附件2

化学发光法主要生产工艺

一、原理

化学发光免疫分析（chemiluminescence immunoassay，CLIA），是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，用于各种抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。化学发光免疫分析包含两个部分，即免疫反应系统和化学发光分析系统。免疫反应系统是将发光物质（在反应剂激发下生成激发态中间体）直接标记在抗原或抗体上，或酶作用于发光底物。化学发光分析系统是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化，形成一个激发态的中间体，当这种激发态中间体回到稳定的基态时，同时发射出光子，利用发光信号测量仪器测量光量子产额，该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比，由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

二、化学发光免疫分析的类型

（一）化学发光标记免疫分析

化学发光标记免疫分析又称化学发光免疫分析（CLIA），是用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用于标记的化学发光物质有吖啶酯类化合物（AE）。

（二）化学发光酶免疫分析

从标记免疫分析角度，化学发光酶免疫分析（CLEIA），应属酶免疫分析，只是酶反应的底物是发光剂，操作步骤与酶免分析完全相同：以酶标记生物活性物质（如酶标记的抗原或抗体）进行免疫反应，免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物，在信号试剂作用下发光，用发光仪进行发光测定。目前常用的标记酶为辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（ALP），它们有各自的发光底物。

（三）时间分辨荧光免疫分析（TRFIA）

是用三价稀土离子及其螯合剂作为示踪物，如铕（Eu3+）、铽（Te3+）及钐（Sm3+）、镝（De3+）等代替传统的荧光物质、放射性同位素、酶和化学发光物质，来标记抗体、抗原、多肽、激素、核酸探针或生物活性细胞，待反应体系发生后，用时间分辨荧光仪测定最后产物中的荧光强度，根据荧光强度和相对荧光强度比值，判断反应体系中分析物的浓度，达到定量分析的目的。

（四）电化学发光免疫分析（ECLIA）

是电化学发光（ECL）和免疫测定相结合的产物，是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，包括了电化学和化学发光二个过程。ECL 反应底物有两种：三氯联吡啶钌[Ru（bpy）3]2+、络合物三丙胺（TPA）。

三、主要生产工艺（以微孔板载体的化学发光酶免疫分析为例进行描述）

（一）固相载体的制备

1．包被板的准备

准备经检验合格的包被板，记录批号、数目、状态标识。

常规质控项目：尺寸，外观，包装。

2．包被液的配制

配制包被缓冲液，加入包被的抗体或抗原至工作浓度，混合均匀，即成所需的包被液，工作浓度的包被液应在规定时间内使用。

常规质控项目：包被缓冲液配方，pH值。

3．包被板的包被

包被液按工艺要求加入包被板。记录所包被的包被板数量。

常规质控项目：包被体积，温度，时间，过程监控。

关键设备：包被机、天平、加样器。

4．洗板工作液的配制（按各单位工艺要求，可以不洗板）

按配方配制洗板工作液。

常规质控项目：洗板工作液配方，pH值。

5．封闭液的配制

按配方配制封闭液。

常规质控项目：封闭液配方，pH值。

6．洗板和封闭

包被完成后，抽去孔内包被液，用洗板工作液洗板后（按各单位工艺要求，可以不洗板），加入封闭液。

常规质控项目：封闭体积，温度，时间，过程监控。

关键设备：包被机、洗板机、天平、加样器。

7．抽干

封闭后的反应板，抽干孔内液体。

常规质控项目：过程监控。

8．干燥

反应板应按工艺的要求进行干燥。

常规质控项目：温度，湿度，时间，过程监控等。

9．密封包装

将干燥后的反应板用铝箔袋密封包装，内放干燥剂（按各单位工艺要求，可以不放）。

常规质控项目：密封性能，标识及效期等。

关键设备：包装机。

10．反应板（半成品）检验

对装袋密封后的反应板进行抽样检验。

常规质控项目：外观、板内变异、板间变异等。

（二）滴配过程

1．酶结合物（也称酶标记物）的制备（根据各产品实际情况，该步骤可不进行）

采用常规过碘酸钠——乙二醇法将相关的抗体（或抗原）标记辣根过氧化物酶（或其他酶），酶标记后的抗体（或抗原）应加入适当的保护剂保存于低温。

常规质控项目：标记方法，过程控制。

2．酶结合物的鉴定

（1）功能性实验

将酶结合物用酶稀释液稀释后，用于产品的滴配，其结果应符合相关试剂盒的质量标准。

（2）稳定性

将酶结合物用酶稀释液稀释，进行2～8℃，及热稳定性实验，滴配结果应符合相关试剂盒的质量标准。

3．酶结合物稀释液

按酶结合物稀释液的配方配制，存放在2～8℃保存，并于规定时间内使用。

常规质控项目：酶结合物稀释液配方，pH值。

4．酶结合物工作浓度的滴配

取酶结合物，用酶结合物稀释液稀释到不同的浓度，用已制备好的反应板进行滴配。测定系列标准品及相应的质控品，确定使体系达到最优的酶结合物工作浓度。

5．酶结合物工作液配制

将所需量酶结合物和酶结合物稀释液按滴配浓度混合均匀。

常规质控项目：分装前检验，用配套的反应板进行检验，外观、灵敏度、质控品测定值、定量产品应作校准品线性检测。

6．酶结合物工作液的分装

按工艺要求分装酶结合物工作液。

常规质控项目：分装前确认试剂名称、批号、数量，分装量，封装后密封性。

7．酶结合物工作液（半成品）检验

对分装后的酶结合物工作液进行抽样检验，外观、分装量、灵敏度、校准品剂量-反应曲线线性、质控品测定值。

（三）校准品、阴/阳性对照或质控品的制备

1．稀释液

按稀释液的配方配制，存放在2～8℃或-20℃以下保存，并于有效期内使用。

常规质控项目：稀释液配方，pH值。

2．校准品、阴/阳性对照的配制

校准品、阴/阳性对照品的配制应具有量值溯源性，可参照国家标准品、WHO标准品或其他级别的标准物质进行配制。

常规质控项目：分装前检验，准确性、剂量－反应曲线线性（定量产品）、质控品测定值。

3．校准品、阴/阳性对照或质控品的分装

按工艺要求分装校准品、阴/阳性对照或质控品。

常规质控项目：分装前确认试剂名称、批号、数量，分装量。

4．校准品、阴/阳性对照或质控品（半成品）检验

对分装后的校准品、阴/阳性对照或质控品进行抽样检验，外观、分装量、准确性、剂量－反应曲线线性（定量产品）、质控品测定值。

（四）化学发光底物的制备

1．底物缓冲液

按底物缓冲液的配方配制，存放在2～8℃保存，并于有效期内使用。

常规质控项目：底物缓冲液配方，pH值。

2．化学发光底物（氧化剂和发光剂）的配制

分别按氧化剂和发光剂的配方在底物缓冲液中加入相应的氧化剂和发光剂。

常规质控项目：氧化剂和发光剂配方。

常规质控项目：分装前检验，本底、发光强度。

3．化学发光底物（氧化剂和发光剂）的分装

按工艺要求分装化学发光底物（氧化剂和发光剂）。

常规质控项目：分装前确认试剂名称、批号、数量，分装量，封装后密封性。

4．化学发光底物（半成品）检验

对分装后的化学发光底物进行抽样检验，外观、分装量、本底、灵敏度、发光强度。

（五）分装、目检和贴签

分装量用减重称量法进行测量，把质量换算成体积后进行分装量的控制。目检是目测检查各组分的色泽、分装量以及是否混浊、有杂质等。

（六）包装

根据试剂盒包装SOP要求及说明书的要求，以流水线操作形式进行包装。包装时应严格检查品名、批号、装量，认真核对各物料数量，并在关盒前进行复核。