

致 力 于 人 类 的 健 康 与 幸 福

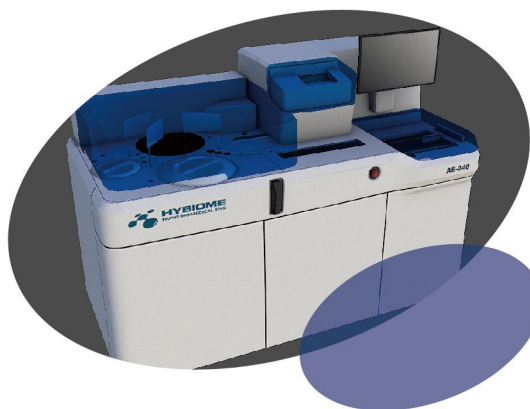
第 07 期
2017/10

华医通讯

www.hybiome.com

全自动化学发光免疫分析仪

Automatic Luminescence
Immunoassay Analyzer



 **HYBIOME**



历史背景

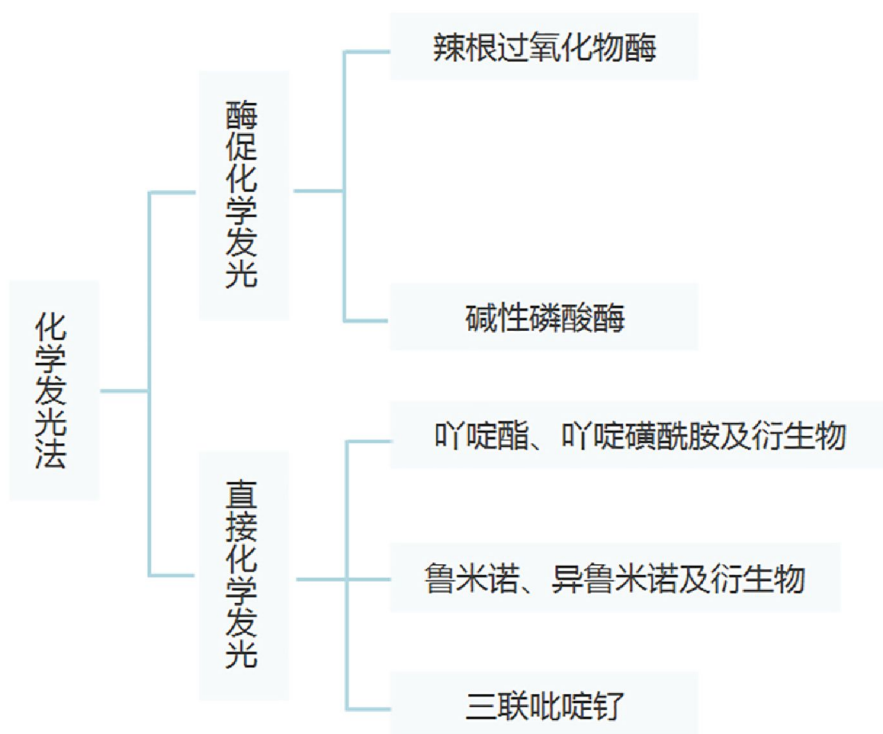
20 世纪 40 年代以来，相继出现了三大免疫技术，分别是免疫荧光技术、放射免疫技术和免疫酶技术。这三大免疫技术各有缺点：免疫荧光技术应用范围窄、灵敏度低；放射免疫技术存在放射污染；免疫酶技术的灵敏度低。于是，化学发光免疫技术应运而生，成为重点研究对象。1977 年，Halman 等人创立了化学发光免疫技术，首次将高特异的抗原抗体反应与高灵敏度的化学发光反应结合起来，避免了放射污染，提高了灵敏度⁽¹⁾。

常见的化学发光免疫技术

化学发光免疫技术由标记技术、分离技术和检测技术构成。

标记技术：即最终反应物的识别方法，又称示踪技术。

化学发光是物质在进行化学反应过程中伴随的一种光辐射现象。化学发光法，广义上讲，只要检测信号是化学发光信号，即可称为化学发光法；狭义上讲，只有标记物是化学发光物质，才是化学发光法。根据广义定义，可以将化学发光法进行如下分类：



评价标记技术，主要从如下几个方面进行比较⁽²⁾：

	辣根过氧化物酶	碱性磷酸酶	鲁米诺类	吖啶酯类	三联吡啶钉
标记物分子量 (道尔顿)	44000	56000	~270	~590	~640
空间位阻	大	大	无	无	无
影响因素	多	多	少	少	少
底物	鲁米诺	金刚烷	鲁米诺类	吖啶酯类	[Rb(bpy) ₃] ²⁺ -TPA
启动剂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	NaOH+H ₂ O ₂	NaOH+H ₂ O ₂	电启动
灵敏度	低	高	一般	高	高
检测范围	窄	广	广	广	广
检测信号	辉光	辉光	闪光	闪光	闪光
成本	低	高	低	低	高
代表厂家	科美	贝克曼 安图	索灵 新产业	雅培、西门子 长光华医	罗氏

分离技术：免疫反应后，需将未反应的物质与特异性反应结合物分离开来，以便准确测量参与特异性反应的抗原抗体的量，这项技术即分离技术。

一般分离技术是：将抗体通过物理化学的方式，固化在载体上，形成捕获抗体；加入待检样本和标记抗体后，待检抗原与捕获抗体、标记抗体反应，形成夹心复合物，从而被捕获至固相，洗去未反应物质，通过检测，可分析抗原的含量。

化学发光免疫分析试剂的分离载体主要有两种：微孔板和磁颗粒⁽³⁾。磁颗粒分离技术是免疫分析技术发展的趋势。下表是两种载体的比较：

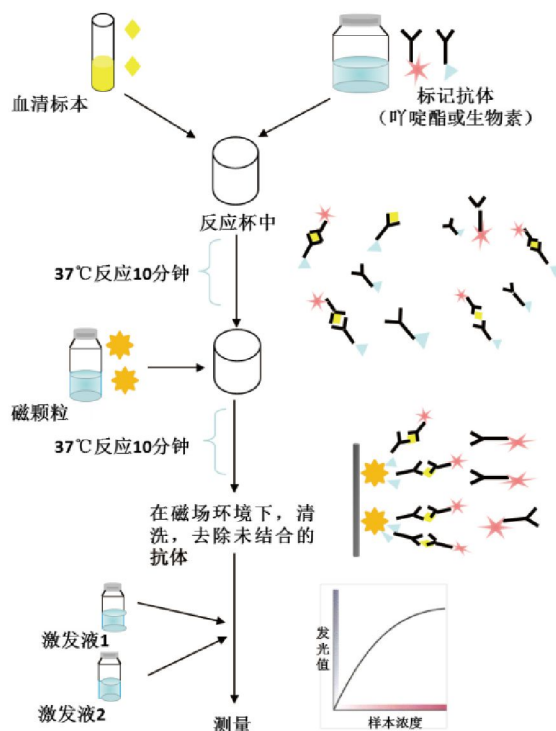
	微孔板	磁颗粒
反应面积	小	大
反应方式	固相液相非均相反应	近似液相均相反应
反应时间	~60min	~20min
检测方式	批量检测	随机检测
灵敏度	低	高
线性范围	窄	宽
定标方式	每次实验均需 六点定标（全点）	通过两点校正，批内定标 定标周期14-30天



分离技术与标记技术相结合，组成了标记免疫分析的试剂部分。

典型的实验过程如下：

- 将样本（校准品）和捕获抗体、标记抗体反应，形成免疫复合物；
- 洗涤，将未反应的抗体、标本等与免疫复合物分离；
- 加入底物液或激发液，产生化学发光；
- 检测；
- 根据发光值，计算待测物的浓度。



将整个实验的动作（包括加样品、加试剂、温育反应、洗涤分离、加激发液等）和检测技术结合起来，进行自动化操作，形成了全自动化学发光免疫分析仪。

全自动化学发光免疫分析仪

化学发光分析仪是试剂、仪器和分析方法三位一体结合的产品。

从功能角度出发，免疫分析仪一般包括样本存储单元、试剂存储单元、加样单元、孵育单元、分离单元、检测单元以及数据处理单元。

★样本存储单元

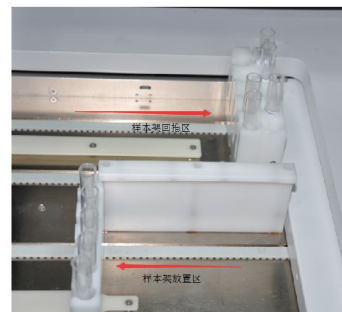
样本存储单元是用来放置样本（包括急诊样本）并进样，同时对装载的样本进行信息识别。目前样本存储有两种类型，转盘式（如下图 1-1）和轨道式，而轨道式又可分为手动进样（如图 1-2）和自动进样（如图 1-3）。轨道式在在线添加样本上有一定的优势，可避免实验中添加样本时影响其它样本检测。



1-1转盘式



1-2轨道式手工进样



1-3轨道式自动进样

图1

样本的信息一般通过读取采血管上一维条码获得。在样本单元一侧安装上条码枪，可手动或自动来读取样本条码，并从医院 lis 系统获取病人详细信息和待检测项目，实验完成后，同时可将测试结果上传到 lis 系统中。对于条码枪的选择，除了扫描速度、扫描宽度外，还有两个重要参数需要格外注意：一个是景深，即条码枪有效工作范围；另一个是分辨率，即成功扫描的最窄条码的宽度，一般为 10mil。

样本单元中还有一个重要功能就是急诊优先。对于轨道式自动进样，需要单独配置急诊位，以实现真正的急诊优先，如下图 2 所示。对于轨道式手动进样和转盘式，急诊位可通过软件配置在任意样本位上，较为灵活。

★试剂存储单元

试剂存储单元主要功能有试剂的存放、混匀以及识别。如图 3 所示。

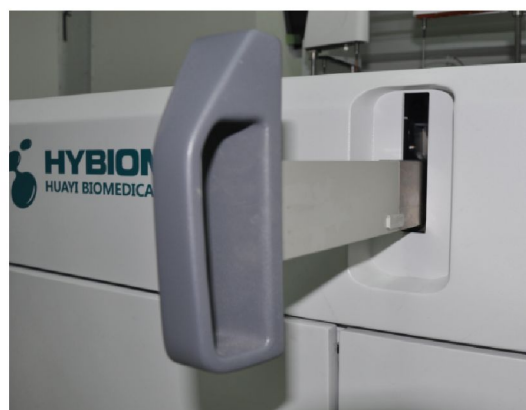


图2 急诊位

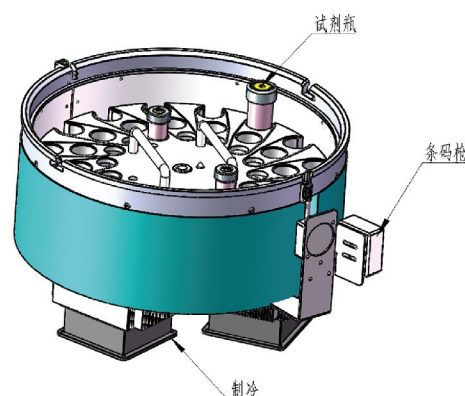


图3 试剂存储单元



试剂仓的低温控制（2-8℃）有利于试剂的存储，所以，现在多数仪器均为试剂仓配制了制冷单元。

混匀机构是通过试剂盘定子齿轮与转动盘上转子齿轮正向和反向旋转冲击实现试剂的混匀，如图 4 所示。

试剂识别机构是用来获得试剂的相关信息如定标曲线、有效期等，一般通过条码枪读取试剂瓶上的一维码和二维码来完成，如图 5 所示。试剂信息可通过试剂盘的旋转由固定条码枪进行定位识别，也可通过手持条码枪进行人工读取。

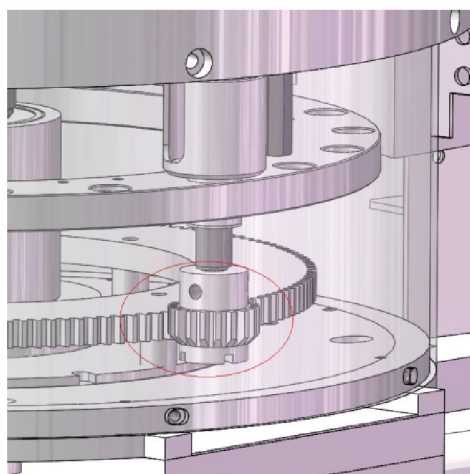


图4 混匀机构



图5 试剂瓶条码

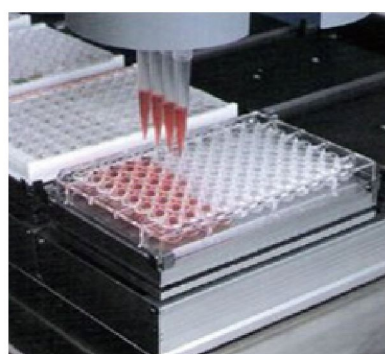
★加样单元

用于样本和试剂的吸样及排样，精密控制液体的液量，保证检测结果的准确性。该单元可分成两部分，液体的吸排和液量的控制。

目前液体的吸排有两种方式，一种是使用可重复清洗并带有涂层的钢针；另一种是使用一次性 TIP 头。如下图 6 所示。



6-1钢针



6-2 TIP头

图6 液体吸排的两种方式

采用 TIP 头,优点是不会产生携带污染,缺点是涉及到 TIP 头的适用性(安装的吻合度),排量的准确性(表面对液体的吸附),以及耗材的费用问题等;在设计仪器时,需要放置 TIP 头的空间,在实验过程中,需要添加 TIP 头等。

使用钢针方便快捷,无需不断地更新加样头,同时也节省了放置 TIP 头的空间。钢针的携带污染率可通过以下措施降低:

第一、钢针进行特殊处理,如针尖涂上特氟龙涂层和内壁的光洁度处理;

第二、钢针清洗:常规清洗和强化清洗。常规清洗是内外壁同时清洗,内壁通过隔膜泵向针内快速注入清洗液进行,外壁则通过反冲形成的水柱来清洗。对于污染性强的项目,如传染病项目,则需要增加强化清洗来进行。

行业标准要求携带污染率应 $\leq 10^{-5}$, HYBIOME 通过采用强化清洗液对针内外壁进行强化清洗,使仪器携带污染率 $\leq 10^{-7}$ 。

加样单元中另一块重要的领域是液量的精密控制。对于小液量 $5\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$,要满足精密性在 2% 以内,设计高精度加样系统是关键。图 7 是常见的液路示意图。

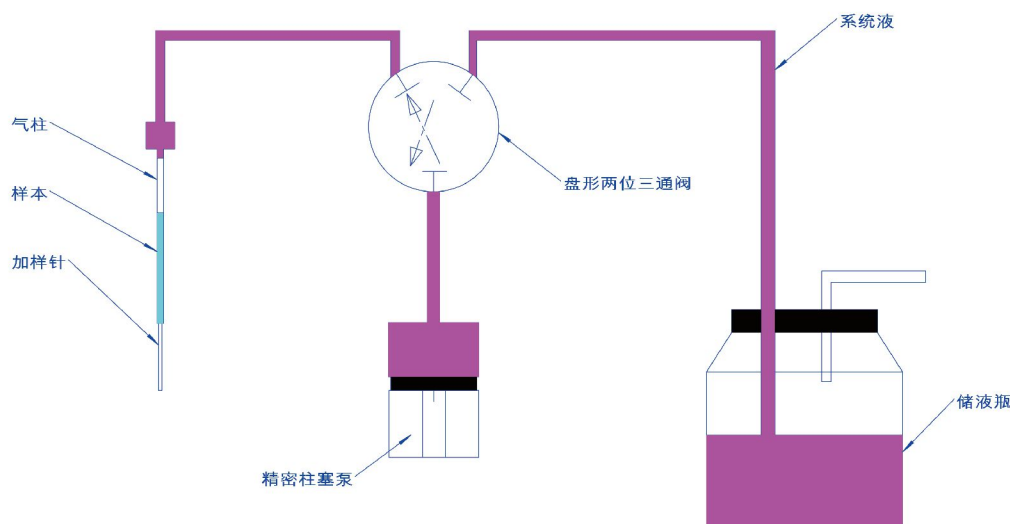


图7 液路示意图

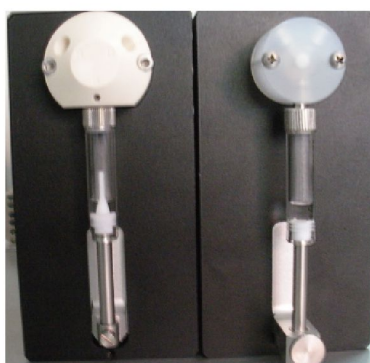


设计高精度加样系统，重点是考虑加样泵的选型和加样泵控制：

首先，加样泵要选择高精密度的加样泵，如图 8 所示，有柱塞泵、注射泵和 V 型泵。注射泵是单头，需要配合旋转阀门使用，而柱塞泵是一体化设计，使用寿命更长，结构也更稳定。V 型泵是定量泵，可以持久性耐腐蚀。样本、试剂的加样可使用柱塞泵和注射泵，而底物激发液则使用 V 型泵。



8-1 柱塞泵



8-2 注射泵



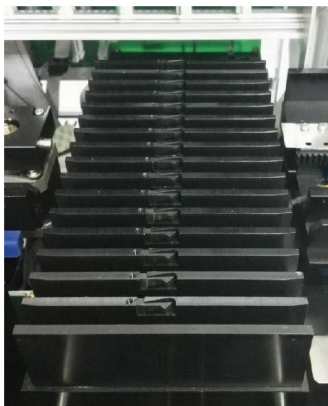
8-3 V 型泵

图8 常见的精密加样泵

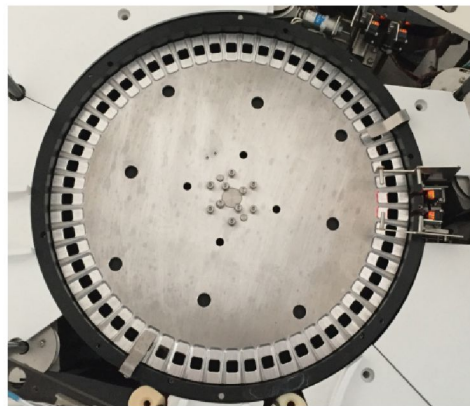
其次，加样泵的速度控制也是需要注意的，速度过快会出现电机丢步、挂液等现象，速度过慢会出现小液量注不出来的问题。所以在进行驱动时，需要合理规划速度曲线。

★ 孵育单元

孵育单元是用来保证抗原抗体在要求的温度下进行充分反应。一般孵育单元温度要求是 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 内，波动度不超过 1.0°C 。孵育单元一般通过加热电阻或者硅胶加热膜进行加热。目前孵育单元有两种结构，一种是槽式，一种是盘式，如下图 9 所示。



9-1 槽式孵育



9-2 盘式孵育

图9 孵育单元两种结构

★分离单元

如图 10 所示是常见的分离单元。分离单元是在抗原抗体反应完毕后，将未反应的物质与免疫反应复合物分离，以免其影响后续的检测。分离时待清洗物置于磁场中，磁颗粒吸附于一侧，加入清洗液，逐步吸走未反应的物质。分离单元设计最大的难点在于如何将未反应的物质分离干净，在尽量降低未反应物质残留的同时避免磁颗粒流失。

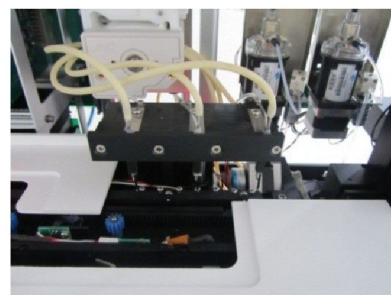
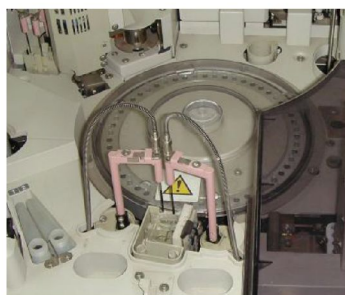


图10 常见的分离单元



分离技术是通过施加磁场将包含磁微粒的免疫复合物吸附起来，而分离出未反应的标记物。

免疫复合物分离过程主要分为以下几个步骤：

- ①吸附过程：将复合物颗粒在磁场环境下吸引到反应杯侧壁
- ②冲洗过程：对复合物颗粒进行冲洗
- ③吸液过程：将液体吸走

以上三个过程是一次完整的分离周期，在实际工作过程中会分为多次冲洗过程。目前我们使用的是 5 阶清洗。

★检测单元

样本抗原抗体浓度与其化学反应发光过程曲线呈一定的函数关系，通过测量免疫复合物的发光值，从而检测出样本浓度值。一般通过光电倍增管 PMT 来采集发光光子信号，而光子信号需要在加入激发液后才能发出。目前，化学发光激发主要有两种，一种是直接化学发光，如吖啶酯在碱性 H_2O_2 溶液中产生发光；另一种是电化学发光，如三联吡啶钌在测量池磁场和电极的作用下加入三丙胺 TPA 发光。两者相比，吖啶酯发光是纯自然化学发光，背景信号非常低，而电化学发光电极和流动比色池存在交叉污染的风险。

为了避免背景噪声对测量结果的影响，光电检测单元需要设计出一个暗室。可使用背胶毛毡等材料来实现密封，同时采用交替遮挡方法实现测量室的光密封，构造出符合标准的暗室，有效滤除背景光，从而降低测量时的本底噪音。如图 11、12 所示，测量室结构中缝隙均采用迷宫式密封，可以有效地隔绝外界光对 PMT 测量的干扰。

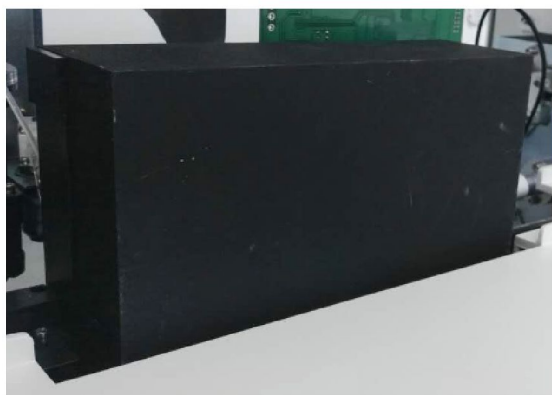


图11 检测单元

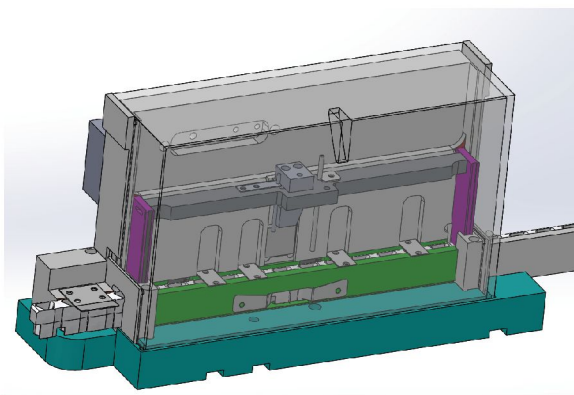


图12 检测暗室

★数据处理单元

检测单元测量出的发光值并不能作为最终结果，需要通过项目定标曲线计算出样本抗原抗体的浓度值，该值最终呈现在样本检验报告单上。

项目定标曲线由扫描项目试剂的二维码获得,如图 13 所示,定标曲线一般有 6 个校准点。通过这 6 个点按照一定的数学模型来拟合成定标曲线，一般有四参数法和多项式法等，不同的项目会使用不同的拟合方法。在客户端使用时，通过定标液进行两点定标以校正主曲线。一般定标周期是 2 ~ 4 周。

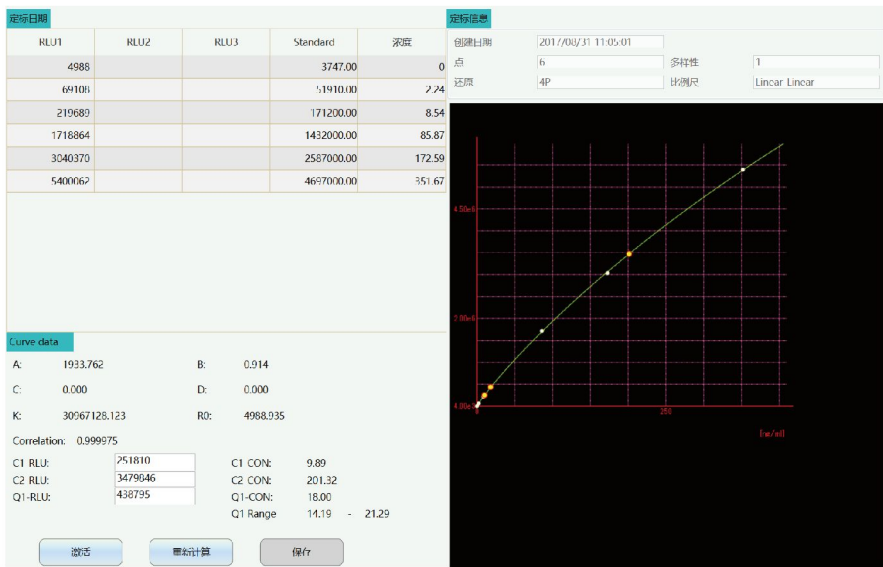


图13 定标曲线示例

全自动化学发光免疫分析仪行业标准

- ◎ 反应区温度控制的准确性和波动度
 温度准确性应在设定值的 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 内，波动度不超过 1.0°C 。
- ◎ 分析仪稳定性
 分析仪开机处于稳定工作状态后第 4h、第 8h 的测试结果与处于稳定工作状态初始时的测试结果的相对偏倚不超过 $\pm 10\%$ 。



◎ 批内测量重复性

批内测量重复性 $CV \leq 8\%$ 。

◎ 线性相关性

在不小于 2 个数量级的浓度范围内，线性相关系数 $r \geq 0.99$ 。

◎ 携带污染率

携带污染率应 $\leq 10^{-5}$ 。

全自动化学发光免疫分析仪AE-180和AE-240性能指标

1. 加样准确性和加样重复性

加样量准确性 95%-105%，重复性 $CV \leq 2\%$ ；

2. 孵育单元温度控制的准确性和波动性

温度准确性 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，波动度 $\leq 1.0^\circ\text{C}$ ；

3. 光学测量性检验

a) 空杯发光值 < 300 ；

b) 加清洗分离发光值 < 500 ；

c) 光检液重复性： $CV \leq 3\%$ ；

4. 线性相关性

线性相关系数 $r \geq 0.99$ ；

5. 批内测量重复性

CEA：浓度值、发光值 $CV \leq 8\%$ ；

T4：浓度值、发光值 $CV \leq 8\%$ ；

Anti-TG：浓度值、发光值 $CV \leq 8\%$ ；

6. 分析仪稳定性

分析仪开机处于稳定工作状态后第 4h、第 8h 的测试结果与处于稳定工作状态初始时的测试结果的相对偏倚不超过 $\pm 10\%$ ；

7. 携带污染率

携带污染率 $\leq 10^{-7}$ 。

分析仪操作注意事项及维护保养

仪器的正常操作和维护保养是仪器长期稳定可靠运行的重要保障。仪器出现的大故障基本都是从小的问题累积造成的，应该防微杜渐，定期、仔细地对仪器进行检查。发现问题，予以重视，及时解决，严禁仪器“带病”工作。否则会影响仪器的使用寿命，导致提前报废，造成极大的损失。

全自动化学发光免疫分析仪安装和日常使用过程中注意事项如下：

1. 仪器应安装在室内，避免阳光直射，环境温度 10℃～30℃，湿度≤70%；
2. 仪器电源电压为 AC220V/50HZ，电压波动范围在 ±10% 以内，且接地良好；
3. 不要将仪器放在靠近离心机、超声波、X 线机、核磁共振等发射强烈电磁波的场所；
4. 仪器使用前检查分析仪上剩余试剂量，放足当日所需试剂，及时清空固体废弃物及废液桶；
5. 仪器上电初始化后需等待半小时以上，待系统各部件温度达到正常工作点后方可进行试验；
6. 仪器实验前需进行系统灌注程序；
7. 样本条码标签固定在样本试管上，确认标签出现在试管阅读窗口中；
8. 仪器实验过程中不能进入仪器运动区域中，以免受到伤害；
9. 仪器实验结束后进行每日的正常保养。

全自动化学发光免疫分析仪的维护保养一般可分为日保养、周保养和月保养。

◆日保养◆

1. 仪器实验结束后，执行吸样针清洗程序；
2. 手工用酒精和纱布轻轻擦拭针的表面；
3. 手工用酒精和抹布擦拭设备台面；
4. 清理固体废料盒和废液桶。

◆周保养◆

1. 运行系统测试，进行光检检查；
2. 消毒并清洗吸样针、清洗槽；
3. 消毒并清洗溶液桶，清理洗针液水槽和过滤网。



◆月保养◆

1. 样本单元中各部件如电机、控制板卡及机械结构检查清洁维护；
2. 试剂单元中各部件如电机、控制板卡及机械结构检查清洁维护以及制冷温度检查；
3. 加样单元中泵、阀检查及维护，吸样针的维护保养；
4. 孵育单元中电机、控制板卡及机械结构检查清洁维护以及加热温度检查；
5. 分离单元中清洗针和运动机构的维护保养；
6. 测量单元中注液泵阀的维护保养；
7. 仪器内部管路的维护保养。

分析仪常见问题及处理对策

仪器在使用过程中，难免会出现一些问题，以致影响仪器正常运转。下面把使用仪器中遇到的问题及处理过程进行总结，以供借鉴。

1 仪器通信失败

仪器与电脑通过串口进行通信的，出现该情况的原因通常有①仪器未正常上电或者上电后立刻重启仪器；②电脑与仪器连接的串口线松动导致通信异常；③电脑串口连接不正确。针对上述情况逐一排查解决。

2 仪器样本针报警探测不到液面

出现该情况是由于仪器吸样针未接触到液面，导致报警。首先检查样本放置的位置是否正确。其次，再检查样本量是否过少导致报警。

3 试剂定标失败

导致试剂定标失败，需要确认以下问题①仪器是否正常灌注；②加样、清洗模块是否正常；③试剂、清洗液、底物液是否充足，是否在开封有效期内；④清洗液是否充足，是否以合格的纯化水配制；⑤试剂是否充分混匀。

参考文献

1. 邱瑾, 刘晓宇, 姚鑫. 化学发光免疫方法的研究进展. 农产品加工. 学刊, 2010, 6: 57-59
2. 李振甲, 应希堂, 马世俊. 化学发光免疫分析技术的研究现状与展望. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 95-96
3. 王栩, 林金明. 化学发光免疫分析技术新进展. 分析实验室, 2007, 26(6): 111-122

有奖征集 华医通讯推出后, 受到读者的广泛赞誉。为了更好的服务客户, 解决实际工作中面临的疑问, 欢迎大家踊跃来信, 分享自己的知识经验或工作中遇到的问题。我们将给予心动的回报!
投稿邮箱: hytx@hybiome.com

有奖征答 室间质评为什么要分组呢?

下期预告 甲状腺功能血清标志物

主编: 常立峻 副主编: 廉倩倩 编委: 徐海伟、张娜娜、何春燕、欧赛英、胥法伟、潘杨滨



苏州长光华生物医学工程有限公司

SUZHOU HYBIOME BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD

地址: 苏州高新区锦峰路8号4号楼

Address: Building 4, No. 8, Jinfeng Road, Suzhou 215163, China

电话: 400 928 0111 传真: 0512-6689 7061

Email: hybiome@hybiome.com www.hybiome.com

