

QC 实验室自动化 ELISA 平台的开发与应用

陈婧, 李博洋*

(无锡药明生物技术股份有限公司, 江苏 无锡 214092)

摘要 **目的:** 生物活性检测作为生物药质量控制的核心环节, 其方法可靠性直接影响药效评估。基于 ELISA 的活性检测虽能精准表征药物-靶点结合特性, 但传统手动操作存在操作误差累积、变异度高、人为失误高及检测通量低等问题。**方法:** 基于 Microlab STARplus 构建全自动化 ELISA 平台, 整合了高精度移液模块及外接设备。**结果:** 自动化系统不仅满足准确度及精密度的要求, 且较手动操作显著降低了变异性。**结论:** 自动化平台实现从样品预处理到检测的全闭环操作, 且标准化操作程序与数据可追溯功能, 有效保障了数据完整性。

关键词: ELISA; 相对活性; 自动化; 质量控制; 生物药

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2026)01-0109-08

doi: 10.19778/j.chp.2026.01.014

Development and application of an automated ELISA platform in QC laboratory

CHEN Jing, LI Boyang*

(Wuxi Biologics, WuXi 214092, China)

Abstract **Objective:** Biological potency assay, as a core component of biopharmaceutical quality control, directly influences drug efficacy assessments through the reliability of the methods. While ELISA-based potency assays accurately characterize drug-target interactions, traditional manual operations are often limited by cumulative operational errors, high variability, human errors, and low throughput. **Methods:** A fully automated ELISA platform using the Microlab STARplus system was introduced by integrating high-precision pipetting modules with external devices. **Results:** This platform not only meet accuracy and precision requirements but also significantly reduces variability compared to manual operations. **Conclusion:** The platform enables a seamless, end-to-end workflow from sample processing to detection, and standardized protocols and data traceability functions to effectively ensure data integrity.

Key words: ELISA; relative potency; automation; quality control; biologics

基于 ELISA 的生物活性检测在生物药开发、表征和质量控制中具有核心地位^[1-3], 其通过精准模拟药物与靶点分子在生理条件下的相互作用机制, 直接反映药物的结合功效。通常情况下, 通过构建四

参数逻辑回归模型(4PL)对稀释至一定浓度的标准品与待测样品的剂量-反应曲线进行拟合, 进而得出标准品和待测样品的半数最大效应浓度(EC_{50})。该参数反映了药物与靶点结合效力的强弱, 二者

第一作者简介: 陈婧, 博士, 副主任药师; 研究方向: 质量控制生物活性。Tel: 18068358907; E-mail: chen_jing0501@wuxibiologics.com

* 通信作者简介: 李博洋, 博士, 副主任药师; 研究方向: 质量控制生物活性。Tel: 15061806304; E-mail: li.boyang@wuxibiologics.com

EC₅₀之比即为待测样品相对于标准品的活性结果^[4,6]。然而,由于 ELISA 检测流程繁琐,包括抗原包被、封闭、多轮洗板、样品预稀释和梯度稀释、多步孵育及显色读板等环节,其中还涉及大量手动移液操作,导致检测变异度及人为失误率显著大于其他理化方法检测结果^[7]。另外,检测通量低(通常一次检测 1~2 个样品)及检测成本高也是 ELISA 方法在 QC 实验室的两大难题。已有文献报道,自动化引入可以显著降低检测的变异性,还可降低人为失误的风险,进而提高检测效率、降低检测成本^[8]。

自动化技术在检测领域的发展历程呈现“功能迭代、问题递进”的演进特征:第一阶段(2000—2010 年)以模块化设备为核心,通过硬件组合实现通量突破,但受限于人工记录与封闭系统,数据完整性与灵活性不足,如 Tecan Freedom EVO^[9];当前(2011 年至今)转向集成式工作站,通过电子记录与审计追踪满足合规需求,如 Hamilton 公司开发的 Microlab® STAR 系列^[8,10-11]。

本研究中我们首次在 QC 实验室搭建了基于 Microlab STARplus 的全流程自动化检测 ELISA 的平台,通过与手动操作一起完成方法的转移、确认及验证,以支持样品的检测。与传统手动操作相比,自动化平台大大提升了检测的质量和效率,并显著提升了数据完整性。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

包被抗原(无载体)和标准品和样品(单克隆 IgG1)为购买或内部生产。检测抗体为辣根过氧化物酶(HRP)结合的抗人 IgG1, F(ab')片段特异性抗体。四甲基苯丙胺(TMB)溶液购自 ThermoFisher。使用透明、平底 96 孔板(Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific)作为检测板,及低吸附平底 96 孔板(Nunc™, Thermo Fisher Scientific)作为稀释板制备梯度稀释液。液体工作站使用的耗材均购自 Hamilton,其中一次性枪头为导电 CO-RE 枪头(300 μL 和 1 000 μL, Hamilton)。除枪头外(Eppendorf),手动操作使用的物料与工作站完全一致。

1.2 ELISA 实验

本研究使用方法为典型的间接 ELISA 法,且使用同一方法考察手动操作和工作站的表现性能。简言之,使用 PBS 稀释抗原,并于 4 °C 冰箱过夜固定在 96 孔检测板上。第二天,弃去包被液,用 PBST 清洗 3 次后,用封闭液(含 0.1% 牛血清白蛋白的

PBS)在 25 °C 下封闭 60 ± 10 min。同时,用封闭液将标准品、样品和对照品预稀释至起始浓度,并在低吸附板上进行梯度稀释。将梯度稀释液从稀释板转移至检测板前,用 PBST 清洗检测板 3 次。加入 HRP 偶联的检测抗体(在封闭液中稀释)和梯度稀释液后,将检测板在 25 °C, 500 r · min⁻¹孵育 120 ± 10 min,然后用 PBST 清洗 3 次。加入 TMB 试剂,于 25 °C 孵育 8~15 min,直至形成足量的蓝色反应产物。最后用 2 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应,并于 450 nmol · L⁻¹波长读取结果。

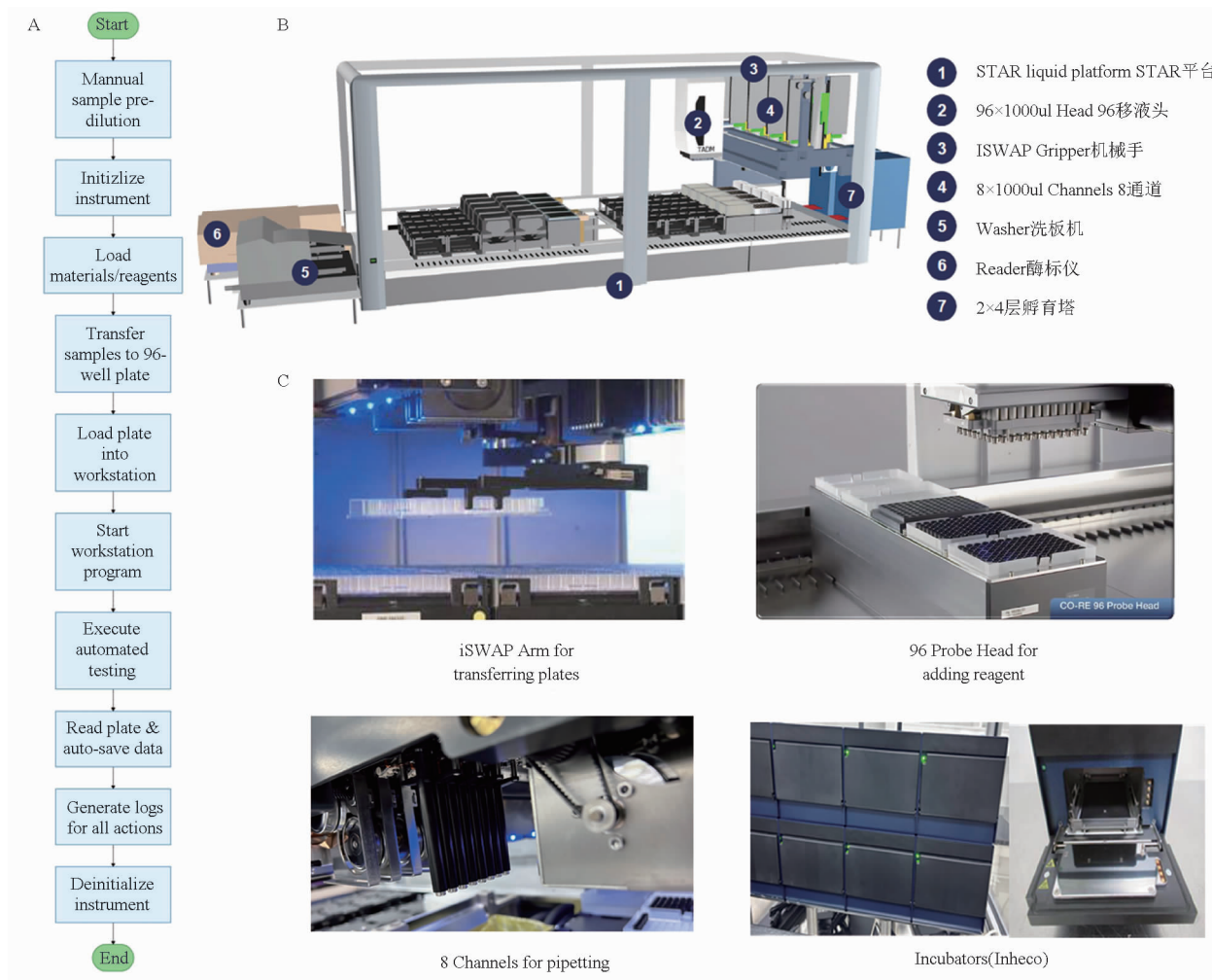
1.3 仪器和软件

采用 SpectraMax M5e 酶标仪(Molecular Devices, UK)执行吸光度检测,并使用 SoftMax Pro 7.0.3 完成数据分析;洗板机使用 BioTek ELx405 型号,通过 Liquid Handling Control 软件实现洗板流程自动化;孵育塔使用 Inheco 振荡培养箱,可严格控制孵育温度和转速。全系统由 Microlab STARplus 平台通过 VENUS 4 软件统一调度,形成完整的检测闭环。单次检测系统适用性和样品适用性结果,以及评估工作站性能的准确度、精密度结果需满足 ICH Q14 分析方法开发指导原则中建议的接受标准(13.1.2 章节)^[12]。

2 结果

2.1 自动化平台 ELISA 方法的建立

如图 1A 所示,为确保实验数据的完整性和可追溯性,检测流程遵循标准化操作与自动化记录相结合的模式:分析员首先执行样品部分手动预稀释并记录关键参数;随后完成仪器初始化、将物料及试剂放到指定位置;将预稀释样品加入 96 孔板后,将含样品的 96 孔板置于工作站指定位置;程序运行;酶标仪读取数据后自动存储原始数据,同步生成包含工作站全操作节点、仪器状态及异常事件的工作日志,确保从样品处理到结果输出的全链路数据可追溯、不可篡改;最终仪器终止化复位。全流程确保数据从生成、传输到存储的全生命周期不可篡改,符合 ALCOA+ 原则。本系统采用符合 21 CFR Part 11 要求^[13]的网络版酶标仪,检测完成后原始数据自动存储至加密数据库,同时工作站运行日志存储于本地盘,并通过验证的自动化程序每小时同步至中央数据库。数据管理遵循严格的合规策略,包括差异备份(每日增量+每周全量)、完整的审计追踪以及定期数据完整性验证,确保数据全程可追溯、安全可靠,满足 21 CFR Part 11 法规要求。



A. 工作站示意图 B. 整合的 iSWAP 机械臂, 96 移液头, 8 通道移液器及孵育塔。

A. Schematic diagram of the liquid handler B. iSWAP arm, 96-pipetting head, 8-channel pipette and incubators integrated.

图1 Microlab STARplus 自动化平台

Fig. 1 Microlab STARplus liquid handler for automated testing

工作站系统基于 Microlab STARplus 平台构建, 核心组件(见图 1B 和 1C)包括: 8 道独立移液通道、96 道移液头、iSWAP 机械抓手, 以及主台面配置的检测板、稀释板、枪头、试剂槽与垃圾袋。系统通过整合洗板机、酶标仪及孵育塔等外部设备实现全流程自动化。其中, 8 道/96 道移液模块可分别满足精准移液、分液与高通量液体处理需求, iSWAP 机械抓手则负责将检测板在主台面与三个外接设备间灵活转运, 整体系统兼具操作灵活性与运行高效性。

通过 Microlab STARplus 工作站中央 PC 端集成控制酶标仪及洗板机, 但三台仪器的校准和维护是相互独立的, 以此可简化设备管理流程并增加灵活性。另外, 虽然 ELISA 方法特异性极高, 其方法设计取决于药物的作用机制, 但仍可按照 ELISA 的四大分类(直接法、间接法、夹心法和竞争法)建立每

类方法的模板文件, 以便授权操作人员在没有软件工程师支持的情况下独立完成方法建立, 只需修改一些关键参数(如稀释体积、孵育时间/温度、转速等)和试液名称即可。

使用自动化平台检测时, 操作员主要负责抗原包被、试液配制(包括洗液、封闭液、检测抗体、终止液)、耗材供应及样品装载等前处理工作。启动后系统全自动完成样品稀释、洗板、孵育及酶标仪检测, 并且检测结束后可自动保存酶标仪原始数据及运行日志, 实现从样品处理、检测到数据分析的全流程自动化, 在实验操作标准化基础上有效保障了数据完整性的风险控制。该检测系统支持多块 96 孔板同步运行, 但根据 ELISA 常规实验流程及报告结果的个数要求, 单次实验检测 2~3 块板可实现检测效率与实验标准化的最优平衡。

2.2 自动化平台 ELISA 检测性能分析

采用常规的间接 ELISA 法分析自动化平台的检测性能。如图 2 所示,第一天的抗原包被由操作人员手动完成,其余所有流程均由工作站完成。该方

法流程考察到了工作站 8 通道的移液精度(对样品的预稀释和梯度稀释)、96 头的加液性能(TMB 和终止液)、孵育塔的温控精度和转速的稳定性以及 iSWAP 机械臂转板定位的精度。

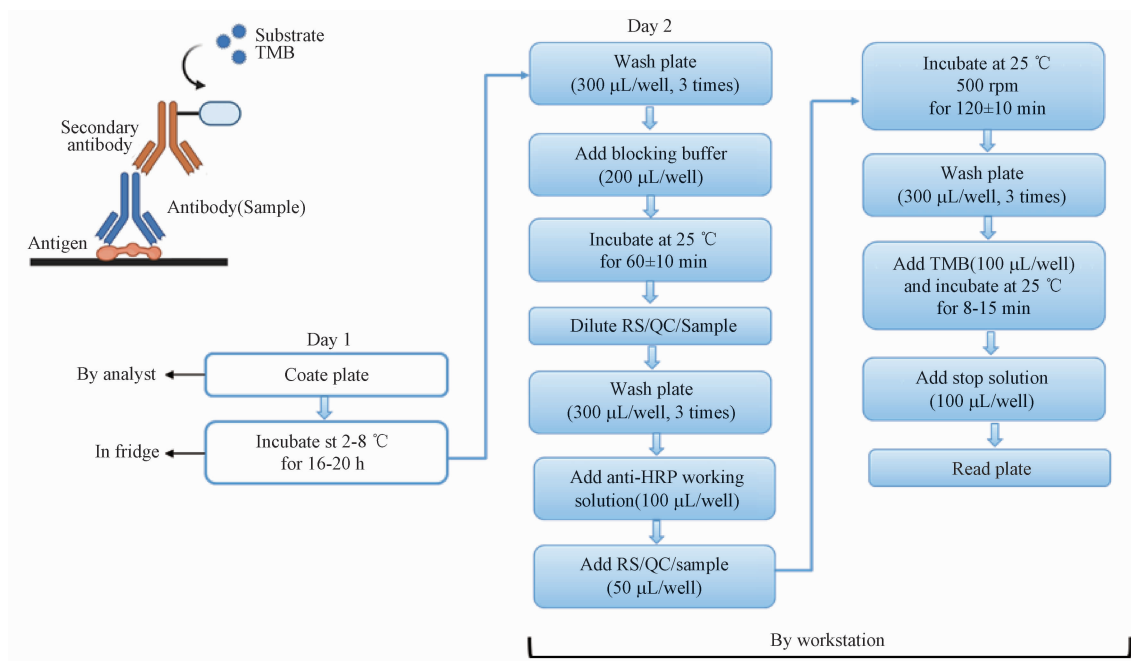


图 2 ELISA 方法示意图及检测流程

Fig. 2 Schematic diagram of the ELISA method and assay flow

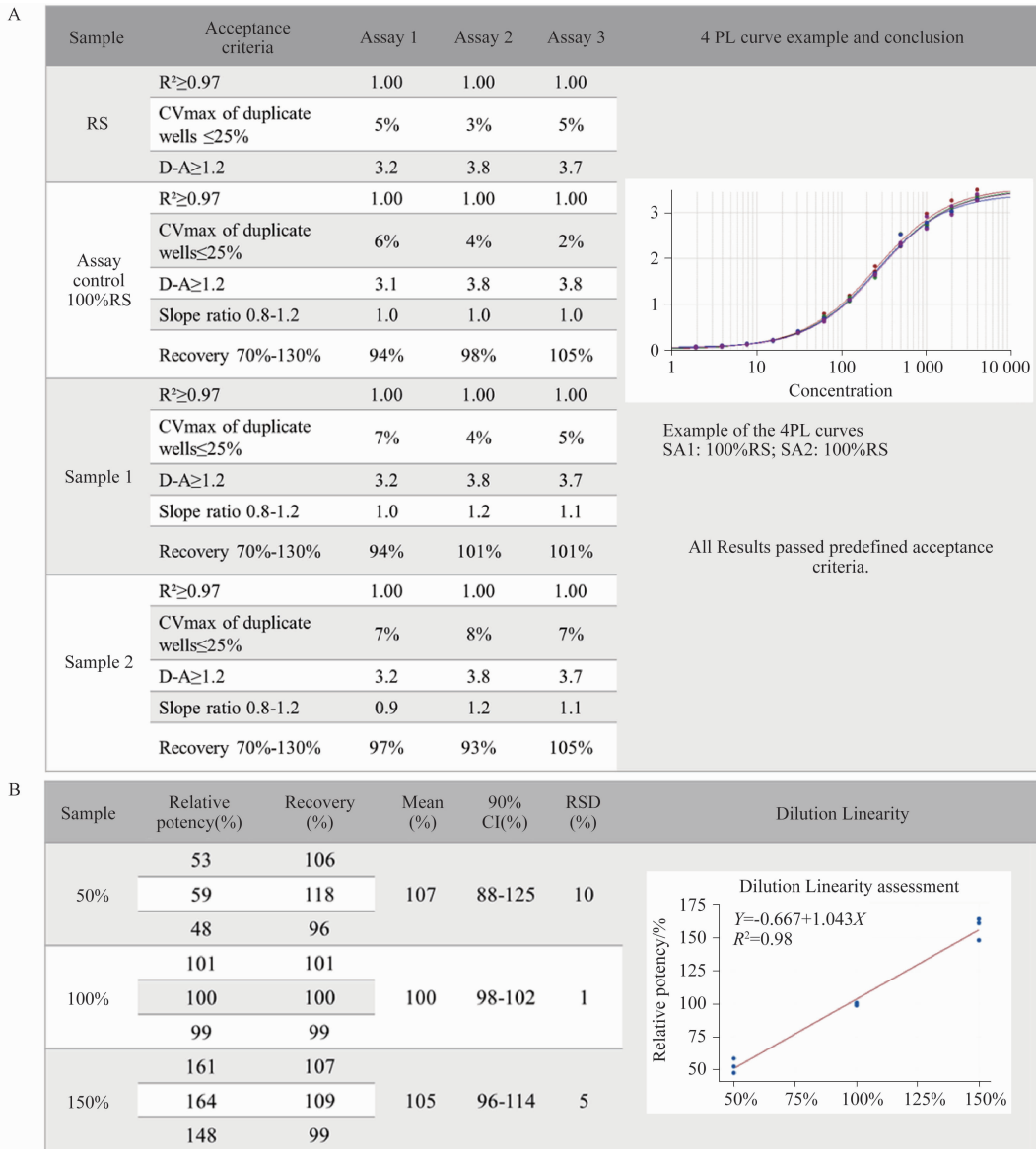
依据 ICH Q14 分析方法开发指导原则中《抗 TNF- α 单克隆抗体的效价测定》示例(13.1.2 章节),采用的检测板布局(每板包含标准品、对照品及 2 个待测样品,各样品梯度稀释后以双复孔形式检测),通过标准品/对照品双质控体系系统性评估工作站的适用性:四参数剂量-响应曲线需满足 $R^2 \geq 0.97$ 的拟合优度,各浓度点双复孔变异系数(CV) $\leq 25\%$,上下渐近线差值(D-A) ≥ 1.2 ,斜率比满足 0.8 ~ 1.2 以确保曲线平行性,同时回收率控制在 70% ~ 130%。如图 3A 的结果显示,所有接受标准都通过,且曲线呈 sigmoid 函数曲线状,对照品和样品在三次检测中的回收率也高达 93% 以上。值得注意的是,所有浓度点双复孔 CV 最大值仅为 8%,说明工作站的移液精度完全满足检测需求。

接着,使用 50%、100% 和 150% 水平的标准品考察了工作站的准确度和精密度。如图 3B 中结果显示,三个浓度水平回收率分别为 107%、100% 和 105%,对应的相对标准偏差为 10%、1% 和 5% (远优于 ICHQ14 建议的 $\leq 20\%$ 的标准),稀释线性良好 ($R^2 = 0.98$, 回归方程 $Y = 1.043X - 0.667$, 覆盖

50% ~ 150% 范围),表明工作站整体满足 ICHQ14 及 ICHQ2(R2) 对于分析方法的核心要求(准确度、精密度和稀释线性)。综上所述,工作站的移液精度和孵育模块(温控、震荡系统)完全适用于 QC 实验室的 ELISA 方法检测。

2.3 自动化与手动操作对比

通过双复孔 CV 和回收率两项关键指标,系统评估了自动化操作与手动操作在检测变异度与目标物回收精度上的差异。如图 4 所示,工作站在实验性能上显著优于手动移液。从 CV_{max} 来看,自动化的均值为 5.4% (95% 置信区间: 3.0% ~ 7.9%),远低于手动移液的 8.2% (95% 置信区间: 5.8% ~ 10.7%),表明其双复孔变异性更低且数据分布更集中。在回收率方面,自动化测试的均值为 100.0% (95% 置信区间: 94.2% ~ 105.8%),结果准确度和精密度高,而手动移液平均回收率 102.8% (95% 置信区间: 97.1% ~ 108.6%),且结果出现显著波动,说明手动操作的检测变异度高。以上数据说明自动化测试的检测变异性更低,且准确度和精密度与手动操作相比更具有优势。



A. 系统适用性和样品适用性结果 B. 不同水平准确度和精密度结果。

A. System suitability and sample suitability results B. Accuracy and precision results at different levels.

图3 自动化平台 ELISA 检测性能分析

Fig. 3 Performance assessment of an automated ELISA testing

2.4 影响工作站结果的关键因素

QC 实验室的 ELISA 检测方法需遵循《中国药典》的要求,以确保检测结果在药品质量控制中的可靠性、一致性和法规符合性。尽管自动化技术显著提升了检测通量与效率,但其影响因素与人工操作存在显著差异,需通过系统性分析实现风险管控。本章节基于因果图(图 5B)对核心因素进行分类解析,并提出针对性控制策略。

2.4.1 环境因素 实验室温度波动可影响酶标板孵育反应的动力学稳定性(手动操作也需关注);由于孵育塔在震荡过程中会产生热量,如果

室温过高,产热能力会超过散热。基于经验,在室温达到 25 °C 时,若孵育塔温度设置为 25 °C,通常实际使用时温度会高出 1 ~ 2 °C (即 26 ~ 27 °C)。因此,需要评估高温孵育对检测结果的影响。图 5A 说明在将孵育塔设置为 28 °C 时检测结果满足依据 ICHQ14 (13.1.2 章节)要求制定的接受标准,因此温度的小范围波动对此方法检测无显著影响。另外,设备震动可能导致机械臂定位偏移或移液精度偏差。建议通过环境监控系统实时记录温湿度,并采用防震台隔离设备干扰。

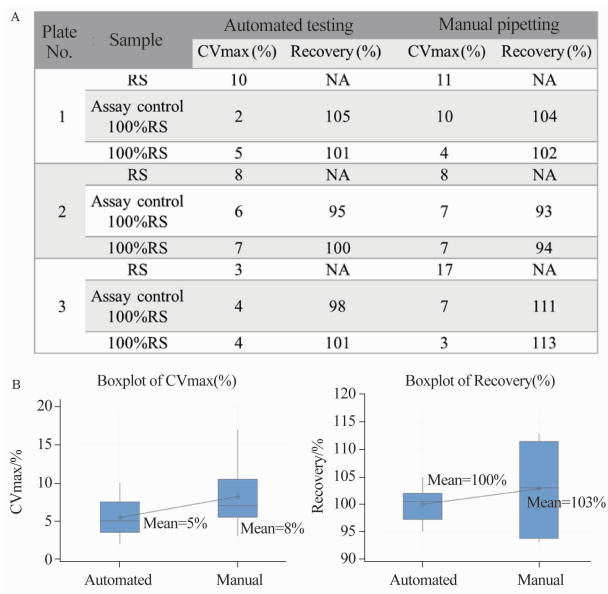


图4 自动化与手动操作对比结果

Fig. 4 Comparative analysis of automated vs. manual operations

2.4.2 物料 关键试剂效价降低的问题手动操作也有涉及;自动化系统依赖电导吸头的液面探测功能,若吸头导电涂层不均匀或批次间公差超标,可导致移液体积异常,需严格监控其性能的一致性。

2.4.3 人员 人员失误包括试液配制错误、方法参数设置错误及物料放错位置,这三点会导致信号值漂移甚至实验终止;高浓度样品需人工预稀释至一定浓度范围内,若操作不当(如移液手法偏差或稀释梯度错误)将导致回收率超限。

2.4.4 设备 机械臂长期运行后,移液通道磨损可导致体积误差,且移液位置也有偏移,需通过周期校准及预防性维护解决;孵育塔温度不均(如边缘孔与中心孔温差大)可影响抗原-抗体结合效率,也需通过周期校准进行监控;外接设备(如洗板机、酶标仪)连接中断会导致实验终止,需在运行前执行自检程序以确保连接正常。

2.4.5 方法 自动化洗板机无法模拟人工拍板动作,残留液可能导致检测变异度高。需调整洗板机吸液高度(如降低距孔底的距离)来最少化残留量;自动化稀释中吸液速度过快易引入气泡,导致检测变异度高、结果异常,可通过降低吹吸速度或调整吹吸次数最小化气泡量;孵育时间若未按自动化特点调整,直接沿用人工参数可能导致信号值漂移,建议方法评估阶段引入孵育参数。

2.4.6 样品浓度过高问题 Microlab STARplus 工作站未整合小量程移液器(< 20 μL),使用大体积吸头(如 50 μL)进行高倍稀释时,会导致移液误差

大,显著影响活性检测结果。建议采用分级稀释策略:人工预稀释至中间浓度,再由工作站完成后续稀释。

总之,自动化技术虽显著提升了效率,但其易受环境波动、设备校准与维护、方法设置及样品处理等因素影响,需通过系统性分析进行精准管控。针对性策略包括环境监控、设备周期性校准、方法参数优化(如洗板高度调整、孵育时间优化)以及分级稀释等操作规范,以降低自动化引入的误差风险并保障检测结果的准确性。

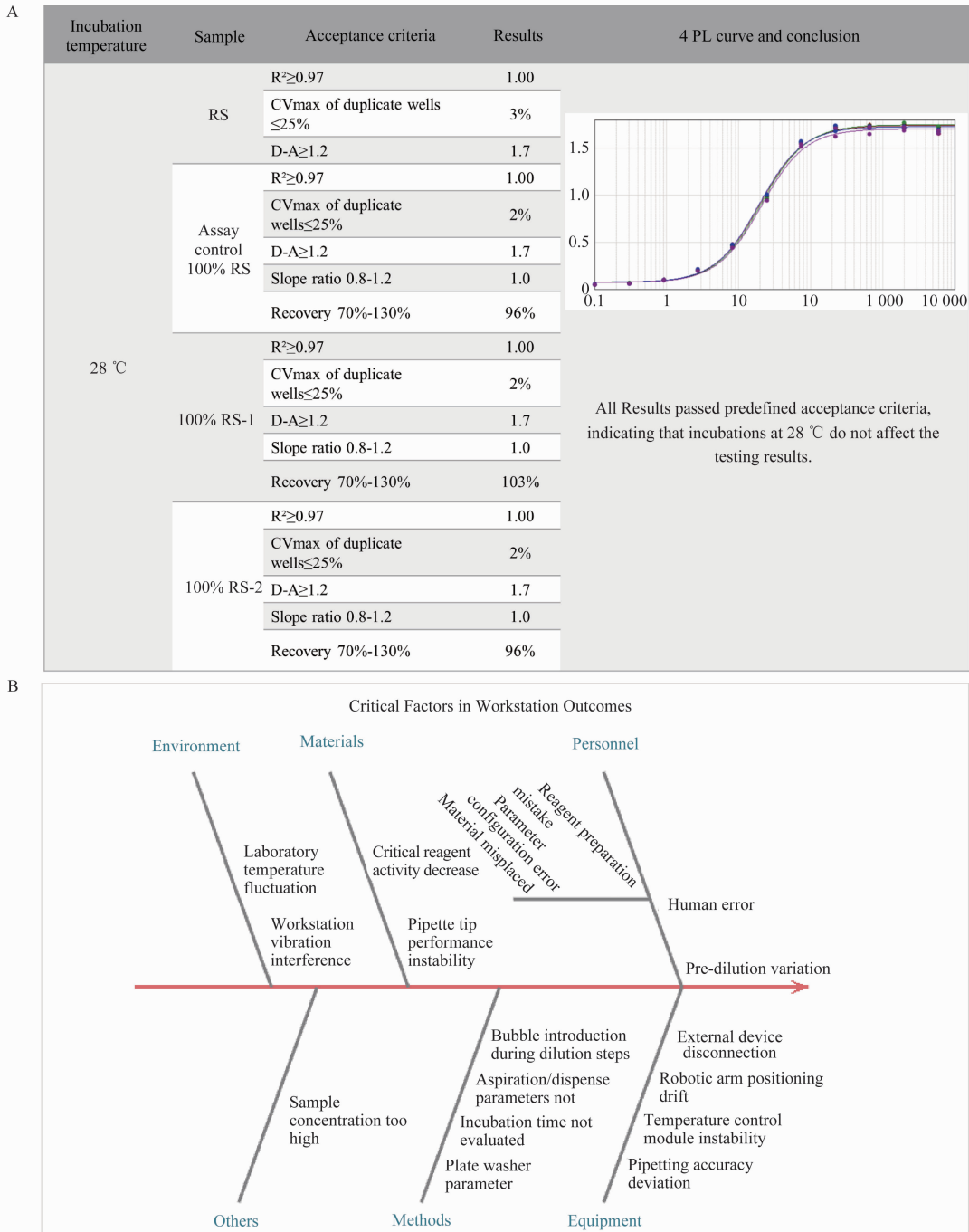
3 讨论

3.1 自动化 ELISA 检测平台的利弊分析

本研究证实,基于 Microlab STARplus 的自动化 ELISA 检测平台显著提升了检测效率与标准化水平。其核心优势体现在:①通过整合移液、孵育、洗板及检测模块实现全流程自动化,减少人为操作误差;②数据完整性风险控制强化,系统自动记录原始数据及运行日志,避免手动转录错误;③高通量处理能力与高精密度满足 ICH Q2R2 和 ICH Q14 要求,尤其适用于生物药等复杂样品的质量控制。此外,本平台核心架构可兼容所有基于 ELISA 技术的检测项目,也适用于 QC 实验室的宿主细胞蛋白 HCP 残留的高灵敏度定量分析。其整合的高精度移液模块(96 头和 8 通道)可用于其他涉及液体处理的实验,包括 PCR 和高通量质粒提取等。

然而,自动化平台的弊端亦不容忽视:①工作站对高浓度样品的处理能力受限(如微量稀释误差放大),需依赖人工预稀释分级操作,增加了操作复杂度;②设备维护成本高,移液通道磨损、温控模块波动等需周期性校准;③环境敏感性(设备震动)可能放大系统性误差,需额外投入防震措施;④若设备断联或软件故障可能导致实验终止。针对上述弊端,下一步需重点优化以下环节:①整合小量程移液模块(如微升级移液技术),减少人工干预需求;②引入智能预警系统,实时监测设备状态(如机械臂定位偏移、孵育塔温度及振荡稳定性),通过预测性维护降低故障率。

另外,尽管自动化 ELISA 平台在提高检测效率和数据可靠性方面具有显著优势,但其推广应用仍面临一些现实挑战,主要包括:①较高的初始建立成本,包括自动化设备采购、系统验证和 IT 基础设施升级等投入;②陡峭的学习曲线,操作人员需要同时掌握 ELISA 检测原理和自动化系统操作;③对专业



A. 高温孵育 (28 °C) 对系统适用性和样品适用性结果的影响 B. 因果图对影响工作站结果的关键因素分析
 A. The impact of high-temperature incubation (28 °C) on System suitability and sample suitability results B. Cause and effect diagram analysis of key factors affecting workstation results.

图 5 影响工作站结果的关键因素分析

Fig. 5 Analysis of key factors influence on workstation results

技术团队的需求,平台的日常维护和故障排查需要同时具备生物检测经验和自动化系统知识的高级工程师,并依赖 IT 专业人员确保数据管理系统的稳定运行。这些因素在一定程度上限制该技术在中小型 QC 实验室的普及应用。

自动化平台虽然初始投资较高(包含设备成本

及 IT 系统搭建),但在具有大规模检测需求的大型 QC 实验室可以通过显著提升检测效率和降低失效率来实现长期的人力成本降低(每个工作日检测至少两个 Assay 且无人为稀释错误,相当于每年节省 2.5 个人力成本)。按行业平均人力成本估算,再加上设备折旧(10% 设备成本/年),预计 4 至 5

年即可收回投资,且从第5年起开始显现收益,对于长期大规模检测需求具有显著的经济效益优势。

3.2 未来发展方向:人工智能(AI)驱动的自动化检测系统

AI的引入有望进一步革新ELISA检测流程^[14]。AI拥有的机器学习(ML)和深度学习(DL)能力在方法模型搭建和缺陷预测方面有巨大的潜力。预期优势包括:①现有自动化平台虽提供标准化模板,但关键参数(如孵育时间、洗板次数)仍需手动调整。基于现有平台积累的数据(涵盖多个生物药结构特性及其锁定的方法参数),构建多元数据库,包括孵育时间、洗板参数与对应检测结果的关联数据。通过机器学习分析历史数据,AI可提供方法参数以适配不同类型样品,减少方法评估成本;②预测性维护:结合设备运行数据(如移液次数、温控记录),绘制移液器精度衰减曲线和温控稳定性曲线,并生成对应曲线方程,可预测机械磨损周期、移液器密封件更换周期,及优化维护计划;③AI可基于ICH Q14及《中国药典》要求,在方法建立阶段,根据数据库,识别影响检测的关键因素,预判潜在风险。例如,AI可提前识别可能导致验证失败的参数(如曲线信号窗口过低),并推荐调整策略(如调整抗原浓度等);④此外,AI可自动生成符合FDA ALCOA+原则的电子记录,确保检测全程被自动记录。

然而,AI应用的潜在风险需审慎评估^[15-16]:①算法“黑箱化”可能导致决策逻辑不透明,难以通过法规审计;②模型训练依赖高质量数据,若历史数据存在偏差,可能引入系统性误判;③初期部署成本高,需跨学科团队协作开发。

4 结论

本研究在QC实验室搭建了基于Microlab STARplus的全自动化ELISA平台,其准确度和精密度均满足ICHQ14建议标准,且较手动操作显著降低变异性。该平台通过标准化流程与数据溯源功能,为生物药的质量控制检测提供高效、精准且合规的检测平台。

参考文献

[1] The United States Pharmacopeia: General Chapter <1032> Design

and Development of Biological Assays [S]. 2023.

[2] The United States Pharmacopeia: General Chapter <1033> Biological Assay Validation [S]. 2023.

[3] 中国药典2020年版. 四部[S]. 2020: 通则1431.

[4] European Pharmacopoeia: Chapter 5.3 Statistical Analysis of Results [S]. 2023.

[5] 中国药典2020年版. 四部[S]. 2020: 通则9101.

[6] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline Q2 (R2): Validation of Analytical Procedures [S]. 2022.

[7] PANDYA K, RAY CA, BRUNNER L, et al. Strategies to minimize variability and bias associated with manual pipetting in ligand binding assays to assure data quality of protein therapeutic quantification [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3): 623.

[8] REY G, SCHUETZ F, SCHROEDER D, et al. Automated ELISA for potency measurements of therapeutic antibodies and antibody fragments [J]. J Pharm Biomed Anal, 2024, 245: 116141.

[9] DUO J, DONG H, DESILVIA B, et al. A generic template for automated bioanalytical ligand-binding assays using modular robotic scripts in support of discovery biotherapeutic programs [J]. Bioanalysis, 2013, 5(14): 1735.

[10] AHENE AB, MORROW C, RUSNAK D, et al. Ligand binding assays in the 21st century laboratory: automation [J]. AAPS J, 2012, 14: 142.

[11] KATZ D, SHI W, PATRUSHEVA I, et al. An automated ELISA using recombinant antigens for serologic diagnosis of B virus infections in macaques [J]. Compar Med, 2012, 62(6): 527.

[12] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline Q14: Analytical Procedure Development [S]. 2023.

[13] Food and Drug Administration. 21 CFR Part 11: Electronic Records; Electronic Signatures [S]. 2003.

[14] UNDRU TR, UDAY U, LAKSHMI JT, et al. Integrating artificial intelligence for clinical and laboratory diagnosis—a review [J]. Maedica (Bucur), 2022, 17(2): 420

[15] KAUR I, BEHL T, ALEYA L, et al. Artificial intelligence as a fundamental tool in management of infectious diseases and its current implementation in COVID-19 pandemic [J]. Envir Sci Poll Res Int, 2021, 28(30): 40515.

[16] AHMAD Z, RAHIM S, ZUBAIR M, et al. Artificial intelligence (AI) in medicine, current applications and future role with special emphasis on its potential and promise in pathology: present and future impact, obstacles including costs and acceptance among pathologists, practical and philosophical considerations. A comprehensive review [J]. Diagn Pathol, 2021, 16(1): 24.

(收稿日期:2025-03-28)