来表示的意义就不是特别大。这种情况下，使用其他单位表示生理活性更合适。此外，当抗体等物质以抗原结合为指标检测时，也需要使用活性和效价来表示，而非使用重量。

注意事项

关于“mole”和“M”

经常被混淆的单位，使用时需要十分注意。

mole（摩尔，符号为mol）：**物质的量的单位**。旧称克分子。mole是物质的量（以克计），在数值上等于其分子量。例如A物质的分子量为350，则1 mole为350 g。1 mole中，该物质的分子含有6.022045×10^{23}个（这是阿伏伽德罗常数，Avogadro number）分子。换言之，某物质6.022045×10^{23}个分子的重量为1 mole。

M（molarity）：**浓度单位**。它指的是1 mole物质溶解于1升溶液中的浓度。即指1 mol/L，而非指1升溶剂中溶解了1 mole物质。若错写成molality的话，就代表重量摩尔浓度，即指溶解于1 kg溶剂中溶质的摩尔数，mol/kg。

在检测领域中，通常使用nM、pM、fM、aM等单位。

*$n=10^{-9}$（纳）、$p=10^{-12}$（皮）、$f=10^{-15}$（飞）、$a=10^{-18}$（阿）。

关于测量值的表示方式

检测的测量结果有两种表示方式，即重量与浓度。

使用重量表示时：检测中使用的试管（tube）、或是板孔（well）大小的标准品的重量或单位，一般为ng/tube、ng/well或mU/tube、mU/well等。

使用浓度表示时：1 mL或1 dL检测样品所含标准品的重量或单位，一般为pg/mL、ng/dL等。

若使用错误的单位会引起严重的错误。假设使用100 µL样品进行检测时使用pg/mL表示，数值则会变成比使用pg/well大10倍。

进行实验时，需要十分注意标准曲线横轴上标示的表示方式。

4. 关于标准物质（标准品）

为表示相对的物质时，需设定适当的标准，并以其为“单位”作标尺，常见于激素研究中。

“单位（U）”是通过将特定的生物活性量设置为1 U来确定的，或者由国际组织（例如WHO）会制备规定的标准品，并确定其效价为每mg对应多少“U”后进行公布。例如NIG-LH-S1、NIG-FSH-S1等为1 mg对应1NIH-U。

基于生物活性单位的定义方法，例如，PTH（甲状旁腺激素）的100 USP unit定义为使体重8-16 kg的狗在16-18小时内血Ca值上升1 mg/dL的PTH量。而降钙素的10 MRC mU定义为使体重100 g的绝食雄性大鼠静脉注射1 h后血Ca值降低10%的量。

无论如何，测量值都是通过将国际标准品与待测样品进行比较来计算的。

B. 评估检测方法

检测方法的评估从两方面进行。

一个是通过检测系统的有效性进行评估，特别是以临床应用为目的时，评估的结果会影响试剂盒的销售，这对于生产商来说至关重要。

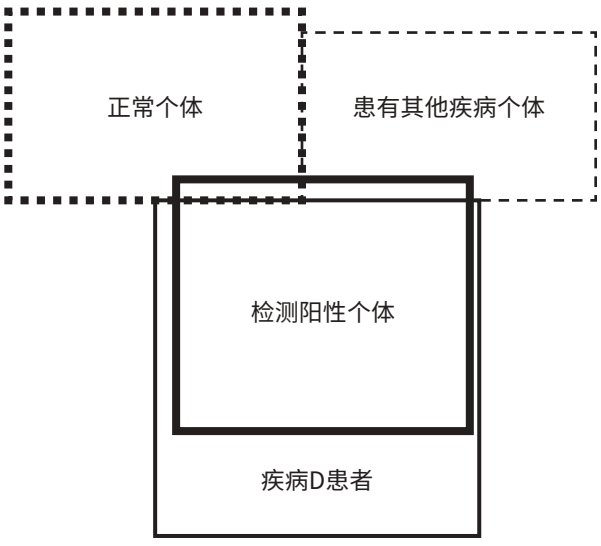
另一个是试剂盒本身的性能，即评估能否准确且精确地检测目标物质。

1. 作为诊断标记有效性的调查和评估

若希望了解检测方法是否符合预期目的，例如想要将其应用于某种疾病的临床诊断时，需判断其作为诊断方法的有效性。

以诊断疾病“D”为例，考虑“D”与“正常人或其他疾病”的情况。

检测法的有效性



灵敏度:“D”的患者中检测呈阳性的百分比是多少?(阳性的定义也很重要)

在定性检测中,阳性指检测到了反应。

在定量检测中,阳性指大于截止值(Cut-off Value)的检测值(截止值一般使用正常个体(阴性)的检测平均值+2(或3)SD为高值,平均值-2(或3)SD为低值)。

SD:标准偏差

(当样品数较多时,平均值±2SD的范围约占整体的95%)

特异性:阳性检测个体中,“D”患者的百分比?

*请注意,这里所述的灵敏度与特异性,与检测方法性能中描述的灵敏度与特异性的定义不同。

高灵敏度与高特异性→有效性高

2. 调查和评估是否可正确且精确地进行检测

正确且精确地进行检测与上述的有效性无关,是指能否可靠地在样品中确定待测物质的重量或浓度的性能。

性能的评估一般称为验证(validate or validation),进行该测试则称为有效性测试(validity test)。

关于需要使用何种评估法,可参考国际协议ICH(International Conference of Harmonization,人用药品技术要求国际协调理事会)、日本药典修正案的参考信息、厚生劳动省的通知等。其内容和检测验证相关的内容将另外介绍。

C. 何谓免疫分析法?

免疫分析法(Immunoassay)是指将亲和性强且特异性良好的抗体用作结合试剂的检测法。

1. 何谓抗体?

“抗体”(antibody)是异物、抗原(antigen)进入体内引发免疫反应而产生的蛋白质的总称,其特征是能够与抗原特异性结合。

抗体作为蛋白,属于免疫球蛋白(Ig)。

(除抗体外,还包含正常γ球蛋白,骨髓瘤蛋白,J链等)

免疫球蛋白分为五类,包含免疫球蛋白G(IgG)、M(IgM)、A(IgA)、D(IgD)、E(IgE)。

IgG的基本结构:IgG由H链(MW 5~7万)与L链(2.3万)组成。

一般由2根H链,2根L链组成。

每一类的H链都具有特征性的结构,分为γ(IgG)、μ(IgM)、α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)五种。

L链也有λ、κ两种。

可变区与恒定区

可变区:即使是同种动物的同一类别抗体,其H链、L链的N端部分的氨基酸序列也并非恒定

(V_L、V_H)・・・与抗原结合的部位

恒定区:在类和亚类中,可变区以外的区域具有恒定的氨基酸序列(C_L、C_H)

IgG的分子量约15万,IgA(基本结构的二聚体+J链)约39万,IgD为17~20万,IgE约19万,IgM(基本结构的五聚体+J链)约90万。

注:J链:组成Ig、IgM的多肽链,分子量为1.5万。有助于形成基本分子聚合物的链。

何谓抗原?

抗原是具有免疫原性(immunogenicity),并且能与抗体特异性结合(specific binding)的物质。

半抗原(hapten):能够与抗体结合,但不能产生抗体的物质(小分子物质)。

单克隆抗体与多克隆抗体

常规免疫法制备的抗体因产生它们的细胞不一定相同,所以可变区的结构并非恒定,因此抗原识别位点和对抗原的亲和性等具有多样性,这些抗体组合在一起就称为多克隆抗体。

由于多克隆抗体会与抗原的不同位点结合,其抗原识别位点非恒定,还可能会与其他结构相似的抗原结合,所以在特异性方面具有劣势。另一方面,多克隆抗体具有"bonus effect",可增加其表观亲和力;在抗体过剩的区域会由于形成大分子聚集体而出现沉淀反应。

与之相反,单克隆抗体的一级结构一致,抗原识别位点恒定。因此能够作为具有明确特异性的结合试剂使用。另外,即使在抗体过剩的区域也不会出现沉降反应。一般来说,单克隆抗体的亲和性也不是很高。

制备抗体需要什么?

● 多克隆抗体

制备抗体需要向不同种的动物同时给药某种动物的抗原和免疫佐剂进行免疫。

对于半抗原物质,需要将其与作为载体的高分子物质结合后进行免疫。有时也会将抗原的部分氨基酸序列与载体结合再进行免疫。

免疫方法包括将免疫佐剂(adjuvant)同时重复给药皮内多个部位的方法,和直接给药淋巴结的方法等。

进行免疫后,初次免疫应答(活体初次与抗体接触时的反应)主要产生IgM。

二次免疫应答(初次免疫应答后,与相同抗原再次接触时的免疫反应。由于免疫记忆的产生*,应答速度快,血液中的抗体效价也会显著上升)主要产生IgG(该过程称为抗体类别转换)。

*免疫记忆指由于初次免疫,导致长寿的特异性T细胞及B细胞克隆增加。

● 单克隆抗体

为了获得单克隆抗体产生细胞,首先对小鼠等动物进行免疫,并从该动物脾脏中提取抗体产生细胞,置于培养体系,与骨髓瘤细胞(myeloma细胞)融合;然后,将细胞(杂交瘤)稀释至每孔1个细胞并继续培养(克隆化),分析培养基中抗体的性质,仅选择产生所需抗体的细胞并增殖;最后通过将细胞植入小鼠腹腔内进一步增殖,可收获分泌至腹水中的抗体。这是通过巧妙地使用具有肿瘤细胞的增殖性和抗体产生细胞功能的杂交瘤(杂交肿瘤细胞)制备而成的物质。

如何利用抗体?

免疫分析法中,抗体作为高特异性的结合试剂使用。

抗体一般无需分离和纯化直接作为抗血清,或作为IgG组分使用。

因其特异性高,所以无需纯化。

抗体可以在溶液状态下使用,或是吸附在试管或板孔的表面(coating),用于捕获待测抗原(作为捕获抗体或固相化抗体)。后者为了增加固相化抗体的量,需要对抗体进行纯化。

此外,在非竞争性检测系统中,会使用酶或生物素标记抗体,用于测量与捕获抗体结合的抗原量。

2. 免疫分析的历史

利用免疫结合反应和沉淀反应等检测物质的方法由来已久。

简单的定性方法包括利用抗体溶液和抗原溶液界面的沉淀反应来测量抗体滴度的实验、使用琼脂板的琼脂扩散实验(Ouchterlony test)。半定量的方法包括红细胞凝集反应、乳胶凝集反应、补体结合反应等实验。

定性的免疫分析始于S. A. Berson和R. S. Yalow的放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)后,详情请参考以下两篇论文。

1) Insulin-I^{131} metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subject.
Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothchild, M. A. and Newerly, K.
J. Clin. Invest. 35, 170-190, 1956

该论文为了探讨糖尿病病因是患者血液中胰岛素的分解这一假说,使用放射性碘标记胰岛素,并与患者的血清共同孵育后,通过滤纸电泳中标记胰岛素的位置来研究胰岛素与糖尿病患者血液中的胰岛素抗体的结合情况。

由于当时普遍认为胰岛素等激素无法形成抗体,所以没有在标题中使用“胰岛素抗体”,而是使用了“胰岛素结合球蛋白”这一表述。(因为糖尿病患者长时间接受猪胰岛素治疗,所以产生了胰岛素抗体。)该论文向一定量的^{131}I标记胰岛素添加患者的血清,再添加非标记胰岛素时,发现与抗体结合的标记胰岛素的量会根据添加的非标记胰岛素的量减少。该论文首次阐明了竞争性结合的原理,并促成了竞争性放射免疫法(RIA)的建立。关于这篇文章,还有一段有趣的小故事:

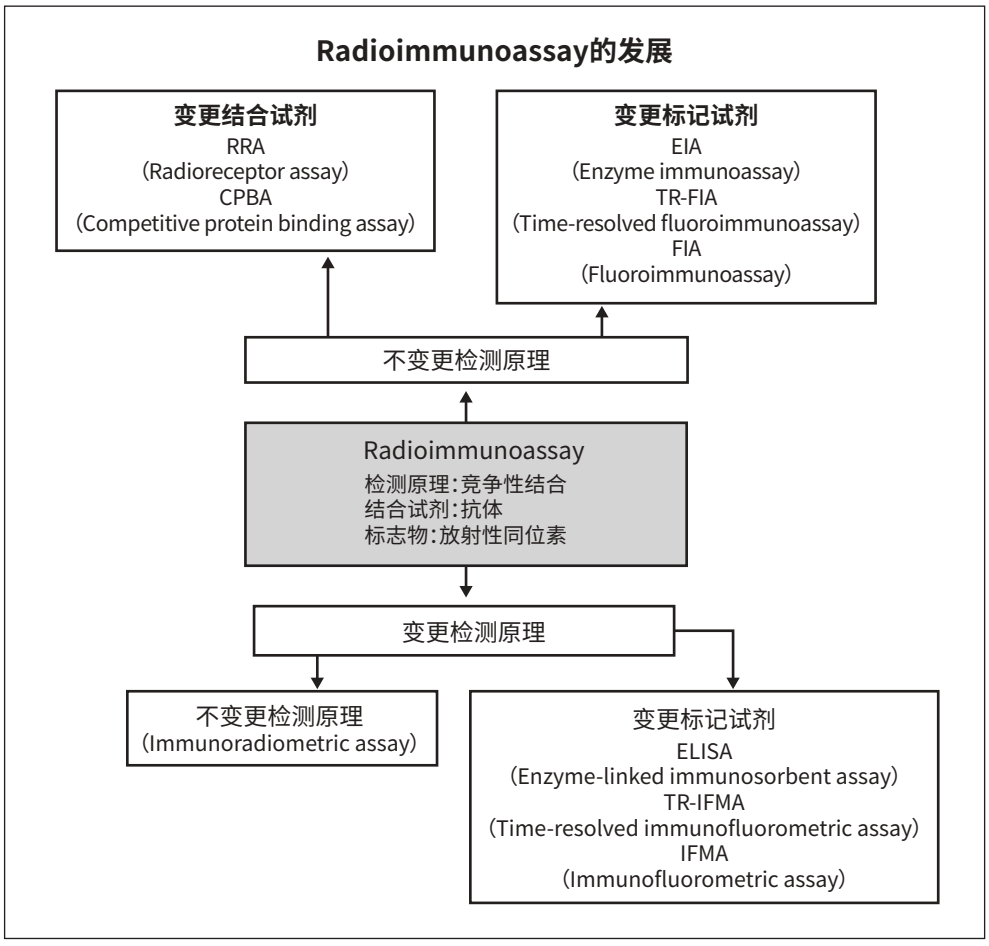
……我们研究了^{131}I标记的胰岛素在糖尿病中的代谢,发现几乎所有接受胰岛素治疗的糖尿病患者都有胰岛素结合抗体。

我们试图公开这一发现的过程颇为有趣。我们投稿的第一份期刊在数月之后拒绝了我们的论文,审稿人的回复是所有人都知道胰岛素不会产生抗体。然而,在Robert Williams带领的西雅图团队确认后,我们得以在1955年6月于俄勒冈州波特兰市举行的核医学学会的首次年会上发表了我们的工作。“(Yalow在“Principles of Competitive Protein-Binding Assays”上发表的文章,Ed. Odell & Daughaday, J.B.Lippincott Co., pp.1-21, 1971)

2) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
Berson, S. A. and Yalow, R. S.
J. Clin. Invest. 38, 1996-2016, 1959

该论文确立了RIA的理论。

随后,RIA被运用于各类激素的研究上,并广泛应用于研究领域和临床领域。由于RIA的检测灵敏度优异,适用于检测此前难以检测的血液中激素的浓度。由此,RIA的使用不仅为内分泌学研究带来了飞跃性的发展,还在临床诊断方面做出了巨大的贡献,Yalow也因此获得了诺贝尔奖。RIA在临床诊断方面的应用也让各企业产生了浓厚的兴趣,并推出各类检测试剂盒。围绕RIA的标志物、结合试剂、检测原理的探讨,创造了大量可能性。如图“Radioimmunoassay的发展”所示,如今的RIA检测法多种多样。



3. 检测法的种类有哪些?

根据检测原理分类

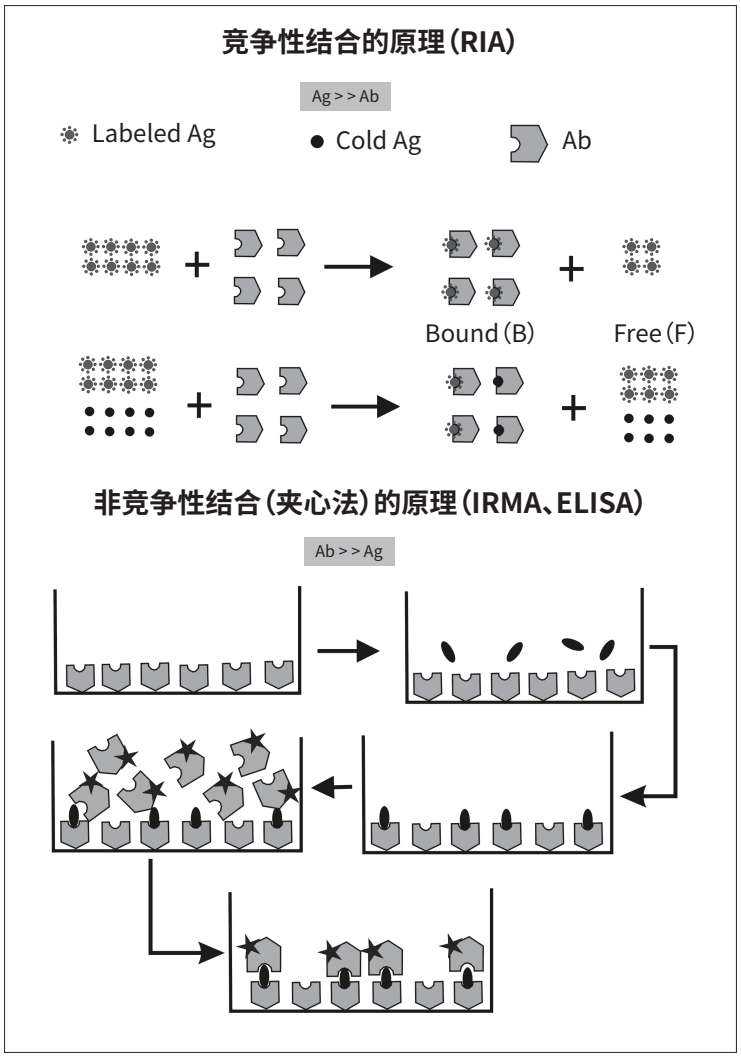
● 竞争性结合原理(Competitive assays)

使用标记物质和非标记物质与一定量(少量)的抗体竞争性结合并检测。反应体系中若只添加标记抗原,那么与抗体结合的均是标记抗原。

若向其中添加非标记抗原,与抗体结合的标记抗原的量就会根据添加的非标记抗原的量(图中为1:1)减少。标准曲线为双曲线型。

● 非竞争性结合的原理(Non-competitive assays)

使用足量的固相化捕获抗体捕获待测物质,并用标记抗体识别,即通过夹心法结合进行检测。



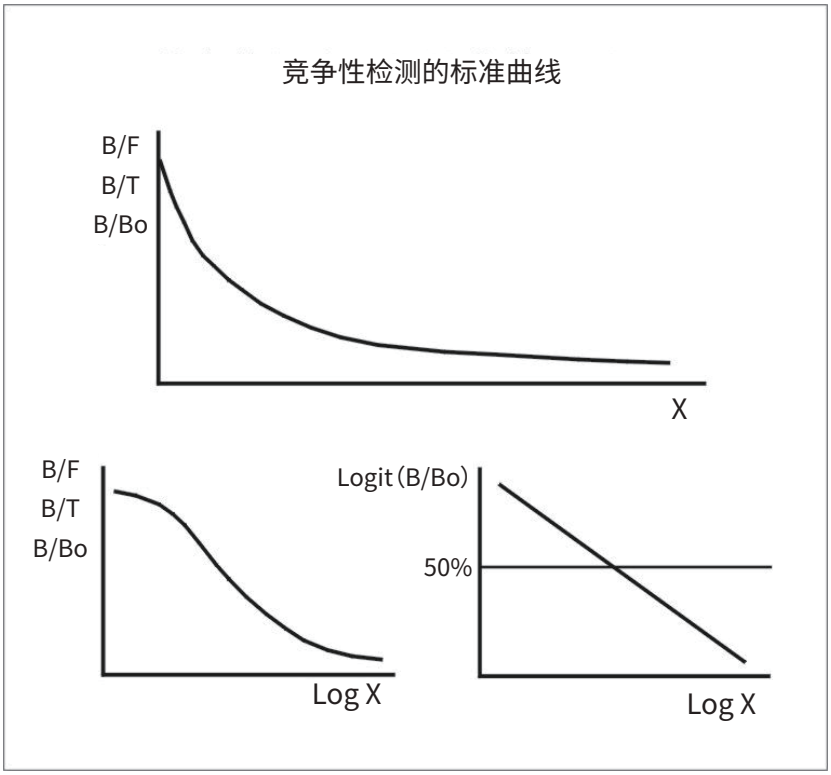
*检测原理和标准曲线(standard curve)

检测时一般会使用标准品绘制标准曲线,并通过对照标准曲线的结果计算检测值。标准曲线根据检测原理的不同,形状也有所不同。

● 使用竞争性检测原理检测时

○ 当横坐标为标准品浓度时,标准曲线为双曲线型。(该曲线在早期使用较多,现在几乎不使用了)。

○ 当横坐标为标准品浓度的对数时,能得到反S型的标准曲线。



这种情况下,纵坐标使用B/F、B/T、B/Bo等。

F:存在一定浓度标准品时呈游离态的标志物

B:存在一定浓度标准品时与抗体结合的标志物

Bo:没有标准品时与抗体结合的标志物

○ 当横坐标为标准品浓度的对数,纵坐标为Logit(B/Bo),此时能得到一条接近直线且斜率向下的标准曲线。

logit(B/Bo)=ln{(B/Bo)/(1-B/Bo)}

使用百分比表示B/Bo时,使用100代替1。

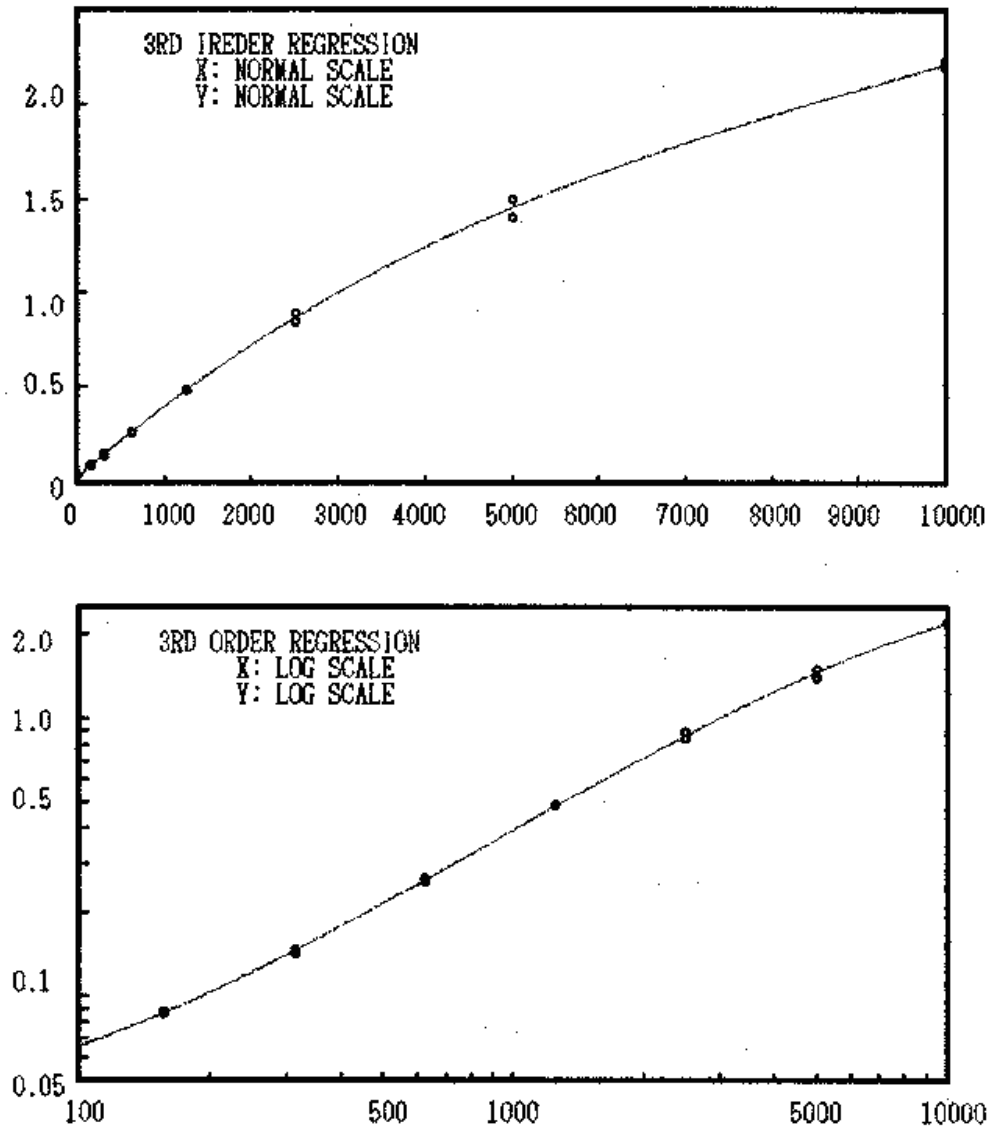
logit(B/Bo)=ln{(B/Bo)/(100-(B/Bo))}

● 使用非竞争结合原理的检测时

○ 在ELISA中,横坐标为标准品浓度的对数,纵坐标为吸光度(absorbance)时,能得到一条平缓且斜率向上的曲线。缩小检测范围可使标准曲线接近直线。

○ 纵坐标为吸光度的对数时,能够得到接近直线的S型曲线。

ELISA的标准曲线



关于ELISA的更多内容，会在下述的《ELISA入门》章节中详细讲述。ELISA的标准曲线以酶反应结果的显色吸光度为纵坐标。此时，对吸光度取对数就能获得如上图所示的平缓S型曲线。

根据反应体系分类

- **均相检测（homogeneous assays）**
  始终在溶液状态下进行检测的检测体系。
- **非均相检测（heterogeneous assays）**
  使用固相化抗体等进行反应、清洗的检测体系。

与动物物种相关的分类

动物物种的问题在于大分子量蛋白的氨基酸序列具有物种特异性，会被抗体所识别。而半抗原的小分子物质（如cAMP和其他类固醇激素）由于没有物种差异，所以不会产生问题。

● 同源分析(homologous assay)

同种动物物种的检测体系,例如使用人样品,人胰岛素作为标准品,并使用抗人胰岛素抗体进行检测的体系。这是一种比较普遍的检测方法。

● 异源分析(heterologous assay)

使用不同种动物检测某种动物的检测体系。虽然由于物种特异性,经常无法顺利检测大分子物质,但可使用近缘物种成功检测。例如牛与羊,大鼠与小鼠(但不能保证全部成功)在使用夹心法结合原理进行检测时,成功率比竞争性结合原理更高。

● 异源抗体分析(hetero-antibody assay)

使用RIA等竞争性检测时,如果异源分析不成功,可以使用同源的标志物与标准品,并配合高浓度的异源抗体,就能提高成功率。

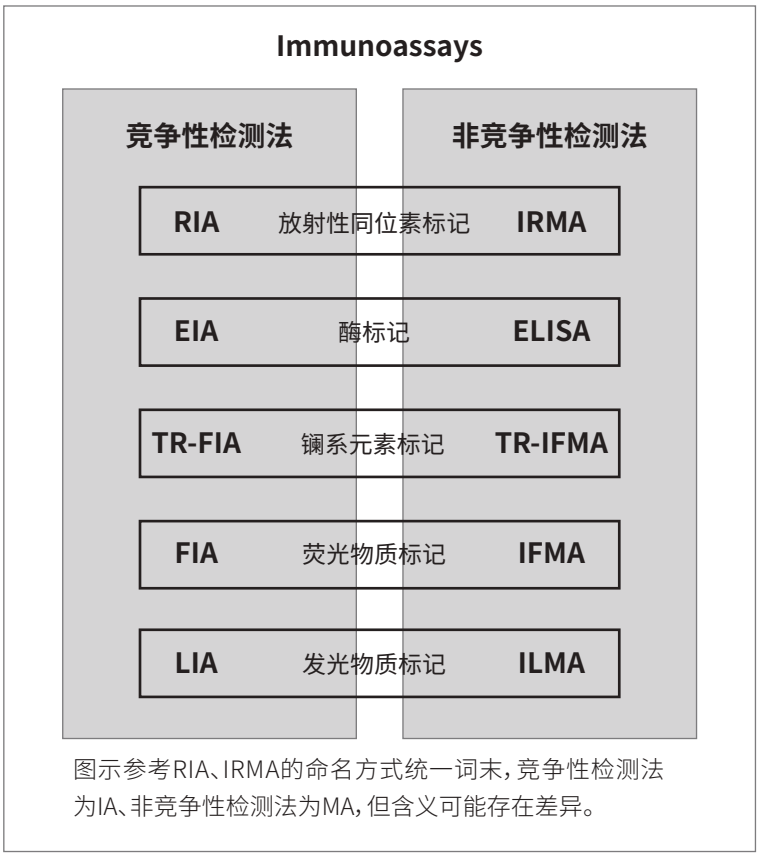
(Iwasawa, A. et al. Endocrinol. Japon 38, 673-683, 1991)

注意:Homogeneous(均相,指均一,均匀)
Homologous(指动物物种相同)
Heterogeneous(非均相)
Heterologous(指动物物种不同)

根据标志物分类:参考图"Immunoassays"

● 放射性同位素

从灵敏度出发,最好使用半衰期短的放射性同位素(Radioisotope、RI),最常用的是^{125}I(半衰期60天)。虽然也能使用^{131}I(半衰期8天),但由于半衰期短因此只能用于实验室的标记实验,无法商用。碘在氧化后,可作为亲电试剂与蛋白中的酪氨酸和组氨酸结合,因此适用于蛋白标记。氚(^{3}H)可在合成时引入到分子内使用,因此适用于小分子物质标记。由于半衰期长达12年,因此需要引入尽可能多的氚,以提高检测的灵敏度。



图示参考RIA、IRMA的命名方式统一词末,竞争性检测法为IA、非竞争性检测法为MA,但含义可能存在差异。

使用放射性同位素的难点在于其使用仅限于RI设施，且处理放射性废物的相关规定非常严格。尽管进行检测受到的外部辐射量可忽略不计，而且半衰期60天的^{125}I可在20个月内减少1/1,000，但仍需严格监管。

Radioimunoassay（RIA）

使用RI标记抗原，通过竞争性结合原理进行检测的检测体系。

Immunoradiometric assay（IRMA）

使用RI标记抗体，通过夹心法原理进行检测的检测体系。

● **酶**

常用的酶有β-葡萄糖醛酸酶和过氧化物酶，然后使用显色底物（chromogenic substrate）显色后，进行比色定量。另外，由于荧光检测非常灵敏，所以也常使用能够发出荧光的底物（例如：4-甲基伞形酮酰-β-D-吡喃糖苷、2-硝基苯-β-D-半乳糖苷等）。由于酶的分子量大，有时会影响抗原抗体的反应。然而，一旦成功，其灵敏度则远优于放射性同位素检测。

Enzyme immunoassay（EIA）

使用酶，通过竞争性结合原理进行检测的检测法。

Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）

ELISA还可用于固相化抗原，以及抗体检测。

ELISA应用广泛，下文将详细介绍。

● **荧光物质**

Fluoroimmunoassay（FIA）

使用紫外线照射后发出荧光的物质，即使用荧光物质标记抗体的竞争性检测，最早使用的荧光物质是FITC（fluorescein isothiocyanate，异硫氰酸荧光素）。部分异硫氰酸酯与蛋白氨基结合。需照射的紫外线称为激发光，其波长根据荧光物质而异。

Immunofluorometric assay（IFMA）

用荧光物质标记抗体后，使用夹心法结合进行检测的检测法。

● **镧系元素**

Time-resolved fluoroimmunoassay（TR-FIA）

镧系元素（Lanthanides）指元素周期表外单独成列的第57到71号元素的统称。这些元素可在特定条件下发出荧光。例如，目前主要使用的63号元素铕（Eu）的螯合物在接受340 nm的激发光时会发出615 nm的荧光。两者的波长差（斯托克斯位移）较大，并且由于荧光的波长较长，不易受激发光的影响。同时因荧光寿命非常长，若在激发光照射后经过一定时间再进行荧光检测，则可在共存物质的荧光消失之后再进行检测。这称为时间分辨荧光法（time-resolved fluorometry），也是TR-FIA的来源。该检测法也称为DELFIA™（Dissociation-enhanced lanthanide fluorometric immunoassay），是注册商标。

使用蛋白标记用铕螯合物进行标记，在最终的荧光检测中，酸性环境会使铕从螯合物中游离出来，包裹在表面活性剂胶束中形成其他螯合物，通过激发光照射会发出荧光。这便是“Dissociation-enhanced”的来源。

● **发光物质**

Luminescence immunoassay

使用化学发光物质（鲁米诺或吖啶酯）进行标记的检测法。以及使用与生物发光相关的物质标记使其产生酶促生物发光的方法，或使用酶标记而成的化学发光底物的方法。

● **离心试剂**

Spin-immunoassay

使用哌啶-N-氧化物衍生物、吡咯烷-N-氧化物衍生物、噁唑烷-N-氧化物衍生物等自由基标记，并以电子自旋共振（ESR、见注）的波谱变化作为指标进行检测的方法。

注）ESR：由于电子具有1/2的自旋，因此向其施加磁场时，自旋会与磁场形成平行和反平行的两种状态。当施加两种状态能量差相当的能量量子电磁波时，会使自旋状态发生反转。自由基的电子数为奇数，存在不成对的电子，具有1/2的净自旋。

相关的标志物还有很多，但考虑到实用性，将不一一阐述。

D. 免疫分析的有效性?

1. 特点与问题

免疫分析具有优越的特异性,使用高亲和性抗体作为结合试剂,具有以下优点:

○ 检测灵敏度良好
○ 对检测对象物质具有高特异性
○ 检测精确度高
○ 操作简单,性价比高
○ 能够一次性处理大量样品

问题

免疫分析最初是用于生理活性物质的检测,后来逐渐扩展到检测活体组分、药物及其代谢物、食品添加剂、转基因农作物、环境污染物等。

免疫分析的主要问题在于作为结合试剂使用的抗体来源特异性问题。尤其是检测生理活性物质时,会出现免疫分析的检测结果无法反映生理活性的问题。其原因是什么呢?

抗原分子的抗原决定簇antigenic determinant(制备抗体的部分、epitope)与表达生理活性的部分的生物活性位点(bioactive site)通常并不一致。生物活性位点指的是具有生理活性的抗原与受体结合的位点,或作用表达的位点。

抗体在免疫动物识别为异物的位点上产生。

也就是说,物种特异性越高,就越容易被识别。

但是各种动物物种的生理活性往往是共通的,而生理活性表达位点的物种特异性较低。

例:胰岛素

胰岛素由胰岛素原的单链多肽通过二硫键折叠后,切断中间部分而来,乍一看像是由两条肽链结合而成。被切断的中间部分称为连接肽(CP),其氨基酸序列在不同动物物种间差异较大。但是,胰岛素几乎没有物种间差异。由于胰岛素产生突变可能会导致动物无法生存,所以胰岛素的氨基酸序列在进化过程中变得更易于保存。哺乳类动物中只有豚鼠的胰岛素结构与其他动物有明显差异,因此常使用豚鼠制备胰岛素抗体。

抗原决定簇和生物活性位点不同会导致什么结果?

如果检测对象物质只有一种分子,且标准品与检测样品中的物质等具有相同的分子结构的话,就不会产生问题。但如果标准品与样品中物质的分子结构不同就会产生问题。那么实际上会出现这样的情况吗?

● 代谢方面

生理活性物质的任务是向靶器官的细胞传达信号。完成任务后,就必须关闭信号。因此,生物活性位点往往会接受某种修饰,使物质失活或是活性改变。另一方面,与生理活性无关的部分会被保留,所以血液中会存在各种各样的代谢物。一旦抗体与这些代谢物结合,免疫分析的检测值就会高于具有生理活性的原始物质量,无法反映检测对象物质的生理活性。该情况通常会出现在药物等的检测时。

● 分子多样性方面

表现某种生理活性的物质,并不只有一种。

例:类固醇激素

类固醇激素根据其生理活性分为雄激素(雄性激素)、雌激素(促卵泡激素)、孕激素(黄体酮)、糖皮质激素(糖肾上腺皮质激素)和盐皮质激素(矿物质肾上腺皮质激素)。不同种类的激素具有一定程度的共同结构,虽然强弱可能会有差异,但发挥相同作用的类固醇有好几种。这种情况下,通过钻研抗体的制备法,可通过免疫分析区分和检测每一种类固醇,若无法实现,则需要使用HPLC等分离后再进行检测。

例:肽、蛋白质

肽类生物活性物质包含称为XXX蛋白家族的组,它们具有相似的结构,但作用不同,或有些相同。

肽和蛋白激素的生物合成和加工过程会产生分子多样性，并且部分从遗传信息，即DNA阶段就已经是能够产生多种分子的结构。

许多糖蛋白中具有不同的糖链序列，这反映在糖链加工过程中的各类前体物质上。

这时，免疫分析无法反映生理活性。

2. 免疫分析的竞争对手是?

那么，除了免疫分析以外还有哪些检测方法呢?

一般的检测方法可大致分为物理和化学检测法以及生物学检测法（生物测定）。

物理和化学检测法

使用某种方法从混合物中分离目标物质，或通过处理使其他物质不被检测，然后检测目标物质的特性并定量的方法。

免疫分析属于此类方法，也就是通过利用与抗体的结合能力使其他的物质不被检测，再利用标志物的特性进行定量。

众所周知的仪器分析法HPLC是利用溶解性与吸附性从其他物质中分离目标物质，并通过目标物质的UV吸收进行定量。随着检测灵敏度的改善，仪器分析也成为了免疫分析的竞争对手。另外，免疫分析与仪器分析配合使用，效果更佳。

生物检测法（生物检测、Bioassay）

利用检测对象物质的生理活性，以生物（个体、组织、细胞）的反应作为指标进行定量的检测法。可以说是生物活性物质的基础检测方法。从激素研究的历史来说，激素的发现源于切除激素产生器官时发生的生物体损伤，以及产生器官的提取物给药导致的损伤抑制和恢复。从这个角度出发，首先使用动物个体进行检测的检测法理所应当。

使用个体进行检测（*In vivo* assay）的问题

个体反应在存在较大的个体差异。

→偏差大→检测值的置信区间广→准确度差→需要大量的动物。因此：

价格高昂。

同时存在生物伦理问题。

后来，随着组织和细胞培养方法的普及，出现了使用培养组织和培养细胞的生物学检测法。

使用培养组织和培养细胞的检测方法（*In vitro* assay）的特点与问题

组织，特别是细胞通过pool能够实现均一化（homogenize）。

→反应均一→缩小偏差→准确度良好。

能够有效利用活体→能够使用最少量的个体进行检测。

依情况也可以使用细胞匀浆，有时也可以使用克隆化的细胞产线。

但是，体外与体内检测结果并非完全一致（存在分子多样性的情况）。

通常，生理性释放的生理活性物质短暂增加后，会通过失活或排泄减少。而在体外实验的反应期内，生理活性物质会一直存在于培养基中。

→虽然可以改善检测灵敏度，但却无视了生物分子的稳定性（生物半衰期）这一重要因子的影响。

生物检测法之间的检测值差异

检测单一激素的生物检测法并不局限于使用一种生物反应。例如，检测黄体生成素（LH）时，体内检测有雄性大鼠的腹侧前列腺重量检测法（ventral prostate weight assay、VPW），雌性大鼠或小鼠的卵巢抗坏血酸耗竭检测法（ovarian ascorbic acid depletion test、OAAD）。体外检测有使用雄性大鼠睾丸间质细胞（Ledig cell）的睾酮生成法等等。由于LH具有分子多样性，这些检测法的检测结果并非完全一致。

HCG的检测案例（Van Hall et al. Endocrinology 88, 456, 1971）

胎盘绒毛会产生与LH的作用、结构相似的激素HCG。

HCG糖链上的唾液酸对生理活性的表达具有重要影响。因此，先制备去除了部分唾液酸的HCG，再使用各种检测法探讨其活性后，所获得的结果如下表：

唾液酸去除率(%)	活性效价(IU/mg)		
	OAAD	VPW	RIA
0	11,290	11,740	4,430
47	1,250	220	6,020
70	86	0.7	4,100
100	56	1.2	4,830

OAAD法可在给药大约2 h后获得得判断结果,VPW则需要3天给药后的第4天才能获得判断结果。(作用于睾丸产生雄性激素,使前列腺肥大化)。结果显示,使用需要花费时间表达生理活性的检测方法中,去除唾液酸的影响会更大。而另一方面,RIA几乎不受去唾液酸的影响,也就是说,它不是抗体的识别位点。

综上所述,生物学检测法本身就存在检测值不一致的问题。

重要的是充分理解各种检测方法检测的是什么,并在此之上对检测值进行分析和判断。

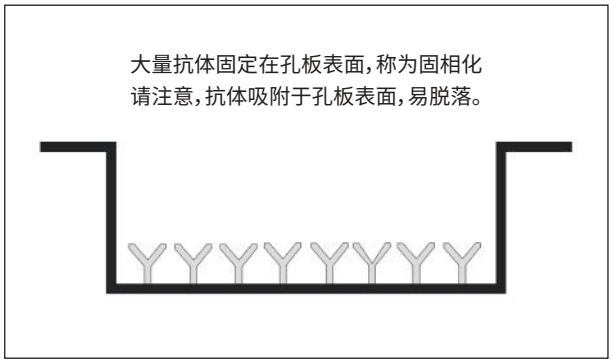
在检测过程中,不要盲目相信检测值,要时常一边反思一边推进检测工作。

I. ELISA入门

ELISA如何使用抗体?

ELISA通常使用96孔的微孔板。

首先,使抗体吸附在孔板表面(称为涂层、包被或固相化)。这种用于捕获检测对象物质抗原的抗体称为捕获抗体。抗体大致呈Y形,Y的顶端具有可识别并结合抗原的可变区域,柄部(Fc)易吸附于孔板底部。孔板的主要材料是聚苯乙烯,属于易吸附蛋白质的材质,因此,从结构等多方面考虑,使其成为更易吸附的材料。向孔板添加抗体溶液时,就会发生自动吸附。通过吸附尽可能多的抗体,即使是极少量的抗原也能被捕获。



那么,如何使用捕获抗体呢?

通过使用右面的示意图进行说明。

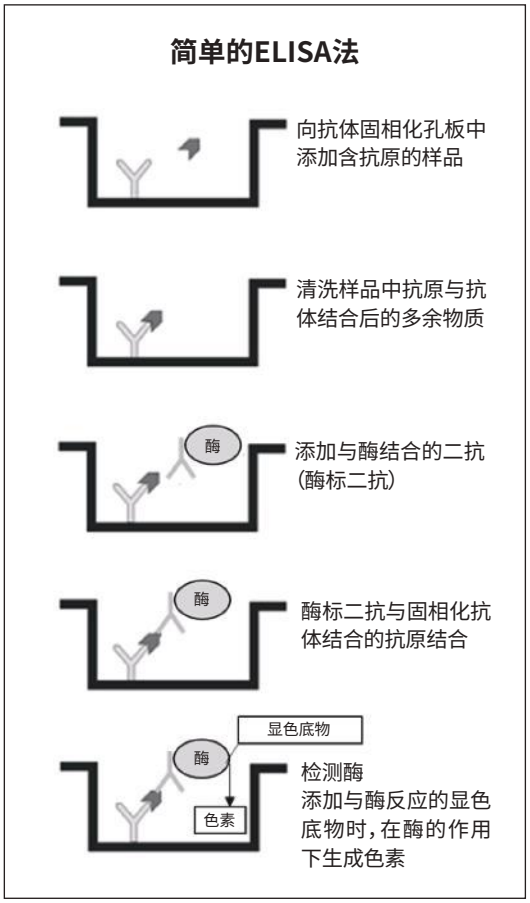
这里为了便于说明,仅描绘了吸附1个抗体时的情况,实际上会有大量的抗体吸附于孔板上。向抗体固相化孔板中添加抗原溶液(标准品或样品/检测样品),静置1~2 h使得抗原与抗体结合。结合完成后,去除多余液体并清洗孔板。这样就能使孔板上仅留下已和固相化抗体结合的抗原。

接着,加入与抗原捕获抗体识别位点(表位)不同的识别抗体(称为第二抗体或二抗),静置一段时间。该二抗已进行化学酶结合的预处理(即为酶标二抗)。

添加的酶标二抗可识别与捕获抗体结合的抗原,并与之结合。随后,清洗多余的酶标二抗。

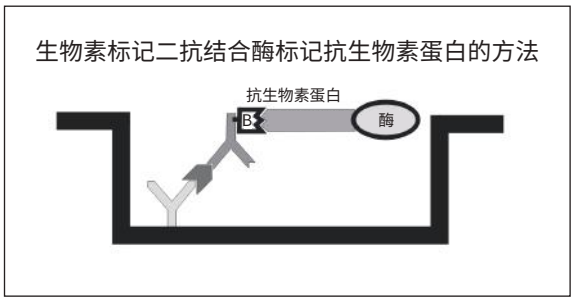
然后,添加酶的显色底物溶液,进行酶反应时,显色底物会在酶的作用下转换为色素。

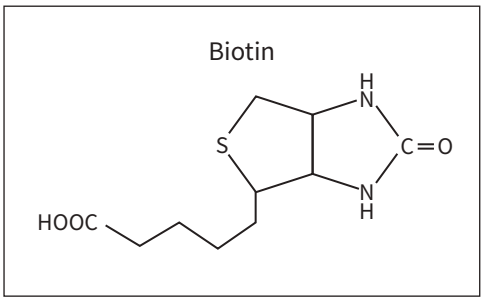
添加反应终止液以终止酶反应后,使用96孔板用比色计检测色素的显色。由此可根据生成的色素来检测与捕获抗体结合的抗原量。比色定量的结果用吸光度(absorbance)表示,因此可以根据标准品的检测结果,绘制以抗原浓度为横轴、吸光度为纵轴的标准曲线,并根据检测样品的吸光度计算出样品中的抗原量。图中所示为进行ELISA的方法中较为简单的方法。由于酶的分子量非常大,使用该方法时,酶标抗体可能会对抗体的结合能力产生空间位阻。此外,单分子的抗体难以与多个酶结合。



因此，研究人员提出了一种通过将酶与其他蛋白质结合来减少抗体空间位阻的方法。如图所示，使用生物素标记二抗。

生物素是一种分子量非常小的物质，是原本存在于生物体内的一种生理活性物质，它能以强力的亲和性与卵白中存在的抗生物素蛋白结合。抗生物素蛋白通过与酶结合，并与抗原结合的生物素标记二抗反应，可克服空间位阻。此外，通过增加与抗生物素蛋白结合的酶，还可以加强信号放大效果。这种改进方法也被应用于ELISA中。





ELISA采用抗体-抗原-抗体的形式，被称为三明治夹心法。即抗体是面包，抗原是火腿。

Shibayagi使用的酶和显色底物

Shibayagi试剂盒通常使用过氧化物酶，这是一种能分解过氧化氢的酶。过氧化物酶有几种类型，这里介绍的HRP是一种辣根来源（Horseradish）的过氧化物酶。它的主要性质如下表所示。

过氧化物酶（Hydrogen peroxidase，Horseradish peroxidase，HRP）	
反应	显色底物+H_2O_2⇔氧化型染料+2H_2O
来源	辣根（Horseradish）
分子量，最佳pH值	40,000，pH 6.5
底物特异性	显色底物（氢供体）无特异性。过氧化物仅限H_2O_2、CH_3OOH和C_2H_5OOH
抑制剂和激活剂	抑制剂：CN^-，S^{--}，F^-，N_3^-（注意：部分抗凝剂含有氟离子，部分防腐剂含有NaN_3！）
稳定性	干燥、冷藏条件下可稳定存储数年，溶液状态下冷藏可稳定存储1年

需要注意的是，部分样品中可能会含有抑制剂。如上表所示，过氧化物酶的抑制剂有CN^-，S^{--}，F^-，N_3^-等。特别是采集血液样品时会使用涂层为氟或NaN_3的采血管。

ELISA中，样品与抗体反应后会进行清洗，因此抑制剂不会对酶活性起决定性的抑制作用，但清洗后仅存的残留物在一定程度上抑制了酶活性时，可能会导致显色减弱。所以，请尽量不要使用这些采血管。推荐使用肝素作为抗凝剂，但肝素可能会影响某些试剂盒的检测系统，这种情况下，使用说明书中会有明确的记载，请遵循说明书的指示进行操作，例如，使用EDTA-2Na或柠檬酸钠，或不添加任何物质，对血清进行检测。

Shibayagi试剂盒中使用的HRP显色底物是3,3',5,5'-四甲基联苯胺（3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine），又称为TMB。

如上表所示，过氧化氢被HRP分解，产生的活性氧将TMB氧化。向生成的蓝紫色溶液中添加硫酸来终止反应，在硫酸的氧化下，蓝紫色会变为黄色，并在450 nm处有吸收。

最后步骤——检测吸光度

检测吸光度，需要检测TMB来源染料在吸收波长为450 nm处的吸收。为了消除孔板的均一性和划痕等影响，会检测在副波长620 nm下的吸光度，并将其与450 nm处的吸光度的差作为真实吸光度。

吸光度是由表示比色定量基础的光透过率和溶液中物质浓度相关性的朗伯比尔定律（Lambert-Beer’s law）决定的数值。

$$吸光度=\log_{10}(Io/I)=\varepsilon lc$$

Io：入射光　I：透射光　ε：摩尔吸光系数（$M^{-1}\cdot cm^{-1}$）　l：吸收层（cm）　c：浓度（M）

换言之，吸光度就是透射光与入射光的比，即透过率倒数的对数。

例如，透过率为10%时，吸光度即为100/10=10，log10=1。透过率为50%时，吸光度为100/50=2，log2=0.301。

朗伯比尔定律指出，吸光度是溶解物质特有的摩尔吸光系数与光通过的路径（光路）长度（即吸收层厚度），以及物质的摩尔浓度的乘积。因此，如果在相同长度的吸收层检测某种特定物质，吸光度则与该物质的浓度成正比。ELISA中物质（染料）的浓度是与抗体结合的抗原量成正比的酶的作用结果，如上所述，以标准品浓度为横轴，吸光度为纵轴，即可绘制标准曲线。

正如“序论——免疫分析”所述，ELISA中标准曲线的形状会因纵轴和横轴的比例不同产生巨大差异。使用计算机计算时，无论哪种取值方式都无太大差异，但回归曲线的拟合度，即回归曲线通过每个标准点的接近程度，所获得的曲线接近平缓的直线时，拟合效果更为优异。在ELISA中，建议对纵轴和横轴进行对数转换，如使用双对数方格纸作图等。

以上是ELISA的简要概述，关于ELISA的操作技巧，请参阅下一章节“ELISA的实操”。此外，关于ELISA的更多详情，请参阅“更多关于ELISA的信息”部分章节内容。

II. ELISA的实操

A. Shibayagi试剂盒操作指南

本章内容主要介绍了试剂盒的基础使用方法。

注意：原则上，本文介绍的操作方法仅适用于Shibayagi的产品。

1. 孔板、标准溶液、样品溶液、试剂溶液恢复至室温后再进行添加、分注

低温状态下立即开始检测，会导致板孔间的温度不均匀，影响抗原抗体反应、酶的活性、显色反应等。此外，还有可能使移液量不正确或不均匀，产生较大的检测差异。

检测样品冻存时，可以通过流水浸泡使其快速解冻。通常蛋白溶液冻融后，蛋白会沉积在底部，因此，解冻后请使用涡旋仪等仪器充分搅拌并混合均匀。

2.试剂溶液的制备法

Shibayagi试剂盒中包含可直接使用的试剂溶液和稀释后使用的试剂溶液。

○ 可直接使用的试剂溶液

缓冲液　　显色液　　反应终止液

○ 稀释后使用的试剂溶液

浓缩清洗液、标记（酶、生物素）抗体溶液、过氧化物酶-亲和素结合物溶液、标准溶液

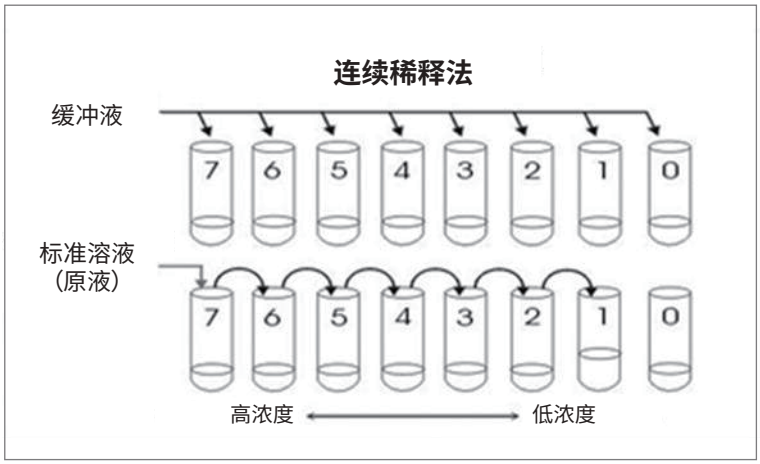
● 标准溶液的制备方法

根据试剂盒不同，可使用以下两种方法中的任意一种标准制备溶液。

a）连续稀释（Serial dilution）

b）比例稀释（Proportional dilution）

a）使用连续稀释法制备溶液

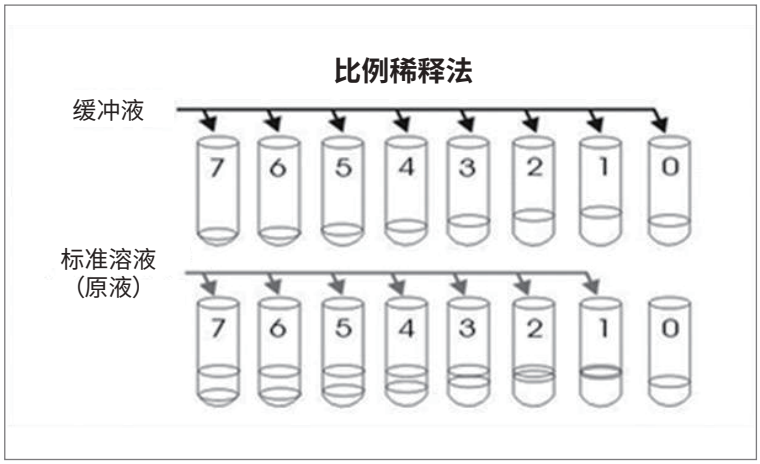


首先，按照标准溶液的类型（如果有7种，加上0则需准备8支）准备相应数量的微管（12×75 mm），参考上述例子，根据浓度从低到高依次编号0、1、2.....7。

向试管中加入一定的缓冲液。此外，浓度最高的试管（7号）中需要加入的缓冲液量与其他的试管的差异较大，需特别注意。

向浓度最高的标准溶液试管中添加一定的标准溶液原液。根据需求，可盖上塞子并充分混匀（使用涡旋仪涡旋1 s，吹打3次混匀）。然后，从试管中取出一定的混合溶液，添加至下一个试管并混合。以同样方法制备至1号标准溶液。0号试管仅为缓冲液。

b）使用比例稀释法制备溶液



首先，按照标准溶液的类型（如果有7种，加上0则需准备8支）准备相应数量的试管（12×75 mm），参考上述案例，根据浓度从低到高依次编号0、1、2.....7。

向试管中加入一定的缓冲液。需要注意的是，与连续稀释不同，比例稀释的每支试管中的缓冲液量都是不同的。

将随附标准溶液的原液按照各标准浓度的规定量分别加入各试管中，盖上塞子并充分混合。0号试管仅为缓冲液。也可将未经稀释的原液作为最高浓度的标准溶液。

标准品的稀释，是决定能否绘制好标准曲线和测量值是否准确的重要步骤。推荐新手可考虑不参考使用说明书，使用准确无误的稀释方法，如连续稀释法。

● 标记（酶、生物素）抗体溶液，以及过氧化物酶亲和素结合物溶液的稀释

试剂盒中的标记抗体溶液以少量分装的形式进行包装。容器内的试剂量大于【试剂盒组成】中记载的量，使用移液器可吸取记载的容量。

溶液采用以下方式进行稀释。

首先，将计算好容量的缓冲液转移至容器A中。

从含有抗体的小容器中吸取【试剂盒组成】中指定的容量（如20 μL），添加至容器（A）的缓冲液中，混合均匀。

● 浓缩清洗液的稀释

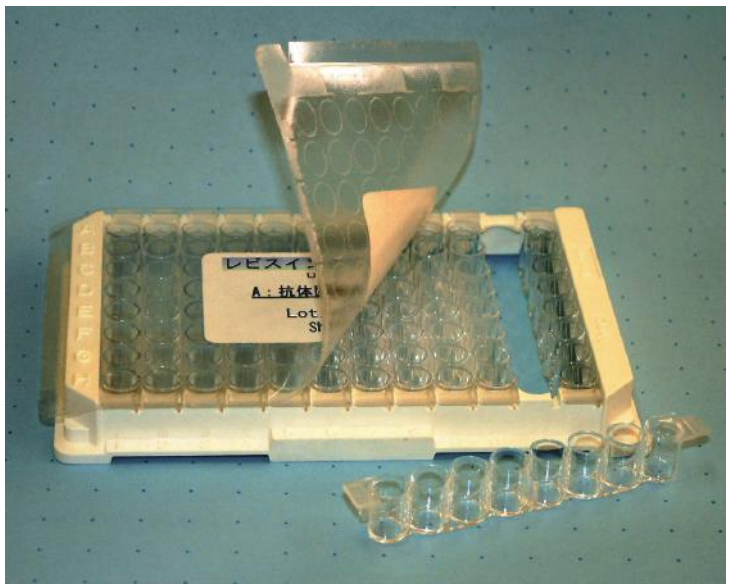
将随附的浓缩清洗液（100 mL）添加至900 mL的纯净水中，制备清洗液。可以在带喷嘴的洗瓶中使用，也可以在自动清洗机的容器中使用。

推荐使用500 mL的洗瓶。

3. 抗体固相化孔板的结构和使用方法

ELISA试剂盒使用的96孔板，如图所示。

孔板共12列板条，每列8孔，嵌入孔板的框架。孔板表面贴有防止干燥的封口膜。



请勿在使用前撕下封口膜，干燥会使抗体变性导致效价降低。**请在孔板恢复至常温后再撕下封口膜**。如果在低温状态下撕下封口膜，胶水尚未软化的部分可能会导致部分封口膜破损残留。

若只使用一半的孔板，可以切下需使用部分的封口膜，取出滑动板，也可嵌入单独的孔板框架中使用（建议保存使用完毕的试剂盒孔板的框架，使用更方便）。

但是，这种情况下，剩余试剂请在有效期内使用。原则上，试剂制备完成后应立即使用完毕。

使用小技巧！

板条的一端用细头记号笔标上编号，即使在清洗时弄混了也可以重新排列。

4. 孔板的清洗方法

抗体固相化孔板需要在使用前和各种反应结束后清洗。

下面将介绍具体的清洗方法。

使用前的清洗

单手持孔板，并使用洗瓶第一次将清洗液注满板孔。然后立即在水槽上方倒置。保持倒置，将96孔中的反应液倒入水槽排空。重复垂直倒液3次，注意不要让孔板从手中滑落。

向孔中第二次添加清洗液，使用相同方法倒掉清洗液。再进行第三次清洗。

反应液的废弃与清洗

按照上述方法处理反应结束后96板孔中的反应液。处理完成后，注意避免干燥，并进行清洗。

单手持孔板，并使用清洗瓶第一次将清洗液注满板孔。**为防止清洗液溢出带来残留**，请小心分注。这时，推荐使用**连续移液器（见下文）**将250 µL的清洗液分别注入孔中。（8连移液器可能会划伤孔底，因此不建议使用）。第一次清洗非常重要。

轻微摇晃孔板后立即在水槽上方倒置。保持倒置，将96孔中的反应液倒入水槽排空。（重复垂直倒液3次，注意不要让孔板从手中滑落。）

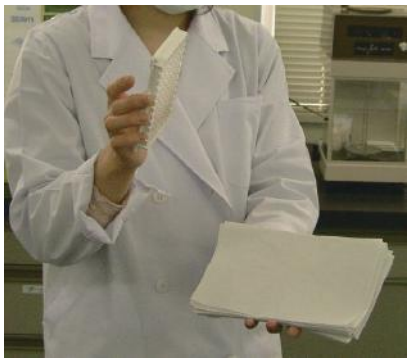
第二次添加清洗液时，即使溢出也没有关系。以同样的方式倒掉清洗液后，进行第三次清洗。

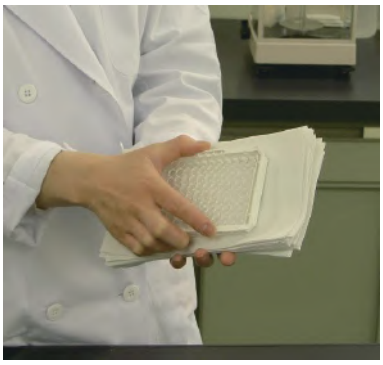
使用市售的自动清洗机清洗也非常方便。

注意：请调整清洗液的喷射力度以避免过强。喷射或吸取的力度太强可能导致固相化抗体脱落，还可能会导致实验误差过大或显色时的吸光度整体过低。

完全去除清洗液

倒掉清洗液后，将孔板倒扣在多层重叠的厚纸巾上拍打几次，去除孔板底部残留的清洗液。请确认无清洗液残留。孔板中残留大量的清洗液可能会导致误差产生。





即使使用自动清洗机也无法完全去除清洗液，因此，必须进行此项操作。

部分试剂盒使用强防水性材料制成的孔板。这种情况下，无需像上述操作一样拍打孔板，可按照使用说明书中的操作，将孔板向下按压在纸巾上就能去除清洗液。

5. 标准溶液与样品的移液和添加方法

Shibayagi检测试剂盒中使用的标准溶液和样品的量为5~10 µL，而部分需添加50 µL预稀释样品。

此外，各标准溶液和样品中均移液和添加不同的溶液，因此，必须使用可更换吸头的移液器。为了尽量减少误差需要慎重选择移液器。另需根据移液量选择量程合适的移液器。

移液器的允许误差

国际标准ISO 8655-5规定了移液器的允许误差范围。

例如，对于使用范围为10~100 µL的可变量程单通道移液器，

系统误差（Maximum systematic error）：±0.8 µL

随机误差（Maximum random error）：±0.3 µL

注）系统误差（与设定移液量之差）：取10次检测的平均值进行比较

随机误差（偏差）：10次检测的标准偏差

因此，如果使用10~100 µL的可变量程单通道移液器量取10 µL进行检测，允许的随机误差为3%。另一方面，使用检测范围0.5~10 µL的可变容量移液器（如Eppendorf 4910）设定10 µL的随机误差应控制在0.8%。

需要注意的是，多通道活塞式移液器（8通道、12通道）的允许误差是单通道规定值的2倍。这类多通道移液器不能用于标准溶液或样品的移液操作中。

移液器的操作方法有两种，下面进行详细说明。

a. “预湿润”法

○ 安装新吸头后，在第一停点的范围内吸排标准溶液或样品2~3次，进行预湿润后，再吸满溶液。
○ 将吸头的顶端轻轻触碰容器内壁，去除顶端外侧的溶液（touch and go）。
○ 将溶液排出板孔。此时，将按钮按到底即可排出溶液（blow out）。
○ 用吸头的顶端轻轻触碰板孔内壁，边去除吸头外侧的溶液，边抽出移液器（touch and go）。如果之后检测的溶液相同，可继续使用该吸头。否则，需更换吸头。

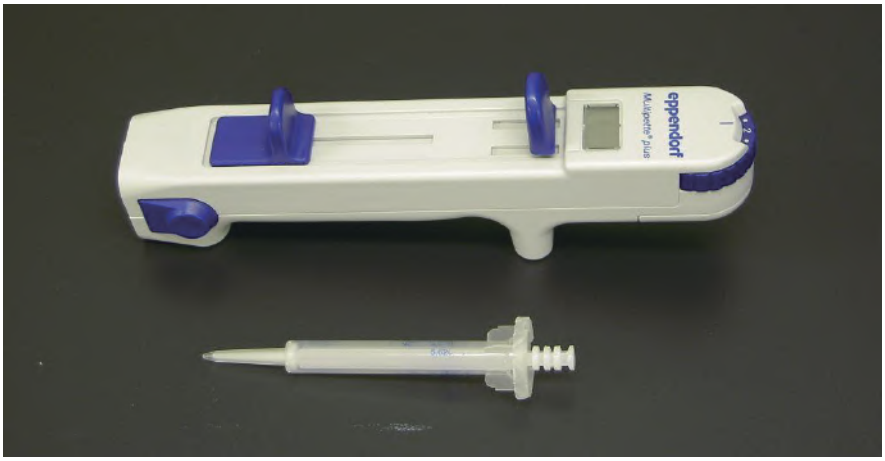
b. “预洗”法

○ 安装新的吸头后，按下按钮至第一停点，轻轻地吸取溶液。
○ 将吸头的顶端轻轻触碰容器内壁，去除顶端外侧的溶液。
○ 将吸头顶端放入已添加缓冲液等的板孔中并放出溶液，上下按压按钮2~3次进行“预洗”。最后，排出溶液。
○ 将吸头顶端轻轻触碰板孔内壁，边去除吸头外侧的溶液，边抽出移液器（touch and go）。然后，更换吸头。

请选择以上任意一种方法移液、添加标准溶液或样品。请务必统一使用一种方法，否则可能会产生较大的误差。
溶解的样品可能会有溶质浓缩在底部，因此，冻存过的样品溶液需要充分搅拌后再提取。
血清和血浆样品的粘性较高，推荐使用预洗法。
提取的溶液量较多时（例如50~100 µL），推荐使用“预湿润”法。
以上方法均参考Eppendorf的使用说明书。在使用其他公司的移液器时，请参考相应的使用说明书。Eppendorf公司指出，以下情况可能会出现括号内的相对误差。
没有touch and go（<3%），没有预湿润（<2%），吸头伸入的深度及角度（<1.0%），没有稳定移液（<1.5%），移液器泄漏（不适配的吸头）（0.5%-50%）等。

6. 试剂溶液的添加方法

向所有孔中添加相同的试剂溶液时，建议使用可连续添加（multi delivery）的移液器（如Eppendorf muti pette plus）。



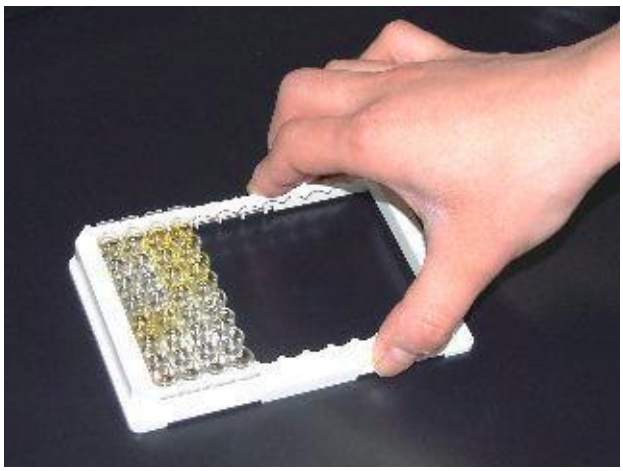
连续移液器的使用方法

○ 充填试剂溶液后，排出空气，并重复吸取试剂溶液1~2次。
○ 使用吸头顶端轻轻触碰板孔壁进行分注，注意不要让顶端浸入孔中液体。
○ 切记不要太过用力，以免溶液飞溅。

7. 搅拌操作

试剂添加后，需进行搅拌操作。

建议使用微孔板混合器（也称微孔板振荡器）等的仪器搭载微孔板，以800 rpm混合搅拌10 s，重复3次。



如果实在没有搅拌器，可以将孔板放置在光滑的实验台上，并用手轻轻按住，在实验台上以稍快的速度按“の“字的书写轨迹做水平圆周运动进行搅拌。

8. 酶标仪和吸光度检测

ELISA的最后一步是检测酶的活性。Shibayagi试剂盒通过使用显色底物TMB（tetramethyl benzidine）显色HRP（horse radish peroxidase）的活性，并以450 nm处的吸光度进行定量（使用与副波长620 nm的吸收差）。通过标准曲线计算样品中检测对象物质的浓度。

显色后的吸光度检测需要使用到酶标仪。酶标仪有两种类型，分别是能够自由改变波长的光栅式酶标仪和只能产生一定波长的滤光片型酶标仪，酶标仪的价格不一，后者价格更实惠。酶标仪还需要对光源与读板部分进行维护，确认使用的波长并清洁滤光片。

吸光度与比色定量

一般而言，比色定量使用朗伯比尔定律。

Lambert-Beer’s law

$$吸光度=\log_{10}(Io/I)=\varepsilon lc$$

ε：摩尔吸光系数（$M^{-1}\cdot cm^{-1}$）　l：吸收层（cm）　c：浓度（M）

即，透光率倒数的对数（吸光度，absorbance）与显色物质的浓度成比例。

一般的比色计会显示吸光度（absorbance）与透过率。

例如，当50%的入射光被吸收时，吸光度为100/50=2，即log2=0.301。透过率为10%时，吸光度为1.0，透过率为1%时吸光度为2.0。透过率与吸光度的关系如下表所示。

透过率%	99.9	99.5	99	90	80
吸光度	0.00043	0.00218	0.00436	0.0457	0.0969
透过率%	50	10	5	1	0.1
吸光度	0.301	1.000	1.3010	2.000	3.000

吸光度3.0相当于0.1%的透过率，可以认为已经超过了吸光度检测的极限。出现这样的吸光度时，需要调整反应体系，降低吸光度。例如，对样品进行稀释等。此外，空白背景（检测物质浓度为0）的吸光度超过0.1的反应体系或酶标仪都是不正常的。当空白背景吸光度过高时，推荐增加使用说明书规定的酶标抗体或酶标亲和素反应后的清洗次数，并缓慢添加清洗液。

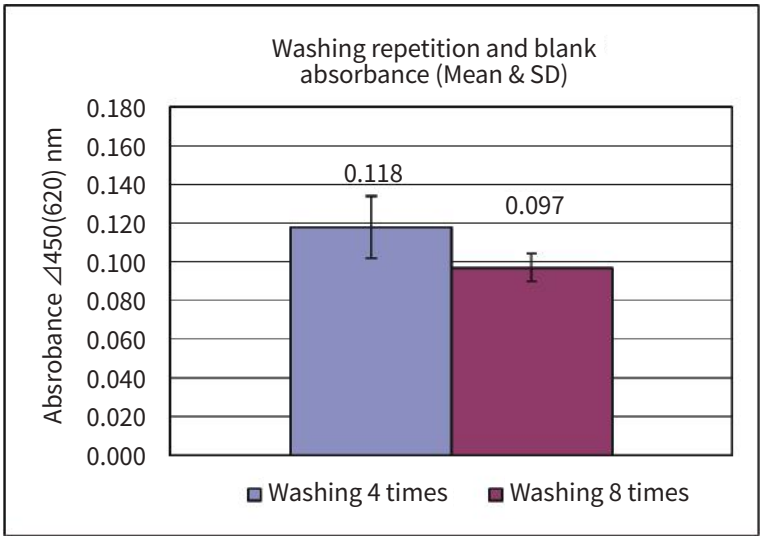
下述将举例说明。

当清洗次数增加一倍且缓慢添加清洗液时，吸光度平均值的差：$p<0.065$

分散比显著性：$p<0.1$

结果显示，空白背景的吸光度确实降低了。

此外，有效降低误差，可控制危险率在10%以下。



9. 为什么不能每个孔加入一种样品?

● 从检测的操作方法考虑

1孔的检测结果缺乏横向支持数据。如果出现检测操作的失误或移液的误差,无法进行对比讨论。虽然结果与同一实验组的其他样品相差不大即可认为没有操作失误,但这样是否合理还有待考证。

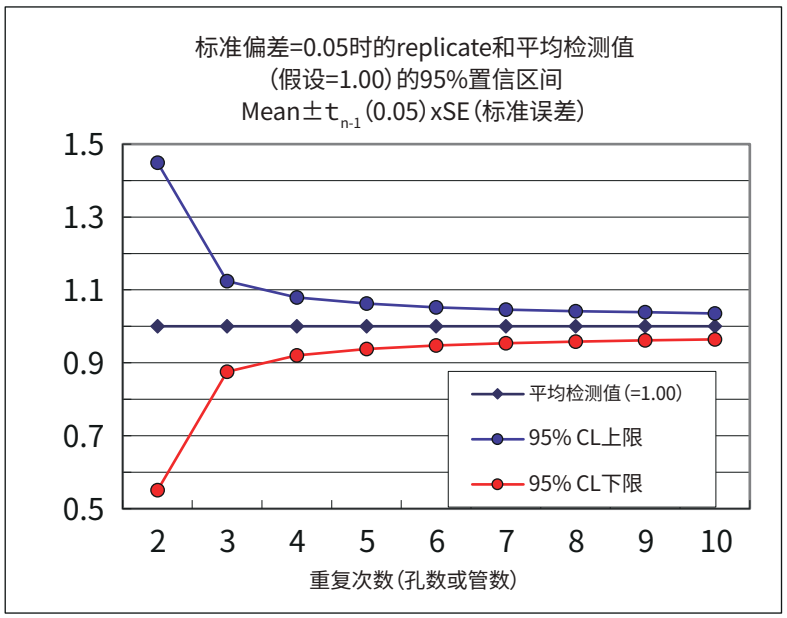
如果重复两次或重复三次检测,将各自的检测值整合起来,就能判断操作无误。但是进行重复两次检测时,出现两个检测值相差较远的情况,则无法判断哪个是异常数据,但至少可以将该样品与同一实验组的其他的样品进行比较来判断。如果是重复三次检测,可以舍弃与其他两个相差较远的检测值。严格来说,建议进行舍弃检测,但当样品数量过少时会变得很难以舍弃。**特别是在重复两次检测中,无法进行舍弃**。如果不是太奇怪的数值,放弃舍弃转而求平均值会更为妥当。

● 从统计学考虑

1孔的情况下自由度为0。因此,统计学上的可信度为0。重复两次或重复三次检测可以计算平均值与标准误差,因此,可以确定检测值的95%置信区间。请注意,表示平均值分布形状的标准误差与样品数的平方根成反比。因此,重复次数越多,平均值的置信区间越小,可信度越高。另一方面,样品分布形状的标准偏差基本与样品数无关,但它的可信度却取决于样品数。

请看下边的图表。

图中显示的平均检测值为1,标准偏差为0.05。即假设相对标准偏差或变异系数为5%时,它表示重复检测中板孔的数量与所求平均值的95%置信区间。除去单次检测,重复两次检测的平均值置信区间约为50%上下。重复三次检测的区间略高于10%上下。一般来说只会重复两次检测,但从这里可以理解为什么笔者会推荐重复三次检测。



10. 试剂盒使用的注意事项

● 请勿将本试剂盒内的试剂用于研究以外的目的。
● 请勿与其他批次的试剂混合使用。此外,即使是同一批次,也请避免与存储的制剂混用。
● 移液以及稀释操作会影响检测精确度,请进行正确操作。
● 孔板干燥会导致固相化抗体变性,请避免干燥。
● 请从试剂移液开始时计算各自的反应时间。
● 如果将试剂移液到96孔的时间较长,请注意保持各孔的反应时间一致。
● 每次检测都需要绘制标准曲线。
● 请务必使用试剂盒随附的缓冲液稀释样品。
● 请严格遵循本试剂盒的储存条件。

● 反应终止液是1 M硫酸，请注意不要触碰到手和粘膜。
● 请勿让显色剂触碰到手和粘膜。
● 处理显色剂与反应终止液时，请勿接触金属。
● 处理样品（血清、血浆等）时请留意感染风险。
● 抗体固相化孔板由8孔×12列构成，因此可以使用切割器等切割，一次使用一列。
● 在制备试剂时，请勿谈话、饮食、吸烟。

B. 移液器的种类与注意事项

移液器的种类

使用至今的手动移液器种类繁多，包括刻度移液管，整体吸量管，奥氏吸管，λ吸管（嘉士伯吸管，收缩移液管），萨利氏吸管，安全移液管，巴氏移液管等。但从40年前，人们就开始使用半自动、全自动移液器。本章节主要介绍常用的半自动移液器的种类、特征及使用时的注意事项。

半自动移液器主要分为三类。

气体活塞式移液器

较为常用的是使用圆锥形塑料吸头的移液器，其优点是溶液不会与移液器主体接触，不会污染移液器，更换吸头后可立即测量其他溶液。

缺点：溶液与移液器之间存在着空气，会受到空气的影响。

弹力：会影响吸取以及排液的速度。

还会受溶液粘度的影响。溶液粘附在吸头内侧会导致排液量减少（空气会穿过粘附的溶液被排出）。

膨胀：溶液的温度高于室温时，空气膨胀，吸取量减少。

收缩：溶液的温度低于室温时，空气收缩，吸取量增多。

因此，1段按压式活塞移液器会有溶液残留在吸头内。而2段按压式活塞移液器会将多余溶液全部排出，所以需将多余排出的溶液也考虑在内。

对策：吸取和排液的速度不要太快，分注时保持速度恒定。

该类移液器（Single-stroke dispenser）的允许误差

如下表所示，国际标准ISO 8655-5规定了该类移液器的允许误差范围。（尽管在p24的《实操》部分已提及，但因其十分重要，故在此重述。）

公称容积（μL）	1	2	5	10	20	50	100
系统误差（μL）	0.05	0.08	0.125	0.12	0.2	0.5	0.8
系统误差（%）	5.0	4.0	2.5	1.2	1.0	1.0	0.8
随机误差（μL）	0.05	0.04	0.075	0.08	0.1	0.2	0.3
随机误差（%）	5.0	2.0	1.5	0.8	0.5	0.4	0.3

公称容积(Nominal volume)指移液器的最大容量。

例如,量程为10~100 µL的可变单通道移液器的误差为:

Maximum systematic error(系统误差):±0.8 µL

Maximum random error(随机误差):±0.3 µL

注)系统误差(与设定液量的差):与10次检测结果的平均值对比

随机误差(波动):10次检测结果的标准偏差

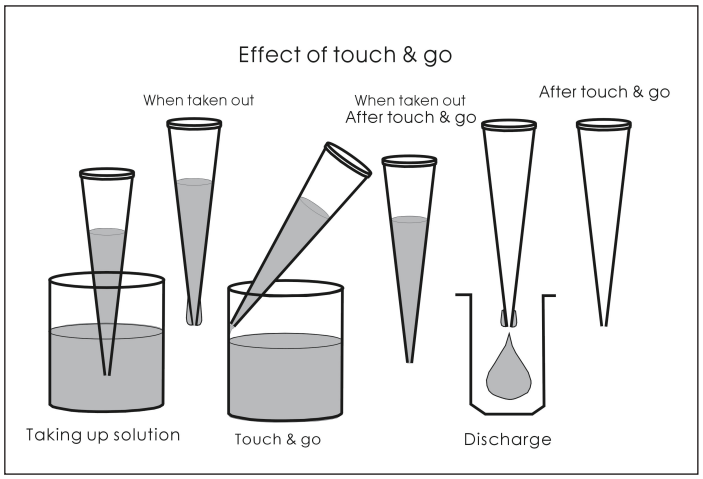
因此,如果使用10~100 µL的可变单通道移液器测量10 µL,那么允许的随机误差为3%。另一方面,检测范围为0.5~10 µL的可变容量移液器设定10 µL时,随机误差可被控制在0.8%。

请注意,多通道活塞移液器(8通道,12通道)的允许误差是单通道移液器规定值的2倍。

请勿使用多通道移液器移取标准溶液和样品。

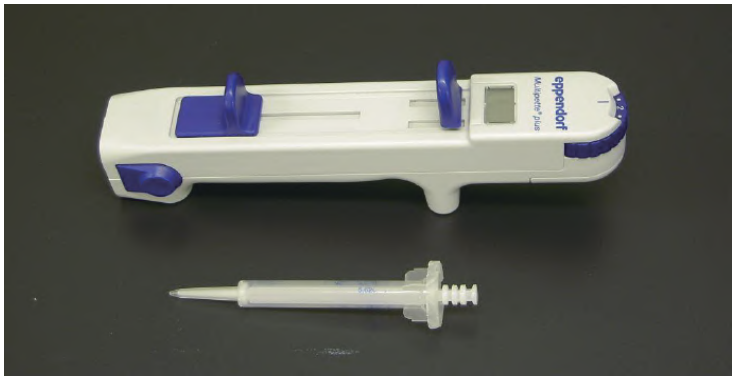
其他注意事项

请注意吸头外侧附着的溶液。吸液后,请将吸头的顶端轻轻触碰容器内壁,进行"touch and go"。排液时需进行相同操作。



在使用2段按压式活塞移液器吸液时,切勿将活塞推至第二段,否则会吸取大量多余溶液,必须在第一段进行吸液。

渐进活塞式移液器



与Eppendorf Multipette Plus类似,使用注射器型的吸头。吸取溶液后按下排出杆,就能缓慢推动活塞,排出一定量的溶液。适用于将相同溶液分注到多个测试管或孔板中。

缺点:这种移液器的精确度取决于制造时的精确度,活塞每次推进的距离和吸头的内径均为恒定的。因此,不同制造商生产的移液器的精确度会有差异。

这种情况下,如果排出量设定较低,误差会变大。

ISO 8655-5规定的多通道移液器的最大允许误差如下表所示。

公称容积(μL)	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000
系统误差(μL)	1.0	2.0	5.0	10	16	30	50
系统误差(%)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.6	0.5
随机误差(μL)	1.0	2.0	3.0	4.0	0.1	15	30
随机误差(%)	1.0	1.0	0.6	0.4	0.5	0.3	0.3

公称容积(Nominal volume)指移液器的最大容量。

注)系统误差(与设定液量的差):与10次检测结果的平均值对比

随机误差(波动):10次检测结果的标准偏差

公称容积的最大允许误差适用于该移液器的所有设定容量。

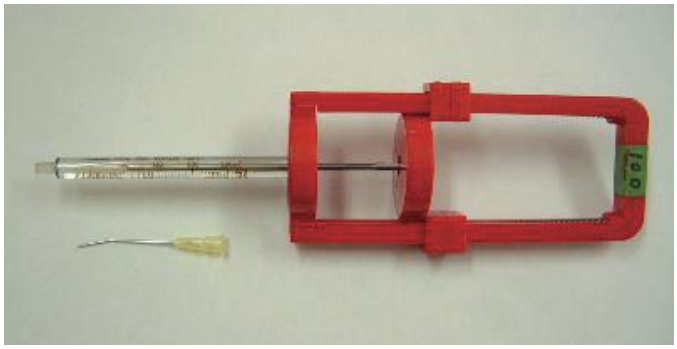
以Eppendorf Multipette Plus为例,2.5 mL注射器的公称容积为500 μL。因此,设置任何小于该数值的量,允许系统误差均为5 μL,随机误差为3 μL。例如,设定50 μL分注50次时,系统误差的最大允许误差为10%,随机误差为6%。

注意事项

请务必排尽活塞与溶液间的空气。吸液后,由于无法确定首次活塞的推进距离是否一致,因此最初1到2次的溶液要注回瓶中。然后,使用吸头尖端轻轻触碰瓶壁,开始分注。

请进行touch and go。尤其是注射器型的吸头,顶端较宽,容易黏附溶液。若想避免黏附,可以在吸头前端安装一个细锥形吸头。

活塞式移液器



与Hamilton注射器类似,活塞可以在一定距离来回移动,吸取和排出定量溶液的移液器。移液器无需手动调整刻度,但需要使用上图所示的装置来自动停止活塞的移动。部分设备也会使用马达来调节活塞的上下移动。

缺点:难以买到适配的适配器

这类移液器的精度最高,100 μL的误差约为CV 0.15%

检测移液器的重复性(随机误差)

在进行100 μL的精确度检测时,需准备约20支直径为8~12 mm的小测试管(ISO的规定为10支)、在灵敏度为0.1 mg的天平上称量并记录,使用移液器移液蒸馏水后再次称重,并计算移液的水的重量。根据所得数据求平均值和标准偏差,并计算标准偏差占平均值的百分比,即CV(变异系数)。

在进行5~10 μL移液器的精确度检测时,需要使用灵敏度更高的天平,如灵敏度为10 μg的半微量天平或灵敏度为1 μg的微量天平。

根据检测时的温度求出水的比重,用于计算容积(volume)并求出系统误差,但ELISA并不需要考虑系统误差,因为标准品和样品都使用同一个移液器添加。使用其他移液器的情况则另当别论。

其他移液操作的注意事项

● 携带污染

假设使用移液器吸取含有高浓度检测对象物质的样品。若不更换吸头直接吸取下一个样品，吸头中残留的高浓度样品会与下一个样品混合，导致检测结果偏高。为了防止这种现象，可以采取以下手段：

1. 更换吸头；
2. 预洗吸头。

吸头预洗是指，吸取高浓度样品后，去除首次吸取的下一个样品，使用第二次吸取的样品的操作。

● 制备标准曲线时使用的标准溶液浓度需由低到高排列

即使发生了携带污染，影响也很小。

● 只需要进行一次Touch and go，若重复多次会甩出吸头内的溶液。

● 使用新吸头时

更换吸头后，需将首次吸取的液体排回溶液后再次吸取。

尽管吸头的疏水性优异，但溶液依然会在一定程度上扩散并吸附在吸头内侧，因此排液量也会相对减少。可以通过排出一次后再吸取来补正液体量。

不建议排液时反复按压活塞，只需排出吸取的液体即可。

● 注意测量和吸取的液体量

吸取的液量越少，活塞移动的精确度和吸头外侧附着的液体造成的影响越大，导致重复操作的误差越大。如果反应条件允许，建议最小测量取液量为50 µL。需要量取5 µL或10 µL时，应使用专门的移液器（测量范围为0.5~10 µL）。

● 防止污染

移液试剂时，请勿将移液器直接插入储液瓶中取液，移液器上可能附有其他物质。需要从储液瓶量取比所需量稍多一点的液体，装入小容器中使用。剩余的溶液不能再放回储液瓶。

C. 移液器的精确度与检测精确度的关系——ELISA的优势——

免疫分析分为两类，一类是基于竞争性结合原理的检测（competitive assays），另一类是基于非竞争性结合（三明治法）原理的检测（non-competitive assays）。

前者有RIA（radioimmunoassay）和竞争性EIA（Enzyme immunoassay）等，后者则以IRMA（immuno-radiometric assay）和ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）等为代表。

让具有免疫分析经验的人感到惊讶的是，与基于竞争性结合原理的检测精确度相比，夹心法的检测精确度更高。其中缘由只需探究移液对检测的影响，就能找到其主要原因。

RIA等基于竞争性结合原理的检测体系中，标记抗原、抗血清和样品会在非常低的浓度下相互作用，因此每种移液的影响叠加后，会导致误差增大，从而降低检测精确度。RIA的检测精确度通常约为百分之几，并且几乎不低于1%。此外，RIA还存在放射性的检测误差。

放射性的波动来源于放射性同位素衰变的波动，检测N cpm的放射性1 min时，其标准偏差为N的平方根。例如，检测10,000 cmp的放射性1 min时，其变异系数为1%。

ELISA等非竞争性夹心结合的检测法又如何呢？

首先，样品的移液误差会直接影响检测值。例如，1%的移液误差会影响1%的检测值误差，这与竞争性检测相同。但是对于抗体而言，捕获抗体和标记抗体都会过量添加，所以即使有些许波动也没有影响。由于抗体已经过量，因此难以对反应造成影响。然后，用ELISA检测酶的活性，IRMA检测放射性。如前文所述，放射性检测的波动无法避免。另外，ELISA中的酶活性也可能会发生变化。酶活性检测用的显色底物和偶联剂也会过量添加，因此，受移液的波动影响较小。但是，清洗时应注意清洗器的水流强度及清洗液的残留。

综上，ELISA的变异系数低于1%就不足为奇了。

因此，考虑移液对实验的影响，非竞争性检测更有优势。

D. 废液等试剂的处理方法

废弃标准请参照各地区的条例及研究所的规定进行处理。

如果条例和规定等均未作出明确指示，请参考以下标准。

【清洗液】

表面活性剂和磷酸缓冲液。请用大量自来水冲洗。

请丢弃未使用的残留溶液。

使用自来水清洗容器，并作为塑料废弃物处理。

【缓冲液稀释的标准品、HRP标记抗体、生物素标记抗体、HRP-亲和素溶液】

请使用大量自来水冲洗，丢弃未使用的残留溶液。

使用自来水清洗容器，并作为塑料废弃物处理。

【显色液的残留溶液：TMB】

未使用的残留溶液应作为有机溶剂委托相关产业（医疗）废弃物处理公司进行处理。或者用纸吸收后进行可燃处理。

使用自来水清洗容器，并作为塑料废弃物处理。

【反应终止液的残留溶液：1 M H_2SO_4】

未使用的残留溶液应作为有机溶剂委托相关产业（医疗）废弃物处理公司进行处理。

或使用以下中和试剂进行中和，然后用大量自来水冲洗。

使用大量自来水清洗容器，并作为塑料废弃物处理。

中和时请务必佩戴眼镜或护目镜保护眼睛。

万一溶液溅入眼睛，请立刻用大量自来水冲洗并就医。

推荐的中和方法：（氢氧化钠与碳酸氢钠二段中和法）

准备0.5 M NaOH和0.5 M $NaHCO_3$溶液。

使用方法：向V mL残留溶液中多次少量添加3.5×V mL的0.5 M NaOH溶液。然后，多次少量添加V mL的0.5 M $NaHCO_3$溶液。会产生少量二氧化碳气体。

也可以仅使用碳酸氢钠进行中和，但根据计算，中和10 mL的1 M H_2SO_4会产生约450 mL（880 g）的二氧化碳。如果介意碳排放量，请使用上述方法。

注意事项：即使添加了过量中和液pH值也会在9的范围内，相当方便。

请小心反应放热与二氧化碳生成，中和后请使用大量水冲洗并废弃。

【使用完成的孔板与孔中的显色液（TMB+反应终止液）】

未使用的残留溶液应作为有机溶剂委托相关产业（医疗）废弃物处理公司进行处理。或者用纸吸收后进行可燃处理。

使用切断内部吸管的洗瓶或吸液管回收孔中的液体。使用吸液管回收时，不要直接冲洗，而是在中间插入瓶子用于截留。回收后的液体应作为非氯（水溶性）有机物委托相关产业（医疗）废弃物处理公司处理。

此外，回收的溶液为反应终止液时也请中和后进行废弃处理。

此时，硫酸的浓度为0.5 M，因此，需要使用回收液1.8倍量的NaOH与回收液0.5倍量的$NaHCO_3$。

【使用完成的96孔板】

按照上述方法去除孔中的反应液后用自来水清洗，并委托相关产业（医疗）废弃物处理公司处理。

或去除96孔中的溶液，用自来水清洗，灭菌后，作为一般废弃物处理。使用高压灭菌器，或在0.1%以上的次氯酸钠溶液中浸泡1 h以上进行灭菌。

【样品粘附的耗材（样品存储容器、吸头）】

请委托相关产业（医疗）废弃物处理公司处理。如果是具有传染性的物品，使用1%福尔马林、2%戊二醛溶液或0.1%以上的次氯酸钠溶液浸泡至少1 h。或使用高压灭菌器灭菌后废弃。

III. 更多关于ELISA的信息

A. 关于误差

本章节以分析法的验证为中心，解答在使用ELISA时遇到的各种问题。首先来了解一下“关于误差”的基础知识。

在各种分析法中，误差可分为以下几种。

1. 偶然误差/随机误差（accidental deviation、random error）

偶然误差即variation（变异、误差），与精确度相关。具体以标准偏差（standard deviation，SD）或相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）的形式表示，又称为变异系数（coefficient of variation，CV）。

注）RSD与CV完全相同，用SD/平均值×100（%）表示。

2. 系统误差（systematic error）

系统误差是指与真实值之间的差值也被称为bias（偏差），与正确性或准确度（accuracy）相关。此外，还与检测平均值相关。

基于以上两种误差，可能会出现以下4种结果。

	系统误差小	系统误差大
偶然误差小	**精确且正确**	**精确但不正确**
偶然误差大	**正确但不精确**	**不精确也不正确**

3. 严重错误（mistake、gross error）

不允许出现的错误，如试剂取用错误、稀释倍率错误、刻度读数错误、操作顺序错误、检测仪器故障、试剂变性、移液器故障等导致无法顺利进行实验的失误。

从ELISA的角度出发，以下将探讨偶然（随机）误差和系统误差。

ELISA的各个过程中可能产生偶然误差（变异）的因素

- 孔板
  - 温度不均匀、结构不均匀
- 样品
  - 样品的浓度不均匀（由于冻融导致溶质分布不均匀）
  - 样品的稀释不均匀（由于搅拌不充分导致溶液中的浓度有所偏差）
- 样品、标准品添加和结合反应
  - 样品（或标准品）的移液（吸头的选择、操作者的操作水平）
  - 温度误差（边缘效应）、时间误差（检测者的操作水平）
- 添加样品后的初次清洗：残留效应
- 随后的清洗：清洗液残留产生的影响
- 酶标抗体（生物素标记抗体）的添加和反应
  - 温度误差、时间上误差
  - 标记抗体的非特异性吸附-空白值增加，与低浓度范围内的检测灵敏度恶化和误差相关。
- 显色液的添加和反应
  - 温度误差、时间上误差
- 吸光度检测
  - 微孔板孔间吸光度的误差（孔板底部的划痕、底部厚度等因素影响）
  - 吸光度检测的精确度（多个光度计的差异）

系统误差：关于偏差-为什么检测值会出现偏差

● 关于标准品

纯度低、重量的偏差（如水分被吸收）、稀释的偏差、吸附现象、结构差异（重组）等。

● 关于检测样品

提取方法（溶血、乳糜）、存储方法（变性）、降解酶的存在、结合蛋白的存在、检测对象物质的结构多样性、添加抑制检测用酶活性的物质、分别使用不同的吸头添加标准溶液和样品等。

● 关于抗体

抗体无法同时识别标准品和样品中的待测物。

如特异性不足，则样品中的其他物质也会被检测出。

● 关于检测体系与检测方法

○ 标准曲线制备体系与样品反应体系之间存在偏差。例如：

标准曲线体系中由周边孔引起的边缘效应（edge effects）、样品的组成成分引起的抗原抗体反应的速度、对反应平衡的影响以及对沉淀反应的影响

○ 吸光度检测设备的检测结果存在偏差（如光电探测器的偏差）

○ 显色的时间性衰减

○ 标准曲线回归方程的拟合不理想（偏离准确度）

以上原因等等皆有可能导致检测值出现偏差。

B. 分析方法验证项目的要求

部分性能参数已经过ICH（International Conference of Harmonization、美国、欧盟和日本三方发起的国际人用药物注册技术协调会议）讨论并视为实施项目。根据厚生省医药审第338号文件，厚生省药品安全局审查管理课长通知各都道府县卫生局，申请审批新药时，需参考分析法验证相关的文本资料（实施项目），将分析法验证相关的资料附件添加于审批申请中。日本药典的第14版、第15版的参考信息中也记载了此项规定。其内容包括以下信息：

1）分析方法（Analytical procedure）（定义）

2）特异性（Specificity）

在多种物质共同存在的条件下，能否准确地对待测物进行分析

3）准确度（Accuracy、Trueness）

真实值（认证值、协议值）与检测值的一致性

4）精确度（Precision）

从均质样品中多次采集的多个样品的检测值之间的一致性

4.1）重复性（Repeatability）

在短时间内、相同条件下检测得出的精确度（=intra-assay precision）

4.2）室内再现性（Intermediate precision）

在不同的测试时间、由不同的实验人员、使用不同的仪器或设备等在同一实验室内进行检测时的精确度

4.3）室间再现性（Reproducibility）

在不同的实验室内进行检测时的精确度

5）检测限（Detection Limit）

检测待测物所需的最低样品量。无须进行定量

6）定量限（Quantitation Limit）

能够以合适的精确度和准确度对待测物进行定量的最低样品量

7）线性（Linearlity）

能够在一定范围内给出与样品中待测物的量呈线性关系的检测值

（在免疫分析中并不严格有效）

8) 量程 (Range/检测范围)
样品与其他待测物的上下限区间，以确认合适的准确度、精确度和线性
9) 稳健性 (Robustness)
即使分析方法的条件发生变化，检测值也不容易受到影响的能力

我们将在后续章节中依次解释每一项验证项目。

C. ELISA中的标准曲线与检测值的计算

使用免疫分析试剂盒时，经常会遇到如何制备标准曲线，以及如何根据标准曲线计算样品检测值等的问题。根据检测原理不同，标准曲线也会有所差异。在使用竞争性结合原理 (competitive binding) 进行检测时，标准曲线可进行近似值的理论性分析。根据X轴和Y轴所需要的刻度，可选择不同的回归方程并绘制对应的标准曲线。Shibayagi的大部分产品为非竞争性检测法 (non-competitive assay) 的ELISA试剂盒，也经常会收到了大量关于如何绘制标准曲线的提问。以下将以实例进行基础说明。

1. ELISA的指标

以酶活性、荧光强度为指标时：
酶→显色底物→显色剂→显色
酶→荧光显色底物→荧光物质→ (激发光) →荧光
由此可见，在显色的情况下应使用吸光度作为指标，荧光的情况下则应使用荧光强度作为指标。

吸光度与比色定量

比色定量法基于Lambert-Beer’s law。

$$吸光度=\log10(Io/I)=\varepsilon lc$$

ε：摩尔吸光系数 ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)　l：吸收层　c：浓度

透过率倒数的对数 (吸光度，absorbance) 与显色物质的浓度成比例。
一般而言，光度计可检测吸光度 (absorbance) 和透过率。
假设50%的入射光被吸收，100/50=2，log2=0.301，则透过率为10%时的吸光度为1.0、透过率为1%时的吸光度为2.0。因此，吸光度在2.5以上时难以保证其精确度。所以，ELISA的检测上限通常在此范围内设定。

荧光强度

$$F=\phi I0(1-10^{-\varepsilon cl})$$

I0：激发光强度　φ：量子产率　ε：分子吸光系数　l：吸收层　c：浓度

在稀溶液中　$F=2.3\varepsilon clk\phi I0$　k：仪器常数

荧光强度与放射性相同，均是与酶转化产生的物质浓度直接相关的数值，因此可视为酶活性的直接指标。

2. 如何在ELISA中计算检测值

a. 手动计算

绘制标准曲线

使用**标准比例的方格纸**，以吸光度和荧光强度为纵坐标，标准品本身的浓度为横坐标 (浓度越低标准点之间的距离越窄)。
使用**单对数方格纸**绘制标准曲线时：以吸光度和荧光强度为纵坐标，以标准品浓度的对数为横坐标 (低浓度的标准点沿Y轴方向保持窄间距)。
使用**双对数方格纸**时：以吸光度和荧光强度的对数为纵坐标，以标准品浓度的对数为横坐标。
使用曲线软尺连接绘制的标准点，制备标准曲线。曲线在X轴和Y轴方向上的间距大致相等。

计算样品浓度

从各样品的吸光度或荧光强度中读取Y→X，求出样品浓度。

● 手动计算相关的注意事项

① 使用标准比例方格纸时

如在大范围内绘制标准曲线，低浓度区域的标准点之间的间隔会缩小，导致难以判断。如样品的吸光度位于低浓度区域，则建议舍弃高浓度部分并放大低浓度区域的刻度。

② 使用单对数方格纸时

在高浓度区域的效果良好，但由于标准曲线的斜率在低浓度区域较为缓和，导致难以凭肉眼判断Y值，因此不建议在低浓度区域进行手动计算。

③ 使用双对数方格纸时

无论是低浓度还是高浓度均可做出判断。如需进行手动计算，推荐使用双对数方格纸。

下列采用计算器计算的情况中，无论采用何种刻度，只要回归曲线与标准点的拟合良好即可。推荐使用与回归曲线拟合良好的转换方法，为此选择使曲线起伏平缓的拟合方法会更为合适。

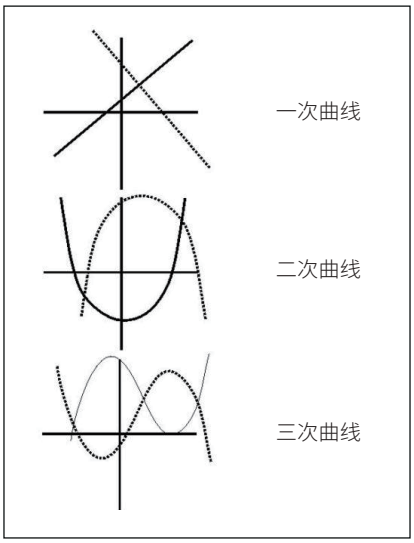
通过将标准点对应的吸光度减去空白的吸光度所得的值绘制标准曲线也是一种良好的方法。由于曲线的顶点可能落在标准点之间，因此这种方法在曲线的斜率平缓的低浓度区域尤为有效。

另外，如果样品处于低浓度区域，一般情况下舍弃高浓度部分计算回归曲线会得到更好的拟合效果。但在这种情况下，二次曲线需要计算3个以上的标准点，三次曲线需要计算4个以上的标准点（请考虑系数的数量）。

b. 计算机绘制回归曲线

模型函数

线性函数（线性回归直线）：在Logit变换中非常实用。
二次函数（二次回归曲线）：当曲线向一个方向弯曲时有效。
三次函数（三次回归曲线）：可用于有拐点的sigmoid函数和逆sigmoid函数。
当然，也可用于无拐点的抛物线。
四参数Logistic模型：适用于sigmoid曲线和逆sigmoid曲线。
部分酶标仪已安装了相关程序，无需再重新输入数值。



线性回归

$Y=aX+b$　参数=2

二次回归

$Y=aX^2+bX+c$　参数=3

三次回归

$Y=aX^3+bX^2+cX+d$　参数=4

四参数逻辑斯谛模型（Four parameter logistic model）

$$Y=\frac{a-d}{1+(x/c)^b}+d \quad 或 \quad Y=d-\frac{d-a}{1+(x/c)^b}$$

（为便于理解，这里以向右上倾斜的曲线为例）

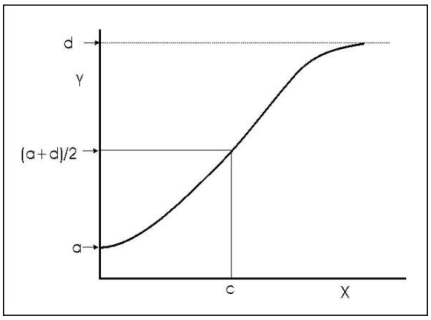
假设X=0时，Y=a

X=infinity时，Y=d

X=c时，Y=（a+d）/2（a和d的中点）。

b：调整曲线的形状

如公式所示，根据曲线的形状不同，其拟合情况也有所差异。无论如何，都需要通过计算标准点的Y值和X值来确认使用的回归曲线与标准点的拟合程度。



c. 回归与计算的具体示例

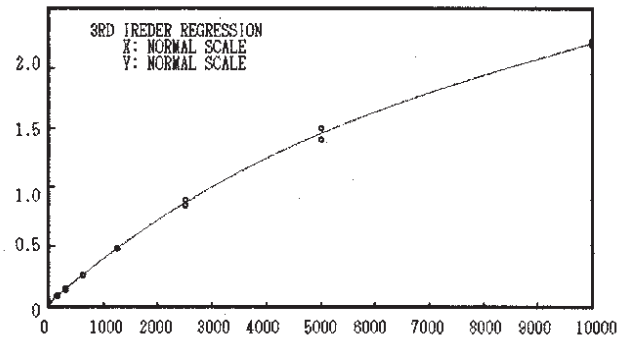
在ELISA中，如果在Y轴上取吸光度和荧光强度、在X轴上取X或LogX，只要检测范围取了较大的数值，那么即使是在高浓度区域中曲线的斜率也会下降，曲线变为sigmoid型的形状。而部分区域（低~中浓度）会呈抛物线状。关于如何选用X轴和Y轴的刻度，不同刻度类型有不同的优缺点，下面将以Shibayagi的大鼠胰岛素ELISA试剂盒T型为例进行说明。当然，即使趋势相同，使用不同试剂盒所绘制的曲线形状也会有所差异，因此并不一定都与此试剂盒的曲线相同。

标准曲线所用的原始数据如下表所示。

标准品浓度 pg/mL	Absorbance (450-620 nm)
0	0.031 0.031
156	0.086 0.087
313	0.142 0.145
625	0.258 0.263
1250	0.483 0.483
2500	0.850 0.890
5000	1.401 1.449
10000	2.199 2.221

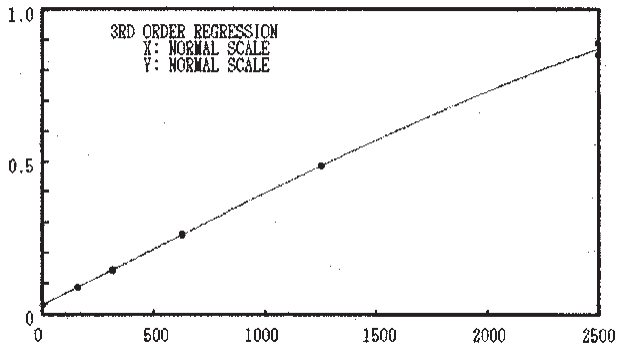
表中标准品浓度成倍增加。这是由于检测范围较广，且检测精确度相对与浓度趋于恒定，即相对误差趋于恒定。因此如果检测范围较广，则推荐参考表中的浓度设定。注意：使用对数刻度时应去除零点进行计算，或在计算时从总数中减去零点的吸光度。

X轴与Y轴均使用标准刻度作图



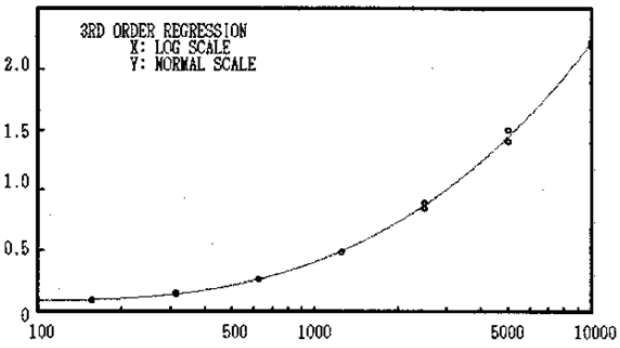
在本例中，回归曲线使用三次回归，可获得良好的拟合效果。虽然没有在此列出，但本例使用二次回归的拟合效果也十分良好。

此情况下各个标准点之间的距离并非恒定，且由于在低浓度区域过于接近，因此这虽然适用于使用方程计算浓度，但不适用于手动计算检测浓度。若样品中待测物的浓度范围集中在低浓度区域，建议参考下图舍弃高浓度区域的部分、只绘制低浓度区域的标准曲线。



在156~2,500 pg/mL的范围内绘制标准曲线，得到如上图所示的标准曲线。在此范围内，曲线的弧度接近于直线，且与三次方程的拟合程度十分良好，手动计算也会较为轻松。

X轴使用对数刻度，Y轴使用标准刻度



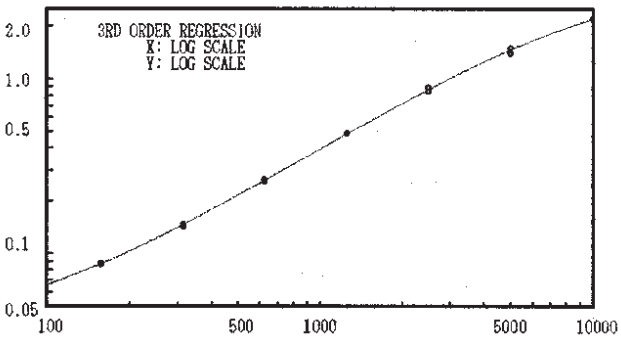
使用单对数方格纸进行绘制时，通常使用如上图所示的刻度表示。

当然，各个标准点之间的间隔是相等的，但低浓度区域的斜率会变平缓，若尝试对这类曲线进行拟合，通常无法获得理想的拟合效果。

因此，笔者不建议采用此种刻度进行绘制。

X轴与Y轴均使用对数刻度

使用双对数方格纸进行绘制



此时几乎呈现线性的平缓曲线，此种情况下与三次曲线的拟合效果良好。笔者建议此绘图方法应用于手动计算和计算机计算。

绘制出满意的标准曲线后，输入Y值并求出X。

若样品已提前稀释，则用稀释倍率乘以检测值计算样品的检测值。

由笔者（若林先生）建立并由Shibayagi免费提供的BASIC程序可自由设置X轴和Y轴来绘制校准曲线，也可从一次、二次和三次回归曲线中选择拟合度较高的曲线计算样品浓度。

Shibayagi向Shibayagi试剂盒用户提供此程序。

不过由于此程序是由BASIC编写的，因此在WINDOWS中运行BASIC还需要中介软件：「BASIC/98 for Windows」Ver.5，本软件由Dennou Gumi有限公司提供，可从电脑专卖店或经营电脑软件的电器店订购。取得此软件后，请与Shibayagi联系，我们将向您发送回归/计算程序以及使用说明。

如无法使用BASIC，我们建议使用EXCEL进行计算。

d. 使用EXCEL进行ELISA的计算

建议使用以下两种方法：

(1) 使用对数变换数据中X和Y互换的标准曲线进行计算

(2) 使用目标搜索功能，利用对数变换数据绘制并计算标准曲线，其中X和Y不进行互换。

EXCEL是非常实用的表格计算软件。

但EXCEL在ELISA的检测、绘制标准曲线，以及检测样品的日常计算中较为麻烦。在标准曲线的回归方程Y=f (X) 中，可以使用“目标搜索”根据Y值求出X。但由于需要逐个计算Y值，所以此方法的效率并不高。相反，使用X值求Y则容易许多，因此建议计算ELISA的检测结果，可考虑使用将X和Y互换的方法。

已注册并获得密码的Shibayagi邮件会员可从官网上下载计算excel模板。下文将展示如何创建和使用该模板。

方法1：使用对数变换数据的标准曲线进行计算的方法（X和Y互换）

标准曲线模板

首先制作如下图的表格。

在单元格B2中输入=Ln (A2)，E2中输入= (C2+D2) /2，F2中输入=E2-$E$9，G2中输入=Ln (F2)，

H2中输入=$K$11*G2^3+$K$12*G2^2+$K$13*G2+$K$14，I2中输入=EXP (H2)，

J2中输入=I2/A2*100。使用鼠标拖拽从B2填充到J2、从B8填充至J8，然后会出现如图所示的“#NUM!“错误值。到这一步表格基本完成，请参考下方表格内容在第一行以及J11~J14中输入如下内容。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Conc.	Ln(conc)	Abs 1	Abs 2	Mean	△blank	Ln (△blank)	CalLn (conc)	Fitness	准确率	
2		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
3		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
4		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
5		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
6		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
7		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
8		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
9	Blank				0						
10											
11										a (X^3)	
12										b (X^2)	
13										c (X)	
14										d (const)	

使用方法

首先输入标准曲线的实验数据，从A列补充至G列：

在表格的A列中输入标准品浓度（从高到低），C列和D列中输入两次检测所对应孔的吸光度。至此，G列为止的表格完成。

请以此表格为基础，参考下方方法创建X和Y互换的图表。

求逆向图表与近似方程式(适用于EXCEL 2003及以下版本)

1) 点击工具栏中的“图表向导”。
2) 选择“散点图”。
3) 仅选择绘图(无线条)(默认设置),下一步。
4) 选择Ln(conc)列(示例中的B2~B8)作为数据范围(不包括数值为0的部分),“数据系列”勾选“列”。
5) 点击“系列”,选择X的数据范围。
6) 选择Ln(⊿Blank列(示例中的G2~G8)为X的数据范围。“下一步”。
7) (这一步操作可省略)在「标题与标签」选项卡中输入图表的标题、X轴和Y轴的名称,点击“图例”选项卡,取消选中“显示图例”。
8) 省略“下一步”,点击“完成”按钮即可在数据表格中绘制图表。
按照上述步骤操作即可绘制出涵盖所选标准浓度的图表。

使用EXCEL 2007时

1) 选择数据范围(B2~B8和G2~G8),点击“插入”选项卡,选择“散点
2) 点击列表中第一个无连线的散点图。→显示以浓度为横轴、吸光度为纵轴的散点图。
3) 点击图表,打开图表工具,点击“设计”,再点击“选择数据”。在打开的窗口中点击图例选项中的“编辑”。
   点击“系列X的值”,选择吸光度对数的范围(G2~G8)。
   点击“系列Y的值”,选择浓度范围(B2~B8),点击“OK”互换X轴和Y轴。
   再次点击“OK”,完成散点图。
4) 继续点击图表工具中的“布局”。
   选择“拟合曲线”,然后选择底部的“更多拟合曲线选项”。选择“多项式拟合”,并将次数设置为3。
   勾选下方的“在图表上显示公式”和“在图表上显示R2值”。关闭选项窗口,完成图表绘制。

后续的计算

如图表中显示的方程为$y=ax^3+bx^2+cx+d$,则在K11、K12、K13、K14的单元格内填写X^3、X^2、X的系数以及常数项a、b、c、d。

H列中将显示计算得出的对数浓度,列表还会自动进行准确度的计算。建议比较I列与A列的数据,确认两者是否一致。J列作为“Fitness”的指标,准确度以百分比表示。

检测三次的情况下则请进行相应的修正。

使用模板进行样品计算

新建如下一页所示的表格,行数应与样品数一致。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	No.	Abs 1	Abs 2	△Bk1	△Bk2	Ln(1)	Ln(2)	AsVal. 1	AsVal 2	Mean 1	SD	CV		
2	1			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!		
3	2												Blank	
4	3													
5	4												a	
6	5												b	
7	6												c	
8	7												d	

在单元格D2中输入=B2-$N$3，鼠标拖拽从D2填充至E2。在单元格F2中输入=LN（D2），鼠标拖拽从F2填充至G2。

在H2中输入=EXP（$N$5*F2^3+$N$6*F2^2+$N$7*F2+$N$8），鼠标拖拽从H2填充至I2。

在单元格J2中输入=（H2+I2）/2，K2中输入=STDEV（H2:I2），L2中输入=K2/J2*100。

检测后，将标准曲线中空白吸光度的平均值输入单元格N3。然后，在单元格N5、N6、N7、N8中输入标准曲线方程的系数和常数项（请复制标准曲线表中的K11~14）

接下来将第一个样品的吸光度1和2输入单元格B2和C2中即可完成这一行。

输入第2个及后续样品的吸光度，鼠标拖拽从D2填充至最后一个样品，完成计算。

模板可从Shibayagi的官网进行下载（会员用），下载后请复制进行使用。

以上内容为重复检测两次的示例，重复检测三次的模板也可提供。

方法2：X和Y不进行互换，利用对数变换数据绘制并计算标准曲线的方法（Goal seek法）

制作标准曲线的模板

首先制作如下一页所示的表格。与方法1相同，根据标准曲线用的检测数据新建A~G列的表格（包括空白组在内，标准品浓度分为8个梯度进行说明）。

单元格B2中输入=Ln（A2），E2中输入=（C2+D2）/2，F2中输入=E2-$E$9，G2中输入=Ln（F2）。这部分与“（1）”完全相同。

H2中输入=（$K$10*I2^3）+（$K$11*I2^2）+（$K$12*I2）+$K$13。

I2中输入1，J2中输入=EXP（I2），K2中输入=J2/A2*100，

鼠标拖拽从B2填充至K2，然后拖拽填充至K8。

至此模板完成，含“#NUM!“错误值的表完成。

使用方法

1）在表格的A列中输入标准品浓度（从高到低），C列和D列中输入两次检测中相应孔的吸光度、单元格C9和D9中输入空白的吸光度。至此，G列为止的表格完成。

请以此表格为基础，绘制图表。

求逆向图表与近似方程式（适用于EXCEL 2003及以下版本）

1）点击工具栏中的「图表向导」，选择只有4个点的散点图（默认选项）。

2）选择Ln（conc）列（本示例中为 B2~B8）作为数据范围（不包括数值为0的部分），“数据系列”勾选“列”。

3）点击“系列”，选择Y的数据范围（G2~G8）。

4）选择Ln（conc）列（本示例中为B2~B8）为X的数据范围。“下一步”

5）（这一步操作可省略）在「标题与标签」选项卡中输入图表的标题、X轴和Y轴的名称，点击“图例”选项卡，取消选中“显示图例”。

6）点击“完成”按钮即可在数据表格中绘制图表。

按照上述步骤操作即可绘制出涵盖所选标准浓度的图表。

X轴和Y轴刻度线的位置并不重要，如有必要可进行修正。

7）在图表中的数据点上右键单击，选择“添加趋势线”和“三次多项式”，点击“选项”勾选“显示公式”和“显示R2值”，三次拟合方程即可在图表中显示。

将拟合方程$y=ax^3+bx^2+cx^2+d$的系数和常数项a、b、c、d输入K11~K14。

使用EXCEL 2007时

1）选择数据范围（B2~B8和G2~G8），点击“插入”选项卡，选择“散点图”。

2）点击列表中第一个无连线的散点图。→显示以浓度为横轴、吸光度为纵轴的散点图。

3）继续点击图表工具中的“布局”。

选择“拟合曲线”底部的“更多拟合曲线选项”。将“多项式拟合”，并将次数设置为3。

勾选下方的“在图表商显示公式”和“在图表上显示R2值”。关闭选项窗口，完成图表绘制。

将拟合方程$y=ax^3+bx^2+cx^2+d$的系数和常数项a、b、c、d输入K11~K14。

至此目标搜索功能的设置准备完成。

根据标准点吸光度计算浓度

运行目标搜索。EXCEL 2003可以在工具栏中找到此功能。

EXCEL 2007需要点击“数据”选项卡，然后点击What if找到此功能。

点击目标搜索栏，对话框中会要求填写3个空栏。在第一个填有公式的单元格中选择H2。

在“目标值”一栏中输入G2的数值（需要直接输入，无法指定单元格）。请勿在此使用回车键，否则会提示错误。

鼠标移动至“待更改单元格”，指定I2。

点击“OK”后开始计算，计算结果会覆盖I2单元格中的数字。然后点击“OK”，这一行关于准确度的计算就完成了。

运行下一个目标搜索，跳转至下一行，指定H3、输入G3的数值、并指定I3，进行这一行的计算。

接下来也是相同的操作，计算至H8。

请注意，此步骤十分容易出错，因此在目标搜索的对话框中输入数值需要集中注意力！

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Conc.	Ln(conc)	Abs 1	Abs 2	Mean	Dblank	Ln(△blank)	输入公式	Ln(calconc)	Calconc	准确率
2		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
3		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
4		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
5		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
6		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
7		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
8		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
9	Blank				0						
10										a (X^3)	
11										b (X^2)	
12										c (X)	
13										d 常数项	

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	No.	Abs 1	Abs 2	△Bk 1	△Bk 2	Ln(1)（目标值1）	Ln(2)（目标值2）	公式 1	公式2	Cal. Ln 1 变化1	Cal. Ln 2 变化2	AsVal 1	AsVal 2	Mean	SD	CV		
2	1			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.7183	0	0	Blank	
3	2			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.7183	0	0		
4	3			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.7183	0	0		
5	4																a	
6	5																b	
7	6																c	
8																	d	
8																		

制作样品计算模板

在D2中输入=B2-$R$2，鼠标拖拽B2复制至E2。F2中输入=LN（D2）、鼠标拖拽F2复制至G2。

H2中输入=$R$5*J2^3+$R$6*J2^2+$R$7*J2+$R$8，复制至I2。在J2和K2中输入1。L2中输入=EXP（J2），复制至M2。

N2中输入=（L2+M2）/2，O2中输入=STDEV（L2:M2），P2中输入=O2/N2*100。

执行计算

首先，将标准曲线表中空白吸光度的平均值（单元格E9中的数字）输入R2。

接下来，复制标准曲线表中的近似方程系数和常数项，粘贴至该表格的R5~R8中。

之后，仅复制D2的样品数至P2，输入全部样品的吸光度Ab1和Ab2后使用目标搜索的准备步骤完成。H、I、L、M、N列的数值保持不变（目标搜索的计算完成后会全部变为正确值）。

运行目标搜索，输入H2、F2、J2的组合求出J2的解，然后同样求出I2、G2、K2的解。后续按顺序使用目标搜索求解。

检测值的平均值、标准偏差和CV会自动进行计算。样品的数量不限。

3. 标准曲线的验证

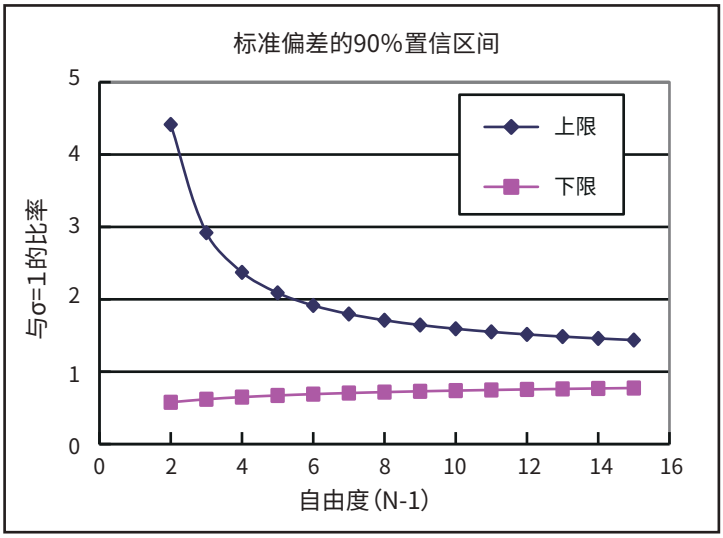
a. 关于标准曲线的偶然误差和系统误差

通过绘制标准曲线计算检测值，代表标准曲线的偶然误差会与样品的偶然误差相加。由于标准曲线是根据多个标准点计算所得，可以将误差控制在小范围内，影响较小，但在验证标准曲线时仍需留心。

标准曲线的系统误差与样品的系统误差有共通点，也有不共通的点。共通点有：试剂因素、移液因素、清洗因素、显色因素等；不共通的点有：标准品的纯度、标准溶液的成分等。后者是影响样品检测值准确性的关键因素，按照ICH的标准来说即为准确度（Accuracy、Trueness）。关于这一点将会在下文的“检测系统的准确度”中进行说明。

b. 检测限（Detection Limit）与定量限（Quantitation Limit）相关

检测限是指待测物的最低可检测量，即“灵敏度（sensitivity）”。此数值只需明确地检测出物质即可，无须进行定量。在ELISA中，以往通常定义为空白吸光度+2SD的待测物量或浓度。若将总体样品的标准偏差设为σ，那么在平均值±2σ的范围内便包含了约95%的总体样品，但如下图所示，在有限的样品数中求得的SD可靠性较低。下图显示了当σ=1时样品数的自由度和所得标准偏差的95%置信区间。



σ的下限：$\sqrt{\frac{n-1}{X^2_H}}s$　　σ的上限：$\sqrt{\frac{n-1}{X^2_L}}s$

X^2（卡方）为自由度n-1时对应的p=0.025（H）及p=0.975（L）的值

s为从样品中得到的标准偏差

σ为实际的标准偏差

基于ISO以及IUPAC的定义，ICH对检测限（DL）的设定为：

DL=3.3s/a

s：空白样品吸光度的SD

a：检测限附近的标准曲线斜率

将定义的等式变形后可以看出，DL中的CV为30%。下面将以Shibayagi的小鼠胰岛素ELISA试剂盒的空白邻近标准曲线为例，对检测限（DL）和定量限（QL）进行说明。

（厚生省 医药审第338号）

检测限（Detection limit）

（基于ISO及IUPAC的规定，ICH对检测限的定义）

DL=3.3 s/a

s：空白样品吸光度的SD
a：检测限附近的标准曲线斜率
DL：检测限

0.004×3.3=0.0131
DL=0.0131/0.0289=0.453

上述公式变形可得
（s/a）/DL=0.3
因此DL中的CV为30%

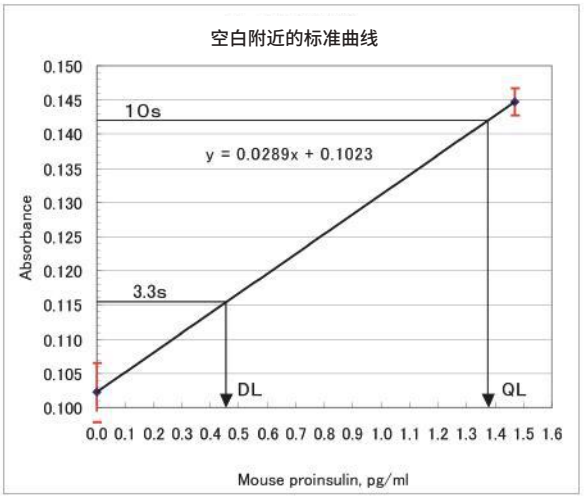
定量限（Quantitaiton limit）

QL=10 s/a

0.004×10=0.04
QL=0.04/0.0289=1.38

QL中的CV为10%

浓度 pg/ml	Abs. 1	Abs. 2	Mean	SD	CV
2.94	0.177	0.168	0.172	0.006	3.57
1.47	0.146	0.143	0.145	0.002	1.36
0	0.105	0.099	0.102	0.004	4.22



此外，关于**定量限（Quantitation Limit）**的定义，是以合适的精确度和准确度可以定量待测物的最小量，即QL=10s/a。QL中的CV相当于10%。

c. 关于前带

在ELISA的检测系统中，随着标准品浓度的增加，吸光度相对于标准品浓度的增加率（即标准曲线的斜率）会逐渐减小，并趋于平稳。即与固定化抗体结合的抗原比例会减少。标准曲线的斜率减小会增加精确度系数（概率误差/斜率），导致检测值失去可靠性。这样的区域被称为前带，代表检测范围的界限。一般的试剂盒中，标准品的最大浓度通常设置在前带之前。另外，前带中的吸光度在3（即99.9%）以上，接近分光光度计的极限。

因此ELISA的吸光度一般设计在2.5以下。

d. 关于范围（Range）

ICH对范围（Range）定义为“上限和下限之间的区域，在该区域中，待测物（如样品等）能以合适的准确度、精确度和线性进行检测”，即可检测范围。从ELISA试剂盒的生产商的角度出发，检测范围指的是从标准曲线的一端到另一端，即能够为检测提供保证的范围。

事实上，在多个孔中检测单个样品时获得的检测值的“最大值~最小值”也称为范围（range），注意不要将两者混淆。（PS：重复两次检测时的标准偏差为range/$\sqrt{2}$，记住这一点可以减轻计算工作。）

e. 标准曲线的评价标准

如何定义好的标准曲线?在*Pharm Res 20: 1885-1900, 2003*的论文中，APPS Ligand Binding Assay Bioanalytical Focus Group推荐了以下条件，可作为参考。

○ 重复检测两次间的吸光度差异小

假设某重复两次检测的标准点吸光度为A1和A2。

A1和A2的平均值与1/2*｜A1-A2｜的比率（%）需在15%以下。

○ 使用6浓度以上的标准点制备6次的标准曲线时，

通过逆回归计算浓度（根据标准曲线的回归曲线计算的各标准点的浓度），

各个标准点的准确度为80-120（70-125）%（这时准确度为标准点的逆回归浓度/标称浓度×100%）。

注）标称浓度指各标准溶液的制备浓度

所有标准点中的准确度（n=6）的平均值为85-115（80-120）%。

注）括号内为最小定量限（QL）的数值

逆回归浓度的变动系数（CV）需在15%以下（n=6）。

○ 选择性（Selectivity）：在低浓度下的识别能力极限

向检测样品（n=6）中加入最小定量限浓度的标准品时，回收率达到75%以上。

f. 标准曲线的再现性

各个标准点的吸光度是否能够在每一次检测中保持恒定、不发生大幅度变化?

标准曲线的形状是否几乎恒定?

各个标准点上的回归曲线准确度是否几乎恒定?

每次使用常规的ELISA试剂盒时，建议对以上几点进行检查确认。

4. ELISA的吸光度偏差如何反映在检测值中

ELISA将通过酶转化的显色底物的显色表示为吸光度（absorbance）。然后以吸光度为纵轴，以待测物的标准浓度为横轴，绘制标准曲线。

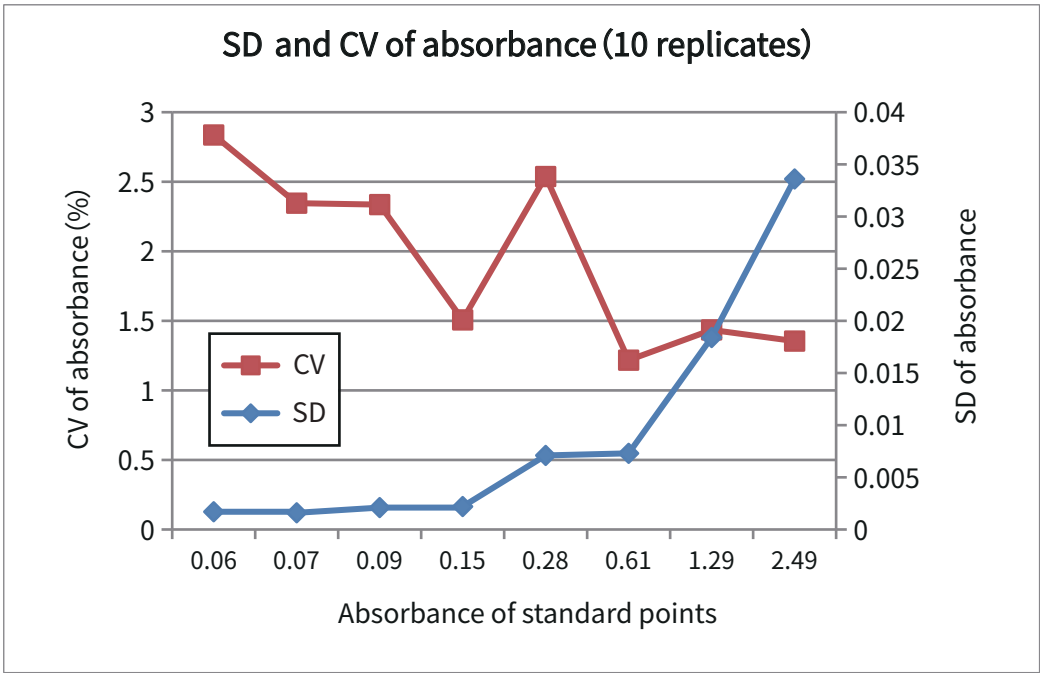
那么，每个标准点对应的吸光度之间有多大的差异呢?当然，这些差异在很大程度上取决于检测系统的性能以及实验人员的操作，不妨先通过Shibayagi的几个实例来观察其趋势。

接下来，通过数值观察吸光度的偏差是如何体现在检测值的偏差中的。

首先，以下是使用某试剂盒对各个标准品进行重复十次检测的结果。在进行了多次检测的情况下，标准偏差的可信度非常高。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean	SD	CV%
2.398	2.484	2.492	2.464	2.511	2.513	2.486	2.505	2.5	2.492	2.4845	0.0336	1.3545
1.286	1.271	1.272	1.263	1.279	1.3	1.299	1.306	1.285	1.323	1.2884	0.0184	1.4349
0.61	0.604	0.609	0.612	0.61	0.602	0.597	0.606	0.602	0.624	0.6076	0.0073	1.2173
0.275	0.292	0.283	0.286	0.284	0.284	0.271	0.29	0.273	0.287	0.2825	0.0071	2.5375
0.147	0.147	0.144	0.152	0.146	0.149	0.146	0.146	0.149	0.148	0.1474	0.0022	1.5068
0.086	0.088	0.091	0.091	0.092	0.092	0.088	0.089	0.089	0.092	0.0898	0.0021	2.3358
0.07	0.071	0.07	0.075	0.069	0.071	0.071	0.07	0.07	0.072	0.0709	0.0016	2.346
0.06	0.064	0.06	0.061	0.06	0.06	0.061	0.061	0.061	0.057	0.0605	0.0017	2.8362

为了更直观地显示，将上述表格转换为以下图表。



此试剂盒的最大吸光度约2.5。随着吸光度的降低，吸光度的偏差（即标准偏差）会明显减少。另一方面，随着吸光度的降低，标准偏差与平均吸光度的比值显示增加的趋势，但与最小值和最大值的比值差约两倍。也就是说，绝对误差会随着吸光度的变化而明显浮动，但相对误差的变化并不明显。

吸光度的偏差和检测值的偏差

接下来，使用此检测系统，计算如果吸光度增加2%，检测值会发生多大的变化。

STD.	吸光度	计算值	吸光度+2%	计算值	⊿%
0.1	0.063	0.1004	0.06426	0.1047	4.28
0.25	0.105	0.2496	0.1071	0.2572	3.04
0.5	0.199	0.5018	0.2034	0.5124	2.11
1	0.426	0.9977	0.4345	1.0159	1.82
2.5	1.173	2.5119	1.1965	2.5612	1.96
5	2.206	4.9683	2.25	5.0902	2.49
10	3.558	10.0479	3.629	10.4286	3.79

⊿%中的数值是在原吸光度的基础上偏离2%时的检测值变化。

即标准品浓度在0.5~5 ng/mL范围内的吸光度变化大致上对应检测值的变化。而当浓度低于0.5 ng/mL或高于5 ng/mL时，吸光度的波动对检测值的影响相对较大。

然而，此检测系统在低浓度条件下的偏差仍然远小于放射免疫分析（RIA）等竞争性检测法。这是因为在低浓度范围内，即使是在双对数方格纸上绘制标准曲线，其斜率也不如RIA那样小。

在低浓度下的偏差增大可能是由光度计的检测偏差或孔板的光学均匀性（厚度或划痕）导致的。

因此，我们仅在孔中加入缓冲液，然后检测48个孔中的吸光度。

检测结果如下表所示。

0.006	0.006	0.005	0.004	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.002	0.003
0.004	0.003	0.001	0.003	0.002	0.003	0.003	0.004	0.002	0.002	0.003	0.002
0.005	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001
0.005	0.005	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.004

此仪器的检测限为小数点后三位，无法获得更精确数值。

Mean	SD	CV (%)
0.00325	0.00112	34.5

吸光度本身的数值非常低，平均为0.00325，换算为透过率后为99.25%。SD值为0.00112，相当于空白和最低浓度标准品偏差的一半左右，很大程度上影响了在空白和低浓度范围内的CV值大小。

5. 模拟结合量与标准曲线

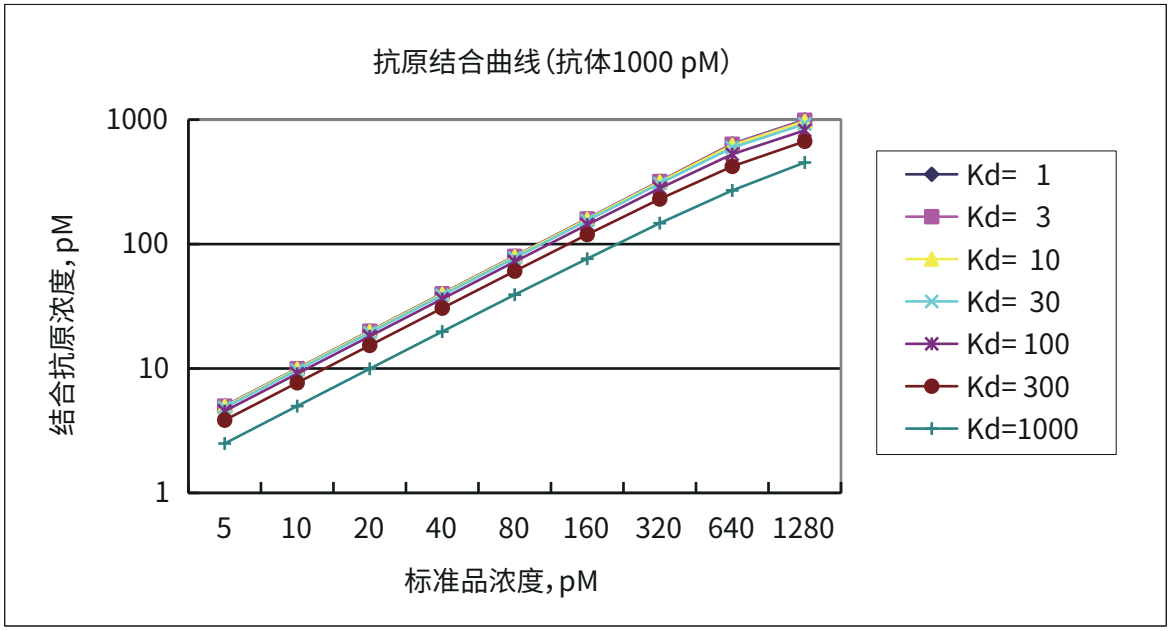
从标准曲线的章节中可以发现，双对数转换中的标准曲线是一条平缓的Sigmoid曲线。而在标准刻度和单对数（仅x轴）转换中无法观察到这种现象。为什么标准曲线不是线性呢？

根据求抗原抗体反应结合常数的公式，假设抗原和抗体的初始浓度分别为H和R，反应结果的结合量为b（单位：M），则：

$$Kd=(H-b)x(R-b)/b$$

$$b2-(Kd+H+R)b+RH=0$$

$$b=\frac{Kd+H+R-\sqrt{(Kd+H+R)^2-4HR}}{2}$$



向1,000 pM固相化抗体中加入5~1,280 pM抗原时，根据解离常数Kd的值，使用上述公式计算结合量如何变化之后，绘制如上图所示的图表。这些结合曲线与实际的标准曲线不同，可以看出其在低浓度区域呈直线。

那么在ELISA中，固相化抗体在各个标准点实际捕获了多少添加抗原？

在添加一定量的抗原时，若要确认其与固相化抗体的结合程度，则需要一定量的标准品在固相化孔中反应后，通过将反应液转移至其他固相化孔中检测“反应后残留的抗原量”。

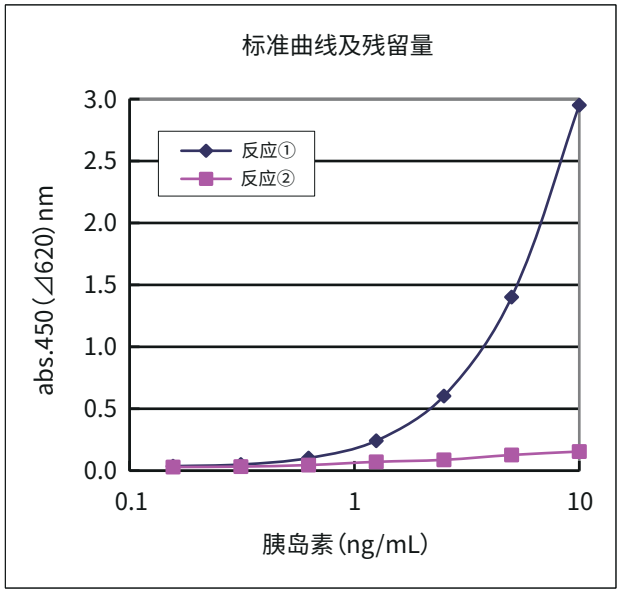
使用LBIS大鼠胰岛素试剂盒（T型）进行测试。

实验方案为：

反应①：按照常规步骤进行反应

反应②：反应①的Biotin,STD反应2 h后，将各STD按照100 μL/well移液至其他孔反应，然后按照常规步骤进行检测。

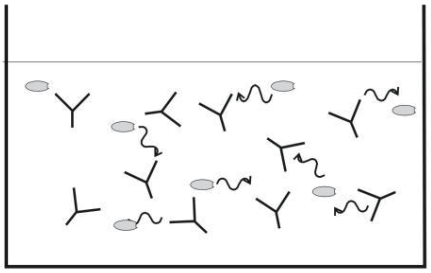
实验结果如下图所示，x轴取对数，反应①即为标准曲线。利用此标准曲线计算反应②的量（即反应①的反应残留量）。

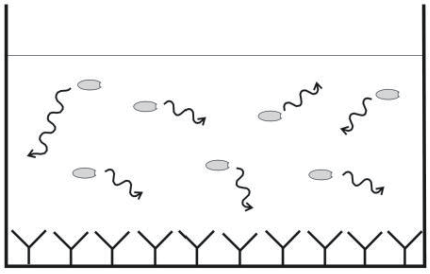


添加量ng/mL	残留量ng/mL	残留率（%）	结合率（%）	结合量ng/mL
10	0.9672	9.7	90.3	9.03
5	0.8273	16.55	83.45	4.17
2.5	0.588	23.52	76.48	1.912
1.25	0.4844	38.75	61.25	0.7656
0.625	0.2868	45.89	54.11	0.3381
0.3125	0.1444	46.21	53.79	0.1681
0.156	0.086	55.13	44.87	0.07

从上表可以看出，结合率会随着添加浓度的降低而降低。而在最低浓度时，结合率只有最高浓度时的一半。如抗原浓度与结合率的关系图所示，结合率与抗原浓度的对数成正比。

其原因可能是当低浓度较低时，达到平衡需要一定的时间，特别是在过量添加抗体时，抗体会被固定在孔底、无法在溶液中自由移动（见配图）。



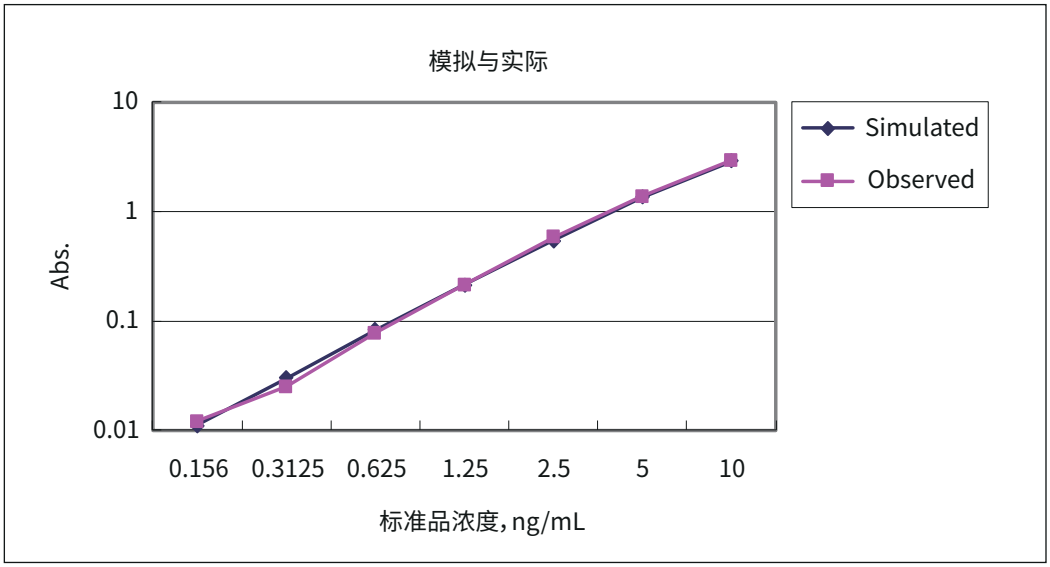


如果抗原与固相化抗体结合，并且所有抗原都与酶标抗体(或亲和素)结合，那么结合抗原的量与酶作用产生的吸光度成正比。而计算表明，酶活性的变化与结合抗原量的对数成正比，但依然存在固相化的障碍。

为模拟添加抗原量和吸光度的标准曲线，需将从抗原抗体反应公式中求得的值与结合效率降低系数1相乘来校正结合量，然后再乘以单位吸光度×吸光率(结合效率降低系数2)。

对于LBIS大鼠胰岛素试剂盒(T型)，实际结合量是通过计算0.156~10 ng/mL范围内的添加抗原得出，即27~1,724 pM以及10,000 pM固相抗体和1,000 pM的解离常数的组合。然后，乘以结合效率降低系数1以及添加抗原在10 ng/mL和5 ng/mL时的吸光率(按每pM换算)，并乘以结合效率降低系数2计算得出标准曲线。与实际的标准曲线重合后的图表如下图所示。

最终可得到令人满意的模拟结果。



固相化等方式导致的结合率降低是影响ELISA检测灵敏度的一大要因。

D. 精确度(precision)相关的参数与计算

虽然与ICH指导原则的顺序差异比较大，但笔者想先从试剂盒用户的角度出发，讨论一下实验中常见的随机误差相关的验证。

在ICH中，精确度(precision，从均质样品中多次采集的多个样品检测值间的一致程度)分为3类。即重复性(Repeatability)、室内再现性(Intermediate precision)、室间再现性(reproducibility)。其中的室间再现性在临床检查中十分重要，但本技术手册主要面向实验室以及个人，因此对室间再现性不进行详细展开。

1. 重复性(repeatability)和室内再现性(intermediate precision)的计算

偶然误差即variation(变异、误差)，与精确度相关。具体以标准偏差(standard deviation，SD)或相对标准偏差(relative standard deviation，RSD)的形式表示，又称为变异系数(coefficient of variation，CV)。

注) RSD与CV完全相同，用SD/平均值×100(%)表示。

变异系数(CV)=(标准偏差(SD)/平均值)×100(%)

CV又称为相对标准偏差(Relative standard deviation，RSD)，在重复性中写作intra-assay coefficient of variation、within-assay coefficient of variation，在室内再现性中则写作inter-assay coefficient of variation、between-assay coefficient of variation。

计算示例如下所示。

一般的计算方法

例如，在不同的4天对3个样品进行检测，每个样品每天检测4次，结果如下图所示。如果只求重复性那么只需要计算一次，下表的数据可以同时计算重复性和室内再现性。假设检测值的单位为ng/mL。

Day1

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.51	2.32	2.38	2.45
Sample 2	12.16	12.92	13.54	13.12
Sample 3	89.31	98.28	93.21	92.63

Day2

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.71	2.54	2.62	2.58
Sample 2	13.14	12.95	13.85	13.33
Sample 3	92.3	95.63	99.23	93.42

Day3

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.16	2.28	2.38	2.33
Sample 2	11.25	11.36	12.15	11.85
Sample 3	87.98	88.56	89.01	91.05

Day4

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.48	2.53	2.38	2.33
Sample 2	12.2	12.88	13.65	13.11
Sample 3	91.32	98.04	95.31	90.01

和 = $\sum Xi$　　平方和 = $\sum X^2$　　标准偏差 = $\sqrt{\frac{\sum Xi^2 - \left(\sum xi\right)^2 / n}{n-1}}$

根据上述公式进行计算，得到如下表所示的结果。

Day1

	和	平方和	平均值	标准偏差	变异系数(%)
Sample 1	9.66	23.3494	2.42	0.086	3.56
Sample 2	51.74	670.258	12.94	0.5776	4.47
Sample 3	373.43	34,903.66	93.36	3.7042	3.97

Day2

	和	平方和	平均值	标准偏差	变异系数(%)
Sample 1	10.45	27.3165	2.61	0.0727	2.78
Sample 2	53.27	709.8735	13.32	0.3874	2.91
Sample 3	380.58	36,238.28	95.15	3.0546	3.21

Day3

	和	平方和	平均值	标准偏差	变异系数(%)
Sample 1	9.11	20.7717	2.28	0.0943	4.12
Sample 2	46.61	543.6571	11.65	0.4219	3.62
Sample 3	356.6	31,796.24	89.15	1.335	1.5

Day4

	和	平方和	平均值	标准偏差	变异系数(%)
Sample 1	9.72	23.6446	2.43	0.09128	3.76
Sample 2	51.84	672.929	12.96	0.6007	4.64
Sample 3	374.68	35,136.98	93.67	3.6835	3.93

● 关于重复性，以Day 1检测值的变异系数为例，Sample 1的变异系数为3.56%，Sample 2为4.47%、Sample 3为3.97%。
由于重复了4次，所以建议取平均值。以Sample 1为例，(3.56+2.78+4.12+3.76)/4=3.56%的可靠性会更高。如前文检测值的偏差章节所述，重复性会随着标准曲线上的位置而发生变化。因此，若样品间的检测值差异越大，那么CV平均值的可信度就越低。这时，应记录每份样品的CV或使用“该浓度范围内的CV百分之多少”等表达方式会更为妥当。

● 关于室内再现性，根据各样品每日检测平均值计算得出下表。

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	和	平方和	平均	SD	CV
Sml 1	2.42	2.61	2.28	2.43	9.74	23.7718	2.43	0.135	5.56
Sml 2	12.94	13.32	11.65	12.96	50.87	648.550	12.71	0.732	5.76
Sml 3	93.36	95.15	89.15	93.67	371.33	34,491.4	92.83	2.576	2.78

由此计算得出重现性用变异系数表示分别为5.56、5.76和2.78(%)。
若想获得可信度高的室内再现性，需增加各检测中各样品的重复次数(replicates)。

● 使用其他方法评估重复性的探讨

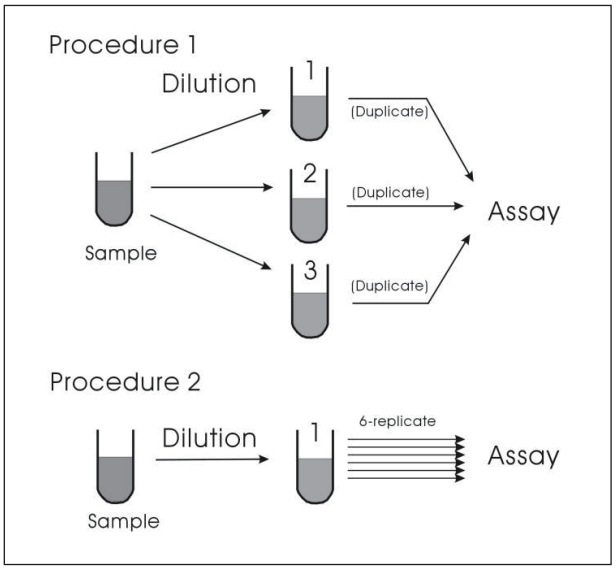
以下方法常被用于评估试剂盒的检测精确度。

进行样品稀释检测时，假设将一份样品通过3次移液取等量的样品，分别使用相同的稀释倍数制成三份稀释样品，然后对每份稀释样品检测两次，并求三份稀释样品的平均值和偏差。样本通常会重复检测，因此在单次检测中对同一样本检测三次并取其变异系数非常实用且有意义。

但笔者的想法有些不同。请参考右图中的Procedure 1，从一份样品中分三次稀释，移液和稀释时都会产生偏差，而且检测阶段也会根据试剂盒的性能产生偏差。此外，检测人员的操作技术也有可能产生偏差。总而言之，此方法会出现过多的变量。另外，试剂盒本身特性产生的偏差也会因重复检测降低各CV的可信度。

因此，尽管该方法可为判断检测人员的技能(即移液器操作和稀释的熟练度)提供参考，但对于试剂盒关键的性能却无法提供明确的信息。另一方面，如果按照Procedure 2只进行1次稀释，那么稀释后的数据不会产生偏差。在此基础上进行六重检测，试剂盒的性能受检测人员操作技术的影响较小。

同时使用以上两种方法并比较两者的偏差有助于鉴别检测人员的操作技能。而在没有稀释的情况下，Procedure 1几乎毫无意义。



2.室间再现性(reproducibility)

室间再现性是指在不同的设施之间进行检测时的精确度。

一般来说,只在一个实验室内进行的检测往往无法得到相关的数据,需设立一个联合项目并由多个实验室协作。如日本放射性同位素协会的放射性药物部门会定期向日本全国各地的临床实验室分发试剂盒和样品委托他们进行检测,并汇总结果。

另一方面,室间再现性评估还应用于实验室和检测人员的水平测试(proficiency test,PT)。从均质材料中菜鸡的样品会定期分发给多个实验室(检测人员),并要求其向中央的计划执行机构报告分析结果,而评估的结果会与所有数据一起反馈给相应的研究室。如此一来就可以根据反馈对自身进行反思,在下一次测试中提升检测能力。

能力测试的其中一项标准为Z score。

Z=(x-xa)/σ

x:在单个实验室内得出的检测值

xa:在多个专业实验室内的检测值的平均值

σ:实验结果标准偏差的目标值

若Z score的绝对值小于2,则表示结果令人满意,

若2<|Z|<3则表示可信度较低,|Z|>3则为完全无法接受的结果。

E. 评估准确度(accuracy、trueness)的实用实验方法

根据ICH,准确度是指准确的数值(经过认证、一致认可的值)与实际测量值之间的一致程度。准确度过去也被称作"正确性、正确度(Accuracy)"。

多种测试方法可以用于验证检测系统的准确度(即检测系统显示正确的数值),例如稀释测试、加标回收测试、与其他分析系统的比较测试等。

1. 稀释线性测试(研究血液成分是否有影响)(dilution linearity test)

使用检测缓冲液连续稀释血清(血浆),横轴取稀释度的倒数、纵轴取检测值时,曲线(稀释曲线)应是一条通过原点的直线。

无法形成直线的情况:首先考虑血液成分的影响,使用不含待测物的血清(free serum)进行稀释后检测绘制稀释曲线。若稀释曲线仍然是非线性,可尝试向系统中加入free serum用于绘制标准曲线。

另一种方法是将稀释曲线与标准曲线叠加在一起,以确认平行性(平行性研究)。

[检测值×稀释度]无论在任何稀释度下都必须保持一致。

以上为稀释测试的要求。

稀释线性测试的示例

下表为Sample 1和Sample 2分别连续稀释后进行两次检测的结果。

Sample 1

Dilution Factor	mean.	SD	CV(%)
1	7.926	0.158	1.992
0.5	3.939	0.115	2.912
0.25	1.925	0.044	2.28
0.125	0.955	0.022	2.343

Sample 2

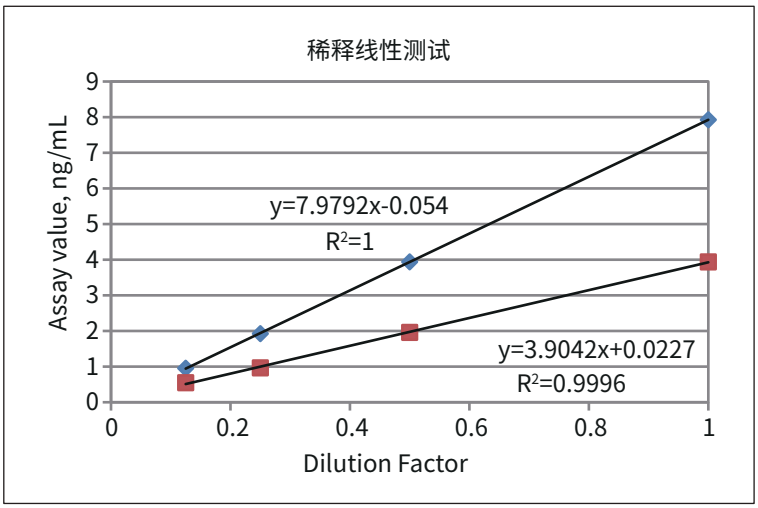
Dilution Factor	mean.	SD	CV(%)
1	3.938	0.103	2.604
0.5	1.96	0.036	1.826
0.25	0.965	0.024	2.476
0.125	0.548	0.009	1.595

将上述结果转化为图表。

以Dilution factor为横轴，以检测值为纵轴绘制散点图。

从图中可以看出，将各个Sample的检测值连接起来，就会得到一条近乎通过原点的直线。

这表明稀释线性测试成功。



2. 加标回收测试（recovery test、spike recovery test）

向待测样品中添加一定量的标准品（spike）进行检测，然后从检测值中减去原样品的检测值，即可检验添加的标准品是否被回收。

一般要求在误差范围内回收100%。

向两份样品中加入不同浓度的标准品，确认检测结果。

关于标准品的添加量，最好以对添加，其中一个量大于样品原始量，另一个则少于样品原始量。 如果添加量与样品中的所含量相比过多或过少都会产生误差，导致难以获得正确的结果。

B << A：B会被A的误差范围覆盖。

B >> A：A会被B的误差范围覆盖，导致回收率过高。

向两种血清样品中分4个阶段加标，并重复检测三次，结果如下表所示。单位为ng/mL。

Sample 1

添加量	实测值	回收量	回收率（%）
0	1.01	-	-
0.19	1.19	0.18	95
0.39	1.38	0.37	95
0.79	1.76	0.75	95
1.97	2.99	1.98	101

Sample 2

添加量	实测值	回收量	回收率（%）
0	4.24	-	-
1.69	5.89	1.65	98
3.39	7.5	3.26	96
5.08	9.1	4.86	96
6.88	10.6	6.37	94

结果显示，Sample 1和2中添加的标准品在检测精确度范围内的回收率几乎达到了100%。

3. 与其他检测系统的相关性测试

若已有既定的检测方法，可使用既定的检测系统和研究中的检测系统检测相同的样品（建议使用多种样品，尽量扩大检测含量范围）。以既定检测系统的检测值为横轴、讨论中的检测系统的检测值为纵轴，绘制两个检测系统的散点图。

此时，相关系数需尽可能地接近1；

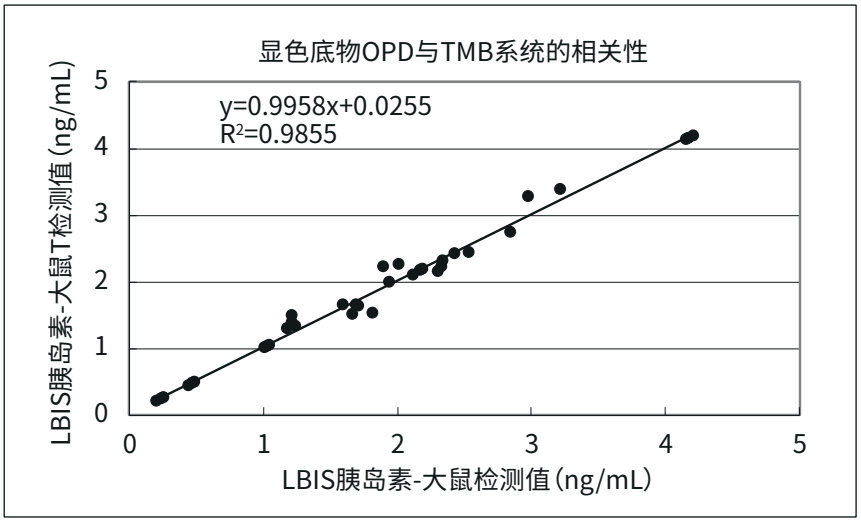
在误差范围内，回归直线的斜率必须接近1。

若两个检测系统的检测精确度良好，那么相关系数应接近1。“在误差范围内”指的是无统计学意义上的明显差异。推荐使用计算相关系数的程序或能够得出回归直线斜率标准误差的程序。

回归直线的斜率不等于1时，表明标准品的纯度不佳导致检测系统获得高检测值。这种情况可尝试使用提供低检测值的检测系统检测标准品，然后将两者进行比较。如斜率仍不等于1，则需要考虑抗体的特异性。

以两种大鼠胰岛素检测系统的比较为例。

使用Shibayagi的两款试剂盒进行检测，一款使用OPD作为显色底物，另一款使用TMB作为显色底物。下图为使用同一样品进行检测的相关性。



相关系数的平方和为0.9855，98.5%的数据可以用这一回归直线进行说明，因此相关系数为0.9927，接近1。

回归直线的斜率0.9958，与1相差不大，Y轴截距为0.0255，也是很小的数值。

由此，可以认为OPD系统与TMB系统拥有相同的准确性。

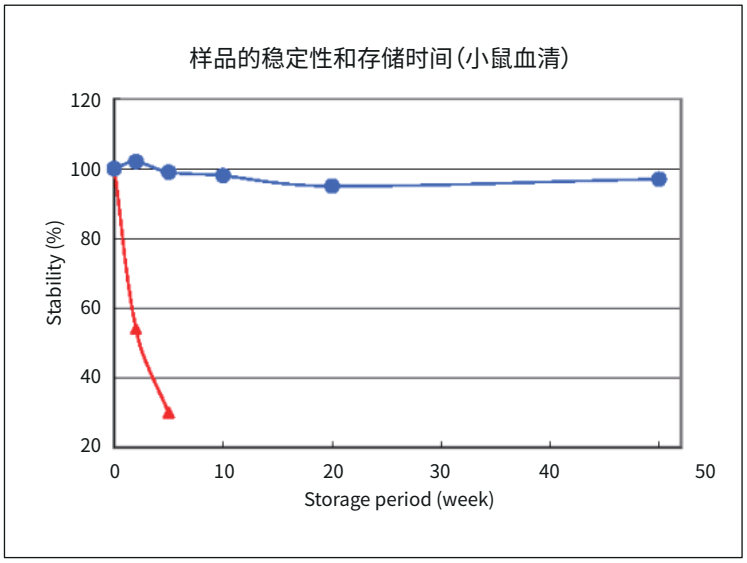
F. 检测样品的稳定性

在进行检测时，检测样品的稳定性、待测物在样品（例如血清）中是否能与抗体保持长时间的结合十分重要。血液中含有能够分解肽和蛋白质的酶，而不同的物质对酶的抵抗力也各不相同。

因此在建立检测系统时，需要在不同的温度以及时间段确认待测物样品中物质的稳定性，并根据结果确定样品的储存方法。推荐使用质控血清（quality control serum，QC）作为样品。质控血清是指含有高/低浓度或高/中/低浓度待测物，通过混合、分装后超低温保存的血清。在每次检测时与其他样品一起进行检测，根据结果判断各个检测是否成功。稳定性的确认标准如下：

室温稳定性	2 h
冷藏柜的稳定性	24 h
冻融稳定性	3次
长期稳定性	-20°C或-80°C

使用LQC（低浓度质控血清）和HQC（高浓度质控血清）重复检测三次。将血清分别储存在4°C的冷藏柜和-20°C的冷冻柜中并检测胰岛素的结果如下图所示。胰岛素在-20°C条件下可保持稳定状态长达50周，而在4°C的冷藏柜中则很快失去了免疫活性。



但在-20°C储存时温度容易发生变化,冷冻溶液的稳定性也让人担忧;且在-20°C冷冻时容易导致蛋白浓度不均,因此推荐在更低温的条件下(如-35°C以下)进行储存。冷冻时也推荐先使用液氮或干冰-丙酮等进行速冻(snap-freeze)后再放入冷冻柜。

添加防腐剂

存储常规样品通常会在血清等中加入杀菌剂和分解抑制剂。

过去常用merzonin(又称硫柳汞、硫醇酸盐)作为杀菌剂,但由于其含有水银成分,近年来已经被禁止使用;如今使用叠氮化钠(sodium azide, NaN_3)替代。叠氮化钠是ELISA中常用的过氧化物酶抑制剂,它不会对抗原抗体反应造成影响,且在样品与固相化抗体反应后进行彻底清洗,就不会对后续的酶反应造成影响。但无法完全保证叠氮化钠可以在清洗过程中完全被去除,所以不使用会更安全。

血液中存在的蛋白酶可能会导致待测物被分解,为了防止这种情况,有时会选择添加蛋白酶抑制剂。但不同的物质对蛋白酶的抗性不同,建议通过实验自行确认破坏程度和抑制剂的效果后再使用。

以胰岛素为例:在采集样品后不立即进行检测,而是放入冷藏柜等设备中储存时,可加入抑肽酶(Aprotinin)作为分解酶抑制剂,使最终浓度为100~500 KIU/mL。

抑肽酶(别名Trasylol)是一种分子量为6,500的碱性多肽,除可以抑制丝氨酸蛋白酶中的激肽释放酶之外,还可抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和纤溶酶。抑肽酶会以1:1的摩尔比与上述蛋白分解酶结合,抑制其活性。

敝司的使用示例如下:

抑肽酶(50,000 KIU)(FUJIFILM Wako销售 Cat.No.010-11834)

⇒溶解于5 mL生理盐水(10,000 KIU/mL)

⇒抽血时在血液中加入1/100的量(v/v)

(最终浓度100 KIU/mL)⇒分离血清(血浆)(1,800 g、30 min、4°C)⇒回收血清(血浆)

另外需要注意的是,向微量待测物中添加高浓度的抑肽酶时,需要考虑抑肽酶的稀释倍数是否会产生不利的影响。

关于抑肽酶(Trasylol)的单位符号

根据销售的公司不同,抑肽酶的单位可能也会有差异。

常见的单位有:

KIU(kallikrein inhibitor unit)、TIU(trypsin inhibitor unit)

BAPNA unit(Nα-benzoyl DL-arginine-p-nitroanilide unit)

BAEE unit(Benzoyl-L-arginine ethylester unit)等

其中的相互关系为
1 TIU：将2 trypsin units减少50%的量
1 trypsin unit指pH 7.8、在25°C条件下，1 min内水解1 μmole BAPNA的trypsin量。
关于KIU与TIU
可抑制32.5 FIP单位胰蛋白酶活性的量即为1 KIU。
FIP unit：1 min内水解1 μmole BAEE的酶量。
1 TIU ≒ 900 KIU（J. Gen. Physiol. 19, 991, 1996）
229,100 KIU=254 TIU
UIP（Peptidase inhibitor unit）：8 UIP=1 KIU

GLP-1（Glucagon-like peptide-1）与DPP-IV（Dipeptidyl peptidase）抑制剂

GLP-1 的活性型为GLP-1（7-36）amide和GLP-1（7-37）。

GLP-1（7-36）amide分泌后，会因为肝细胞、外周组织、血液循环中的一种氨肽酶dipeptidyl peptidase IV（DPP IV，一种被DFP（diisopropyl fluorophosphonate）灭活的丝氨酸酶）而失去2个N端氨基酸，变成GLP-1（9-36）amide。另外，GLP-1（7-37）也会变为GLP-1（9-37）。因此，在检测血液中的活性型GLP-1时，需在样品中加入DPP-IV抑制剂。

G. 检测系统的稳健性（robustness）

稳健性的定义是“即使分析方法的条件有些许不同，检测值也不易受到影响的能力”，但对于试剂盒生产商而言，应充分考虑试剂盒能够正常使用的各种条件范围，以应对用户的问题和投诉。

检测样品除了血清和血浆外，还有培养基、孵育培养基和组织提取物等。因此需要公开以下信息，或作为内部资料进行保留：

样品：pH范围、蛋白浓度的容许范围、盐浓度的容许范围、有机溶剂如乙醚、酒精等的污染浓度界限、储存条件

搅拌：搅拌次数的上限和下限、反应中是否进行搅拌和搅拌的条件

反应条件：进行反应的方式、与温度时间的关系、温度范围、孵育时间的范围

清洗：清洗液强度界限、清洗次数的范围

吸光度检测：褪色和时间的关系以及检测时间的允许范围、检测波长的允许范围

空白对照：非特异性吸附和反应的各个条件间的关联、与清洗条件的关联

另一方面，用户也需要事先确认常规样品的性质（pH、蛋白浓度、盐浓度等）、均一性；如果样品不均一，那么在规定范围内能否正常地进行检测。此外，关于样品的储存条件也应在测试后制定内部标准。

H. 精确度管理——通过控制图对每次检测进行评估

没有目的地重复检测可能会导致严重的后果。

在检测同一系统中动物的无处理组时，有时会出现检测值与上一次不同的情况。那么，这种情况是只在这一次的检测中出现，还是上一次的检测中出了问题?如果不定期检查确认检测结果，就无法进行分析。因此，精确度的管理非常重要，记录检测中的各种数据、使用并总结验证方法、判断是否进行了可靠的检测。但是，过于繁杂的记录可能会给ELISA的使用者造成负担，可考虑仅对有需要记录的内容进行记录。

标准曲线的管理

标准曲线的再现性：确认各个标准点的吸光度是否始终相同

检测范围是否稳定

由于空白孔的数量较少，因此无法每次都准确地求出检测限或定量限。

通过质控血清（QC）进行检测评估十分重要，可根据每次的检测值求出实验室内再现性。

质控血清的种类：2~3种浓度的质控血清、LQC、（MQC）、HQC（低、中、高）

质控血清的制备：

① 常规血清+标准品进行制备。

② 使用常规血清以及改变生理状态制备的高（中）低浓度水平的血清。

为避免质控血清反复融冻，需分装后放入超低温冰箱进行储存。每次检测取用1 set。

控制图：根据之前数次的检测结果，计算总平均值和总SD值。根据总平均值和1SD、2SD的值作出平行于横坐标的直线，并在图上画出最近一次检测的检测平均值，评估其位置。此位置至少应在±2SD的范围之内。

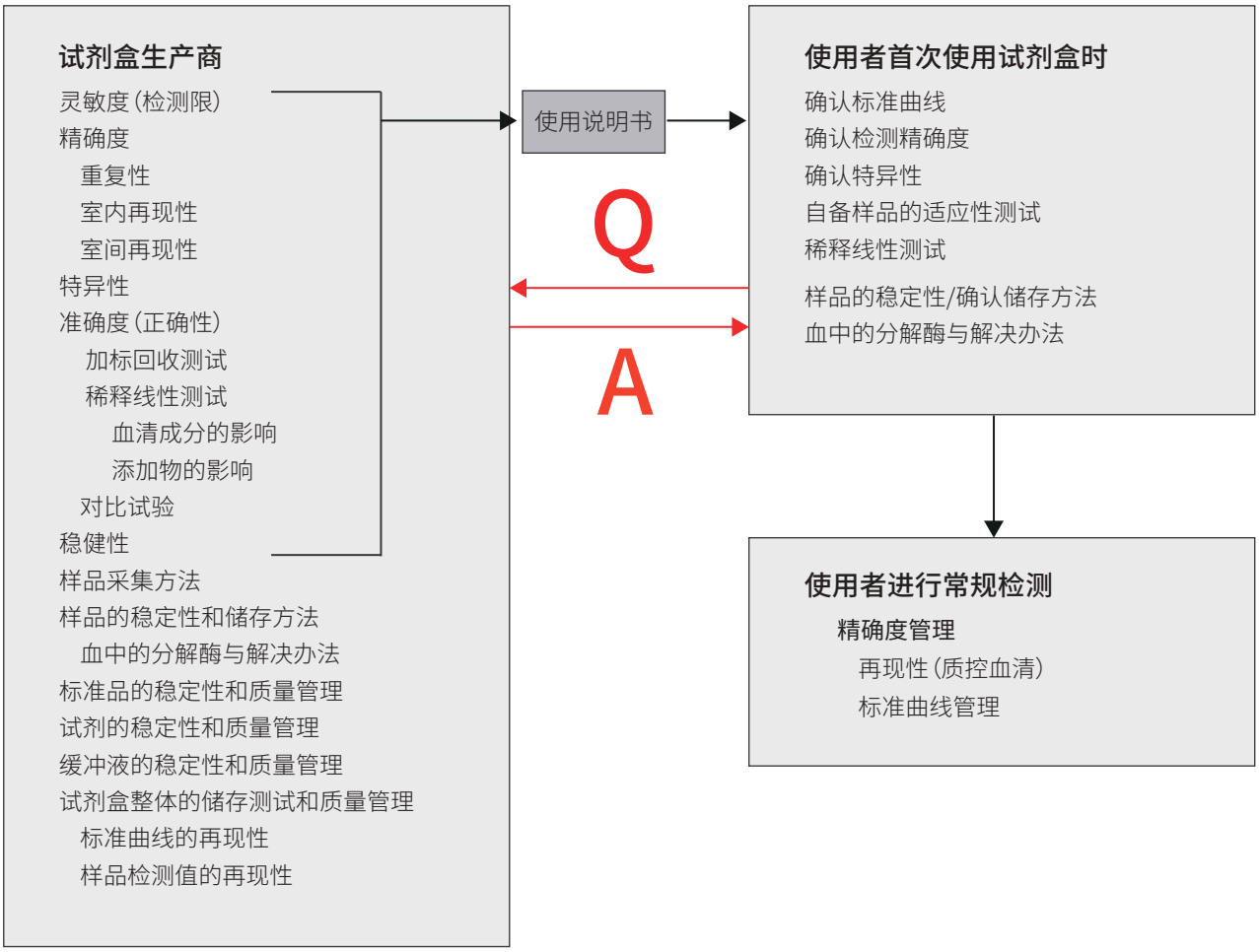
试剂盒的生产商和使用者应进行的分析验证和质量管理

下图概括了从生产商和使用者角度应该进行的分析验证和质量管理。

当然，在生产ELISA试剂盒的过程中每一个步骤都必须进行分析验证，以确保试剂盒性能。但如果将这些数值全部公开，则有可能导致说明书过于冗长。因此，使用说明书应选取对使用者检测有帮助的信息。此外，当使用者有需求时，也应该提供其它的信息。

使用者需在首次使用试剂盒时考虑其特性，确认试剂盒是否适用于自己的检测样品。确认可使用后，则可进行常规检测。为避免出现严重错误，进行常规检测时应严格实行精确度管理。

试剂盒的生产使用和分析验证



I. 改善ELISA的性能

为了尽可能地减少偶然误差（随机误差）和系统误差从而提高检测性能，整理了以下要点：

○ 关于样品重复次数（Replicate）和检测平均值的可靠性
○ 边缘效应（Edge effect）和解决方案
○ 样品中血液成分的影响和解决方案
○ 关于血液样品的pH
○ 移液器和移液时的注意事项
○ 关于样品与试剂盒的适应性测试
○ 通过改善清洗方法，降低空白的非特异性吸附导致的吸光度增加
○ ELISA操作的注意事项总结
○ 通过能力测试提升操作技巧

1. 关于样品重复次数（Replicate）和检测平均值的可靠性

已在II. ELISA的实操“为什么不能每个孔加入一种样品?”（p28）中进行说明，请参考此部分内容。

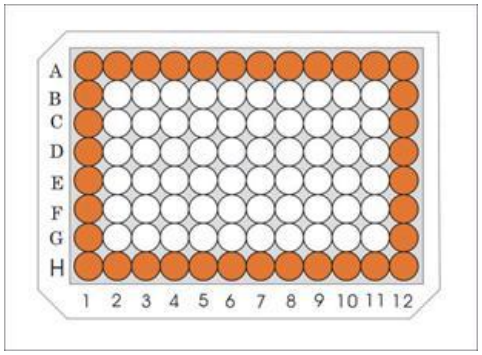
2. 边缘效应（Edge effect）和解决方案

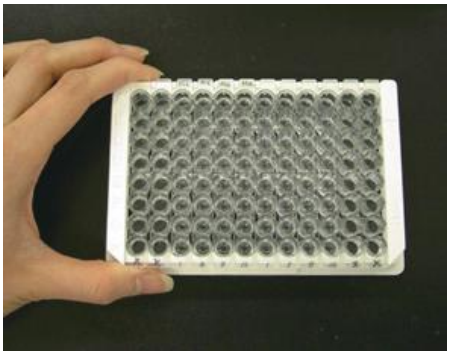
ELISA中令人困扰的现象之一边缘效应（Edge effect），是指孔板外围的孔因受到外部热量（冷/暖）的影响，导致比其他孔反应迟缓、过度反应或由于溶剂蒸发导致非特异性吸附等，从而改变吸光度的现象。

受热影响的主要原因可能有：

● 孔板和试剂等没有充分解冻至室温（从冰箱取出后立即使用）
● 即使恢复至室温，热量也会通过外部热源（包括人体）的辐射或传导进行传递
● 接触空调的冷风或热风（接触气流的流速在0.3 m/s以上就会有蒸发可能）
● 在阳光直射的窗边进行检测
● 在冬天早上的实验室进行检测，此时的室温较低，需要一段时间才能恢复正常室温

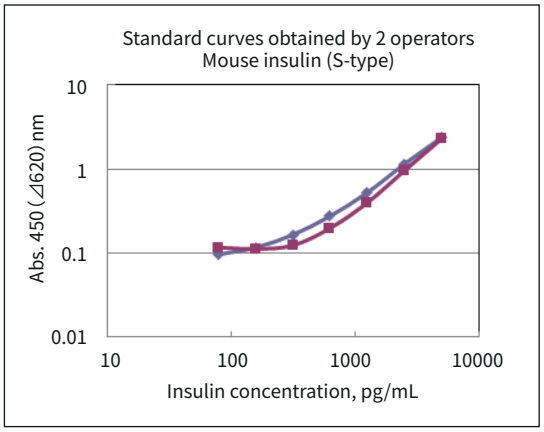
新手在操作时出现边缘效应的常见原因是用非惯用手固定孔板。也就是在移液过程中为了固定孔板，用食指按住图中A1的角，拇指按住H1和H2的角，或者是用食指和拇指指腹牢牢地固定孔板的左侧和底部。这种固定方式在添加显色底物（如TMB溶液）时，直到溶液添加完毕为止手指周围都会持续受热（并且新手会在移液操作上花费更多的时间），因此有可能导致边缘效应。孔板的左侧通常用于制备标准曲线，若出现边缘效应，空白对照的吸光度可能会比低浓度标准溶液更高。



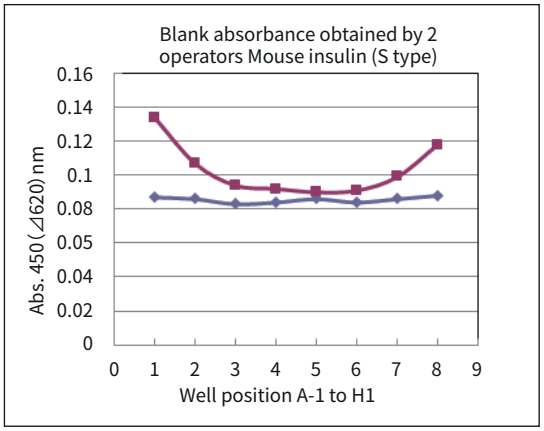


以下用敝司的实例进行说明。

下图为新手和老手使用同一试剂盒同时进行ELISA检测时的标准曲线。此时空白对照的吸光度，老手为0.081，新手为0.127。新手的空白吸光度高于标准品1、2、3的浓度，因此该标准曲线无法使用。



同时仅使用孔板第1列进行空白的测试结果如下图所示。老手在不同的位置均能得到稳定的吸光度，而新手的吸光度向两端升高，可以看到明显的边缘效应。



边缘效应的解决方案

◎ 试剂盒中的所有组件（固相化孔板、所有试剂等）应在室温下放置至少1.5 h，并用手确认已达到室温后再使用（风扇吹风可加快恢复室温）

◎ 避免接触空调和暖气的风，并注意远离辐射热源（切记操作者自身也是热源）。特别是在添加显色液时，操作者应避免近距离接触、请保持适当的距离进行操作。H行与操作者的距离最近，需要特别留意。

◎ 添加显色液的操作应平稳、快速地完成。花费时间越长，越容易出现边缘效应。另外，建议以A行作为空白，从B行~H行逐渐增加浓度。

◎ 建议右撇子使用孔板的右侧列（11，12）作为标准曲线，左撇子使用左侧列（1，2）作为标准曲线，降低手指的热量对标准曲线系统的影响。

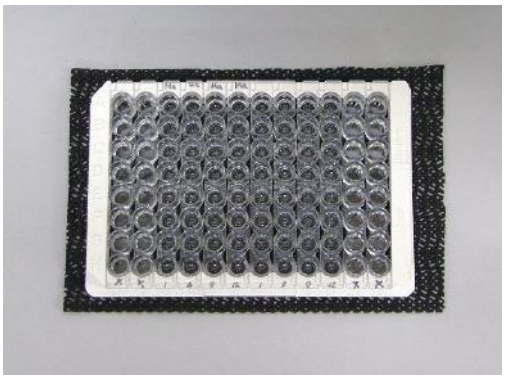
如希望使用一如既往的配置进行实验：

◎ 移液时建议使用一根手指轻轻抵住孔板侧面，防止孔板滑动的同时避免热量传递。

◎ 推荐可以裁剪一块比孔板稍大的防滑垫（杂货店里售卖的玄关垫等垫在物品下方防滑用的垫子）垫在孔板下方，即可在不接触孔板的情况下进行移液。

防滑垫的颜色多样，但实验台的台面通常是黑色的，因此建议选择黑色的防滑垫，减少与孔板间的违和感。

◎ 反应过程中需使用孔板盖或封口膜盖住，避免气流的影响。也可在孔板上覆盖塑料饭盒之类的物品防止热源和气流的影响。



3. 样品中血清成分的影响和解决方案

正常检测在制备标准曲线时，反应一般在低蛋白浓度状态下进行，而作为样品的血清或血浆含有高浓度的蛋白。高浓度的蛋白溶液可能会干扰固相化抗体的结合反应。

商业化的试剂盒一般已经考虑到了这种影响，若希望自行确认，可参考稀释线性（与标准曲线的平行性）。

换言之，即证明无论进行何种程度的稀释，检测值都保持不变。在这种情况下，稀释使用检测缓冲液中进行，稀释后线性丢失，即检测值乘以稀释率得出的数值并非恒定时，可能是受到了血液成分的影响。

4. 关于血液样品的pH

由于二氧化碳气体会随时间而逸出，血液样品的血浆或血清在制备后会立即从中性状态变为碱性。以下为使用小鼠血液进行观察的数据。

小鼠：BALB/c，6周大，♂，未绝食

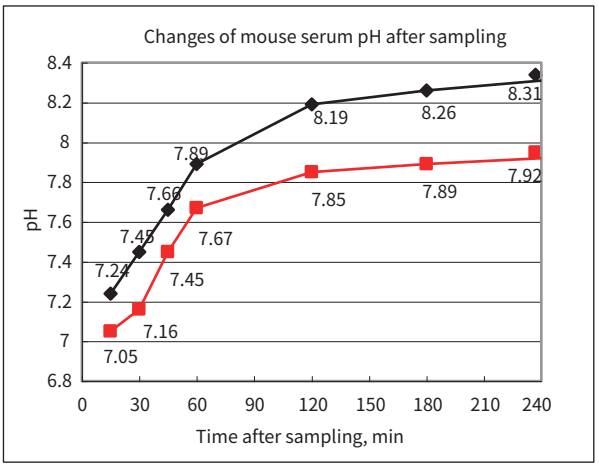
检测样品：血清，心脏取血，2~8°C储存，静置，PP瓶

血浆，EDTA-2Na作为抗凝剂，2~8°C储存，静置，PP瓶

检测仪器：Twin PH（HORIBA）Model：B-11

在上述条件下随时间变化的pH值如下所示。

● 血清



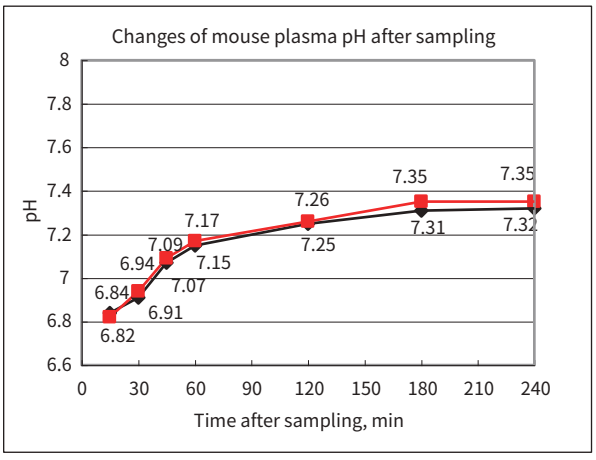
采血后，血液的pH值呈生理性。但在采血后的1 h之内，随着二氧化碳气体的逸出，pH值明显升高。2 h后，pH值进一步升高至8左右。

动物之间似乎存在个体差异。

在本测试中，在2~8°C下冷藏存储。当温度越高，pH值上升会越快。

另外，二氧化碳冷冻时的溶解度会降低，因此即使冷冻保存，解冻后依然呈碱性。

● 血浆



左图为使用EDTA-2Na处理所得到的血浆的pH变化情况。

EDTA本身为强酸性，但二钠盐为弱酸性，常用作抗凝剂，因此从中得到的血浆在15 min后会呈现6.8左右的弱酸性。

1 h后接近7.2，4 h后保持在7.3左右。

EDTA-2Na的最终浓度为1 mg/mL，即0.1%。制备血浆后的pH值为6.8，呈弱酸性，因此可认为缓冲作用在一定程度上抑制了二氧化碳气体排出所导致的pH值升高。

即使样品均为血浆，使用肝素处理血浆的结果也会有所不同。肝素是含有硫酸根的大分子，通常作为钠盐使用，但Na的比例各异。根据Merck Index，1%水溶液的pH值应为6.0~7.5。肝素的最终浓度为10 µg/mL（1.2 U/mL），即浓度为0.001%，因此对血浆的pH值影响不大。所以，调整后的pH值随时间变化可能与血清的情况相似。

由于抗原抗体反应在非中性的碱性条件下会受到抑制，如果突然将血清样品等加入ELISA等抗体固相化孔板并在常温下反应数小时，pH值则会不断上升，最终导致无法进行检测或获得准确读数。因此，使用稍强的缓冲液将样品稀释到一定程度会更安全。使用碳酸氢盐缓冲液的培养基也是如此。

5. 移液器和移液时的注意事项

移液器相关的内容在“ELISA的实际操作”部分有详细介绍，为了减少误差，在此仅列举使用气体活塞式移液器时的注意事项。

- ○ 选择与待测液量相符的移液器
- ○ 使用移液器生产厂家推荐的枪头
- ○ 待液温度完全恢复至室温再进行移液操作
- ○ 注意液体的粘度、密度和挥发性。对高粘度液体使用共洗法
- ○ 根据样品和情况选择使用移液方法，移液方法不宜混用：
  预湿法/预洗法
- ○ 移液应以稳定的速度进行。需操作熟练，避免移液不均匀。
- ○ 控制枪头没入液体的角度和深度
  改变没入深度可改变吸附于枪头外部的液量
  改变角度可改变待测液进入枪头的量
- ○ 进行“touch and go”操作（见上文）
- ○ 定期进行移液测试以及移液器的维护

6. 关于样品与试剂盒的适应性测试

确认待测样品是否符合检测试剂盒中对样品的要求，有助于在无法获得预期检测结果时查明原因。

待测样品的种类丰富，比如采血时是否进行了麻醉、麻醉剂的类型、采集血浆时使用的抗凝剂、样品在常温或低温下放置时二氧化碳的逸出和pH值的升高、作为防腐剂添加的化合物、储存期间血液成分的浓缩和变性等因素都有可能存在于待测样品中。因此，建议在每次检测时都实施精确度管理，以确认待测样品是否会因为上述因素而影响到使用试剂盒的反应系统。

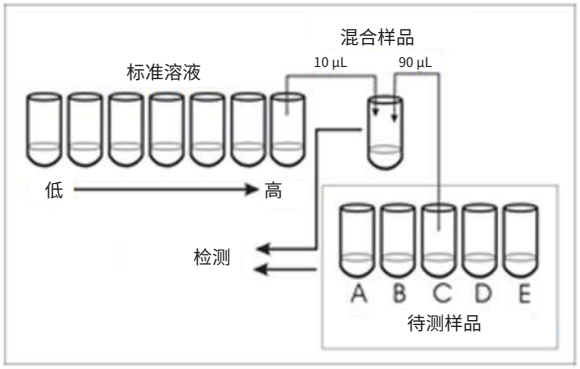
实施方式：由使用者进行简单的加标回收测试

首先制备标准溶液系列。选择一个代表性的样品（例如对照组中的样品之一），取90 μL分装至小试管中（记录采集样品的编号，假设为No.C）。

然后取最高浓度的标准溶液10 μL加入小试管的样品中，充分搅拌。加入标准品的样品与其他样品一同进行检测，并将得到的检测值与No.C样品的检测结果进行比较。

假设No.C的检测值为A ng/mL，如检测在检测精确度的范围内，则加入标准品的样品的检测值应为A×0.9＋（最高浓度标准溶液×0.1）ng/mL。

简而言之，这是一种简单的加标回收测试。



若待测样品得出了与此计算值相近的值，则证明此待测样品符合检测试剂盒中对样品的要求。

注）若移液器无法正好取得90 μL样品，也可以取100 μL。添加10 μL标准溶液的情况下，理想的检测值为A×0.91＋（最高浓度标准溶液×0.09）。若样品过少、不足以取用90 μL的情况下，可考虑（50 μL+5 μL）的组合。更少量的组合，考虑到移液器的精确度，检测值可能会不可靠，若增加标准溶液量，则无法忽略样品稀释。

7. 通过改善清洗方法，降低空白的非特异性吸附导致的吸光度增加

空白吸光度来源于酶标抗体或生物素标记抗体的非特异性吸附。请参考“ELISA的实际操作”部分的示例，尝试通过改善清洗次数和方法抑制空白吸光度和误差。

虽然关键是增加清洗次数，但清洗时切勿用力过猛，否则可能会使固相抗体脱落。重要的是多次温和重复地清洗。

8. ELISA操作的注意事项总结

为在ELISA实验中获得良好的效果，下面总结了一些重要的注意事项。

● 样品的采集和储存
注意溶血、乳糜以及储存温度
有需要请添加抑肽酶
重点注意（事前检查）：乙醚麻醉、肝素
避免使用：叠氮化钠、氟离子
切记融解后需进行搅拌

● 移液器的检测和使用方法
选择适合的移液器，并对其性能进行检测
移液方法的选择和熟练操作
请勿在添加标准溶液和样品时使用8通道、12通道的移液器

● 孔板的清洗
防止前后样品交叉污染（carry-over）
添加标准品和待测样品后清洗孔板
调整清洗的水流（自动清洗器）
增加清洗次数、温和地清洗

● 防止边缘效应
【孔板、样品、试剂溶液】的室温化
空调气流、辐射热源的存在

● 标准品和样品的充分反应
严格按照规定的反应时间

● 充分搅拌

● 防止孔板底部的划痕

● 推荐进行二次或三次以上的重复检测
（不建议只进行单次检测）

9. 通过能力测试提升操作技巧

ELISA的操作乍看之下十分简单，这也是ELISA的“卖点”。但通过本手册中也能发现，ELISA的操作对熟练度的要求较高。此外，分析方法验证中的实验室间再现性评估也适用于实验室和检测人员的能力测试（proficiency test，PT）。即定期从均质材料中提取样品分发给检测人员，然后将分析结果上报给计划实施管理员。而评估的结果会与所有数据一起反馈给相应的检测人员。如此一来就可以根据反馈对自身进行反思，并在下一次分析中体现反思的成果。

能力测试的其中一项标准为Z值（Z score）。

$Z=(x-xa)/\sigma$

x：一个检测人员得出的检测值

xa：多个专家得出的检测值的平均值

σ：试验结果的标准偏差

若Z 值的绝对值小于2，则表示结果令人满意，

若2<｜Z｜<3则表示可信度较低，｜Z｜>3则为完全无法接受的结果。

－正文完－

IV. 附录

附录1：血液样品的采集方法

血清样品的采集方法

将采集的血液静置30~60 min，待其完全凝固后，将凝块从管壁上轻轻剥离（推荐使用圆头细玻璃棒），并用冷却离心机分离。需注意的是，在此过程中，如果旋转过于剧烈会导致红细胞破裂，造成溶血。Shibayagi推荐的条件是温度4~8°C，1,200 g（旋转半径12 cm，转速3,000 rpm），30 min。离心分离时离心力（g值）的计算方法为：

旋转半径×角速度^2/980

旋转半径单位为cm，角速度为6.28×（每秒转数）。

例如，当旋转半径为12 cm，转速为3,000 rpm时（即50转/秒），12×（6.28×50）^{2}/980=1207，因此结果为1,207 g，约1,200 g。

（注：6.28=2π，g=980 cm/sec^2）

血浆样品的采集方法

提前准备采血注射器、注射针头、采血管、装有碎冰的冰盒。需采集血浆（plasma）时，可使用经肝素或EDTA-2Na处理的注射器和针头采集血液。肝素处理是指将注射针头安装在注射器上，少量吸入1,000 units/mL的肝素原液，并在空气中多次推动活塞以去除多余肝素溶液。添加EDTA-2Na至最终浓度为1 mg/mL。

如果采血量较少，建议使用经肝素处理后的血细胞比容管与采血管。

Shibayagi使用最终浓度为10 μg/mL=1.2 units/mL的肝素。

参考文献：ホルモン実験ハンドブックⅠ 飼育と手技 日本比較内分泌学会編ISBN 4-7622-4661-1

附录2：关于肽溶液与试剂溶液的制备

多肽、蛋白质的存储、称量与溶液的制备

部分肽和水的亲和力较强，在极端情况下会出现潮解。如果放置不管，它们有可能会因吸收空气中的水分而变得粘稠，甚至溶解。TRH等就是很好的例子。一般情况下不会出现这种极端情况，但需意识到蛋白与肽具有一定程度的吸水性。称重时，应在充分去除水分后尽快进行。

相反，也有呈中性，难以溶于水的肽，如生长激素与催乳素等。

存储方法：

如果担心在空气中被氧化，可用氮气替换存储瓶中的空气，并将存储瓶放入装有硅胶的小容器中冻存。具体步骤如下。

1. 首先，准备减压用干燥器。在干燥器内部的架子上铺上滤纸或纸巾，打开装有肽或蛋白容器的盖子后放入（竖立置于合适的支架上。盖子松开即可）。
2. 接着连接真空泵，充分排出干燥器内的空气。此时，应稍微打开干燥器的活塞，缓慢排出空气。完全排空后关闭活塞。
3. 准备一个橡胶气球，使用氮气瓶向气球内注入氮气。
4. 将气球连接至减压干燥器，小心地将干燥器的活塞稍微打开。这时候要边观察气球大小的变化，边将氮气缓缓注入干燥器。如果气流太强，会导致肽的粉末飞扬。当气球不再收缩时说明氮气填充完成。如果气球过小，可以暂时关闭活塞，向气球中重新填充氮气后再注入干燥器。
5. 氮气填充结束后，打开干燥器的盖子，取出装有肽的容器，盖紧盖子，用乙烯基胶带封口。
6. 将盛放肽的容器放入装有硅胶的小容器中，盖紧盖子用乙烯基胶带封口，放入冰箱储存。如果不担心氧化，则无需将空气替换为氮气，只需密封后放入装有硅胶的小容器中，放入冰箱储存即可。如果以溶液状态储存，稀释的肽可能会受到溶液中的溶解氧的影响。若无法保证稳定性则不推荐用此方法。此外，以溶液状态保存时还需要添加保护蛋白等以防止吸附。可确保其稳定性时，建议将溶液存储在-80°C（至少-35°C以下）。在-20°C下保存时，溶质可能会浓缩在容器底部。这是由于溶液冻结缓慢引起的，因此放入冰箱前建议使用干冰-丙酮等制冷剂进行快速冷冻。

称量与溶解：

称量前的前处理：为了尽可能去除水分，需打开肽容器的盖子后放入装有强干燥剂的干燥箱中静置一晚，然后快速称重。请预先在天平箱中放入干燥剂（根据结构不同，也可能无法放置）。

为了对少量物质进行准确称量，需要选择天平种类。天平分为电子分析天平（最大读数0.1 mg）、半微量天平（最大读数10 μg）以及微量天平（最大读数1 μg）。天平最后一位读数通常不准确。天平的灵敏度越高，越容易受室内空气流动，特别是空调引起的空气流动的影响，因此，至少需要把秤盘部分置于箱中。但部分市售的电子天平的秤盘是外露的，使用时建议放入透明箱中使用。

称量的方法和溶液的制备：准备1~1.5 cm^2 的铝箔，擦拭干净并干燥。不要用手接触铝箔，使用镊子和剪刀进行操作。使用镊子将其中一个角稍微向上弯折。例如，如果要精确称量约1 mg的肽（蛋白质），可以使用半微量或微量天平。如果使用电子分析天平，就要做好会出现10%以上误差的准备。将秤盘清理干净，放上铝箔并记录重量。然后用药勺将大约1 mg的砝码放在秤盘上并称重，记录称量前后的重量。此时，请勿用药勺调整肽的量至1 mg，只需保持原来的重量即可。这一操作称为“准确称量约1 mg”。

准备与重量对应的容量略少的溶剂，装入小烧杯或小试管中，并将铝箔和多肽一起放入烧杯中。然后，称量缺少的溶剂，并加入烧杯。这是根据液量而非重量来进行调节。溶液制备完成后，取出铝箔。另一种方法是，不将铝箔放入溶剂，而是将铝箔上的样品抖落至烧杯中，再次称量铝箔，然后计算与装有样品时的重量的差值。请根据样品的吸湿性考虑如何操作。

上述方法均以肽能够顺利溶解于溶剂为前提。无法确定肽能否溶解时，需使用移液器吸取已知量的溶剂，并将装有肽的铝箔放在空烧杯底部，然后从移液器中滴入一滴溶剂。确认肽溶解后再加入移液器中剩余的溶液，并根据需求补充溶剂。这一操作对于蛋白质尤为重要。如果不确认能否溶解就直接添加大量溶剂，可能会出现所谓的”块状物“，导致无法形成溶液。

肽与蛋白质无法溶解时

如果在上述操作中蛋白质或肽无法溶解而产生结块，或是保持粉末状时，可添加少量（根据溶液量）约0.01 N的NaOH溶液，大部分情况下都能溶解。然后，一次性加入原来的中性溶剂中进行稀释。如果一开始就确定该物质难以溶解，则可预先制备约0.1 M的小苏打（碳酸氢钠）溶液，并添加一定量进行溶解。碳酸氢钠的pH最高为9，因此，与NaOH等强碱溶液相比，导致蛋白变性的可能性更低。并且大多数情况下都能使其溶解。随后，向该溶液中添加所需量的目标缓冲液以制备溶液。

缓冲液的制备

注意结晶水！

在制备某种浓度的溶液时，如0.1 M磷酸二氢钠溶液，不能直接计算Na_2HPO_4的分子量然后进行称量。首先要确认试剂瓶上的标签，大多数情况下记载的都是$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，即含有12分子的结晶水。因此，需要把标签记载的结晶水的分子量也考虑在内进行称量。

过期的小苏打不是小苏打

小苏打（碳酸氢钠，$NaHCO_3$）长时间置于空气中，会吸收空气中的二氧化碳形成一部分碳酸钠（Na_2CO_3）。因此，瓶底剩余的少量小苏打建议丢弃。部分以小苏打为基础的生理盐溶液（如Krebs-Henseleit溶液），除了会使用磷酸盐，还会使用小苏打与氯化钙。若部分小苏打变成了碳酸钠，溶液混合时就会变浑浊，但新鲜的小苏打不会出现这种现象。如果出现了浑浊，不要认为“失败了！”就把溶液丢弃，将5%二氧化碳（5% CO_2-95% O_2）混合气体加入缓冲液中，浑浊就会消失，变成清澈的溶液。

此外，氢氧化钠也能进行转化。

在试剂溶解后，一定要确认缓冲液的pH值。

关于pH计

取下电极上的橡胶塞！

pH计基于玻璃薄膜的玻璃电极和含有KCl的校准电极之间的电位差与pH成比例的原理而设计。因此通常会使用两组电极，但也会把两组电极组合一根完整电极，并附有用于校正温度影响的温度传感器。仔细观察能够发现电极分为两层，内层为玻璃电极，外层为KCl电极。测量pH值时，请务必打开电极上方的橡胶塞。带橡胶塞的开口不仅是KCl补充溶液的入口，打开橡胶塞后，KCL在外部空气压力的作用下会通过KCl电极下方的陶瓷（玻璃球上方的白色小点）缓慢排出。这样才能准确测量pH值。例如，将带橡胶塞的电极放入甘氨酸溶液中，观察pH值的变化。起初的读数为7，但随后就会下降到6.5。两性电解质会渗入陶瓷导致KCl电极故障，使用时请一定要注意！

不要吝啬pH标准缓冲液!

使用pH计前必须使用附带的标准缓冲液进行校准。如果因为麻烦而放弃校准，那就不是一名合格的研究者。那么，应何时从瓶中取出标准缓冲液呢?一周前?一个月前?插入电极的校准用标准缓冲液容器能否密封?

使用pH计前的校准步骤中，应先丢弃容器中的标准缓冲液，再从新瓶子中倒入所需的量。

标准缓冲液，尤其是碱性缓冲液会吸收空气中的二氧化碳导致pH降低。因此不要吝啬标准缓冲液，每次使用时必须要更换。如果剩余碱性标准缓冲液的量低于存储瓶的1/3时。需购买新的标准缓冲液。

想要了解更多信息

激素庵官网（日语）（http://gekiso-an.kir.jp/）
⇒“免疫分析的详细介绍”

Principles of Competitive Protein-Binding Assays
W. D. Odell & P. Franchimon编
J. B Lippincott Company.（1971）

生化学实验讲座 16 激素 上
日本生化学会编
东京化学同人（1977）

内分泌学
吉村、川上、井村、东条编
南山堂（1978）

内分泌实验讲座 5 激素检测法（上）
井村、宫井编
讲谈社（1882）

Principles of Competitive Protein-Binding Assays(修订版)
W. .D. Odell & P. Franchimon编
John Wiley & Sons, Inc.（1983）
酶免疫分析法
蛋白质核酸酶 增刊 No.31（1987）

Chemical Analysis. Vol. 117
Application of Fluorescence in Immunoassays
Ilkka A. Hemmila
John Wiley & Sons, Inc.（1991）

Principle and Practice of Immunoassay
C. P. Price and D. J. Newman编
Stockton Press（1991）

数据的获取方法和总结方法-分析化学用统计学和化学计量学
J. N. Miller and J.C.Miller（宗森 信、佐藤寿邦 译），共立出版

厚生省 医药审第338号分析法验证相关内容（实施方法）
1997年10月

ICH Harmonized Tripartite Guideline
Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2（R1）
Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994
（Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 12996 incorporated in November 2005）

第15版改正版日本药典第2部，参考信息，25 分析法验证，1647，（2006）

Recommendations for the bioanalytical method of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules.
DeSilva B, Smith W, Weiner R, et al.
Pharm Res. 20: 1885-1900（2003）

中日英术语对照表

中文	英语
四参数Logistic模型	four parameter logistic model
NIH单位	NIH-U
免疫放射分析法（IRMA）	immunoradiometric assay, IRMA
稳定性	stability
异源抗体分析	hetro-antibody assay
异源分析	hetrologous assay
边缘效应	edge effect (edge phenomenon)
回归曲线	regression curve
活性（值）	activity
截断值	cut-off value
稳固性	robustness
质控血清	quality control serum, QC
稀释试验	dilution test, dilution linearlity test
吸光度	absorbance
竞争蛋白结合分析法	competitive protein-binding assay,CPBA
竞争性测试法	competitive assay
均相检测	homogeneous assay
偶然误差、随机误差	accidental deviation, random error
摩尔	mole, mol
重复次数（每份样品的孔、管数）	Replicate
系统误差	systematic error
检测限	detection limit
标准曲线	standard curve
抗原决定簇	antigenic determinant
高浓度质控血清	HQC
国际单位（IU）	international unit (IU)
误差	error
固相化抗体	coated antibody, capture antibody
重复检测三次	triplicate assay
时间分辨荧光法	time-resolved fluorometry
室间再现性	reproducibility
室内再现性	intermediate precision, intra-assay precision, within-assay precision
准确率	accuracy, trueness
精确度	precision
生物检测	biological assay, bioassay
相关系数	correlation coefficient

中文	英语
相对标准偏差、变异系数	relative standard deviation, RSD, coefficient of variation, CV
单位	unit (U)
线性	linearlity
低浓度质控血清	LQC
定量限	quantitaiton limit
加标回收测试	recovery test, spike recovery test
冻融	freezing and thawing (frozen-thawed)
同源分析	homologous assay
特异性	specificity
重复检测两次	duplicate assay, assayed in duplicate
人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)	International Conference of Harmonization (ICH)
连续稀释	serial dilution
范围、检测范围	range, assay range
非竞争性分析	non-competitive assay
严重错误	mistake, gross error
非特异性吸附	non-specific adsorption
标准误差	standard error, SE, standard error of mean, SEM
标准品	standard preparation
标准偏差	standard deviation, SD
非均相检测	hetrogeneous assay
方差	variance
分析法	analytical procedure
重复性	repeatability
竞争性放射免疫法	competitive radioassay
放射受体分析	radioreceptor assay RRA
放射性同位素	radioisotope
放射免疫分析	radioimmunoassay
免疫分析	immunoassay
摩尔浓度	molarity, M
验证	validation
效价	potency

索引（除附录）

——A——

Absorbance 17, 18, 27, 36
Accidental deviation 34
Accuracy 35, 54
Antibody 6
Antigen 6
Antigenic determinant 14
Aprotinin 57
Assay 4

——B——

Berson 7, 8
Bioassay 15
半抗原 6
比尔-朗伯特定律 18, 27, 36
比例稀释 21
比色定量 27, 36
边缘效应 60
边缘效应解决方案 61
标准曲线 10
标准曲线的检查 45
标准曲线的拟合 49
标准曲线的评价标准 47
标准曲线模板 40
标准溶液制备方法 21
标准物质（标准品） 5
表位 17
捕获抗体 7

——C——

Competitive assay 9
初次免疫应答 7
长期稳定性 56
重复性 35, 51

——D——

DELFIA 13
Detection limit 35, 45
Dilution linearlity test 54
单克隆抗体 6
定量检测 4
定量限 35, 45
定性检测 4
动物种类 11
冻融稳定性 56
对照血清 57
多克隆抗体 6

——E——

Edge effect 60
ELISA标准曲线的拟合 49
ELISA操作的注意事项总结 64
ELISA中的偶然误差 34
Enzyme immunoassay (EIA) 13
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 13, 17
Epitope 14
EXCEL中的ELISA计算 40
二次免疫应答 7
二抗 17

——F——

Fluoroimmunoassay (FIA) 13
发光物质 13
范围（检测范围） 36, 46
放射免疫分析 7
放射性同位素 12
非竞争性结合 9
非均相检测 11
分析方法验证项目 35
分子多样性 14

——G——

Goal seek法 43
Gross error 34
固相化抗体 7
关联性测试 56
国际标准品 5
过氧化物酶 18

——H——

Hapten 6
HCG 15
Hetero-antibody assay 12
Heterogeneous assays 11
Heterologous assays 12
Homogeneous assays 11
Homologous assays 12
Horseradish peroxidase 18
HRP 18
恒定区 6
回归曲线 19, 37
回归与计算的示例 38

——I——

Immunoassay 6
Immunofluorometric assay (IFMA) 13

Immunogenicity 6
Immunoradiometric assay (IRMA) 13
In vitro assay 15
In vivo assay 15
Intermediate precision 35, 51
——J——
加标回收测试 55
夹心法 18
夹心法原理 9
检测 4
检测方法的评估 5
检测限 35, 45
检测样品的稳定性 56
检测原理与标准曲线 10
检测值计算——根据回归曲线使用计算器计算 37
检测值计算——人工计算 36
搅拌操作 26
精确度 35, 51
精确度管理 58
竞争性结合原理 9
绝对量 4
均相检测 11
——K——
抗体 6
抗体固相化孔板 22
抗体类别转换 7
抗原 6
可变区 6
孔板的清洗 23
——L——
Lambert-Beer's low 18, 27, 36
Lanthanides 13
Linearlity 35
Logit 10
Luminescence immunoassay 13
镧系元素 13
朗伯比尔定律 18, 27, 36
冷藏柜的稳定性 56
离心试剂 13
连续稀释 21
量程 36
灵敏度 6
——M——
M (molarity) 4
Measurement 4
Mistake 34
Mole (mol) 4
酶 13
酶标二抗 17
酶标仪 26
免疫分析的特点和问题 14
免疫分析法 6
免疫记忆 7
免疫佐剂 7
——N——
NIH-U 5
Non-competitive assays 9
能力测试 64
浓缩清洗液 22
——O——
偶然误差 34
——P——
Precision 35, 51
Proportional dilution 21
平均值的置信区间 28
——Q——
Quantitation Limit 35, 45
前带 46
亲和素 20
清洗次数 27
——R——
Radioimmunoassay (RIA) 8, 13
Radioisotope (RI) 12
Random error 34
Range 36, 46
Recovery test 55
Repeatability 35, 51
Reproducibility 35, 54
Robustness 36, 58
如何添加试剂溶液 25
——S——
Serial dilution 21
Specific binding 6
Specificity 35
Spike recovery test 55
Spin-immunoassay 13
Standard curve 10
Systematic error 34
生物检测 15
生物素 18
试剂盒使用的注意事项 28
试剂溶液制备法 20

试剂使用后的处理方法 33
室间再现性 35, 54
室内再现性 35, 51
室温稳定性 56
随机误差（偏差） 24, 34
——T——
Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) 13
TMB 18
Trasylol 57
Trueness 35, 54
糖蛋白 15
特异性 6, 35
添加标准溶液和样品 24
同源分析 12
——V——
Validate (validation) 6
Validity test 6
——W——
完全去除清洗液 24
稳健性 36, 58
物理和化学的检测方法 15
误差 34
——X——
吸光度 17, 18, 27, 36
吸光度的偏差和检测值的偏差 48
稀释线性测试 54
系统误差 24, 34
显色底物 18
线性 35
相对量 4
血液成分的影响 62
血液样品的pH 62
——Y——
严重错误 34
验证 6
样品和试剂盒的适应性测试 63
样品计算模板 41
胰岛素 8, 14
移液器——Touch & Go 30
移液器的精确度与检测精确度 32
移液器——连续添加 25
移液器——预湿润法 25
移液器——预洗法 25
移液器——允许误差 24, 29, 31
移液器——种类 29
移液注意事项 32
异源分析 12
异源抗体分析 12
抑肽酶 57
荧光物质 13
有效性测试 6
——Z——
杂交瘤 7
载体 7
重复性 35, 51
准确度 35, 54
自动清洗机 23

上述试剂仅供实验研究用，不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: https://labchem-wako.fujifilm.com / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片和光（广州）贸易有限公司
广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室
北京 Tel：13611333218
上海 Tel：021 62884751
广州 Tel：020 87326381
香港 Tel：852 27999019
询价：wkgz.info@fujifilm.com
官网：labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信

目录价查询

2404WABT01