

经验交流

化学发光分析法变异因素的控制

陈 文 勇

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

关键词 化学发光, 变异, 免疫分析

化学发光分析法是一种高灵敏度的分析测试方法, 但该方法易受多种因素干扰, 易使结果产生较大变异。针对这一问题, 我们采取了一系列措施, 在甾体激素的化学发光免疫测定中获得了满意的效果。

材 料 和 方 法

发光测定使用自制的发光标记物孕酮-ABEI, 及孕酮抗血清, 所用水均为超纯水, 仪器用 LKB-1250 发光光度计。于塑料试管中依次加入 200 μ l 被测液, 100 μ l 2 mol/L 氢氧化钠及 50 μ l 200 μ mol/L 氯化血红素, 混匀, 置入测定槽, 由蠕动泵泵入 100 μ l 0.1% 过氧化氢, 积分 10S。

发光免疫分析的步骤为: 100 μ l 标准品或血清抽提液与 100 μ l 抗体于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入 100 μ l 孕酮-ABEI 标记物, 置 4 $^{\circ}$ C 作用半小时, 然后加入 100 μ l 活性炭分离剂, 离心, 取上清液 200 μ l 作发光测定。免疫分析所用的各试剂均由分析缓冲液(含 0.5 g/L 明胶的 0.05 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液)配成。

结 果 与 讨 论

1. 环境因素 发光测定仪中的光电倍增管易受空气湿度的影响, 当相对湿度大时, 仪器零点发生较大幅度漂移, 光电倍增管处于不稳定状态, 易造成结果变异; 控制相对湿度为 50—65% 时, 仪器相对稳定, 零点漂移约为 ± 0.1 mV, 此时可进行测定。不同的仪器对湿度的敏感性不同, 所要求的相对湿度亦不同。若在机内对光电倍增管配以适当的保护装置, 则可减小因湿度引起的变异。与湿度相比, 温度的影响较小, 控制室温在 15—25 $^{\circ}$ C, 便可获得良好的效果。

2. 仪器进样装置 发光测定的最后一步是在暗室中注入过氧化氢引发发光反应, 如果采用手动进样, 例如用注射器, 则发光值会因进样时注入的过氧化氢与试管中的反应液混合不均匀而引起变异。LKB-1250

发光光度计因配备半自动蠕动泵进样, 减小了这种人为的变异。此外必须避免注入的过氧化氢和金属接触, 如不宜使用带有金属针头的注射器等。

3. 水质 水是影响发光测定的一个重要因素。比较石英双蒸水、叁蒸水和超纯水的本底, 发现随着水的离子浓度降低(电阻值增大), 发光测定的本底下降。超纯水含离子浓度极低, 不仅本底很低, 而且置玻璃瓶中 3 个月以上并不增高本底。新鲜的叁蒸水的本底接近超纯水, 但因离子浓度较超纯水大, 故不能久存于玻璃瓶中, 应当改用塑料瓶。双蒸水的本底明显地高于前两者, 用它配制的试剂, 使用期限较短。

4. 试剂 发光测定使用的试剂应是分析纯, 但更高的纯度, 如优级纯, 并不会明显地降低本底。但是, 试剂的存放时间及温度是影响结果变异的重要因素。各贮存液及分析缓冲液均应保存在 4 $^{\circ}$ C, 工作液仅限当日使用。几种贮存液的贮存参考时间为: 分析缓冲液、氯化血红素及氢氧化钠均为 1 个月; 孕酮-ABEI 标记物无水乙醇溶液 1 年多; 活性炭分离剂为 1 星期。过氧化氢工作液应在使用前配制, 尤其在浓度低、室温高时, 要尽快使用。上述各试剂如存放与使用不当, 将导致本底剧增, 并使结果产生难以预测的变化。

5. 缓冲液添加剂 除了缓冲液的 pH 外, 其中的蛋白质对发光测定也有明显影响。某些激素的标记物, 如孕酮-ABEI, 易吸附在容器壁, 使得发光测定值持续下降, 导致结果变异很大。若在缓冲液中加入蛋白质, 如牛血清白蛋白或明胶, 可以有效地抑制这种吸附, 清除变异。

6. 发光测定变异对发光免疫分析的影响 在发光测定的线性范围内, 发光值愈小, 变异愈大(图 1)。发光测定是发光免疫分析的最后一步, 它的变异是整个免疫分析结果变异的重要组成部分。为减小发光免疫分析结果的变异, 必须控制发光测定的变异。通常要求这一步的变异系数小于 5%, 从图中可知与其对应的发光值约为 10 mV, 也就是发光免疫分析的标准曲

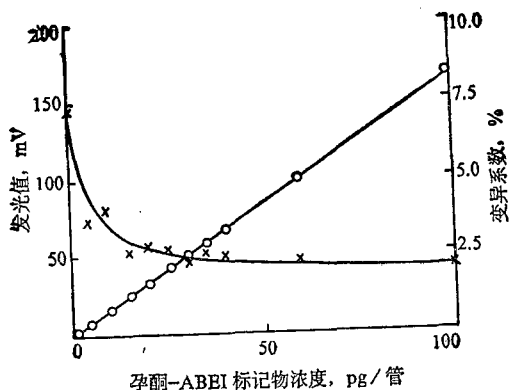


图1 发光测定的线性图(O—O)及其相应的变异系数曲线(X—X)

图中各点均为20个平行管统计结果

线的最高剂量管的发光值不应低于10mV,这样才能保证整条标准曲线的发光测定误差不超过5%。

7. 发光免疫分析的结果变异 除了第6条中的发光测定变异外,还有许多因素影响发光免疫分析的结果。

(1) 血清抽提: 选用不同极性的有机溶剂抽提血清,因抽提出的组分不同,对发光测定将产生不同程度的干扰。如采用无水乙醚抽提血清孕酮时,干扰大,结果很难与放免测定结果对比;而改用正己烷抽提时,干扰小,结果与放免对比良好。

(2) 抗原抗体的结合时间: 用分步竞争法测定孕酮,有些文献[1]报道将孕酮标准品或标本与抗血清在37℃结合15min,再在4℃放置15min,然后加入发光标记物竞争反应。我们的实验表明,这种方法虽然快,但结果的变异偏高,不易控制。原因是孕酮标准品或标本与抗血清未达到饱和结合,管与管间,批与批间容易产生不同的抗原抗体结合率,导致结果变异增大。若将标准品或标本与抗血清的结合时间适当延长,以达到饱和结合,或者先过夜孵育,再进行竞争反应,则

结果的变异减小。

(3) 活性炭吸附时间: 加入活性炭分离游离的标记物,活性炭作用时间愈长,对标记物的吸附越多,甚至竞争已和抗体结合的标记物。为减小批内变异,必须严格控制其作用时间的一致性。通常要求在能准确加样的条件下,以最快的速度,如每min70管,加完活性炭。如果加样时间太长,将导致活性炭作用时间差别太大,增加结果的变异。

(4) 被测液的取样方法: 经活性炭分离后,吸取上清液作发光测定,可用微量加样器定量吸取或采用倾倒法将上清液倒入另一管中。经测定,倾倒法的变异系数比定量吸取法增加约1%。因此,在大批量临床标本的测定时,可采用倾倒法,而进行实验研究时可定量吸取。

(5) 加热的影响: 在进行发光测定前,经固相法分离的被测液中加入氢氧化钠后,于60℃加热一定时间,以促使标记物释放,提高发光强度。在本文的方法中,加热也使所有测定管的发光强度增加至原来的1.2—1.5倍,但同时也使非特异结合管的信号提高到原来的3.5—4倍;另外,加热并不能减小平行管的变异值;因此,发光测定前加热并非必要。

(6) 抗血清的性能: 具有桥效应^[2]的抗血清将导致测定的标准曲线最高剂量管的B/B₀值上升,使标准曲线变得平坦,从而增加测定结果的变异。若能使用单克隆抗体或者采用不具有桥效应的多克隆抗体,则结果的变异将会降低。

参 考 文 献

- 1 Pazzagli M, Kim J B, Messeri G *et al.* *Clin Chim Acta*, 1981; 115: 287
 - 2 Corrie J E T. In: Hunter W M and Corrie J E T ed. *Immunoassay for Clinical Chemistry*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1983: 353
- [本文于1990年8月13日收到,11月20日修回]

(上接第479页)

参 考 文 献

- 1 SKálhegg B A. *Eur J Biochem*, 1974; 12: 1075
- 2 Mashige F *et al.* *Clin Chem*, 1981; 27: 1352.
- 3 兒玉隆成 他. 臨床検査機器・試薬, 1987; 10: 335

- 4 田中直見 他. 肝臓, 1981; 22: 785
- 5 五味邦英. 新潟県臨床衛生検査技師會誌, 1986; 26(2): 32
- 6 Mendenhall. *Clin Gastroenterol*. 1981; 10: 417
- 7 Joelsson B *et al.* *Clin Chim Acta*, 1984; 136: 203