

酶联免疫吸附试验中影响全自动加样系统加样准确性的因素分析*

毕聪玺, 梁晓华[△], 臧亮, 邓雪莲, 王琳 (辽宁省大连市血液中心 116001)

【摘要】目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)中使用不同容量加样针和分液高度,对全自动加样系统加样准确度和精密度的影响。**方法** 选取 10 μL 和 100 μL 两种加样量,每种加样量分 4 个小组进行实验,分别使用不同容量(400 μL 和 800 μL)的加样针和不同分液高度(浸润和未浸润)加样,计算每组的最终加样量、均值相对误差(E)和变异系数(CV),与实际工作标准进行比较。**结果** 10 μL 加样 E 在 $-37.9\% \sim -2.8\%$, CV 在 $3.29\% \sim 14.49\%$; 100 μL 加样 E 在 $-1.9\% \sim 0.8\%$, CV 在 $0.44\% \sim 0.95\%$ 。**结论** 不同容量加样针和分液高度对 10 μL 加样影响较为明显,对 100 μL 加样影响较小,在使用全自动加样系统进行 ELISA 时,应当选择适当容量的加样针和分液高度。

【关键词】 分液高度; 准确度; 精密度; 挂滴现象

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)02-0149-02

Analysis on factors affecting sampling accuracy of automatic sampling system in ELISA* BI Cong-xi, LIANG Xiao-hua[△], ZANG Liang, DENG Xue-lian, WANG Lin (Dalian Blood Center, Dalian, Liaoning 116001, China)

【Abstract】Objective To investigate the influence of different volumes of sampling needle and liquid height on the accuracy and precision of the full-automatic sampling system in ELISA tests. **Methods** The two sample amounts of 10 μL and 100 μL were selected and the each sample amount was divided into 4 groups for conducting the experiment. The different volumes (400 μL and 800 μL) of sampling needle and different liquid heights (infiltration and non-infiltration) were used to conduct sampling. The final sampling amount, mean relative error (E) and coefficient of variation (CV) were calculated in each group. Then the results were compared with the actual working standard. **Results** E of sampling 10 μL was $-37.9\% \sim -2.8\%$ and CV was $3.29\% \sim 14.49\%$; E of 100 μL was $-1.9\% \sim 0.8\%$, CV was $0.44\% \sim 0.95\%$, respectively. **Conclusion** The different volumes of sampling needle and liquid height can affect the sampling amount of 10 μL obviously, but less affect the sampling amount of 100 μL . So the appropriate volume of sampling needle and liquid height should be selected to conduct the ELISA experiment when using the full-automatic sampling device.

【Key words】 sampling liquid height; accuracy; precision; hanging drop phenomenon

在对大批量标本进行微量加样时,传统的手工加样模式就显现出很多弊端,比如需要耗费过多人工、过多加样时间、加样手法不同导致加样量产生偏差、加样时可能孔位加错等^[1]。全自动酶免系统整合的加样器具有高通量、加样准确、人为干预小等优点,对于需要同时进行大批量微量加样的实验室来说,利用全自动加样器进行加样就显得尤为必要,近年来全自动加样器已在国内临床检验科和采供血系统广泛使用^[2-3]。实际工作中选用不同容量的一次性加样针及分液高度等参数都会对全自动加样器的加样准确性以及后续实验产生影响^[4-5],经过查阅资料发现此类有关报道较少。作者结合实验室日常工作,设计实验来探讨以上两个参数对全自动加样器加样准确度和精密度的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 设备与耗材 分析天平(德国沙多利斯),全自动酶免一体机(ADC ELISA 500 烟台艾德康,加样器单元为 4 通道),洁净的酶免微孔反应板 8 块,室温放置隔夜纯水 200 mL,洁净试管 16 支(加入适量纯水作为模拟标本),容量为 400 μL 和 800 μL 的全自动酶免一体机配套使用一次性加样针头若干。

1.2 方法 根据加样量不同将实验分为 10 μL 和 100 μL 两大组,每组按加样参数不同分 A、B、C、D 4 个小组(共 8 组)。

A 组:使用 400 μL 容量加样针,分样时针尖浸没于微孔内预先加入的模拟稀释液(浸润);B 组:使用 400 μL 容量加样针,分样时针尖高于微孔内模拟稀释液面(未浸润);C 组:使用 800 μL 容量加样针,其他条件同 A 组;D 组:使用 800 μL 容量加样针,其他条件同 B 组。实验前将预先准备好的 16 个模拟标本放入标本区,在全自动酶免一体机控制软件中将加样器的 3 个加样通道锁定,只留取 1 个通道进行加样。根据每组实验标准编辑加样程序,设定相应的加样量和分液高度等参数、选用对应容量的加样针。将微孔板每个微孔掰下,加入 100 μL 模拟稀释液后于分析天平称重,记录结果,并将其放回微板对应位置,每板(即每小组)标本数为 16,单组称量结束后将微板放入仪器加样平台。运行加样程序,结束后立即称取每个微孔的重量,记录结果。将实验前后对应孔位 2 次称量数据相减即为每孔加样重量,根据当时室温查得纯水密度后换算每孔加样量(体积)。

1.3 统计学处理 利用 SPSS17.0 统计软件计算每组的最终加样量 $\bar{x} \pm s$ 、均值相对误差(E)和变异系数(CV),与实际工作标准进行比较。

2 结果

在进行 10 μL 加样时,只有 A 组满足实际工作要求,在进

* 基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心专项课题(28-8-3)。

作者简介:毕聪玺,男,主管检验技师,本科,主要从事输血安全研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xixi19820123@163.com。

行 100 μL 加样时, 各组均满足实际工作要求。见表 1。

表 1 实验各组加样量计算结果($n=16$)

组别	10 μL			100 μL		
	$\bar{x}\pm s$	$E(\%)$	$CV(\%)$	$\bar{x}\pm s$	$E(\%)$	$CV(\%)$
A 组	9.72 $\pm$ 0.32	-2.8	3.29	100.8 $\pm$ 0.50	0.8	0.50
B 组	8.95 $\pm$ 0.76	-10.5	8.50	98.9 $\pm$ 0.59	-1.1	0.60
C 组	8.76 $\pm$ 0.29	-12.4	3.31	98.8 $\pm$ 0.43	-1.2	0.44
D 组	6.21 $\pm$ 0.90	-37.9	14.49	98.1 $\pm$ 0.93	-1.9	0.95

注: 实际工作 10 μL 加样应满足 E 在 $\pm 10\%$, $CV \leq 3.5\%$; 100 μL 加样应满足 E 在 $\pm 3\%$, $CV \leq 1.0\%$ 。

3 讨 论

实际工作中, 微量加样的准确性直接影响生物、化学等实验结果^[6-9], 而且加样量越小准确性越难以控制。如采用 ELISA 进行丙型肝炎抗体检测时, 微孔先加入 100 μL 稀释液, 再加入 10 μL 标本进行实验, 此时 10 μL 加样准确性比 100 μL 更难控制。本实验在进行 10 μL 加样时, 只有 A 组数据满足实际工作标准要求, 分析其原因, A 和 B 组比较, B 组采用未浸润分样, 由于液体表面张力的存在, 分样时悬空的加样针尖会产生 1 mm 左右的液滴, 即挂滴现象, 由于血浆类标本的黏度存在差异^[10], 表面张力即存在差异, 液滴大小不一, 实验结果显示 E 为 -10.5%, 即平均加样量只有 8.95 μL , 且 CV 为 8.50%, 加样准确性无法达标。A 组采用浸润分样, 加样针尖与稀释液液面接触, 分样时产生的液滴随即溶入稀释液中, 可以有效避免挂滴现象的产生, E 为 -2.8%, CV 为 3.29%, 准确度和精密度均达到标准。由以上两组实验可见, 消除挂滴现象对 10 μL 加样的准确性起着至关重要的作用, 同时也表明浸润加样可以有效消除挂滴现象。本实验在浸润分样时针尖会有极微量稀释液残留(稀释液残留量不会对后续分样产生影响), 实际工作中可以进一步调节和设置分样高度, 使针尖高度距稀释液液面小于产生液滴的直径, 分样时产生的液滴也可以随即溶入稀释液内, 既可以消除挂滴现象, 又可以防止加样针尖稀释液残留。A 和 C 组比较, 将样品吸入加样针后, 加样器活塞与样品之间会有一段空气存在(空腔气体), 当分样时, 活塞并不能直接挤压需要分配的液体, 而是挤压二者之间的空腔气体, 再将压力传导给前部的样品。空腔气体因黏性样品的阻力和活塞向外的压力共同作用产生微小的形变, 即体积缩小, 活塞挤压的进程不能完全传递给样品, 导致分液体积有所下降, 空腔体积越大(大容量加样针)产生形变越大, 对分样准确性影响也越大。如实验结果所示, 10 μL 加样时 C 组加样针容量较大, E 也越大为 -12.4%, 即平均加样量只有 8.76 μL , 已经不能满足准确性要求。D 组作为 B 和 C 组不利条件的叠加, 加样的准确性变得更低, 完全不能满足实际工作要求。在

进行 100 μL 加样时, 各组加样数据均满足实际工作标准要求。即全自动酶免一体机如果使用以上两种不同容量加样针进行加样, 以及加样时产生的微量挂滴现象对加样准确性的影响均处在允许范围内, 因此进行 100 μL 加样时, 选择实验中的 4 种参数组合均可。

综上所述, 使用全自动加样器进行微量加样时, 应当根据加样量的不同来选择适当的参数和方法。进行 10 μL 加样时, 应设计方法(如采用浸润加样)尽量减少分液时挂滴现象的产生, 同时选用容量小的加样针以减小空腔气体, 确保分样准确; 对于 100 μL 加样, 虽然以上参数对加样准确性有一定影响, 但在允许范围内, 可以根据实际情况选择参数。而对于一份标本需要同时进行多项酶联免疫吸附试验(不同体积)加样时, 可以从加样准确性、实验耗时、耗材使用量等各方面综合考虑, 设计更适合的加样参数和方法, 只有这样才会使加样的准确性得到提高, 从而降低整个酶联免疫吸附试验的系统误差, 为实际工作提供更为准确的实验数据。

参考文献

[1] 徐永良. STAR 全自动加样仪双向通讯功能的应用[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 204.

[2] 马秀敏, 杨忠思, 张永征. RSP 全自动加样器维护保养的体会[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(5): 360.

[3] 张辽明, 周海容, 张永昌, 等. 使用一次性加样针控制血液加样中交叉污染的探讨[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(4): 289-290.

[4] 赵飞雪. Microlab FAME 全自动酶免分析仪检测的影响因素及质量控制[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(13): 1090-1091.

[5] 朱美芹, 王莉莉. Tecan Freedom Evolyzer-2200 全自动酶免分析仪应用评价[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(10): 1677-1678.

[6] 胡良勇, 汪朝红. 数字微量加样器检测校准方法的研究[J]. 中国医疗设备, 2011, 26(3): 11-12.

[7] 吴军, 常见. 微量加样器的正确使用与校准[J]. 中华医学研究杂志, 2006, 6(10): 1160.

[8] 叶贤林, 杨立新, 周一炎. 应用甲基橙比色法测试加样器的精度[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(6): 406-407.

[9] 费荣, 张立波, 马贵明. 环境温度变化对全自动加样器影响分析[J]. 临床血液学杂志, 2013, 26(6): 410-411.

[10] 席文华, 李泽文, 刘汝胜. 高黏样品影响全自动生化分析仪加样量[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(5): 500-501.

(收稿日期: 2014-05-22 修回日期: 2014-09-30)

(上接第 148 页)

[5] 韩晓蓉. 乙肝五项指标测定结果与 HBV DNA 的关系探讨[J]. 中外医疗, 2012, 32(17): 40-42.

[6] Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. Comparison of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test versus the Cobas Amplicor HBV monitor for HBV-DNA detection and quantification during antiviral therapy[J]. New Microbiol, 2008, 31(1): 27-35.

[7] 荆成宝, 禹梅, 刘婕. 2 种 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测试剂的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 206-207.

[8] 陈小颖, 赵荣平, 应春妹. 实时荧光定量 PCR 检测低含量 HBV-DNA 的分析[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 85-87.

[9] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy [J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl): S174-S184.

[10] 蔡惠兴, 吴英, 梁鹏. 乙肝血清标志物与 HBV-DNA 定量检测结果分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(2): 227-229.

(收稿日期: 2014-05-07 修回日期: 2014-08-28)