

丁香园免疫学技术讨论版

胶体金文献翻译活动论文集

第一辑

(仅供内部交流, 请勿外传)

二〇〇七年九月二十日

免疫金文献翻译活动参译人员名单

策划	waynepionnet	lzsgxl	
翻译	20021108	backtoheart	fengzhizi33
	jevans_lee	joni	keling2006
	liu903	liu_wei	lone_king
	lurenquan	phy128	Rainlylily
	rapidtest	ruimufang	Tombacon
	几凡木木		
校对	waynepionnet	lzsgxl	Tombacon
	Rapidtest	lone_king	
编辑	quatrefoil	dayu1979	byd123

声明：本论文集仅供丁香园战友内部交流学习使用，虽然我们对译文作了反复校对，但由于译者水平有限，译文中疏漏、错误在所难免，因此，对有争议的地方以原文为准，也欢迎大家在论坛中讨论交流您的意见。

目 录

综述篇

1、胶体金在快速检测中的地位	1
----------------------	---

检测技术开发篇

2、胶体金在快速检测中当前及未来的应用	3
---------------------------	---

加工工艺

3、开发灵敏度高、重复性好的侧向层析诊断产品	
第一部分：对于老问题的新方法	21
4、开发灵敏度高、重复性好的侧向层析诊断产品	
第二部分：新方法带来的新挑战	29
5、核酸膜免疫	
第三部分：共价连接及生产	38
6、胶粘剂迁移对层析检测的影响	44
7、基于蛋白质原料的体外诊断产品的稳定性问题	54
8、湿气处理	62
9、硝酸纤维素膜吸附蛋白的常见问题处理	
第一部分：基本原理	69

法规与标准篇

10、出口管理条例：体外诊断产品的相关问题	81
-----------------------------	----

综述篇

胶体金在快速检测中的地位

John Chandler, Tracey Gurmin, and Nicola Robinson 文

rainylily 战友 译

（声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原文作者。）

优良的稳定性、灵敏度、精确度及制造过程中的可重复性，使得胶体金适合基于膜的检测技术。

快速膜检测需求广泛，可应用于诸多领域（见下表）。随着灵敏度和特异性的提升，大量的潜在应用可能是作为替代昂贵仪器检测方法的低成本选择。

快速检测的应用	
临床医用	
● 变态反应	● 应激反应
● 心梗标志物	● 毒理学
● 退行性病变	● 肿瘤标记
● 药物滥用	农业应用
● 生殖	● 食品安全
● 法医	● 植物及农作物疾病
● 免疫分型	环境应用
● 感染性疾病	● 生物学污染
● 血清学试验	● 环境污染
● 性传播疾病	兽医学应用
	（与多数人类临床应用领域相似）

这篇文章重点讲述此种检测方法中极为重要的组成部分——检测标记物的生产制造对整个检测系统的性能及可靠性的影响；尤其是强调了胶体金标记物在此检测功能中的优势。

什么是快速检测？

快速检测是一种廉价的、一次性的、基于膜的检测方法，它能提供分析物存在于液体样品的视觉证据。这种检测可以以独立的试纸条，也可以以装在塑料盒中的形式进行。总的来说，做此项检测至少需要 200u1 的液体标本，可在 2 至 5

分钟内完成。在临床检测中，样品可能有尿、血液、血清、唾液或其他体液。

在非临床检测中，样本可能是由土壤、粉尘、植物或者食品制备的微量溶液，它们同样可以直接应用膜试纸条检测。这种检测方法无需仪器操作，可应用于临床、实验室、室外或者家庭——通常为无操作经验人员使用。

快速检测法有两种形式——层析和渗滤。层析是最普通的形式因为其制造及使用都比较简易，这两种形式所涉及的原理虽然相同，但我们这里将要讨论的是层析检测法。

一个快速检测的底层一般是硝酸纤维素膜，在它上面固定了检测蛋白，通常是抗体或抗原（图 1）。

连接着膜的是包含有干燥金标的金标垫（通常是玻璃



烧瓶中的金标液
Hugh Burden 摄
courtesy BB
International

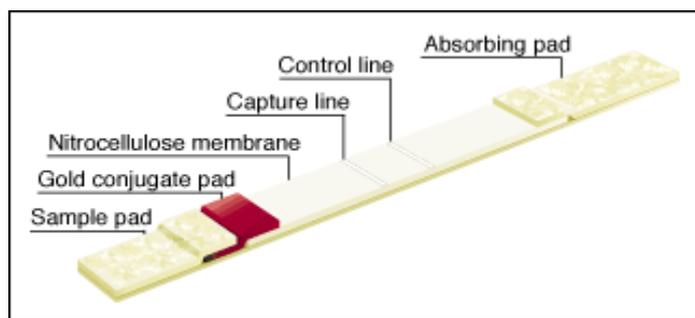


图 1 侧向层析快速检测试纸条的结构图

纤维)。对于目前大多数可做的检测项目，这种结合垫含有吸附了针对待检分析品的特异性抗体或抗原的金粒子。样品垫通常为纸质，附着着结合垫。当使用样品垫时，液体样品通过毛细扩散作用穿移过结合垫，再水化金交联物，使待分析样品与交联物相互作用。然后金交联物与待分析样品复合物转移至膜条带上再移向蛋白结合物，复合物在此处被固定后以一条细细的红色的形式产生明显的信号。第二条线是控制线，由余下的金交联物形成于膜上，表明测试完成。

顾名思义，快速检测应在短时间内提供结果，准确的说是在几分钟内。这种检测法必须方便、精确、可靠、廉价、是一次性的而且操作简易的。它们也必须容易和清楚的说明书，甚至是没有经验的使用者也能操作。从生产厂家的观点来看，这种快速检测将会带来巨大的附加值，且容易向世界各地的使用者推广，而无论使用者其有无此项检测的经验（见文后附言）。

快速检测功能广泛。改变抗体或者对条带的化学配方作微小的变动，同样的设计应能用于多种检测。

为何使用金标记？

早期的快速检测使用有色胶乳形成可视信号，目前的某些检测仍使用此手段。过去和现在，乳胶法一直是凝集反应主要的标记方法，这是因为它在结合成分的存在下易于凝集。对于快速检测而言，交联物的稳定性是避免假阳性的关键，而易于凝集可能就是其产生假阳性的主要问题。

因为具有更好的潜在稳定性，20 世纪 80 年代末，金标记被引入膜快速检测中。在适当的生产条件下，任何被精确大小的金颗粒都可以被重现性制造出来。不同的大小可用于不同的用途。其优良的稳定性、敏感性、精确性及可重复生产性等特点使得金适合于在快速检测中的应用。金本性属惰性元素，被适当加工可形成完整的球形颗粒。当正确连接时，蛋白质能牢固地结合在金颗粒表面，无论是液态或固态都能保持长久的稳定性。而且，若是在制造过程中蛋白被精确固定，其与金交联物的非特异性结合可被减至零。

标记抗体和抗原的不同标记物优缺点的比较如表 1 所示：

表 1. 快速检测中常用标记物的特征比较

特征	金	银	碳	乳胶	燃料	酶
重复性	***	*	***	***	***	***
放大性	***	*	**	**	**	***
一步	***	***	**	**	**	*
敏感性	*	—	*	***	***	**
多重分析检测	***	***	*	*	*	**
稳定性	***	***	**	*	*	*
结果清晰	***	***	***	***	***	—
易于制备	***	***	**	**	**	**
使用简单	***	***	*	**	*	*
适应性	**	**	**	**	**	***
低成本	***	***	***	***	***	**
* 应用受限						
**适于部分检测						
***效果显著适于大部分检测						

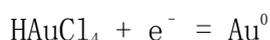
胶体金的制造

当胶体金被大量生产时，为保证批间重复性及避免不稳定性，成熟的工艺方法是必须的。为获得最终稳定敏感的产品，生产 100 升高质量的胶体金就需要极度的细心与仔细以获得最终稳定及高灵敏度的产品。在生产过程中的每一步都需要使用电镜检查来进行质量控制。

在过去的 20 年里，生产商们引进了各种不同的方法来合成胶体金，目的就是为获得直径一定且均一的单分散性的胶体。尽管所有的生产方法都是依赖于还原 HAuCl_4 来形成金原子，但其物理条件还是有相当大的差异，如反应物添加的次序、还原剂使用的多寡、以及最终生产出的胶体的质量（大小、形状、变异系数等）。

大体来说，所有的生产方法都是使用还原剂提供电子给溶液中带正电荷的金离子而产生金原子，如下所示：

氯金酸 + 还原剂 = 胶体金



通常使用的还原剂包括柠檬酸钠、黄磷、硼氢化钠、硫氰酸钠。图 2 所示为不同离子水平还原过程。

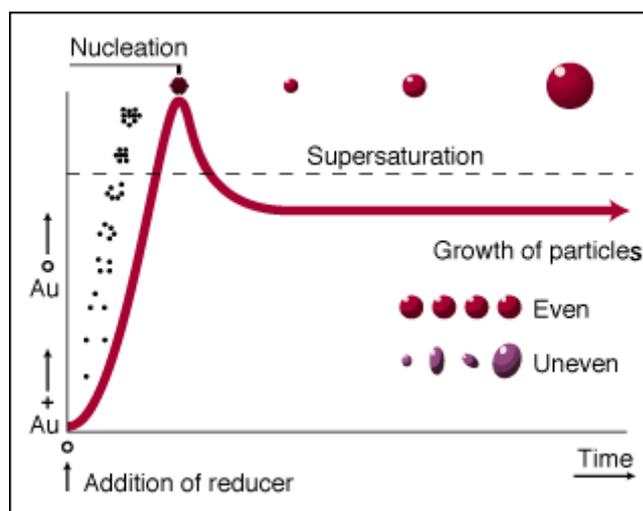


图 2 金离子还原形成金颗粒

在加入还原剂之前，溶液中所含为 100%金离子。曲线的纵坐标代表在加入还原剂时金离子转变为金原子的进程。加入还原剂之后，溶液中金原子的含量立即出现急剧的上升，直到其达到过饱和。紧接着在一个被称作核化的过程中发生凝集作用，在核化位点形成由 11 个金原子构成的中央的二十面体金核心。核化位点的形成是为了减少溶液中金原子的过度饱和，其形成极其迅速。此过程一旦完成，溶液中剩余的金原子在递减的能量梯度下继续结合核化位点直到所有的原子从溶液中移除。

最初形成的核数目决定了最终将有多少颗粒形成于溶液中，而这个数目又反过来取决于所加入的还原剂的量。还原剂越多产生的晶核越多从而产生的金颗粒也越多。显而易见，在一个含既定数目氯化金的溶液中，形成的核化位点的数目越多，最终形成的每个金颗粒的尺寸就越小。因而微粒的大小可通过所加入的还原剂的量来精细调控。如果生产条件经过优化，所有的核化位点都可以在瞬间同时发生，使得所形成的金颗粒大小都完全一致（即单分散型）。要做到这一点是很困难的。大多数的生产方法都无法使所有金离子于瞬间同时得到还原并形成核化位点，从而造成核化过程的不均一及多分散性胶体的产生，最终导致产品的重

复性低下、交联物不稳定。

每个胶体金粒周围都包绕着来源于溶液中残留阴离子的负电荷层的金颗粒悬液构成（见图 3），这种被称作 zeta 电位的电子层使得金颗粒之间相互排斥并在悬浮液中任意分布。zeta 电位可以通过改变周围溶液中离子的浓度而被压缩或扩张。

高质量的胶体金和定制加工完好的交联物方便用于商业用途，通过从信誉度较好的供应商购买这些成分而非试图自己加工大批量的金不仅可以节省生产厂家的时间还可以减少他们的制作风险。

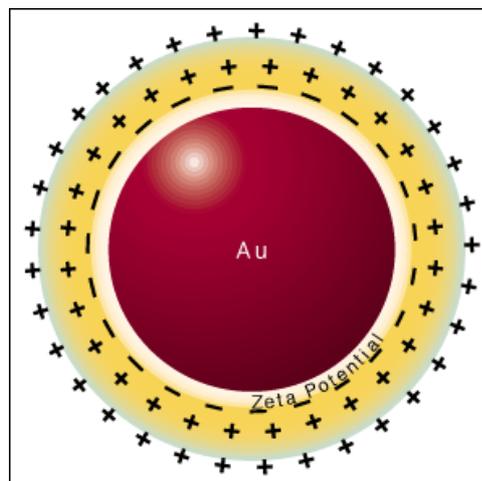


图 3 被包绕双电子层的胶体金颗粒

好胶体金和不好的胶体金

胶体金及交联物的生产制造表面看似简易，若掉以轻心则可导致生产出劣质、性能差及重现性极差的产品进而影响其商业用途。将这样的产品应用于快速检测中可能导致结果的低稳定性、低敏感性及低特异性。为防止这样的结果出现，应使用透射电子显微镜（TEM）来评价胶体金的超细微结构。这种检测能使生产者对照标准比较胶体的直径，得到颗粒球状、颗粒不规则性和颗粒直径的变化。

如果还原过程中核化作用及形成速度没有得到很好控制，粒子的形成就会不均一。（见图 4），所见的粒子可能具有不同的大小及形状（如椭圆形、三角形、长方形、菱形等等）。这样的粒子在与蛋白的结合过程中将无法被均匀包被，也不能在溶液中均匀分布。最终将影响产品的颜色、敏感性、特异性及稳定性。仅

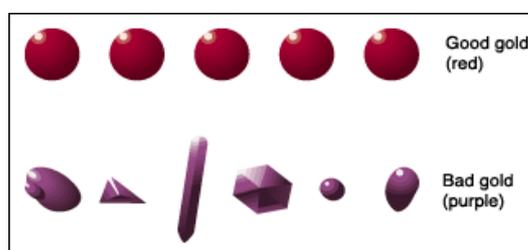


图 4 优质胶体金与劣质（不稳定）胶体金

仅 5% 形状不均一的粒子都会影响测试的结果，使其完全不具重现性。与代表着制作精良的 40nm 的单分散性胶体粒子的樱桃红色相比，由“劣质金”所形成的信号常可见到淡蓝色或紫色。虽然在检测系统中白色背景膜上较暗的颜色更容易

辨别，但暗示着潜在的不稳定性，而这种不稳定性更容易造成错误的结果。更严重的是，粒子形状及尺寸的不均一会导致蛋白包被的不均一，这样会导致交联

物长时间的积聚与凝集，储存于溶液中的交联物可能于几天甚至几个小时内就出现这样的变化。

即使立即将交联物干燥于固相基质上也无法完全克服这个问题，在干燥过程中，由于粒子形状而未稳定结合的表面蛋白很容易分离，造成假阳性及高背景。

快速检测操作过程中一个最常见的问题就是金交联物不能以适当的速度及完整形式从玻璃纤维结合垫上释放，这个问题常常是因为未完全包被的金颗粒直接暴露在玻璃纤维材料上而不能释放。这必然意味着表面蛋白或者永久地附着在纤维基质上或离开金颗粒自由飘浮。开始就具备包被均一的单分散性球形粒子再加上制备完好的金交联物，可大大减少这种危险问题的发生。

尽管 TEM 检测是决定胶体质量的唯一正确方法，但鉴定胶体或交联物是否包含融合的、凝集的或者不均一粒子亦或含有不同大小粒子群体的快速方法就是目测它的颜色。优质的 40nm（诊断应用中最常使用的粒子大小）的胶体应该显示樱桃红色。如果胶体或交联物出现紫色，很有可能说明其质量低劣且不稳定。

金颗粒大小的选择

检测信号是由金颗粒聚集于测试线或控制线而出现的信号。这些粒子必须足够大到能被看见，粒子的尺寸越大，这些粒子聚集后就越容易被看见。例如 1nm 直径的粒子，无论其聚集数量多少几乎都是不可能被看见的，因为 1nm 的粒子没有更大粒子所具有的亮红色。只有直径达到 20nm 的粒子才会出现可见的信号。随着粒子尺寸的增大，位阻现象又成了一个（见图 5）。例如，如果 IgG（160,000 道尔顿）分子仅仅 8nm 长，大约 4nm 从金颗粒表面伸展开，那么，100nm 的粒子将会使这些小的表面分子显得更小而很难与特异性的蛋白相互作用。此外，这些粒子的尺寸越大，它们在既定体积溶液中存在的数量越小。

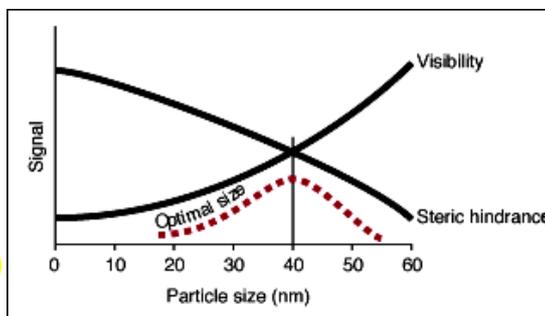


图 5：因优化信号选择金粒子的大小

这种可见度的需要与位阻现象之间的矛盾现象表明，对于大多数的免疫检测应用而言，最适的粒子大小是 40nm。在某些情况下当位阻现象成为较大问题时（如针对较小的抗原），20nm 的粒子则更为合适；当希望出现更深颜色或当分子

表面较低的曲率提高了抗原抗体分子间的交互作用，较大一点的粒子则更为可取。应该由实验决定确定多少颗粒大小能带来高灵敏度、浅背景色和高稳定性。

胶体金的制造

制造者必须了解让他们的蛋白与胶体金持久结合的物理及化学进程，具备了这些知识之后，要进行从小批量制造到大规模生产就变得轻而易举，而无须以牺牲产品的敏感性、稳定性、特异性或重现性为代价了。仅仅把交联物揉合到一起，虽然成本低廉且简易，却通常会导致聚集体的形成。通过 TEM 可以观察到，每一个聚集体都是由 4 个或更多金交联物分子组成的群体。这种聚集体的存在通常预示着产品的不稳定性，其性能会随着时间而改变。虽然比较未聚集的产品刚开始具有更高的灵敏度，但这些产品很快会出现稳定性和特异性的问题。

一种好的交联物表现为蛋白吸附于金的表面上，与胶乳不同的是，蛋白是被动地吸附于交联物表面，因而不会出现共价结合。然而，由于某些小分子与金表面没有足够的结合位点；像激素、药物及其他小分子 (<10KD) 在被动交联之前必须先结合到大分子载体上，多为 BSA。在任何情况下，位阻现象都会阻碍小分子升至 zeta 电位。载体应该是惰性的，这样就不会影响检测蛋白质的活性。

抗体的 Fc 片段紧紧吸附在金颗粒表面上，这样围绕着金颗粒的双电子层表面的 Fab 片段就突出在外面，这样 Fab 就能吸附分析物（见图 6）。胶体金上标记抗体时，不能有适量的待标记抗体存在。因为过量的游离的抗体会跟胶体金上的抗体与抗原发生竞争反应，导致出现假阴性，而且过量的抗体蛋白会影响到标记物的稳定性。蛋白质和胶体金结合的最佳条件在蛋白质的等电点附近。

蛋白通过以下机制于几秒之内吸附于金表面：

- 金粒子所带负电荷与蛋白内氨基酸（如赖氨酸）所带阳性电荷的最初的相互吸引
- 蛋白通过某些氨基酸残基包括色氨酸与金粒子表面之间的疏水吸附作用

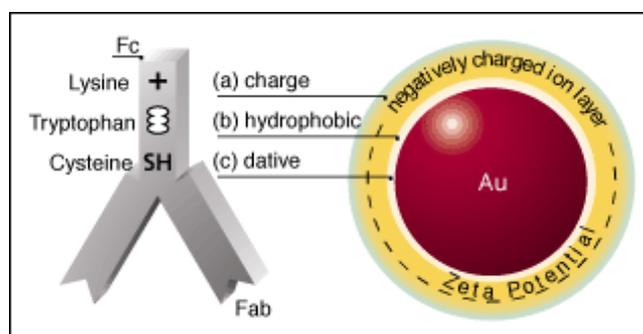


图 6 抗体与金粒子的结合力

- 蛋白中的半胱氨酸的巯基与金粒子间的配价结合

交联物的稳定

随着特异蛋白的结合，交联物必须用适当的试剂进行稳定，通常使用 BSA、明胶、PEG（聚乙二醇）或酪蛋白。使用稳定剂有双重功能，一是它可通过封闭胶体表面未和特异性蛋白结合的位点而减少了非特异性反应；二是它可有助于更稳定的悬液的形成。

一旦结合，金即被调整至预期的浓度，并混悬于相应的缓冲液中。这种缓冲液应可使液体交联物稳定，商业生产者常会使用低摩尔浓度缓冲液以使得工业客户能简单重悬交联物于自己所选的缓冲液中。总的来说，最终的储存缓冲液不应含有高盐缓冲液和表面活性剂，因为它们有可能通过水解或置换抗体造成损伤。含有巯基或汞的防腐剂会造成交联物的完全毁坏。胶体金最常用的防腐剂为 0.1%叠氮化合物。

专业制作出的胶体金的储藏几乎是无限期的。通过计算有多少结合剂可吸附到金粒子的表面，可能会减少批间差，其形成的交联物比单独的抗体可更长久的储存；恰当干燥于固相组分的金标蛋白则可保存数年之久。

胶体金的大规模制造

尽管已经有技术及科学的资料来描述出简单的小量胶体金和交联物的生产过程，但应用于大批量商业生产（譬如 100 升的量）时的方法仍旧存在着所有权的问题。假设从氯金酸至胶体金的还原过程必须于微秒之内完成，那么 100 升或更大量产品的生产则需要非常精细的技术而不是仅仅遵循着小量产品生产的同一原则。

由于这些技术仅仅为用于商业生产的金交联物企业中的专家所熟知，所以大多数生产者不会试图在企业内部选择这种艰巨的任务生产大批量的胶体金。相反，快速检测试剂的生产商会与胶体金专家合作，籍此来减少费用的成本和失败的危险，同时也可以使得他们的产品尽快走向市场。

这样的合作安排通常由生产商进行内部的实验开始，这些实验使用小量商业用途的胶体来决定何种抗体最适于其应用。随后，一些企业内部进行更大量的胶体交联实验来决定按比例放大 10 倍或 100 倍的产品是否能生产出相同质量的交联物。在提高温度和应用不同缓冲液以及干燥状态下进行此阶段的严格的金交联

物稳定性实验操作是尤其重要的。质量控制应包括使用 TEM 检查有关聚集产生的情况、光密度、敏感性及其特异性。在进行大批量快速检测产品的生产之前，多批次地进行这种大量的实验来决定生产的重现性是很有必要的。

定量的可能性

大多数的快速检测只是定性的，只能用于检测临床样本中是否含有超过检测浓度的特定生物成分存在。然而，有许多的检测则需要一种定量的元素，例如监控临床指标的变化或确定特定分析物的相对或绝对浓度。

这样的检测包括三种形式，第一种形式是，当进行测试时，许多内在的信号可出现测试结果在视觉上的对比，这种测试仅仅能提供半定量的结果，结果可分为阴性、弱阳性、中阳性和强阳性。第二种类型，检测线的反应剂设计成只能结合已知一定量的分析物，任何过量的分析物将会和下一条检测线结合，产生一个温度计式的条带梯度。

在第三种测试类型中，测试样品所产生的信号由一个小型的、便携式的分析仪读取，并由分析仪将有色的测试线转换为数字信号，许多这样一般的条带测试读取仪将于近期应用于商业用途。

金标记尤其适合于这种定量或半定量的测试，因为测试产生的信号既精确又具有高度可重复性。大多数的信号是利用光电二极管通过反射标定的刻度尺产生数字，精确度取决于可被读取得测试结果的准确程度以及测试条带产生的可重现性信号的可靠程度。由于金标记的精确度，相对于许多其他类型的标记，其可产生的可重现性信号具备更高的可靠性。

金标信号的银增强作用

无论以层析还是渗滤模的形式，快速检测法通常都可提供与 ELISA 试剂盒相似或更高的敏感性。对大多数的待分析物而言，检测水平达到 1ng/ml 或更小的量是可能的。然而，也有许多待分析物对这种直接标记系统无法达到足够的敏感度。

要用肉眼清晰背景的白色膜条上发现金产生的信号，其敏感度则要受到使用者能力的局限。使用光反射技术的定量方法常常无法达到人类肉眼视觉更大的敏感性。使用银来增强金标记强度是一种有价值 and 前途的技术，它可获得增加 100 倍的检测敏感性。用这种方法将银溶液应用到测试线，来源于金标记的初期

信号（有时候是肉眼可见的）即可被增强。在应用较小粒子（约 5nm）的金交联物的位置，使用这种间接方法可获得更大的总体敏感性。通过在一步测试法中掺入银试剂就有可能无需任何其它步骤就使信号得到增强，这样液体样品的应用便能推进整个反应的进程（见图 7）。所有的反应物（包括金交联物及增强剂银盐）都被干燥于测试条带上仅由样品溶开。

这种间接的增强技术有望在 pg/ml 的范围内对待分析物进行检测。被干燥后的反应物是稳定的并有可能在聚集之前被引入测试装置中。由于敏感性的增强，比目前用于直接标记的测试系统中更小量的样品也可被检测出。鉴于银的增强效果，使得为从前的交联检测法无法检测出的待分析物而研究开发出基于金的一步检测法成为可能。

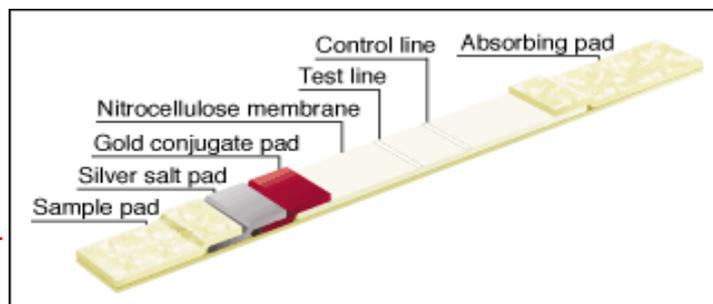


图 7 层析快速检测中银对金标

附言：

快速测试要求

基于膜上的快速检测法可广泛的应用于临床。虽然在临床环境中大多数检测是由专业的医疗保健人士操作，但越来越多的检测方法被批准由相对无经验的家庭使用者操作使用。为创造可成功应用于这个特殊市场的快速检测法，生产商必须为这些有或无经验的使用者周全考虑。除此之外，生产商为了获得加工处理的效率而控制成本必须有自己的一套需求。以下是目前快速检测产生的关键要求。

操作简易 或许操作上的简易是使得快速检测在商业上可行的最重要特色。一般而言，这种检测都是应用多功能且简单的生化技术而无需或仅需极小的操作经验即可完成的。面向使用者、提高操作性简易性的特色包括一步操作法及测试结果易识别的特色。

样品量小 临床医生和家庭使用者都钟爱测试中仅需极少量样品这一点，此特色具有众多优点：收集样品时无需较多经验，通常操作速度较快，给患者造成的潜在伤害及疼痛也会较少，同时还能减少浪费。

快速 快速检测正因这一点而得名。在许多临床检测应用中会使用到快速检测，速度是其根本。根据临床医生需求，这种检测的理想目标就是在 3 分钟内提供结果，而许多快速检测都可满足这种要求。

灵活 对大多数的检测而言，若要满足临床医生需要即时出结果就可能要以牺牲检测结果的质量为代价。对生产商而言，应为快速检测选择那些可获得定性、半定量、或者定量结果而无需大幅置换基底物或反应物的理想的原材料。

临床应用 要使得快速检测能在临床环境中得到广泛应用，它取得的结果必须可与临床实验室仪器检测所提供的相媲美。快速检测的理想特征包括高敏感性（<1%的假阴性）、高特异性（<1%的假阳性）及长期稳定性（12 个月以上），结合良好的检测设计，既有助于减少金交联物的应用时产生的假阳性和假阴性，又能增加测试（交联物）的长期稳定性，商业用途的金交联物可达到长达 12 个月的稳定性。

可靠性 快速检测的发展造就了大量多样化的测试片或试剂盒式检测模式的产生，适用的环境范围从紧急车辆到家庭环境不等。快速检测除了对物理条件不能苛刻外，更要求其能提供变异系数在 5%或更小范围内的可靠结果。若严格地控制生产条件，金交联物将有助于通过最小化批量生产中的变异提升测试的可靠性。

低廉 欲用于临床检测的快速检测遭到同临床实验室检测一样全面降价的定价压力；欲用于家庭使用的快速检测又遭到同其他厂商相同产品的价格竞争；面对这两种情形，厂家必须面对每种测试结果都达到低成本的市场需求。

高附加值 为了能在以低价出售的一次性快速检测中获利，生产商必须不断生产以降低产品成本。理想的测试应使用易获取的高质量的原材料，部件易于大量组装，这样才能达到原料及劳动力成本均低廉。要取得这种平衡，原料和试剂则适于使用比手工操作优势大得多的自动加工处理。

商业接受度 无论是由临床中受过训练的专业医疗人士还是毫无经验的家庭使用者使用，快速检测的设计必须关注消费者的可接受度。相比令操作者毫不费力操作的产品，令人棘手的储存及操作形式、难以识别的颜色都是产品难在商业上取得成功的弊端。

结语

当乳胶普遍用于结合物时，快速检测从 20 世纪 80 年代中期开始没有太大的变化。但自那以后，由于在大量快速检测法设计中对更高敏感性、可靠性及重现性要求的增加使得金作为交联物的首选。

制作精良的金试剂无论以液体还是干燥形式存在都具有极大的稳定性。如果继续有对基于金的快速检测有更大敏感性和特异性的需求，唯有对胶体金的生产和使用进行严格的操作才有可能取得成功。

参考文献

1. J Chandler, Assay device and method, 96901447.1. European patent application, British Biocell International.

2. John Chandler, PhD, is the managing director, and Tracey Gurmin and Nicola Robinson are part of the custom consultancy team at BBInternational (Cardiff, Wales, UK

检测技术开发篇

胶体金在快速检测中当前及未来的应用

James Carney, Helen Braven, Joanna Seal, and Emma Whitworth 文

Rainylily 战友 译

（声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。）

稳定性、灵敏度及大批量重复性使得胶体金成为快速检测中一种理想的检测标记物，但它的应用并不仅仅局限于层析检测。

在过去的 5 年中，应用金颗粒及层析的检测法日益确立了其在床旁检测中的地位。针对不同分析物的简易层析检测法的出现简化并加速了检测体系，也对诸多企业产生重大影响。例如，可以在临床问诊过程中利用病人的一滴血液、尿液或者唾液做出精确的诊断结果，这样当病人仍在场时就可以立即开始治疗了。同样地，食品生产公司可以在食品加工的不同阶段运用质控检测而无需专门的实验室人员也无需中断生产加工过程。另外，层析检测还可应用于兽医行医、食品贮藏和环境监测等领域，而无需专门德操作设备和培训以及结果的阐释。再加上反应的快速，使得层析成为一种理想的自我检测手段。



用于制作胶体金的溶液成分

用于制造层析检测的材质在不断改进，也伴随着试验设计的不断改善，这些进步使得更多可产生定量结果的层析检测使用量的需求有所增加。随着数十亿元全球性的体外诊断检验市场的不断增加，这些促进因素同样可以导致快速检测手段的多样化和实验室分析的便利。这篇文章讨论了这种多样化的起因，并概括了一些胶体金可适用于各种诊断应用的特性。

胶体金在层析检测中的使用

层析检测常采用两种颗粒：染色乳胶和胶体金。许多最近开发的层析检测，包括 Phadia AB 公司 (瑞典, Uppsala) 的 Immunocap Rapid 快速试验和 Merck KgGA 公司 (德国, Darmstadt) 为检测食源性病原体开发的 Singlepath 和 Duopath 试验，都选用纳米金作为标记物。

颗粒大小 用于层析检测中纳米金颗粒要比胶乳颗粒小，用于检测中硝酸纤维素膜的孔径为 8-10 微米，可一次容纳大量纳米颗粒。这种检测形式的敏感性取决于颗粒和被分析物在沿着膜向吸附线移动时的混合程度（见图 1）。而另一个重要的因素就是小颗粒在吸附线上紧密堆集从而更易识辨。

IDV 制造商必须从声誉良好的供应商处购买胶体金以确保满足严格的质控标准使得颗粒的大小和尺寸均一，这些也是保持诊断产品能自由凝集及稳定储存的主要因素。胶体金是一种均质的颗粒溶液，颗粒具有均一的表面积和电荷，满足了蛋白附着的两个主要标准。

颗粒大小范围 用于层析检测的胶体金颗粒的大小范围为 5-200nm。颗粒尺寸的范围使得其可应用于不同领域。较小的颗粒可应用于生命科学领域。

为了利用层析检测应用中中大颗粒的强可识辨特征，颗粒的均一性是关键。优质的胶体金颗粒必须是单分散性的、球形的，

而且形状不均一的粒子数应少于 5%。其他规格的胶体金会使得实验结果不佳，并造成时间和资源的浪费。而优质的胶体金每升可以产生更多的实验结果。

可辨识度 范围在 20-120nm 的胶体金可散发绿光因而可出现鲜红色。即使颗粒小于透射光波长由于表面等离子共振作用它仍可以发光。被散发出的可视光波长因颗粒尺寸的大小而异。

蛋白结 不同于用于胶乳中的共价结合，蛋白质如抗体是被动结合于胶体金上的。这种结合是一种相对简单的过程无需使用其他试剂。有三种常用的金颗粒结合模式存在。

标准的胶体金颗粒被一层负电离子包被着，在离子结合过程中，所有蛋白质上的正离子可以牢牢结合在颗粒的表面。当使用柠檬酸制作金颗粒时，颗粒会与氨基酸如赖氨酸结合。

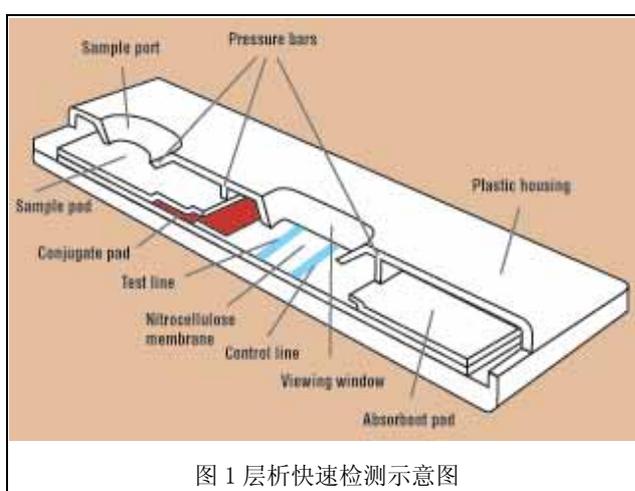


图 1 层析快速检测示意图

具有高度疏水性的氨基酸（如酪氨酸和色氨酸）通过疏水作用结合到金等颗粒的表面。对于疏水性氨基酸含量很高的蛋白质(如免疫球蛋白)来说，疏水结合起着重要的作用，这也是结合颗粒长时间接触含有洗涤剂的缓冲液后反应性降低的原因。

金硫键是由金和硫共用一个电子对而形成的牢固连接。金微粒与蛋白内的半胱氨酸残基的连接可能是吸附于颗粒上抗体或抗原的最重要部分。因此，应避免使用硫柳汞等含硫缓冲液或防腐剂。

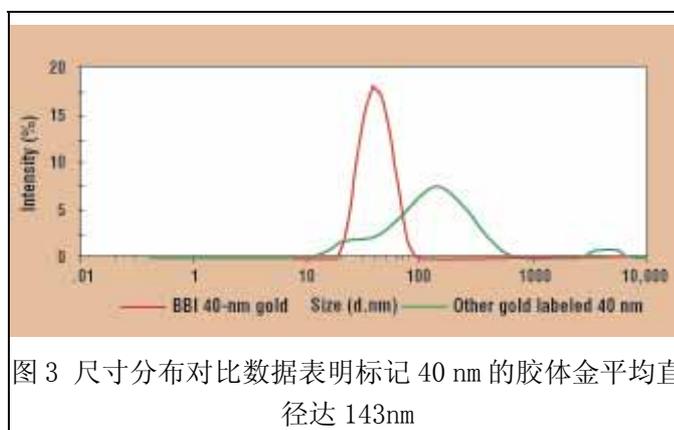
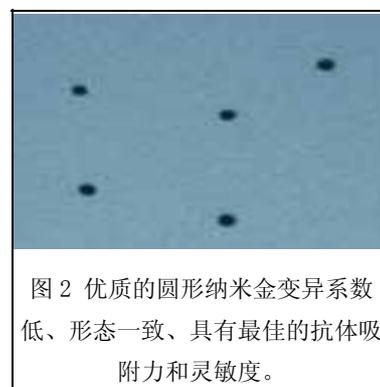
可调控性 经过严格的质控程序可持续生产出尺寸符合要求的均一圆形胶体金颗粒。多年的发展经验已经消除了批量生产中的变异因素及大批量供应的难题（如图 2）。胶体金的连接方式简单，仅仅涉及到蛋白、稀释液及微粒而无需反应剂。根据规定的原材料，IDV 生产者可以计算出每粒胶体金所需要的能做出最佳检测结果的精确的抗体数量，从而节约成本减少原材料的浪费。

层析检测中原材料的改进 用于层析检测的原材料质量的改进已经提高了检测的性能。

颗粒 工艺上的改进可以不断生产出大量大尺寸（250 nm）圆形胶体金颗粒，可作为市场上多种标记物。40nm 大小的颗粒被认为是最适于层析检测的。这种大小的尺寸既足够大到易于识辨又足够小到不会对蛋白结合到胶体金表面产生空间位阻从而优化标记原材料的性能。随着颗粒尺寸的增加，其辨识度也有所增加。最初的研究表明，应用 60nm 的胶体金可以增加某些检测中末端信号的辨识度，从而有可能提高测试的敏感性。

硝酸纤维素膜 这种硝酸纤维素膜的一个重要特征就是其孔径的大小可以控制蛋白结合的有效表面积及样品通过测试条带的毛细管流速。劣质胶体金易于聚集，不能自由通过纤维素膜，因而胶

体金颗粒的大小必须均一。IDV 制造商还必须保证胶体金尺寸的规格。尺寸分布



比较显示，生产粗劣的胶体金标记为 40nm，可能包含不同尺寸的颗粒，其平均直径可以达到 143nm，而导致错误的结果（如图 3）。新型硝酸纤维素膜被制成可湿水的，不影响蛋白质吸收和测试功能。利用表面活性剂和某些阻滞剂进行产品的后期处理可提高颗粒的流动性，消除测试组份间的非特异性相互作用。

样本垫 样本垫可以被化学药品浸渍减少样品成分差异、提高检测灵敏度。去污剂、增稠剂、阻滞剂和盐通常可以经干燥后加入样本垫。此工艺可以避免使用复杂的显影/追踪缓冲液，实现真正的一步检测。

其他膜 如今的血液分离膜可以有效地分离静脉或毛细血管中未溶血的红细胞及血浆。直流膜和测流膜均已上市，可以分离 10-110ml 全血样品，这样可以对血清或血浆进行直接检测而无需进行样品处理和离心。

核苷酸层析检测 层析检测法已经发展至可以用多种形式检测核苷酸。该测法可以检测出如聚合酶链反应（PCR）及结螺旋霉依赖性扩增等扩增技术的产物，结螺旋霉依赖性扩增是一种类似于 PCR 的等温扩增法，其 DNA 链的分离是通过酶作用而不是加热来完成。这些技术无需昂贵的设备就可以进行检测。

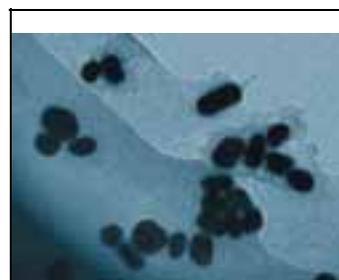


图 4 劣质 40nm 胶体金形态非圆形、不均一、易聚集、颗粒间变异系数高

非序列特异性检测 这是一种以层析形式并应用抗体或半抗原标记的核苷酸检测核苷酸分析物的存在或缺失。应用这种检测方法，两种半抗原（DNP 和生物素）通过与（固定于层析带上的）抗 DNP 抗体和（结合于纳米金颗粒上的）抗生物素抗体结合捕获并检测分析物。半抗原具有在高温下稳定的

优势，并且不会影响核苷酸修饰酶的活性。半抗原还可以通过商业方式获得合成的寡核苷酸。该方法适合于使用生物素和 DNP 标记的试剂检测双链扩增产物（如图 5a）。

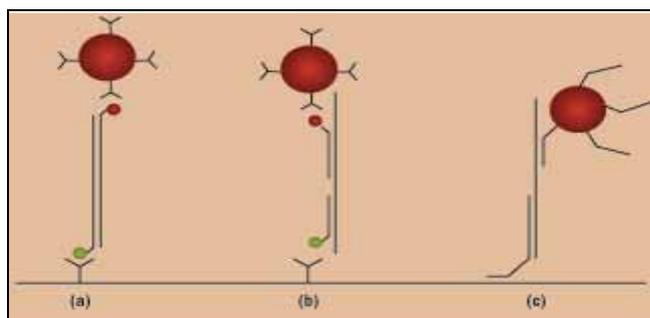


图 5. (a) 作为 PCR 扩增引物，检测双链 PCR 或 tHDA 产物；(b) 以固定的吸附抗体、抗体-胶体金结合物及半抗原标记的序列特异性寡核苷酸探针，检测未标记的单链核酸靶标；(c) 使用固定的寡核苷酸吸附探针和寡核苷酸结合胶体金，进行无抗体检测。

序列特异检测 许多分子诊断应用需要应用序列特异性检测。这种检测法可

以了解核苷酸分析物的序列从而区别于其他分析物和非特异性扩增产物。通过使用寡核苷酸探针与目的序列的退火复性完成序列的特异性。有多种方法可以确保信号的产生是依赖于通过使用探针固定靶标或者通过标记纳米金的探针-靶标退火来实现（如图 5b 和 5c）。

无抗体核苷酸层 无需抗体的检测系统可以减少成本并增加检测的重复性、灵敏度及特异性。无抗体的核苷酸层析检测系统是基于通过固定寡核苷酸探针的靶标捕获和通过直接结合到纳米金的探针的检测（如图 5c）。序列特异性寡核苷酸探针可以利用斑点印记检测法原理类似的方法固定于层析条带上。捕获探针的灵敏度和特异性与使用抗体的方法相当，并且在多重分析

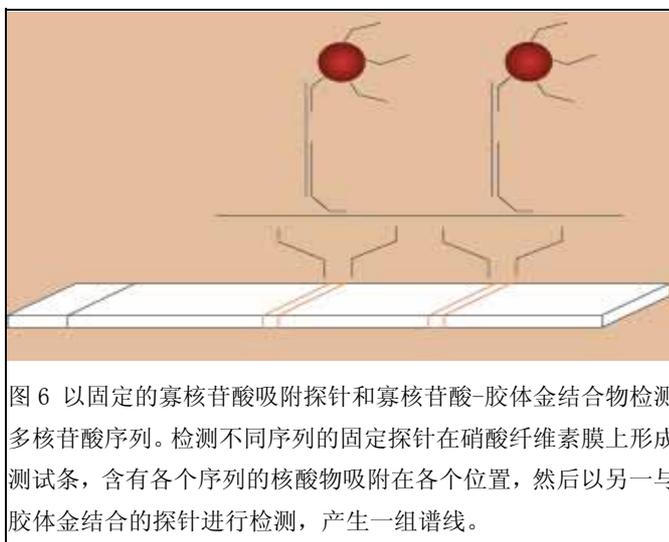


图 6 以固定的寡核苷酸吸附探针和寡核苷酸-胶体金结合物检测多核苷酸序列。检测不同序列的固定探针在硝酸纤维素膜上形成测试条，含有各个序列的核酸物吸附在各个位置，然后以另一与胶体金结合的探针进行检测，产生一组谱线。

（如在每个条带上使用多条吸附线）方面有明显的优势（如图 6）。人们使用多种技术开发将核苷酸结合到纳米金的方法以得到稳定坚固的结合物。

胶体金的其他应用。胶体金在那些需要仪器辨别最终结果的快速检测中同样有效。这些检测利用的是胶体金的光散射特性。尽管 20-120nm 的胶体金比可见光波长小，但由于具有表面等离子共振特性其在光散射方面仍有效。表面等离子共振是特定波长的投射光和存在于纳米金中传导电子相互作用的结果。光散射的强度取决于投射光的波长和粒子的大小。这种表面等离子共振特性可以作为检测用于标记的粒子的方法而被开发。

由于其具有的表面等离子共振特性，胶体金还可用作微阵列中的荧光标记替代物。与荧光标记测定相比，利用共振光散射检测纳米金颗粒测定细菌 RNA，灵敏度要高 50 倍。使用金颗粒还有一个优点——它不会发生光致漂白。

光散射的强度和最大波长与纳米金颗粒的大小成正相关。通过混合不同直径的胶体金颗粒，选择出不同的颗粒用于不同的分析物，将可能开发出多重检测法，若再加上对不同尺寸粒子等离子共振峰加以区分的话。这样就可以扩大应用于层析或者其他检测形式的测试范围。

纳米金颗粒的使用使得 Pointcare Technologies 公司（美国麻省，Marlborough）应用简化电流细胞计数原理开发出一种 CD4 检测法。这种开发的检测法免除了各种不同的荧光标记和错综复杂的检测衡量手段。这种 CD4 淋巴细胞计数法使用可特异性结合到这些淋巴细胞表面的胶体金抗 CD4 抗体结合物，它可以在特定的方向散发出光从而区别于其他类型的细胞，例如表达 CD4 的单核细胞。这种简易、小巧、轻便的细胞计数设备还可以计数白细胞和淋巴细胞，它还可以用来监测 HIV 和 AIDS 病人的疗效。

胶体金在光散射诊断中的应用

人们对开发涉及到胶体金和纳米银的其他光散射技术一直有着浓厚的兴趣，表面增强拉曼光谱技术 (SERS) 中的目前已应用于多种领域，纳米金在 SERS 检测方面的应用也日益广泛尤其是在生物分析领域。

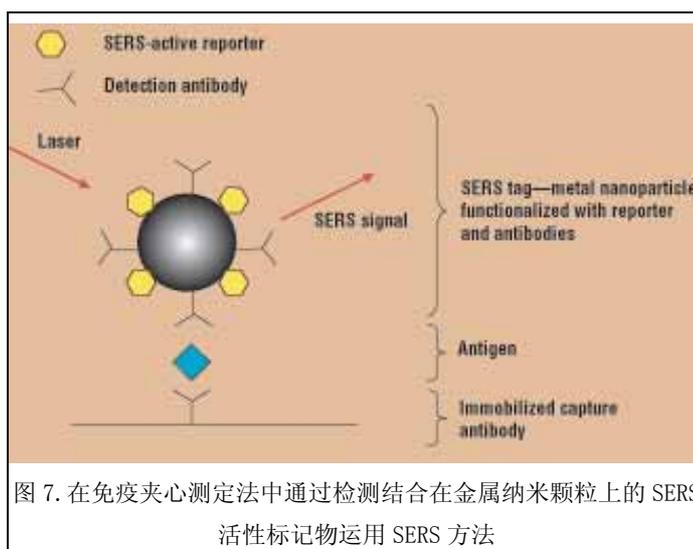
拉曼光谱技术 (SERS) 方法 拉曼散射指的是对投射光在不同波长处的光散射。由于每一种物质都有其独特的拉曼光谱，使得 SERS 成为一项极好的鉴别工具。

然而，拉曼信号也有其特有的弱点：约 10⁷ 个入射光子中就有 1 个在出现散射时波长偏差。这些信号可以通过两种方式来增强。其中一种方法是共振拉曼散射，即将激光调至检测物质的吸收波长；另一种方法就是 SERS，它要求检测物质紧密靠近金属（金或银纳米颗粒）的表面，等离子共振特性可使信号增强放大至 10⁵ - 10⁶ 倍。将两种方法融合后即称作表面增强共振拉曼散射技术 (surface-enhanced resonance Raman scattering)，它是一种十分灵敏的技术，可将信号放大 10¹⁴ 倍，并能够进行单个分子的检测。

应用纳米金属作为 SERS 基质 胶体金和纳米银的光学特性使得它们成为 SERS 检测的良好表面和基质。纳米金属适于液相检测，并且在现有的多种生物检测领域应用广泛。颗粒的大小、形态、间隙等因素对信号的增强非常关键，因而必须使用优质颗粒。开发一种稳定的检测系统依赖于优质纳米颗粒生产出的能与生物分子相互作用的稳定产物。生产出球形颗粒的替代物（如三角形或杆状）与未来 SERS 的应用密切相关，并有利于其应用。

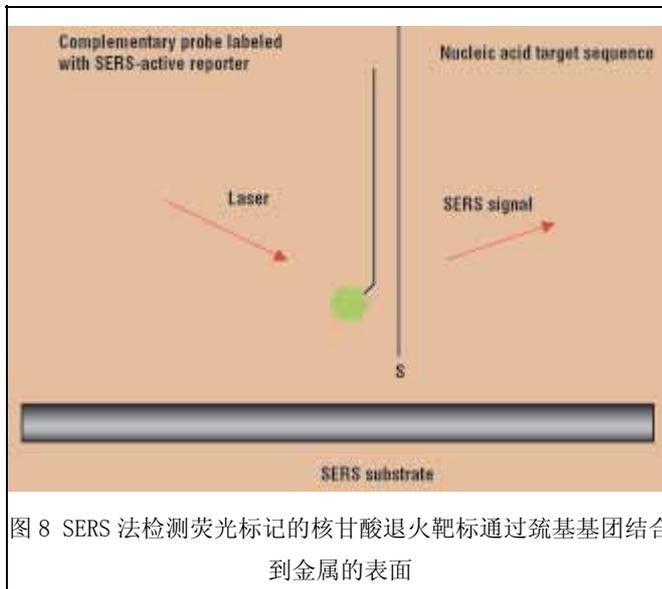
SERS 标签 尽管 SERS 可用于无标签检测，但某些情况下，也需要在检测系统中引入一个 SERS 活性标记或报告基团，从而产生出强大的、易于检测的特征

性拉曼信号。每个样本可以检测不同的标记物，而且 SERS 光谱特征在多重分析方面比荧光技术潜能更大，该标记可以只需将部分纳米颗粒。例如 Nanoplex Technologies 公司（美国加州，Mountain View）生产的 SERS 纳米标记物，包括一个包被着一层 SERS 活性标记分子和玻璃的金属



纳米颗粒。这些颗粒可以代替传统的基于颗粒的检测以及具有金属标记复合物的定量 SERS 检测，用于联合 SERS 检测和免疫测定形式的诊断领域（如图 7）。

均相测定。类似于 SERS 的检测方法也可以应用于分子诊断领域。由于核酸可以用多种可购买到的荧光基团标记，这种标记无需被引入为纳米颗粒的一部分，但相反却可以用来标记核酸分析物。例如，将一个寡核苷酸吸附探针固定于金属表面，与标记的靶 DNA 一起退火反应，将染料引至金属表面，造成荧光淬灭、产生 SERS 信号（如图 8）。此外，应用结合纳米基质和染料标记的分析物具有均相检测形式的优势。通过控制胶体银的凝集，以氨基酸基团和荧光基团修饰的核苷酸已被应用于 DNA 的定量检测。通过扩增阻碍突变系统等位基因



特异 PCR 多重检测，明确样本的基因类型，尤其具有临床诊断价值。

结论

由于其能满足快速检测中灵敏度、稳定性、可靠性的增加需求，优质的成品胶体金依然是快速检测发展和生产中的常用标记。胶体金的尺寸范围使得其在多

种领域中具有广泛的用途。如果生产得当，它可以带来精确、稳定的结果，产生成本效益和可靠的快速检测。可运用多种方法来开发胶体金在快速检测中的应用，甚至可以加速新的应用领域的开发。由于市场对更加精密和使用简易的快速检测法的需求，加上诊断工具需要和特定治疗相配合，因此胶体金的多功能性将有助于促进未来快速测定的开发。

展望未来，随着目前基质开发和新的标记物的设计合成等领域研究的深入 SERS 作为一种检测手段将受到更多的关注。同时，与此相匹配的仪器设备的发展将会增加其在诊断领域的实用性。金纳米颗粒在 SERS 这个新的应用领域中会发挥更大的作用。

参考文献

1. J Alter, "One-Step Separation of Plasma from Whole Blood for In Vitro Diagnostics," Genetic Engineering News 16, no. 5 (1996): 28.
2. J Alter, "Single-Step Vertical Plasma Separation of Whole Blood for Tests and Sample Prep," Genetic Engineering News 16, no. 20 (1996): 30.
3. M Vincent, X Yan, and H Kong, "Helicase Dependent Isothermal DNA Amplification," EMBO Reports 5, no. 8 (2004): 795 - 800.
4. P Francois et al., "Comparison of Fluorescence and Resonance Light Scattering for Highly Sensitive Microarray Detection of Bacterial Pathogens," Journal of Microbiological Methods 55, no. 3 (2003): 755 - 762.
5. CL Haynes et al., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy," Analytical Chemistry 77, no. 17 (2005): 338A.
6. LR Allain and T Vo-Dinh, "Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Using a Silver-Coated Microarray Platform," Analytica Chimica Acta 469, no. 1 (2002): 149 - 154.
7. K Faulds et al., "Quantitative Detection of Dye Labelled DNA Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) from Silver Nanoparticles," Talanta 67 (2005): 667 - 671.



加工工艺篇

开发灵敏度高、重复性好的侧向层析诊断产品

第一部分：对于老问题的新方法

Brendan O'Farrell and Jeff Bauer 文

Tombaco 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原文作者。)

对材料进行选择和生产工艺采用新方法能改善诊断产品性能。

侧向层析诊断技术作为一种稳定和实用的技术适合在多样的 POC 或者现场使用。然而，该技术不能广泛适用于要求非常灵敏、重复性好或者需要获得定量结果的情况。近年，在各种非传统市场领域对该技术的兴趣与日俱增。驱动侧向层析技术复兴的综合因素包括：现有技术面临的专利压力，另外新技术拥有好的灵敏度、可重复性和定量性或者目标结果的可记录性；为适应 POC 或者现场使用的市场要求，要求投入市场周期短且投资合理。

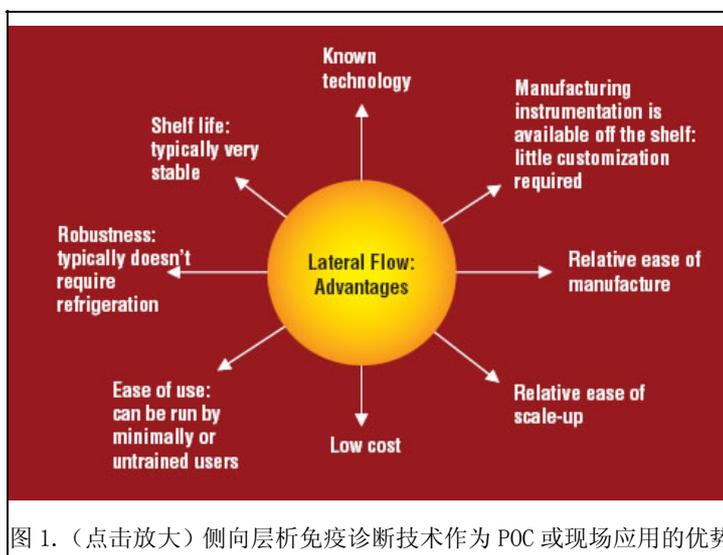


图 1. (点击放大) 侧向层析免疫诊断技术作为 POC 或现场应用的优势

要求投入市场周期短且投资合理。

侧向层析免疫诊断 (LFIA) 系统的优势众所周知 (见图 1)。在这些优势中最重要的是 LFIA 作为一种适用 POC 或者现场使用的技术，具有投资小、进入市场快的特点，且能被适用于更广阔的应用领域。这些优点是其他公认的目前正在发展的 POC 技术所不能比拟的，包括传感器和芯片技术。

侧向层析诊断技术已经在一些市场领域内得到引入和发展 (见图 2)。然而，生产适合这些领域需要的侧向层析诊断产品仍然面临挑战。随着应用范围的扩展，增加了对技术的要求，要求改善灵敏度、可重复性和生产能力。例如，要求定量化和客观化的读条/记录技术能与实验室信息系统连接。除了改进材料、分析技术、读条技术和生产工艺外，侧向层析诊断发展也需要更多的学科交叉。

近年，适合这些要求的生产侧向层析诊断试纸的新方法不断涌现。每个新方法都是 IVD 厂家在这类生产技术基本原理上如何进行新突破的结果。



图 2. (点击放大) 侧向层析免疫诊断技术在 POC 和现场应用的市场分。

这是两部系列中的第一篇文章，阐述了研究和生产高灵敏、好重复性的 LFIA 产品存在的挑战，且概述了克服传统方法局限性的革新。该文关注传统生产技术和材料，不仅讨论每个条件的限制且谈到克服这些局限性的具体步骤。

硝酸纤维素膜（译者注：以下简称 NC 膜）图 3 描绘了一个传统侧向层析测试条的常规生产过程。使用在该系统和行业内的生产材料

和工艺流程基本保持不变。

NC 膜材料被大多数侧向层析诊断产品系统选用。虽然也有市场上的其他材料被尝试（例如：尼龙膜和 PVDF 膜），这些尝试仅获得有限的成功。有限成功的原因包括成

本、使用局限、新的化学和工艺的知识要求和使

用 NC 膜已知经验的惯性。虽然 NC 膜也不是 LFIA 中分析用膜的理想材料，但它

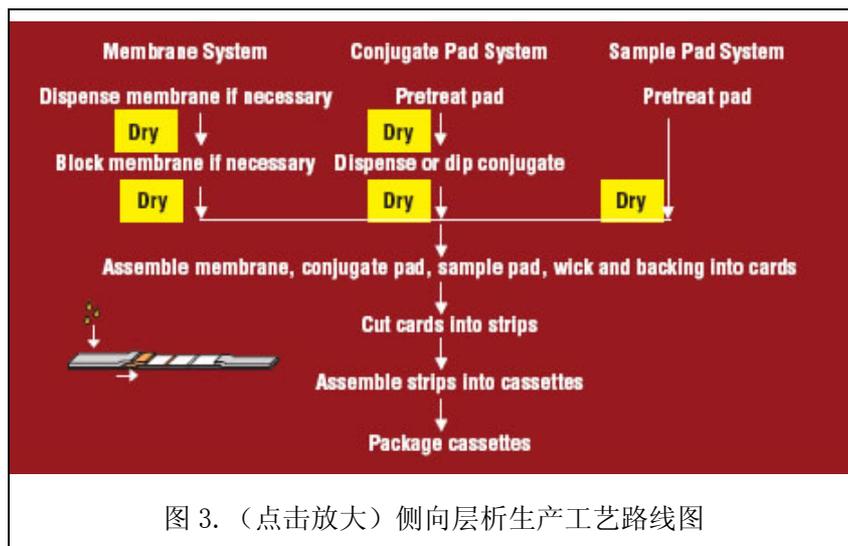


图 3. (点击放大) 侧向层析生产工艺路线图

具有的某些属性使得它可以在该领域内使用。这些属性是成本低、毛细流动稳定、

高蛋白结合能力、处理相对容易（有聚酯背衬的膜）和拥有不同的吸水速率和表面活性组分的产品

尽管有这些积极的特性，NC 膜也有许多的缺陷。这些缺陷包括，批内批间性能重复性差、保质期问题、易燃性和易损性（无背衬膜），和由于环境引起变化的属性，例如湿度。

对于 NC 膜的这些缺陷，诊断开发者和 IVD 生产商要花费相当多的时间和精力在克服材料内在问题的化学配方优化上。他们也优化了生产工艺保证产品在整个保质期内性能稳定。仔细控制关键步骤，喷点、浸泡和烘干过程，注意对膜的化学和生物处理，来预防发生额外的变化，得到完美的成品。

膜上的试剂喷点 对于标准的 LFIA 产品，NC 膜上至少



图 4. BIODOT 公司的 XYZ3050 平台配有 BioJet Quanti 3000 和 AirJet Quanti 3000 喷头

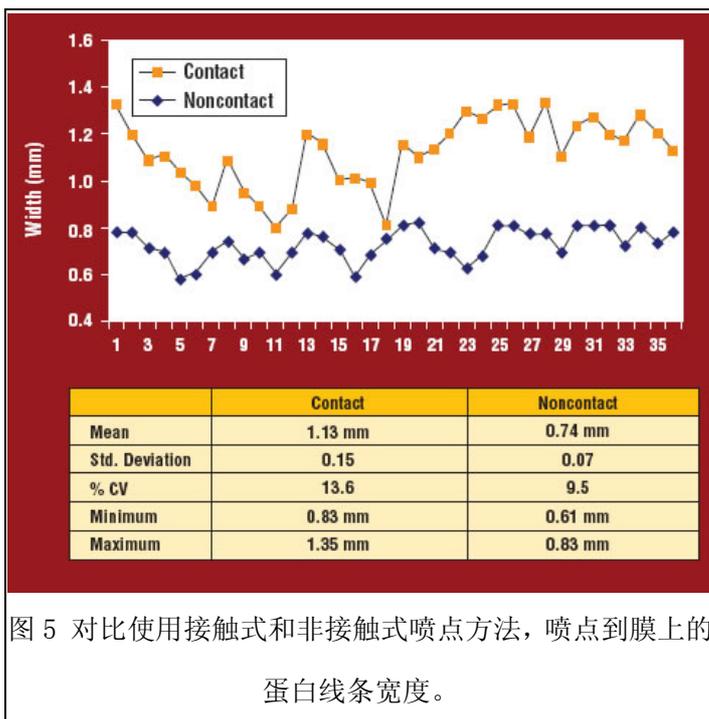


图 5 对比使用接触式和非接触式喷点方法，喷点到膜上的蛋白线条宽度。

有一根测试线和一根控制线。该过程使用喷头喷点一定量液体到单位长度膜上。 IVD 生产商使用两种喷点方式：接触式和非接触式。

接触喷点系统中，喷头划过膜表面，同时泵推动一定量的液体从喷头处释放到表面上。该系统是简易和实惠的。然而，该过程与膜表面接触，会导致划痕。另外，由于液体进入膜的过程不仅依靠膜表面与喷头的

接触，而且与膜的吸液能力的一致性有关，使得线条宽度会发生变化。该变化可能是读数分析时主要影响因素，因为读条仪获得的结果与线的宽度相关。这使得检测结果不一致且系统完全不能定量。

另一种选择是非接触式喷点系统，例如 BioDot Inc. (Irvine, CA) 的 BioJet Quanti 3000 系统（见图 4）。BioJet 使用电磁阀连接高精度步进泵，喷

点液体颗粒到膜上且以紧密的交迭点构成连续的线条。试剂在接触点处被吸收入膜内，膜表面与喷头的接触影响因素被排除。非接触喷点的线条宽度比接触喷点更均一。使用接触和非接触式喷头喷点的线条宽度进行比较（见图 5）。

连续化生产工艺方法更好控制，因为喷点过程是与成像系统连接，能检查喷点线条的质量同时标记任何坏的部分（见图 6）。连续喷点设备能喷点出一致的线条宽度，同时成像系统能实时评估线条质量。

膜封闭 在侧向层析系统中，膜封闭具有多种功能，包括

防治和减少样品或标记物对捕获线和整个膜的非特异性吸附。封闭也被用于控制层析速率和稳定测试、控制线蛋白。封闭过程包括将制作试纸用膜浸泡在由蛋白、表面活性剂和聚合物组成的水溶液中。然后将膜拿出、喷点、干燥。

封闭过程有批处理和连续两种模式，使用连续的处理工艺使浸泡和烘干具有最好的一致性。这两个步骤确保了最佳产品性能和可重复性。烘制批次间由于采用了不同烘干方式造成产品性能的差异，能够通过使用连续干燥系统来解决。例如，干燥塔以相同的方式处理每个步骤，烘制批次间对比验证容易，不受温度和湿度的差异影响，且能高效工作。



图 6 BIODOT 公司的 RTR4500 连续喷点系统中的连续生产成像与坏段标识系统

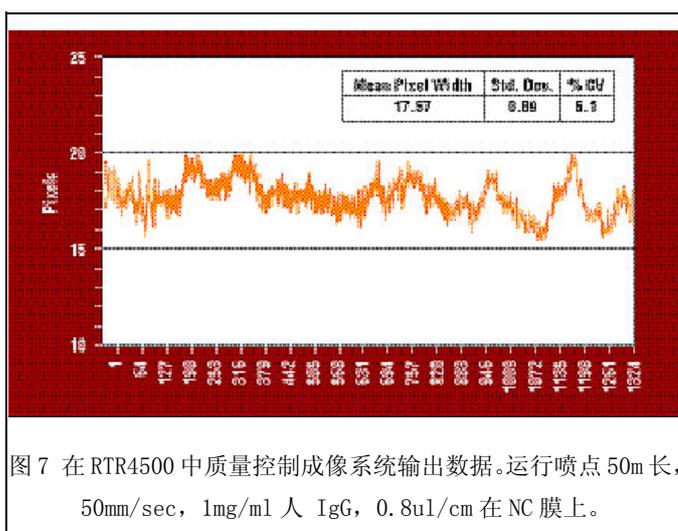


图 7 在 RTR4500 中质量控制成像系统输出数据。运行喷点 50m 长，50mm/sec，1mg/ml 人 IgG，0.8ul/cm 在 NC 膜上。

连续浸泡和干燥使处理材料更加均一，原因如下：在浸泡槽内单位长度材料的处理时间一致；干燥塔中单位长度垫的干燥时间一致；且减少了槽内批次溶质残余不均的影响，连续浸泡槽连续地补液并混合，使得溶液浓度保持一致。

如使用的材料需要封闭 NC 膜，将会是一种不幸的结果。在产品保质期内封闭工艺的作用是防止产品发生变异，这将增加生产成本和复杂性。

图 8a 和 8b 论证了封闭对产品初期和结束时性能的影响。该图对比了浸泡和非浸泡封闭金标产品的定量性能、视觉读条情况。首先，诊断试纸被封闭和使用，它显示出更低的信号灵敏度和更高的变异系数（CV），结论为封闭不适合应用在诊断试纸。然而，当检查移除封闭步骤对系统稳定性的影响时，非封闭的膜对诊断产品的重大影响非常明确，原因是干燥包装储藏后诊断反应时间发生了变化。

标记物垫：玻璃纤维、聚酯膜和人造纤维 在典型的诊断系统中，标记物垫承载标记物、保证其在产品保质期内的稳定性和有效的、重复性好的释放标记物。事实上，标记物喷点、干燥和从材料上释放的差异是诊断试纸性能差异的主要来源，表现为批内和批间的 CVs 值。标记垫的释放快慢也是重要的因素，必须保证释放的一致性。

由于使用材料的属性，标记物垫应该经预处理，确保适宜的释放和稳定性能。垫的处理是浸泡在由蛋白、表面活性剂和聚合物构成的水溶液中，然后干燥。类似膜的浸泡和干燥处理，该过程能被应用在手动批次操作模式和连续化操作模式，后者能使整个批次材料更加均一。

将标记物添加到已处理垫上的方法要根据测试条的最终性能来评估。以下两个方法被用来添加标记物：浸泡，将已处理垫浸泡到标记物溶液中；使用定量的非接触喷点方法喷点，例如使用 BioDot 的 AirJet Quanti 3000 喷头（见图 4）。

定量喷点标记物到标记物垫上比浸泡工艺有更好的吸附均一性。

喷点标记物也影响了标记物从垫上释放的均一性和效果。另外，喷点标记物去除了浸泡期间发生的前处理溶液洗脱处理过程。

表 I 数据论证了在两种不同标记物垫上使用浸泡和喷点标记物的差异比较。在该实验中，一定规格的顺磁性颗粒被用于每个垫，无论是浸泡法还是喷点法，



图 8 (a) 封闭和未封闭膜在变异系数和线强度方面的比较。
(b) 封闭对膜层析速率稳定性的影响。柱条表示诊断试剂流动通过 25mm 膜的时间。DB=浸泡封闭，UB=未封闭。

	Dipped Coating of Conjugate	Dispensing of Conjugate Using Air-Jet Quanti 3000
16s Polyester (S&S)	65.6	92.7
GF 33 (S&S)	41.4	81.9

表 I 在试纸测试时，不同标记物垫上顺磁粒子释放的百分比。（n=10）

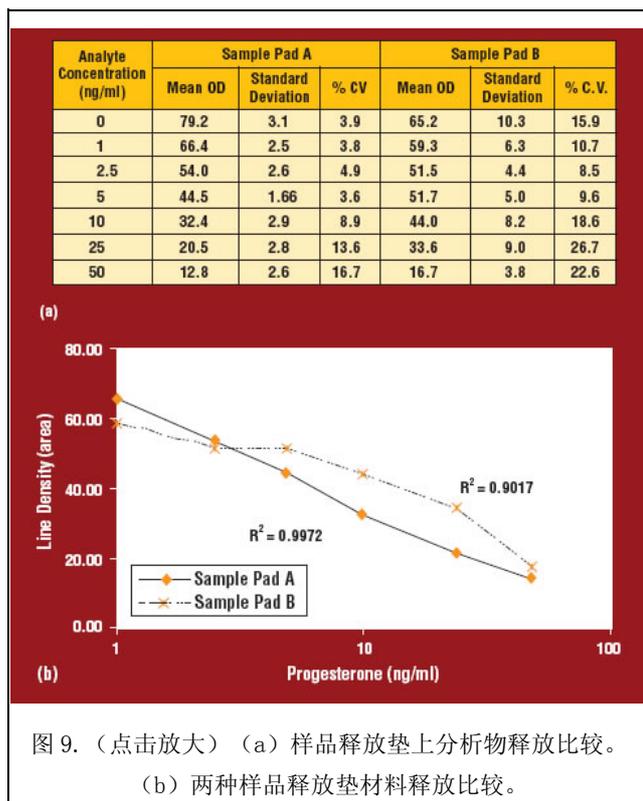


表 II)。该实

验是用免疫夹心法测试血清中标记物。对应喷点使用 BioDot 的 AirJet Quanti 3000，乳胶颗粒喷点多用浸泡方式。规则的标记物使每个测试条都有同样的量。该结果通过光学读条仪来测试。通过标记物喷点改善是该诊断法在临床应用范围的 CVs 值。

另外对于标记体系，选择标记物和标记方法是重要的。对于进行定量分析能力而言，共价耦联是重要的，对比被动吸附法，它在配体和颗粒间具有更稳定的联接。新的标记和读条方法将在本系列的第二篇文章中进一步讨论。

样品垫 纤维素、玻璃纤维、聚酯膜和其他的过滤介质在 LFIA 中，样品垫接受样品和处理样品使其与试纸兼容。

该过程不能对分析物质产生影响，且对于诊断试纸具有高效的和高重复性的释放性能。材料选择可能影响分析性能，由于很多可用材料和它们所含成分类型的不同

每个垫含有总量相等的颗粒。干燥过的垫装配形成 LFIA 试纸，使用 150ul 缓冲液测试。标记物释放的测定是通过光谱分析诱导连接血浆的铁离子总数进行的。

使用浸泡和喷点两个不同标记物处理方式，标记物从垫上释放情况有明显差异。标记物喷点法比等量浸泡法，集中于一个更小区域内，而与标记物垫的材料关系不大，且颗粒能更好的从材料上释放。

数据进一步证明标记物定量喷点能改善测试条的 CVs 值（见

Analyte Concentration (ng/ml)	Sample Pad A		Sample Pad B	
	Mean OD	% CV	Mean OD	% CV
0	0.044	29.5	0.023	55.9
0.38	0.131	27.3	0.069	11.1
0.75	0.154	26.9	0.109	10.2
1.00	0.236	16.1	0.138	11.3
2.00	0.389	5.5	0.224	5.1
4.00	0.699	12.7	0.402	10.0
8.00	1.193	7.5	0.664	2.3
16.00	1.904	1.3	1.004	5.6

表 II 使用不同标记物喷点方法在血清标记物测定中的数据比较。

均一性。如果需要，垫前处理方法必须仔细设计，避免缓冲液在干燥中浓度倾斜和边缘效应影响。在均一地处理垫时最好使用连续化方式。

选择合适样品垫材料的重要性，通过检测孕酮竞争定量诊断中的 CV 值和线性关系，证明了改变材料对诊断试纸性能的影响（见图 9a 和 9b）。该系统中两个不同的样品垫材料被评估。两个垫分别是纤维材料和其他不能判别的材料。每个垫都经缓冲液处理，保证 PH 并确保分析物不被结合，且添加聚合物稳定流速。结果通过 BioDot 试纸条读条仪读取，该读条仪使用 CCD 成像捕获和计算线密度。

样品垫 A 具有更好的分析物释放性能，改善了 CVs，尤其是在曲线末段，和在整个分析范围内的良好线性关系。为该系统选择错误的样品垫材料对生产合格定量诊断产品会有影响。

层叠、切割和包装 在侧向层析诊断中使用不同功能的多种材料，意味着需要将单个组分层叠到背板材料上。传统上，无读条仪配合的侧向层析试纸使用手工层叠法，层叠过程有很大的差异。该差异导致测试条间叠合位置和卡中最后线条位置的差异。虽然在许多要求不高的应用中某些差异是可接受的，但叠合位置的差异导致了试纸条质量的差异。

然而，在一些高要求的应用中，跑板时间和流动结构的差异对分析性能有很大的影响。尤其是在配合读条系统的情况下，横跨整个试纸宽度的喷点线条均一，跑板速度达到要求，组装箱内线条位置一定，即被认为是好的测试条。这些因素对层叠工艺、切条工艺和装盒工艺有较高要求。自动化操作是缩小工艺差异的关键。使用带有成像系统和材料边缘传感器的连续化层叠设备，象在切条和装配工艺中一样的传感技术，为这些应用领域生产出合适差异的部件（见图 10）。



图 10 BIODOT 公司的 LM6000 连续层叠系统。

结论 由于这些技术的存在，标准的侧向层析诊断产品能做到高灵敏、重复性好和经济化生产，适合在很大范围领域内应用，在这些领域内很少有其他的诊断方式能与其竞争。通过选择合适的材料、生产设备和生产工艺技术，IVD 生产商能生产出符合严格性能标准的诊断产品，所以对这些选择需要格外关注。

为了达到更高的应用水平，要求革新和方法学上的更好应用。一些新颖的方法用于材料学设计、生产工艺设计、分析设计、检测和样本处理技术，这些方法

使得该技术性能得到明显改善。关键是实现这些改变，同时保证侧向层析诊断产品的性能和在 POC 和现场检测的基本应用。

该系列的第二篇文章将讨论材料和生产工艺的标准方法选择，关注新方法对诊断产品性能的改善，同时讨论其产生的工艺挑战。



作者简介：Brendan O' Farrell, PhD, Diagnostic Consulting Network (Irvine, CA) 负责人 an BioDot Inc 技术研发部副总. Jeff Bauer 也是 Diagnostic Consulting Network 负责人之一 ,且是 BioDot Inc 的首席科学家.

作者联络方式分别为：bofarrell@dcndx.com and jbauer@dcndx.com

加工工艺篇

开发灵敏度高、重复性好的侧向层析诊断产品

第二部分：新方法带来的新挑战

Brendan O'Farrell and Jeff Bauer 文

TomBacon 战友 译

声明：(本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原文作者。)

从更多专业领域分析，适合定量诊断分析需要的新技术的开发。

侧向层析免疫诊断 (LFIA) 作为一种稳定的技术适合在广泛、多样的 POC 或者现场使用。然而，该技术不能适用于要求非常灵敏、重复性好或者需要获得定量结果的情况。

在过去的一些年里，在制作侧向层析诊断产品方面出现了一系列新方法，使得该技术可以用于广泛、多样的更高要求的应用领域。这些革新的方法迫使对 LFIA 制做原理产生新的关注，同时研究进行研究、生产所需要的资源，以便成为这个领域内成功的改革者。

本文分为两个系列篇，于六月期杂志开始登载。第一篇文章关注 LFIA 行业中传统的生产技术和材料，讨论各因素造成的局限性，并且将克服这些局限性的一些方法做了概要，以便制作重复性好的诊断产品。下篇文章关注材料、信号标记试剂、读条仪和整个 LFIA 观念的新方向，可能开发出更量化的，灵敏度更高的 LFIA 产品。伴随这些新方向而来的是一些新的行业挑战。

方向趋势 通过这些年重要的大量研发努力，已经发现了克服许多在传统侧向层析免疫诊断产品中材料和设计固有弱点的方法。使用传统的方法手段，对产品设计和生产过程做出仔细的观察，使其可能转化到生产，获得具有低水平信号变异系数 (CVs) 的侧向层析诊断产品。该诊断方法的灵敏度接近或优于相关竞争的技术。然而，制作具有好重复性和高灵敏度表现的 LFIA 产品，可能需要在材料科学、标记技术和装置设计上作出相当大的改变。

材料科学 最初使用在 LFIA 上的材料不是专为这个系统中设计的。硝酸纤维素膜、玻璃纤维、聚酯纤维、人造纤维和其他过滤介质都被调整用于这个产品，但是每种材料都表现出其固有的不均一性，在传统产品结构中影响了 LFIA 的可重复性。新的材料需要比现有的材料在功能表现上有所改进。在诊断分析系统中

表现出功能多样性的材料是合意的。新材料的应用为 LFIA 装置设计打开了全新观念的大门。

标记物 传统使用胶体金、彩色微球或荧光乳胶干燥在标记物垫上作为微粒标记，由于其不稳定性和释放的不均一导致高的差异水平。由于生产扩大上的缺陷和由检测手段的局限性导致的信号丢失，这些标记物的灵敏度往往是有一定的局限性。在对三维空间材料（例如 NC 膜）的视觉检测中，仅仅能检测到大约膜表面 10um 深度的信号；在该系统中剩余的信号被丢失。

新标记物，与具有选择性的材料连接并且配有读条系统，能产生重大的性能改进，可做为已经在用的标记物的替代物。

装置设计和读条仪，装置设计革新保留了传统 LFIA 合意的部分，但尝试避免由于主要材料和制做过程产生的缺陷。许多的这类设计依靠读条仪配合。因此，他们需要多学科交叉研发，增加了产品的设计和研发周期的复杂性。

材料和装置设计 对于使用在侧向层析诊断产品中具有多重功能的叠层吸水材料，可能引入智能特性的东西，使制造过程更加复杂，同时增加了诊断产品的变化性。下一代侧向层析诊断产品要达到高重复性和高灵敏度的要求，需要关注开发使用在该类诊断产品中的新材料。这适合于整个诊断装置，而不仅仅是对于膜系统。

虽然在过去十年中做了一些革新的尝试，真正应用于 LFIA 材料的新方法，独特的反应表面和标记物垫材料，并不是很多。这些对于某些部分进行的尝试并不能满足市场需求。然而最近出现在市场上的几个革新似乎显示出一些被接受的情况。

考虑 LFIA 材料选择时，设计者可能关注以下多种表现特性：

- 高度规则表面介质带来了优质线条品质
- 拥有一致膜孔径大小、厚度和蛋白结合能力的三维结构材料
- 在多种吸水速率下的正确毛细层析
- 在有可能情况下最轻薄化
- 在整个产品保质期保持好的流体流动特性，独立测试
- 在整个产品保质期保持毛细时间增加的低 CVs 值，独立测试
- 最小程度的金属污染
- 低荧光背景干扰

- 无干扰反应
- 储藏期间的稳定性
- 非易燃性
- 低成本
- 共价联结的活性
- 多功能性，例如，单一材料作为标记垫、样品垫、反应载体、分离介质和吸水介质。

几种新材料和相关的设计方向是在这些基本原则下进行研发的，虽然仍未有能完全实现所有列出描述的产品进入市场。下列一些产品就是说明。

革新的材料，一种符合上述一些描述的材料被研发，这就是 Whatman (Florham Park, NJ) 公司的 Fusion 5 材料。该大孔径、单层材料是亲水的和本来就不能被蛋白结合的。这种材料意义在于单一材料实现了用于传统侧向层析装置上所有材料的功能。它可以作为样品垫、胶体金垫、膜和吸水纸。

由于它不能被蛋白结合，Fusion 5 不适合传统的将测试线和控制线喷点到介质层的使用方法。一种策略被作为代替办法，有点象在流水中放一个大石头。大直径珠粒（大约 2 μ m）被标记到测试线和控制线蛋白上，然后被喷点到材料的适当位置。大珠粒被固定在材料中，并形成测试线和控制线区域。当样本和标记抗体结合复合物层析通过所谓的“大石头”时，在这个区域出现了蛋白结合和信号表现。

该系统固有的开放孔径意味着检测能被极其快速的完成，表现出阴性和阳性结果。速度或者反应时间对于 LFIA 是重要的，但在多数情况下它与灵敏度构成反相关。在 Fusion5 中使用珠粒方法极大地克服了这个问题，且拥有低背景值和增



图 1. 图示快速诊断研究，使用 Fusion 5 的 HCG 诊断产品。Whatman (Florham Park, NJ)。 (a) 0 秒， (b) 15 秒， (c) 1 分钟。

加了配体结合的面积。

将 Fusion 5 应用于 LFIA 产品，能使生产过程变得非常简单。LFIA 标准生产中的基本步骤，浸泡、干燥和层叠，都被省略。使用该材料必需满足一个要求，相关的大颗粒在测试线和控制线区域内能沉积形成线条，这可能是技术难点。然而，该沉积过程通过使用非接触和接触两种方式喷点，被证明具有技术可行性。

微柱层面 另一种新的分析和材料设计方向是 Amic AB (Uppsala, Sweden) 的 4CastChip。该公司研发出一种诊断分析层面，其在塑料表面分布有高度规则的微柱阵列（见图 2）。



图 2 微柱结构的 4CastChip, Amic AB (Uppsala, Sweden) 产品。

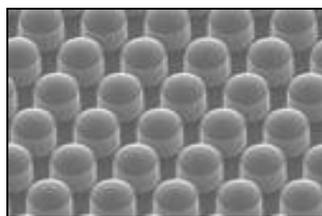


图 3 Amic 装置流道的规则柱结构

4CastChip 中的微柱表面被右旋糖苷修饰为亲水性的，且驱动流道内的样品和试剂毛细层析。同样，微柱为测试线和控制线处的捕获配体提供了一个生物适应性好的表面。该材料与标准的 NC 膜材料相比具有高度规则性（见图 3）。象 Fusion 5 一样，Amic 公司的装置提供了多种功能，微柱构成的流道能作为加样区、反应表面和吸水垫。

在芯片表面上，将蛋白结合到该材料的表面是通过氨基和醛基间的共价吸附力。蛋白被喷点到表面，然后在潮湿环境中，短时间内发生联接反应。该材料能应用于发生高灵敏反应的分析产品，其使用荧光标记，且与读条系统连接时能测出明确的灵敏度值（见图 4）。

在芯片表面上，将蛋白结合到该材料的表面是通过氨基和醛基间的共价吸附力。蛋白被喷点到表面，然后在潮湿环境中，短时间内发生联接反应。该材料能

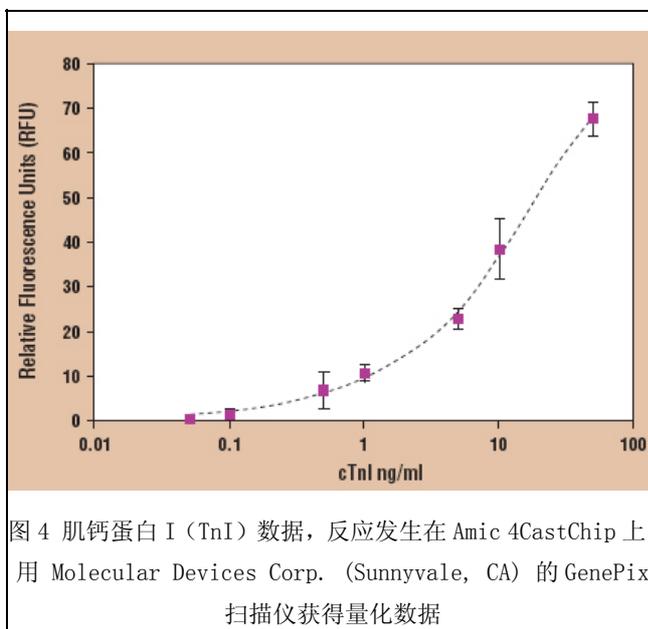


图 4 肌钙蛋白 I (TnI) 数据，反应发生在 Amic 4CastChip 上。用 Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA) 的 GenePix 扫描仪获得量化数据

应用于发生高灵敏反应的分析产品，其使用荧光标记，且与读条系统连接时能测出明确的灵敏度值（见图 4）。

与 Fusion 5 一样，在生产期间，该装置有可能减少生产流程中的一些步骤。同时，它需要将蛋白连续喷点到离散的材料表面，该工作仅能通过非接触喷点技术来完成。芯片要求单片生产操作，从生产过程的观点来看可能是一个弱点，反之象 NC 膜类的材料可以实现滚轴式的生产。喷点方式必须具有高度的规则性、重复性和精细控制，以便确保线宽度是一致的（见图 5）。

4CastChip 表现出 LFIA 层构思路上的转变，作为一种有效的二维空间层构，不是由离散的孔构成的。然而，该装置表现出真实的毛细能力，有极其规则的亲水表面和产生视觉上可接受的灵敏度线条（在系统测试时间内，与已知的应用于临床和 POC 系统产品中的材料相比）。该材料自身具有高度稳定性和能保持蛋白长期结合在稳定的位置上。所以，它符合在本文开头列出的理想装置的很多标准。

标记和读条系统 几种类型标记颗粒技术被使用在 LFIA 系统中。对多种标记方法进行选择，决定了可达到的灵敏度和简化了标记生产，并且使用读条系统连接测试条是必要的。如果读条仪是必需的，使用的标记方法将决定读条仪的类型。标准系统利用胶体金或乳胶颗粒包含可视或荧光染料进行标记。



图 5 BioDot 公司(Irvine, CA) 的 AD 3200 型喷涂仪。

分析系统决定了一些缺陷的影响方式。例如，当一种可视标记被评估时，使用眼睛或读条仪判断，显现的信号仅仅是膜顶部 10 μ m 内的表现。捕获信号中的重要部分因读条仪的透视性而丢失。同时，侧向层析分析不允许信号放大，由于考虑到设计和使用的简便性，多步分析方法一般不用在该系统。

然而，一些颗粒标记的新方法在近年被引入。包括顺磁粒子（PMPs），被 Magna BioSciences (San Diego) 使用在磁性免疫层析测试技术（MICT）；且荧光标记的革新，被 Cibitest GmbH (Neu-Ulm, Germany) 应用于荧光标记免疫试纸条技术（FLORIDA）研发。

PMP技术 Magna Bioscience的MICT技术以前在IVD技术杂志上有所报道。¹摘要，在LFIA系统中使用顺磁粒子的优点如下：

- PMPs 是一种直接代替颜色或荧光标记胶体颗粒的技术。

- 标记化学成熟并且可标准化。
- 试剂稳定
- 研发产品信号稳定
- 生物材料上磁背景低
- 磁区域不受视觉屏障阻碍；因此，对膜有污染或染色的样品测试能被进行，且测试和控制线不一定要是可视的。
- 读条仪能检测在介质底层内的所有信号

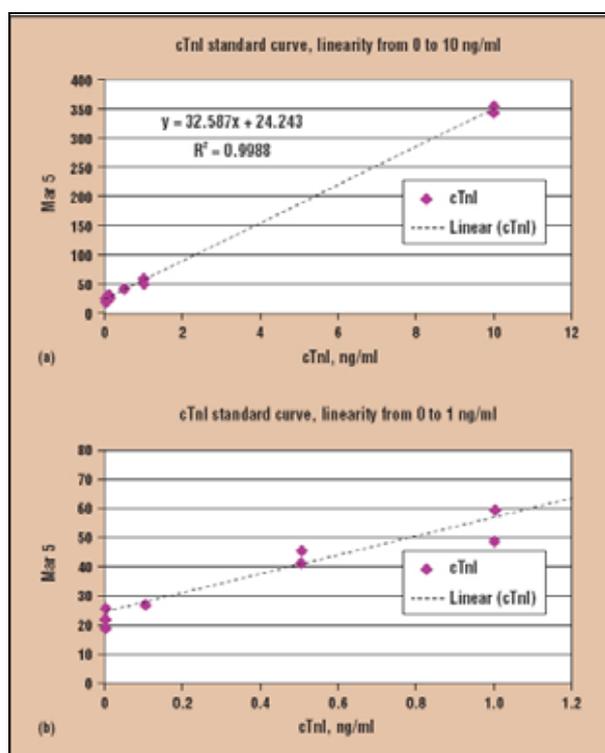


图 6. (点击放大)心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 数据, 使用 Magna BioSciences system 进行研究。

(a) cTnI 标准曲线显示从 0 到 10 ng/ml 的线性关系;

(b) 从 0 to 1 ng/ml 曲线的放大。

最新消息显示，在肉眼和视觉读条仪可检测空间结构以下的信号颗粒捕获问题已被克服。高利用率的信号强度能被转化成重要的检测灵敏度数据。

MAR 系统被证明在多种系统中都具有可行性。该系统被证明在多种分析系统和材料中具有高灵敏度和可应用性。

荧光团技术 另一个应用于侧向层析分析的敏感标记和读条方法，Cibitest 的 FLORIDA 技术，作为信号产生试剂，所有的荧光团以高密度形式标记在载体分子上（见图 7）。荧光团和载体复合物被标记到使用在分析诊断中的特异性蛋白上。

这意味着荧光团与蛋白的连接率是非常高的。因此，信号强度比标准的抗体直接连荧光团方法要高。

该技术额外的优点在于标记的荧光在可见波长范围内，使得信号的产生和检测极其的简单，而标准的荧光团标记检测需要一个复杂的读条仪。Cibitest 装置仅要求一盏激发灯，判读能被肉眼完成。因此高灵敏度分析能被实现，虽然信号的量化上还存在问题。

荧光读条技术 对于任何需要读条系统的 LFIA 研发来说，主要问题之一是必须连接到一个合适的系统上。对于一些检测研发人员而言，与荧光读条仪连接会有问题，因为在试纸条研发完成之前就要将大量的预先投资都放到专利和读条仪的研发上。市场中缺乏适合侧向层析诊断的低成本、易使用的读条仪，该读条仪要能快速转化成可用产品。

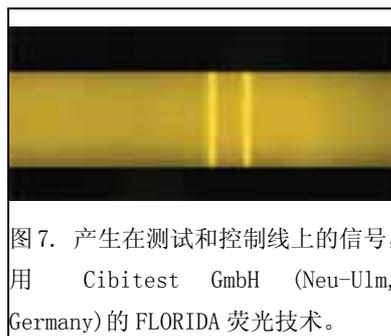


图 7. 产生在测试和控制线上的信号，用 Cibitest GmbH (Neu-Ulm, Germany) 的 FLORIDA 荧光技术。

Embedded Systems Engineering GmbH (ESE; Stockach, Germany) 制造的荧光

分析读条仪

尝试去解决这

个问题。ESE

制造了一个微

型的共焦光学

传感器（见图

8）能适用于多

种结构的综合

性考虑，包括

手持式和实验

室式单位（见

图 9）。该传

感器能快速改

进，使用在多

种类中的任何

表 I HIV 混合浓度平板测试结果，使用 HIV 1/2 荧光 LFIA 从 the One Step One Solution program (OSOS) 和 the Embedded Systems Engineering 手持荧光传感器。检出值被证实，使用平均 5 个被证实的 HIV1/2 阴性样本和 3 个标准背离。

	OSOS Fluorescent HIV 1/2 Assay			Abbott HIV 1/2 Assay		GenSys HIV 1/2 Assay		Abbott Western Blot
	Fluorescent Units	S/CO*	Result	S/CO*	Result	S/CO*	Result	Result
PRB204-1	929	0.91	N	2.1	P	0.3	N	N
PRB204-2	4000	3.90	P	17.2	P	8.9	P	P
PRB204-3	946	0.92	N	0.2	N	0.2	N	N
PRB204-4	3741	3.65	P	17.2	P	8.5	P	P
PRB204-5	3973	3.87	P	17.2	P	8.7	P	P
PRB204-6	3844	3.75	P	17.2	P	8.8	P	P
PRB204-7	3645	3.55	P	17.2	P	9	P	P
PRB204-8	3628	3.54	P	17.2	P	8.8	P	P
PRB204-9	1048	1.02	P	2.5	P	0.4	N	N
PRB204-10	1684	1.64	P	11.8	P	2.5	P	i
PRB204-11	4000	3.90	P	17.2	P	9	P	P
PRB204-12	4000	3.90	P	17.2	P	8.7	P	P
PRB204-13	1858	1.81	P	8.6	P	1.8	P	i
PRB204-14	4000	3.90	P	17.2	P	8.9	P	P
PRB204-15	3995	3.89	P	17.2	P	9.2	P	P
PRB204-16	4000	3.90	P	11.8	P	7.8	P	P
PRB204-17	2987	2.91	P	11.3	P	6.5	P	P
PRB204-18	2904	2.83	P	8	P	2.5	P	i
PRB204-19	4000	3.90	P	7.5	P	4	P	P
PRB204-20	3828	3.73	P	17.2	P	8.6	P	P
PRB204-21	3221	3.14	P	5.9	P	4.6	P	P
PRB204-22	3778	3.68	P	17.2	P	8.6	P	P
PRB204-23	736	0.72	N	0.1	N	0.2	N	N
PRB204-24	1050	1.03	P	13.3	P	0.3	N	i
PRB204-25	1218	1.19	P	17	P	0.3	N	i

荧光标记产品上。该系统在多种测试系统中表现出高灵敏度和大动态范围（见表 I 和 II）。该类装置和服务的实用性解决了 LFIA 开发者的工具包中一个关键的开发障碍。

多学科交叉平台研发

研发高灵敏度和高重复性的定量 LFIAs 产品的主要面临挑战之一是该类检测系统要求更多的多学科交叉步骤，比使用传统技术制作标准的侧向层析分析产品。需要广泛的学科研究投入，包括材料科学、化学、生物学、光学、软件和

Sample ID	Fluorescent Signal	Fluorescent HIV 1/2 LFIA (S/CO)	Abbott HIV 1/2 rDNA (S/CO)	Abbott 3rd Gen Plus (S/CO)	GenSys HIV 1/2 (S/CO)
SV401-A	896	0.87	0.16	0.26	0.43
SV401-B	892	0.87	0.24	0.33	0.88
SV401-C	991	0.97	0.23	0.29	0.71
SV401-D	1068	1.04	3.74	2.29	0.46
SV401-E	1621	1.58	12.96	6.26	1.47
SV401-F	3179	3.10	8.76	7.21	6.10
SV401-G	3977	3.88	5.17	4.91	7.04

表II HIV血清转化平板测试结果，用OSOS HIV 1/2 荧光LFIA和ESE手持荧光传感器测定。检出值被证实，使用平均 5 个被证实的HIV1/2 阴性样本和 3 个标准背离。

硬件工程，同时还要求过程设计、设备设计和项目管理。专门技术要求整合所有的这些原理并确保制作出可行的产品，可能会遇到困难，尤其是对于小公司。

然而，开发精确定量 LFIAs 产品要求更多的合作。需要保证能够使相互的思考、工艺和专门技术驱动这个过程，就象与 BioDot Inc. (Irvine, CA) 有合作关系的 Diagnostic Consulting Network (Carlsbad, CA) 提供的一步一解决程序 (OSOS)。OSOS 程序设计是为研究者提供服务，在研究过程中帮助他们评估某些新的相关的 ICT 分析技术；以提供读条技术、新材料和新标记技术构成的网络结构；



图 8. 小型荧光传感器模型，Embedded Systems Engineering GmbH (Stockach, Germany).



图 9. 手持荧光 LFIA 读条仪

并且在各种体系中评估这些艺术性技术的有效性。也包括一个教学性组成部分，通过该公司能直接学到基本的 LFIAs 方法和与前沿发展水平保持同步。诊断工业

中的微矩阵和微柱体开发多依靠协同合作，研发和生产中需要多学科交叉。在过去十年中，它获得了可观的投资。采用多学科交叉分析研究程序组合外包的概念，可能使他们获得成功，尤其是对小公司而言。

结论

这些新技术进行的严格测试将被取信市场，例如有效性、适合应用环境和终端客户、成本、产品的可生产性和使用明确专利的有效性。该技术将继续改进直到被完全的新技术代替，主要决定因素是被证明具有实用性和广阔的应用空间。

2005 U. S. 临床诊断POC市场估计在\$83 亿，大约\$30 亿POC测试产品是与血糖监控无关。²产生在广泛地使用的POC测试中的重大潜在利润提供了LFIA积极的发展动力，但也更好的体现出其巨大的市场性。

同时临床 POC 市场仅仅是该技术的冰山一角。象畜牧兽医诊断、食品微生物、农业、水产业、环境、工业健康和安全，所有的都显示市场增长的信号和有更大的潜力。为满足这个领域内许多新应用方向的需求，可能需要将本文讨论的方法类型工业化。

参考文献

1. RT LaBorde and B O'Farrell, "Paramagnetic Particle Detection in Lateral-Flow Assays," *IVD Technology* 8, no. 3 (2002): 36–41.
2. Clinica, *Complete Guide to the Diagnostic Market 2004–2009* (London: PJB Publications, 2003).



Brendan O' Farrell, PhD, Diagnostic Consulting Network (Irvine, CA) 负责人an BioDot Inc技术研发部副总. Jeff Bauer 也是 Diagnostic Consulting Network 负责人之一，且是 BioDot Inc 的首席科学家. 作者联络方式分别为: bofarrell@dcndx.com 和 jbauer@dcndx.com

加工工艺篇

核酸膜免疫

第三部分 共价连接及生产

Kevin D. Jones 文

liu903 战友 译

（声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。）

简单、快速的膜介质核酸检测方法已步入发展轨道，但未来还有很长的路要走。

本文第二部分主要讨论提供给膜介质核酸免疫快速诊断应用（IVD 技术，方法 2001 年 9 月，53 页）研发者们使用的技术。共价连接作为一类具有化学—可控定量偶联技术而被应用到膜介质核酸检测系统中，在本文总结部分较为详细地介绍共价连接方法（见图一）。本文结尾部分描述了核酸膜介质快速分析产品生产过程中的—些还没有被解决的问题和挑战。

直接结合 核酸无自身反应性，也就是说在一般条件下核酸不会反应，只有在系统中加入足够能量核酸才被动地与其它基团发生作用。已有报道，在可见光（需加光感剂如亚甲基蓝）和紫外光（无需光感剂）条件下核酸可与蛋白质直接交联。

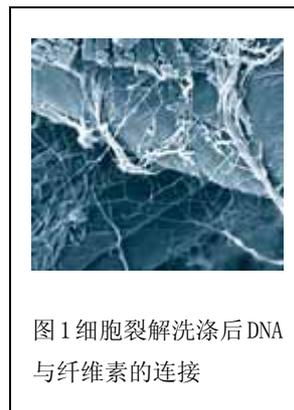


图1 细胞裂解洗涤后 DNA 与纤维素的连接

反应膜 活化膜的制造大受关注。所谓活化膜是指表面可提供直接反应的化学基团的膜介质。无需其它试剂，液体样本可直接结合到活化膜表面，这样体现它的好多优势，特别是应用到微量分析中。用来活化膜介质的化学试剂有多种，具有代表性是类似于叠氮化合物—些物质，它们具有一般的反应共性，然而也存在相似的弊端。

反应膜存在几个问题。

第一个问题是失活。随时间的延长，经化学活化的反应膜会因为表面和空气发生反应而失活。膜活化所用化学试剂活性愈高，失活率愈大。为克服这个问题，制造商现在采用对目标探针特异性反应的低活性化学基团。醛基和胺基间的反应就是个典型例子，其中胺基和醛基的功能性都比较稳定。

另一个问题是非特异性结合。活化膜在应用前必须进行封闭，否则会有额外

样品附着在膜上。封闭步骤需简单、快速、高效。理想的封闭结果是形成一个疏水、无电荷的膜表面，然而通常情况下这很难做到。靶物质和膜结合后也必须进行封闭。膜表面钝化将引入一个新的化学反应，虽然这些新的化学反应不和核酸分子作用，但它可增加膜表面的电荷及疏水性进而导致非特异性信号的上升。这种非特异性信号的来源既有过多结合的样品也有过多结合的检测物质。

活化剂 鉴于具有自身反应性的固相物体在生产、贮存和运输过程存在诸多问题，反应膜不再作为探针共价结合的膜介质。挑选一种只和探针发生特异性化学反应的支持物很难，这种膜物质须低反应性且活性不易因时间、贮存而丢失。目前市场大多数膜介质其表面带有可反应的氨基或醛基基团。

带有氨基的生物分子可以连接到醛基化的物质表面，这一现象虽然被发现了很多年，然而对于连接到醛基化膜的方法却了解甚少。醛基化膜表面优势在于不需添加其它试剂就可以发生大量的连接反应。这种连接反应可能是通过形成 Schiff' s 碱完形成的（见图 2）。

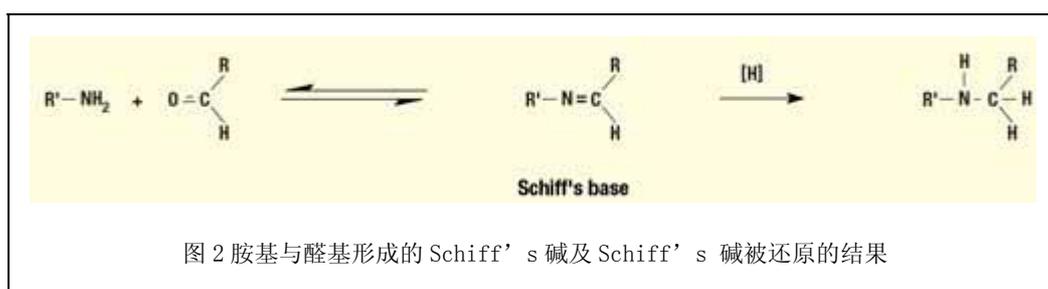


图 2 氨基与醛基形成的 Schiff' s 碱及 Schiff' s 碱被还原的结果

关于是否需要据形成的 Schiff' s 碱还原的争论很多。Schiff' s 碱虽比较稳定，但在生理条件下此反应是可逆的。为保证得到不可逆的连接反应，应加入温和的还原剂（如硼氢化钠）以减少 Schiff' s 碱中间体的生成。理论上虽如此，但在正常情况下不需要还原 Schiff' s 碱，有两种可能解释的原因。一种讲法是，Schiff' s 碱连接通过类似于 z 原则作用形成。虽然在生理情况下 Schiff' s 碱合成反应是可逆的，但大多数的 Schiff' s 碱参与到后面的连接反应，少数逆转反应不影响结果。因此分子仍然可以附着到膜上。另一种假说是基于在聚合反应生产的化合物中几乎没有胺的性状，所以推测 Schiff' s 碱通过胺基群聚合形成。而事实上天然核酸的胺基基团因嘌呤或嘧啶环的存在而不起化学反应。因此，任何核酸和膜的连接反应都是由在探针合成中引入胺基（如 N6-6-aminoethyl(d)ATP or N6-6-aminoethyl(d) CTP）的末端和醛基结合形成。连接到膜介质表面上的探针一端游离，以便和加入的样本反应。

只要有胺基或巯基的活性基团就可合成一条寡核苷酸链，其中的胺基和巯基又可以和其他活性基团连接，其连接方式有两种，其中一种通过相似的基团的连接，即同源双功能连接（即带有胺基分子和带有胺基分子的结合，或带有巯基分子对带有巯基分子的结合），另一种是不同基团间的连接称为异源双功能连接（即带有巯基分子和带有胺基分子的结合，或带有胺基分子对带有巯基分子的连接）。上述两种连接方式在标记探针制备都可用到，同时膜介质表面游离的胺基和巯基基团群可被用于其它类似用途。带有胺基或者巯基基团的膜介质可以从几个厂家购买到，也可通过标准方法活化来获得。

传统的结合技术特别是带有胺基基团的分子主要通过同源双功能连接，最常用的连接剂为二醛类如戊二醛（见图3）。目前戊二醛不再作为常规应用试

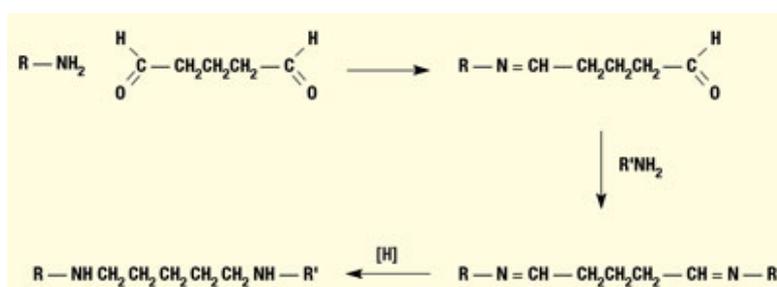


图3 胺基和戊二醛同源双功能连接反应图 图中反映出同源双功能连接反应存在的问题，当第二个胺基分子（R'-NH2）在与戊二醛连接时，未参与到第一连接反应中第一类胺基分子（R-NH2）会与之产生竞争。

剂，现在同源双功能连接最常用的 Syngene 公司用以合成核酸并商业化的 disuccinimidylyl suberate (DSS) 或者是 p-phenylene diisothiocyanate 试剂。N'-N-o-phenylenedimaleimide 用于巯基基团间交连。所有同源双功能连接试剂存在时，探针开始活化，之后再加入第二种材料。虽然同源双功能连接成功用于标记探针的合成，但因其在双引物合成时存在很多问题固而不能被普及应用。同源双功能连接实质是在分子两端形成相同的反应基团，这就意味着在探针活化开始阶段不可避免探针之间的相互作用。基于上述原因，异源双功能连接连接越来越受欢迎。

巯基应用可选择巯基-交换反应如果一个巯基化探针引入到二硫化膜介质上，即可发生巯基-交换反应，然后探针通过二硫键连接到膜上。巯基化探针与处理膜表面的连接反应证明上述反应。巯基-交换反应快速并可定量，唯一弊端是巯基化探针使用前可能形成引物二聚体。并且通过阻隔二硫键形成引物二聚体大的试剂都会干扰免疫探针二硫键形成。

许多能用来交联的化学试剂可应用于巯基和胺基异源双功能连接。通常情况

下，应用到巯基化核苷连接的常用试剂有 NHS、MBS 及 SPDP。前面提到的巯基吡啶连接中二硫键的大多是 SPDP 催化形成，然而，二硫键易形成链内连接而不是在探针和链间连接。目前异源双功能连接倾向采用胺基化寡核苷酸，连接化学试剂多使用 sulf-SMCC，因为它比较稳定（见图 5）。

无论使用何种方法（二巯基交换除外），共价连接的实现是内在的一系列反应过程，在这个过程中目的物与膜连接及接下来膜封闭都需要一定时间，一般在 30min 到几小时不等，这种时间上的差异为自动化及大规模的生产带来困难。光激活连接化学试剂的引入在一定程度上改善上述情况，因为它可应用于简易的成批量生产工艺。但光激活连接化学试剂非常稀有且价格不菲。

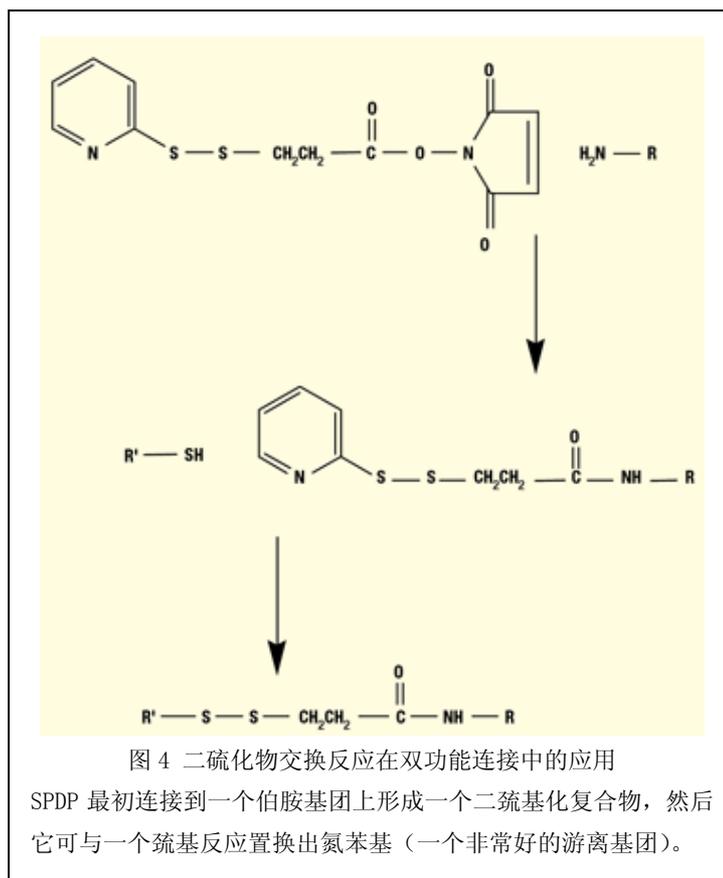
膜系统生产要求

任何大规模生产工艺理想的状况是简单、快速且价格不高，可再生，同时不影响杂交的相互作用。生产工艺必须建立质控，主管生

产线的 QC 或者引入的底物材料不要过于复杂，否则很难通过 FDA 规程的各项试验检查。

高度活化膜常因钝化作用引起寿命衰减的问题，使得人们更希望用活化的核酸与介质膜结合，而不是采用将膜活化后再与核酸连接的方法。现有化学试剂活化膜的方法就象介质膜自身进行整体改造一样简单，而核酸探针在使用前必须进行修饰，而这些修饰一般在探针合成时或者扩增前的溶液中进行。

目前从蛋白免疫分析产品及还不成熟的核酸分析产品的市场来看，膜介质检验产品是最简单的，因为其结合和染色的材料可被应用于连续的过程。膜介质检验产品比较容易调控，染色剂不仅显示出整个反应的过程，还可以定量。喷雾技



术及干燥染色方法因在传统层析检验中而闻名。建立大规模的生产线需要配套的产品设备及过程控制、优化、维修几个方面的大量经验。对这一技术的简化应用或者在适当情况下用于增强表面物理吸附,可显著提高生产效率、降低生产成本。珠介质分析方法的生产过程中也比较简单,它是将核酸是固定到通过尺寸筛选的大珠介质上。

尽管期望将喷雾技术及干燥染色方法应用到核酸膜介质检测方法中,但是目前对于生产,特别是在分析产品的生产阶段,还没有找到一种成熟的工艺技术可以对生产过程进行控制。

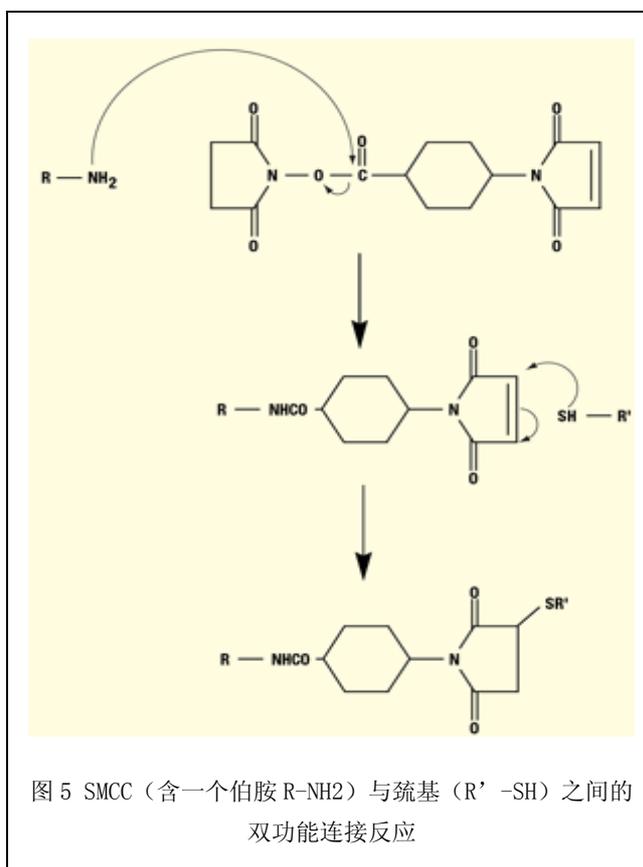
紫外交联试剂加入到一标准连续的生产过程中,通过传统的碱基定向连接方法或者使用一种特殊化学试剂使得核酸的光连接变的相对简单。光源将会随时间衰减,因此,为保证生产设备的全寿命周期内交连的连续性,需要一些光检测仪用于检测和控制

光照强度。光强度过弱将会导致连接的不完全,光照过强不仅会导致核酸的过度连接而且会丧失活性。必要的控制仪器的设计比较简单。

目前化学连接是批量生产的方式,膜、核酸及固定试剂是在反应终止前规定时间内被活化。尽管有多种控制方法,在生产环境中批次生产步骤很难判定。生产成本可能会比连续生产方式高很多。生产过程可能会有所改变,但其初始生产设备的采购成本会相当高。

微型分析仪和珠介质分析仪的批次生产与通常的批次生产有显著不同,珠介质分析仪可以通过共价化学方法低成本、高效率的大批次生产。试验证明,生产规模、所需材料量、批次生产过程易于控制。

微-微阵检验 (Micro- and macroarrays) 多是按照批次方式组装,很少按



照连续方式组装。因此对共原子价联接的表现没有特殊要求。而且微阵检验是唯一一种可以在介质表面上对逐步组装探针的体系类型。Affymetrix (Santa Clara, CA) 最先尝试将这项技术应用于实际, 在应用过程中, 这项技术被一步步的改进并产生了正确的加工流程, 逐渐成熟了起来。高造价和批次生产是微阵检验的独特生产特征。这一过程方法不可用于替换主流的生产、应用过程。

结论

目前市场上已有几家膜介质核酸检测产品, 一般是将用固定连接了探针的反应膜片放入 PCR 产物的溶液中进行检测。尽管与其它一些核酸检测方法比较, 膜介质核酸检测技术简单、快速; 但和我们常用的试纸法比较, 膜介质核酸检测的简单、快速方面还差很远。Xtrana (Broomfield, CO) 公司和 PBA Bio Ltd. (Brisbane, Australia) 展示的用于核酸检测的层析测试条, 样品也只限于 PCR 产物。尽管这个测试方法为层析测试形式, 但在样品加入前需要进行一些的操作步骤 (问题化的), 因此在本质上是一个多步骤方法仅适用于专业人员使用。

通过物理或者共价作用, 一条相配的核酸探针能比较牢固地结合到膜底物上去, 并且能定向使碱基游离, 后者可以和后加入的探针相互作用。要制备简单的一步法核酸检测方法, 目前必须解决问题集中在样品收集及准备、扩增和相配套的敏感检测技术这几个方面。样品准备、扩增的快速技术很多, 但大多数更适用于微型仪器设备而不是膜分析。现有的样品准备系统 (如 FTA from Whatman, Isocode from Schleicher & Schuell, or micromachined cell filters) 和简单完整扩增系统 (如 flow thermocyclers) 均不适用于传统的层析分析。在单一试验或者化验中, 介质膜作为检测载体可能更耐用些。当然, 或许还有更好技术需要人们进一步的开发。

膜介质核酸分析最主要而又突出的优点是简易又价廉。如果膜介质应用发展到既能达到核酸测试的功能要求又能发挥其本身经济、简易的性能的阶段, 它将会有很大的市场前景。但是如果膜介质分析只是作为多步骤操作中一个中间环节, 它很可能被微型设备活微型分析仪所取代, 尽管它有价格上的优势。

无论哪种基础技术, 它们的共同点是仪器记录数据。一步法核酸检测关键在于克服定量功能的挑战。一旦出现真正定量的膜介质检验, 那么一步法核酸检测的问题可能就不会那么令人沮丧了。

加工工艺篇

胶粘剂迁移对层析检测的影响

Kevin D. Jones, Anne K. Hopkins 文

fengzhizi33 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。)

选择适当的胶粘层有助于厂商改善基于膜的诊断产品的加工处理并延长该产品的效期。

用于层析诊断检测的材料有两个共同特性：多孔渗水并有相关脆性。为弥补该类材料的物理强度的不足，该类材料通常会依靠胶粘剂的作用装配到特定支架上（见图 1）。以前，产品开发者用过几乎所有种类的胶粘剂来装配这些物质，包括热固性胶粘剂。

现在，随着胶粘剂技术的发展，一系列适用于层析检测应用领域的胶粘剂已被制造出来。通过选择一种能将应用于层析检测条的多孔物质有效结合起来的胶粘剂，产品开发者可确保该产品在整个效期内都能得到正确的结果。

在大多数层析应用领域里，多数产品开发者指定使用压敏胶（PSAS）（*全称压力敏感型胶粘剂*），该胶粘剂在产品的设计、加工或使用过程中不会出现相应的复杂化现象。通过使用一种适当的胶粘模式，证明使用压敏胶（PSAS）是一种可将层析检测条各组分粘合在一起的可靠的方法。

图 1：层析检测条的典型结构，显示粘合层的位置，该粘合层将各多孔物质粘合于特定支架上。

在典型的层析应用中，各组分物质的粘合是通过胶粘剂渗透到多孔物质

里的过程完成的，从而将所有组分连接在一起。这种胶粘剂在正常条件下的迁移过程被称为冷流。因为在压敏胶（PSA）渗透进入到层析测试条其他组分的过程中没有提供热量，所以一定程度的冷流作用是各物质连结形成的基本。然而，不足或是过度冷流作用的胶粘剂也会给该类诊断产品的开发者提出挑战。

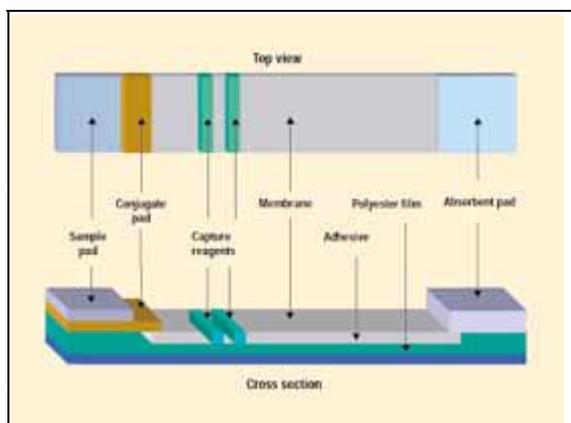


图1 Diagram of a typical lateral-flow assay showing the location of adhesive layer used to bond porous membrane materials to a supporting substrate.

为确保层析产品的正确生产和性能，产品开发者就必须研究使用什么类型的胶粘剂，并选择一种能很好地兼顾粘合强度和迁移程度两种特性的最佳胶粘剂。当产品开发者通过研究，检测，并允许一定程度胶粘剂迁移的影响时，由胶粘剂迁移造成的影响通常已被最小化。

表 I: 本文所描述的用于研究的胶粘剂的硬度和冷流特性

胶粘剂	相对硬度	冷流倾向
RHA	高	低
RHB	中等	中等
RHC	低	高

迁移影响的范围

如果胶粘剂使用前未经审查，过多的胶粘剂迁移会影响层析检测中的许多组分。如果冷流程度太低，会造成粘合力太低以致产品各组分无法充分粘结的结果。因此，为获得高的粘合力，产品开发者必须探寻一种能够提供高程度冷流的胶粘剂。

表 II. 本文所描述的多孔基础物质的特性

级别/型号	成分	厚度 (μm)	孔径 (μm)	迁移速度(sec)
GFD	玻璃纤维	675	6	70
F075-14	聚乙烯醇/玻璃纤维	380	20	40
3MM	纤维素	335	4	640
PuraBind AS	硝酸纤维素	125	3	50
PuraBind AF	硝酸纤维素	125	5	37
PuraBind AR	硝酸纤维素	125	8	27

另一方面，太高的冷流程度会造成孔隙堵塞、局部疏水及产品复溶问题的现象，这些现象也会干扰产品的性能。这些现象主要是由于产品各组分粘合好后胶粘剂迁移渗透到多孔物质里而引起的，尤其是在长效期的储存过程中。

在许多情况下，与冷流相关的问题可以通过使用 direct-cast 膜来解决。例如，这类膜可通过背衬塑料薄膜阻止胶粘剂进入膜孔，从而消除产品储存期间的

胶粘剂垂直渗透作用。然而，有些情况下，由于有背衬和无背衬的膜在产品加工或性能特性方面存在巨大差异，使产品开发者在这种情况下必须使用无背衬的膜。

甚至在 direct-cast 膜的使用时，过度的胶粘剂迁移也会妨碍产品其他组分的自身功能，这些组分包括样品垫、胶连结合物垫和吸水纸。例如，当样品垫在产品检测中被用来控制加样量时，胶粘剂迁移渗透进入样品垫能影响总的有效样品量。相同的，当一种产品检测时包含过滤步骤时（如一些产品的检测需要全血分离处理），胶粘剂的迁移会一定程度封闭膜的过滤作用，使产品检测时只产生少量的有效样品。

胶粘剂迁移也会发生在一些特定的产品中，该产品的膜上附有一层起保护层作用的塑料薄膜——这是一种越来越广泛使用的产品模式。当胶粘剂垂直渗透迁移发生在有背衬膜产品时，它所造成的影响要比同样发生在无背衬膜产品上的影响更显著。过度的胶粘剂迁移会阻碍可视化检测线的加强，导致该检测线的强度明显降低。

开发基于膜的定量检测产品的厂商也会碰到同样涉及冷流现象的问题。胶粘剂迁移堵塞特定材料的多孔结构，使该材料的床体积下降，因而影响检测的标度。现在通用的定量检测器械是通过光学方法（反射或传送）进行读数的。任何一种情况下，部分阻塞的膜能改变通过捕获区带的标本和胶连结合物的量，从而改变产品检测的灵敏度。胶粘剂迁移堵塞部分膜结构也会改变材料有效的光吸收或光反射，从而影响检测的读数。

类似的影响也会发生在基于磁性粒子的检测系统，该系统是基于结合到捕获区的胶连结合物总数进行检测的。如果捕获区带的有效区域被胶粘剂迁移所堵塞，检测结果读数会相应下降。此外，在产品储存过程中，这种读数结果会随着胶粘剂的不断迁移而进一步恶化，所以，随着时间的变化，同样浓度的样品会导致不同的读数结果。

不考虑定量的检测方法，检测膜上局部疏水位点的存在能很大程度影响产品的检测。膜上不能浸湿的斑块会导致检测结果的变化，尤其是当这些疏水斑块有规律地存在于捕获区域内。

胶粘剂迁移的研究

通过相关硬度等级将压敏胶分类。高硬度的压敏胶具有低冷流程度和低原始粘合力的特点。低硬度的压敏胶具有高冷流程度和较高原始粘合力的特点。

生产 3 种不同硬度的胶粘剂（见表 I），用于研究不同胶粘剂在层析材料上的影响。在调查研究中，每种胶粘剂在塑料支撑板上涂上一层 23um 的薄层，该塑料支撑板是典型的诊断产品用薄片材料。这类薄片材料还包括一系列孔径的硝酸纤维素膜，纤维素膜，以及玻璃纤维产品（见表 II）。

这些诊断用材料在 20kPa 的恒压下进行粘合层压并封存在铝箔袋中。装好的铝箔袋保存在恒温室（20° C）中或者存于恒温培养箱（37° C）中。在调查研究中，每隔一定时间取相应样品进行性能检测。

使用层析免疫测定来评定不同形式胶粘剂的影响。通过测定去离子水经过一段特定距离（7.5 cm 的玻璃纤维和纤维素膜；2 cm 的硝酸纤维素膜）的时间来评定水平移动的速度。

使用一种典型的层析检测模式（单克隆抗-βhCG 抗体捕获和胶连，用于结合尿液中的 HCG），检测硝酸纤维素膜的性能，蛋白质的应用，捕获线的强度，以及疏水斑块。所有的检测都用两种独立的物料重复检测 10 次。

这些薄片状材料也同时用电镜扫描（SEM）进行分析。对于这些检查，这些薄片状材料的横截面被切出用于粘合层厚度的测量。

研究结果

以无薄板材料支撑的膜的迁移检测的结果为对照，该研究的结果显示，所有层压在胶粘板上的材料的水平迁移速度会随时间的延续而增强（见表 III）。增强的程度取决于用来粘合各材料的胶粘剂的硬度。以下是该检测结果的概要：迁移时间，疏水斑块的检查，捕获线的强度以及胶粘剂迁移渗透的深度。

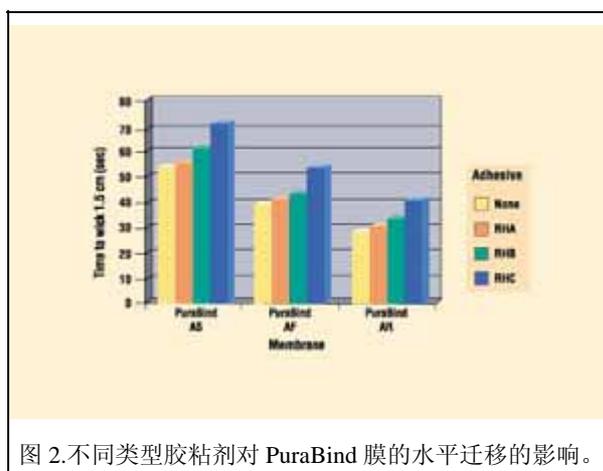


图 2. 不同类型胶粘剂对 PuraBind 膜的水平迁移的影响。

表 III. 37 °C 环境下存储后的侧向层析数值.

材料	胶粘剂	初始侧向层析率 (sec)	3 月后实测侧向层析率 (sec)	变化指数 (%)	6 月后实测侧向层析率(sec)	变化指数 (%)
GFD	none	69.5(±7) ^a	73.0(±5) ^a	5	75.3 ^a	8
GFD	RHA	71.3(±9) ^a	74.2(±3) ^a	4	77.1 ^a	9
GFD	RHB	73.6(±7) ^a	80.2(±4) ^a	9	87.3 ^a	19
GFD	RHC	71.9(±6) ^a	86.3(±5) ^a	20	107 ^a	49
F075-14	none	47.4(±6) ^a	46.5(±5) ^a	(2)	48.2 ^a	2
F075-14	RHA	49.1(±3) ^a	51.1(±4) ^a	4	54.1 ^a	10
F075-14	RHB	48.6(±5) ^a	54.4(±4) ^a	12	59.3 ^a	22
F075-14	RHC	49.0(±4) ^a	62.2(±5) ^a	27	73.4 ^a	50
3MM	none	637(±12) ^a	643(±9) ^a	1	651 ^a	2
3MM	RHA	641(±7) ^a	634(±6) ^a	(1)	647 ^a	1
3MM	RHB	640 (±9) ^a	641(±6) ^a	0	643 ^a	1
3MM	RHC	645(±5) ^a	672(±7) ^a	5	681 ^a	6
PuraBind AS	none	50.3(±8) ^b	54.8(±6) ^b	9	52.9 ^b	5
PuraBind AS	RHA	48.8(±5) ^b	55.2(±6) ^b	13	56.2 ^b	15
PuraBind AS	RHB	49.7(±6) ^b	60.6(±7) ^b	22	66.8 ^b	34
PuraBind AS	RHC	50.4(±7) ^b	71.0(±10) ^b	41	78.4 ^b	55
PuraBind AF	none	37.2(±3) ^b	39.0(±5) ^b	5	42.1 ^b	13
PuraBind AF	RHA	37.7(±2) ^b	40.7(±6) ^b	8	42.9 ^b	14
PuraBind AF	RHB	38.4(±2) ^b	42.6(±3) ^b	11	45.4 ^b	18
PuraBind AF	RHC	37.8(±5) ^b	52.6(±6) ^b	39	57.3 ^b	52
PuraBind AR	none	27.0(±4) ^b	28.5(±3) ^b	6	29.0 ^b	7
PuraBind AR	RHA	28.3(±4) ^b	29.7(±4) ^b	5	30.1 ^b	6
PuraBind AR	RHB	28.5(±3) ^b	32.5(±5) ^b	14	33.6 ^b	18
PuraBind AR	RHC	28.3(±3) ^b	41.0(±4) ^b	45	46.6	65

^a 7.5cm以上^b 2.0cm以上

迁移时间: 测量标本在待检试样上迁移过特定距离所需的时间, 所有这些待检试样都在 37° C 下储存 3 个月 (见表 2)。在这些研究中, 使用硝酸纤维素膜的试样对迁移时间的影响最显著。对于 8um 孔径的硝酸纤维素膜, 使用硬度最小的胶粘剂 (RHC) 粘合时, 标本迁移过 2cm 该膜所需的时间约比不使用胶粘剂的膜增加 45%; 使用中等硬度的胶粘剂 (RHB) 粘合时, 迁移所需时间增加 14%; 而当使用最大硬度的胶粘剂 (RHA) 粘合时, 迁移所需时间仅增加 6%。

类似的影响也发生在本研究所评估的其他薄片状膜上。在所有情况下, 使用硬度最小的胶粘剂 (RHC) 会导致迁移时间显著拉长。

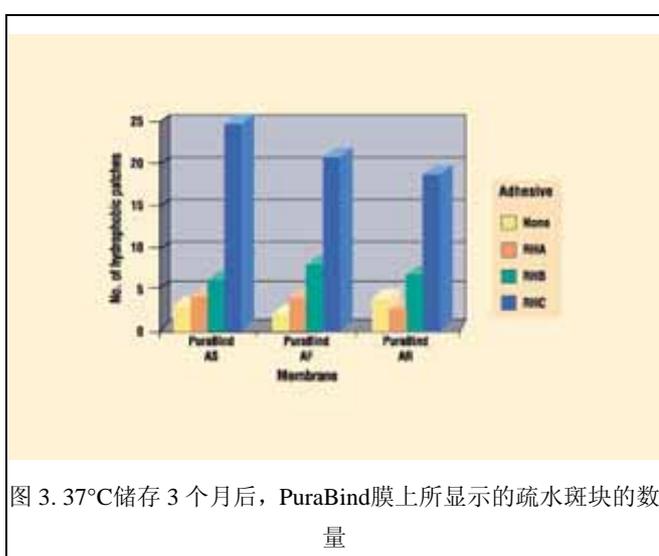


图 3. 37°C 储存 3 个月后, PuraBind 膜上所显示的疏水斑块的数量

对于薄片状纤维素膜 (3mm), 37° C 储存 3 个月后进行检测, 其迁移时间无明显变化。在该组样品中, 使用最大硬度胶粘剂 (RHA) 或中等硬度胶粘剂 (RHB), 各自迁移时间均无显著增强; 使用 RHC 胶粘剂粘合时, 其水平层析迁移时间仅增加 5%。

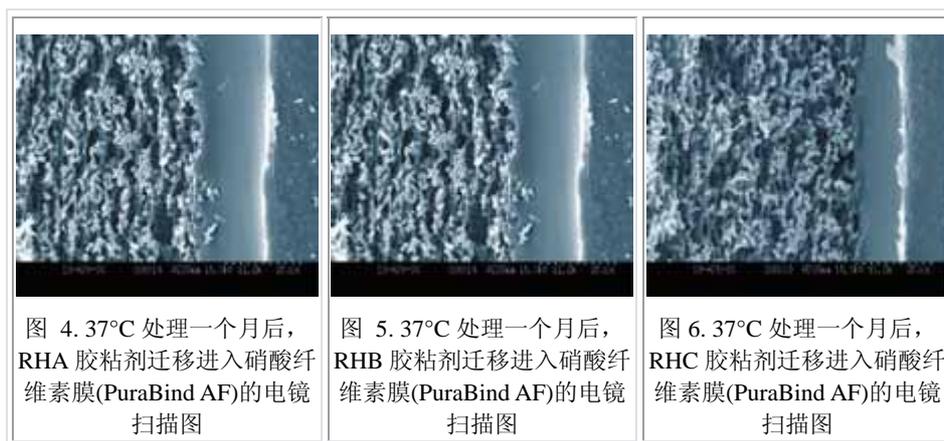
对于玻璃纤维膜, 该检测性能 (迁移时间) 则表现为中等水平的影响。

在该组试样中, 使用 RHC 胶粘剂粘合时, 其迁移时间的增加是显著的 (GFD 膜增加 20%; F075-174 膜增加 27%)。

疏水斑块: 在层析检测过程中, 使用者偶尔会发现没完全浸湿的小斑块。这种现象通常是由于液体层析过膜的不均匀性产生的, 这种不均匀性可能是由于膜孔堵塞或是膜疏水性增强造成的。

典型的防止疏水斑块现象出现的方法是在捕获区包被完后对膜进行封闭。在研究中, 同时也保留没有封闭处理的膜作为对照。每种膜各切 20 条 5 x 25-mm 的条作为评估检测用, 检测后计算疏水斑块的数量 (见图 3, 表 4)。

对照试样和使用最大硬度胶粘剂 (RHA) 粘合的膜所产生的疏水斑块最少; 用 RHB 胶粘剂粘合的膜所产生的疏水斑块的数量稍微增加; 而使用最小硬度胶粘剂 (RHC) 粘合的膜所产生的疏水斑块的数量最多。这些粘合的膜的疏水性能在储存过程中还会继续改变。



捕获线强度：在研究中，捕获线强度作为该检测模式的性能标准，与用于粘合各产品组分的胶粘剂的类型直接相关。用最大硬度胶粘剂（RHA）粘合的模式没有捕获线的问题；而用最小硬度胶粘剂（RHC）粘合的模式，则出现捕获线不均匀和斑块状的现象。检测加样后，这些膜也会出现局部的浸湿不完全的现象，并在一些情况下，会出现没浸湿的白色斑块。

迁移的深度：这些准备好的试样在 37° C 储存一个月后，对它们进行电镜扫描（SEM）分析，用于评价胶粘剂迁移的程度（见图 4-6 和表 V）。在所有试样里，胶粘剂的原始包被厚度为 23 μ m。

电镜扫描（SEM）结果显示，在一个月储存过程中，所有试样的胶粘剂粘合层的深度都随之增加。虽然，最初假定胶粘剂的迁移程度将通过胶粘剂移动的模式进行确定，但是，电镜扫描（SEM）结果显示，胶粘剂迁移的程度主要不是依赖其底层基质或自身特性的。

相反的，胶粘剂的迁移程度主要是取决于研究中的胶粘剂的自然属性。最大硬度的胶粘剂（RHA）显示最小的迁移性，胶粘剂粘合层的深度平均为 23 到 25 μ m。胶粘剂渗透的深度会随着硬度的减小而增加，用 RHB 胶粘剂的粘合层深度大约增加到 30 μ m，用 RHC 胶粘剂的粘合层深度大约增加到 45 μ m。

研究结果显示

该研究的结果显示，当产品开发者使用相关硬度太低的胶粘剂时，多孔材料会受冷流影响。而当胶粘剂的相关硬度增加后，迁移渗透的程度会降低。

相同的，该结果显示，胶粘剂的最大程度的渗透会造成大量相关的影响。例如，最小硬度的胶粘剂（RHC）不仅有最大的渗透程度，而且会造成标本迁移时间的显著提高并产生大量的疏水斑块。

表 IV. 不同类型胶粘剂粘合的膜的疏水斑块数量

膜	胶粘剂	每 20 条的疏水斑块数	膜	胶粘剂	每 20 条的疏水斑块数
AS	None	3	AF	RHB	8
AS	RHA	4	AF	RHC	21
AS	RHB	6	AR	None	4
AS	RHC	25	AR	RHA	3
AF	None	2	AR	RHB	7
AF	RHA	4	AR	RHC	19

胶粘剂迁移的最大的实时影响是：造成水平迁移时间的增加，疏水斑块的出现和增多，以及膜内床体积的降低。对于第三种情况，膜材料的变薄会使所有的

表 V. 所有试样储存在 20° C 和 37° C 两种情况下，胶粘剂层厚度的变化的 SEM 分析

材料	胶粘剂	20° C 下的厚度	变化率 (%)	37° C 下的厚度	变化率 (%)
GFD	RHA	23	7.5	23	7.5
GFD	RHB	25	12.5	25	12.5
GFD	RHC	31	27.5	40	50
F075-14	RHA	24	10	26	15
F075-14	RHB	29	22.5	32	30
F075-14	RHC	36	40	46	65
3MM	RHA	25	12.5	26	15
3MM	RHB	28	20	28	20
3MM	RHC	36	40	41	52.5
AS	RHA	25	12.5	24	10
AS	RHB	28	20	28	20
AS	RHC	35	37.5	42	55
AF	RHA	24	10	25	12.5
AF	RHB	28	20	29	22.5
AF	RHC	40	50	47	68.5
AR	RHA	26	15	27	17.5
AR	RHB	29	22.5	31	27.5
AR	RHC	42	30	50	75

影响变得很显著（如，在研究中，硝酸纤维素膜的受影响程度要比纤维素或各等级的玻璃纤维显著）。

虽然膜和胶结合垫是决定层析检测产品性能的最关键组分（其中一个组分该文已做研究），但是也必须注意发生在各种情况下的胶粘剂迁移现象。^{1,2}胶粘剂也可能向制品切割的边沿迁移，导致与其他物质的接触和粘连。

当检测用试样储存在较高温度时，选择不适当胶粘剂所产生的影响会相应快速地出现（大约 1 个月）。然而，在实时（通常）环境下，这些影响发生的时间会更长，并且有些特定影响会比其他影响更容易发生。对于使用 RHC 胶粘剂的产品，在 20° C 条件下，迁移时间和局部疏水的影响大约会在 5 个月后出现，而使用 RHB 胶粘剂的产品，该影响发生的时间会更长。

重要的，对于层析检测产品，该研究所述的影响一般都会发生在产品合理的效期之内。多数层析检测产品的效期都要超过 12 个月。但这将产生各种问题，过度的胶粘剂迁移将很可能在这段时间内显示它的影响。

这种迁移也会对半定量或定量检测产生很大的影响。在定性检测中，膜床内体积的改变和标本迁移速度的改变所产生的影响可能是有限的。但是，在定量检测中，任何膜床内体积的改变都会改变通过捕获区的标本的数量，从而影响检测结果的标定；任何迁移速度的改变都会直接影响该检测的灵敏度。显然，新一代定量层析检测产品开发都必须注意这些问题。

结论

产品开发者在设计一种层析检测产品时需考虑到方方面面的问题。³他们不但需要选择能根本上提供检测诊断信息的胶结合物和反应物，还需要选择能产生化学作用的基础材料和其他组分。任何有必要的时候，产品开发都必须设计检测方案，以确保检测产品中所有组分能彼此协调一致，并使生产可行性、稳定性、可靠性等因素得到最优化。

通过研究诊断检测中所选择的胶粘剂的相关硬度，开发者应该能预知胶粘剂与其他基础材料粘合的方式。有了这些信息，产品开发就能选择一种合适胶粘剂，这种胶粘剂能提供产品所需的粘合力，且不会发生过度的迁移或相关的影响。

选择一种合适胶粘剂能显著提高诊断检测产品的效期。加速破坏实验能提供产品各组分在长周期中的兼容性和功能等有用的信息。然而，为稳固地确定一个

特定层析产品的效期，开发者必须进行充分的效期测试。该研究显示，这种效期测试中还必须包括与胶粘剂迁移相关的各种影响的检测。

参考资料

1. Kevin D. Jones, "Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 1: Principles," IVD Technology 5, no. 2 (1999): 32 - 41.
2. Kevin D. Jones, "Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 2: Common Problems," IVD Technology 5, no. 3 (1999): 26 - 35.
3. Alan Weiss, "Concurrent Engineering for Lateral-Flow Diagnostics," IVD Technology 5, no. 7 (1999): 48 - 57.

作者简介：Kevin D. Jones ，诊断技术经理；Anne K. Hopkins ，Whatman 国际(Maidstone, Kent, UK)的主要技术工程师。这篇文章源于由《IVD 技术》赞助的美国临床化学协会栎山会议（美国波士顿，2000 年 5 月）论文集。

加工工艺篇

基于蛋白质原料的体外诊断产品的稳定性问题

Patrick E. Guire

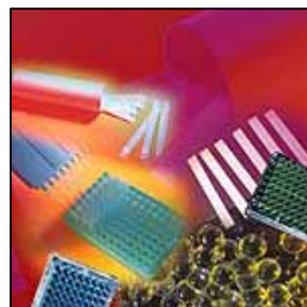
backtoheart 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。)

在新型免疫诊断产品的开发阶段，为保持蛋白质试剂在干燥和溶解状态下稳定而进行的实验至关重要。

免疫诊断产品开发的基础——蛋白质，是一种生物大分子，它根据希腊神话中一位多变的艺术形象——Proteus（希腊海神）而命名。如同他们共通的名字所展示的那样，蛋白质具有改变自身构型的能力，不过这也导致了其活性的丧失。因此，例如抗体、凝集素、酶等蛋白质试剂所具有的特异性结合、催化反应功能，对在预处理、贮存、使用加工等操作过程中存在的潜在有害影响非常敏感。

本文将对关系到体外诊断产品的各种蛋白质稳定性问题进行讨论。一部分问题是关于进行干燥处理的蛋白质的稳定性，另一部分是关于保持在溶液状态的蛋白质的稳定性。



干燥、冷冻或者冻干过程可能会造成蛋白质的严重变性，除非蛋白质得到了适当的保护。因此，正确的干燥方法和保存条件对于干燥组分的保质期至关重要。而溶液状态下蛋白质的稳定性则受到众多可变因素的影响：温度、微生物污染、酸碱度或者缓冲溶液。

此外，本文还将讨论为什么产品性能的问题并不总是应当归罪到稳定性问题上。在生产过程中的因素也许才是罪魁祸首。

蛋白质的特性

蛋白质是一种具有三维空间催化反应或者特异性吸附功能的柔性分子聚合物。催化反应和特异性吸附位点上的氨基酸的空间构相是由这些氨基酸相互之间，以及溶剂、溶质分子的交互作用决定的。

蛋白质分子由亲水和疏水氨基酸组成；这样的一种组成使得蛋白质在水溶液中会自然折叠，让更多的疏水氨基酸折叠聚集在球形蛋白质内部，而让更多的极性氨基酸暴露在能与水结合的表面。

其他起到交联效果的相互作用力包括静电作用、氢键、范德华力、螯合作用以及共价键（比如：二硫键）。其中一些相互作用力对于诸如冷冻、干燥等相变产生的影响非常敏感。

干燥稳定性问题

尽管大多数可特异性吸附的蛋白质在溶液状态的自然构象下发挥作用，但干燥或者冷冻状态仍然是稳定保存的首选。在这些相对稳定的状态下，诸如蛋白酶、氧化剂等有害作用的溶剂与蛋白质的频繁碰撞将会得到最大限度的减少。但是通过干燥或者其他相变方式，比如沉淀和冷冻，将溶剂从蛋白分子中去除，将可能损害蛋白质的功能构造。这些相变可能使通常折叠在分子内部的疏水氨基酸暴露在分子表面，从而造成蛋白质分子通过疏水表面与其他分子结合，导致蛋白质分子的变性。

干燥的方式包括自然风干或者冷冻干燥，例如试剂瓶中结合物的干燥、塑料板或者膜材料上包被抗体的干燥。需要注意避免的是在一系列步骤中无意识间发生的干燥，可能是由于同时操作一大批例如平板或者试管等包被产品而引起，也有可能是由于工作在极其干燥的环境而引起。

在要干燥的溶液中加入适当的溶质来防止蛋白质变性是一种非常有效的保持蛋白质稳定的方法。这些溶质的特点是都具有亲水基团，这些基团通过掩盖疏水性氨基酸从而达到稳定蛋白质功能构造的作用。因此，由于在干燥时溶剂的去除会促进蛋白与蛋白，尤其是蛋白与固相表面的相互作用，所以在干燥前加入稳定剂非常重要。

商品化稳定剂的使用

商品化稳定剂同样适用于保质期的优化。在一个实验中，96孔聚苯乙烯板 (Immulon 2; Dynex Technologies Inc.; Chantilly, VA) 上包被单克隆或多克隆抗体，这些抗体分别采用以下试剂作为稳定剂：Stabilguard biomolecule stabilizer (SurModics Inc.; Eden Prairie, MN)、Stabilcoat immunoassay stabilizer (SurModics Inc.)、Superblock blocking buffer (Pierce Chemical

Co.; Rockford, IL) 以及牛血清白蛋白 (BSA)。其中使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为阴性对照。然后将这些平板干燥并密封保存在放有干燥剂的铝箔袋中。室温保存一段时间后, 单克隆抗体包被的平板被用来进行夹心法酶联免疫测定, 而多克隆抗体包被的平板则进行以辣根过氧化物酶为抗原的直接吸附测定。

在室温下保存 18 月后, 除了以 BSA 作为稳定剂的单克隆抗体外, 所有单克隆抗体样本的活性回收率都在比较好的范围 70-80% (见图 1); 而多克隆抗体的实验结果则表现出更显著的差异 (见图 2)。但是, 关系到稳定剂 Superblock 的 50% 活性的

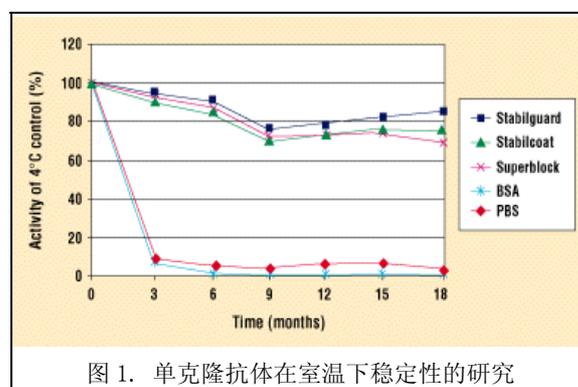


图 1. 单克隆抗体在室温下稳定性的研究

损失, 似乎发生在干燥的过程中, 而在其后的保存过程中则保持了相对稳定的活性水平。从实验可以看出多克隆抗体比单克隆抗体更加存在活性损失问题, 这表明在测试多种产品时可能有必要找到针对每个体系的最适稳定剂。

干燥方法的影响

无论是干燥方法还是保存条件, 想要保持稳定都有很

苛刻的要求。当蛋白应用到膜上时, 通常要求非常快速的干燥或者冻干, 以保持蛋白最佳性能和活力。而对于平板、试管或者微珠的蛋白包被来说, 相对于快速干燥,

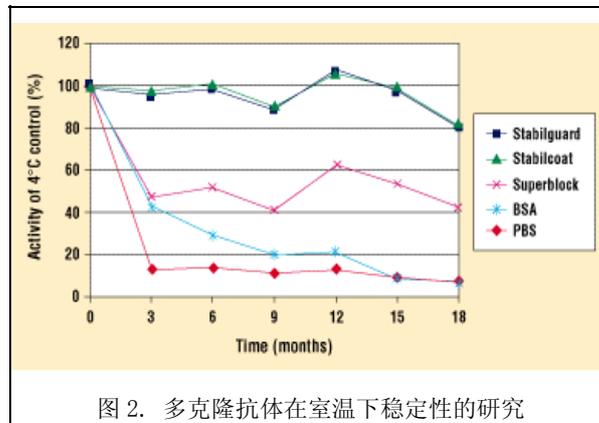


图 2. 多克隆抗体在室温下稳定性的研究

确保组分的彻底干燥则更为重要。为了得到最大限度的有效期, 所有干燥后的产品都需要保存在放有干燥剂的密闭容器中。

我们研究了不同干燥方法对抗体在室温下保存 6 到 12 个月后活性的影响, 最后得到下列数据 (见图 3)。在这个实验中, 为了比较不同干燥方法的影响, 在 96 孔板中加入抗兔单克隆抗体并进行孵育, 然后洗板, 接着在同一块板的不同位置分别加入 Stabilguard biomolecule stabilizer 和 Superblock blocking buffer, 孵育后吸除。最后这些 96 孔板通过下列常用的方法进行干燥:

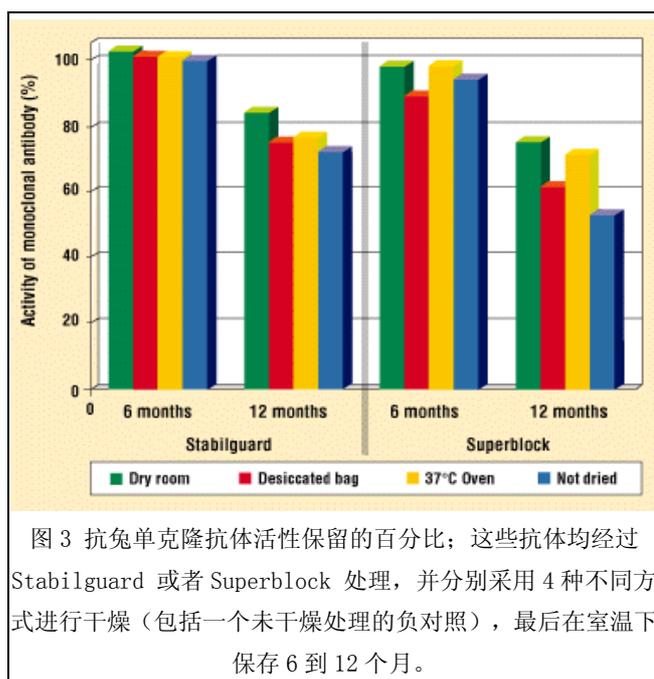
- 室温 (20 - 24° C) 下, 相对湿度为 16% 的烘房中干燥 4 小时。

• 室温 (20 - 24° C) 下，装有干燥剂的密封塑料袋（相对湿度为 23%）中放置 4 小时。

• 37° C 下，相对湿度为 26% 的烘箱中烘干 2 小时。

作为负对照，在室温下，将一些板放入不含干燥剂的潮湿的铝箔袋中，密封保存 90 分钟。

这些经过干燥的平板接着被密封



在放有干燥剂的铝箔袋中并在室温下保存，以便对长时间的稳定性进行评估。抗体活性的回收率通过酶联免疫夹心法检测得到，其中兔源抗体作为待检物，HRP（辣根过氧化物酶）标记的羊抗兔作为夹心法中的第二抗体。在检测的时候，新近包被一批平板（即不进行干燥处理）作为标准对照或者 100% 活性值对照。

虽然这几种干燥方法并不是截然不同，但使用烘房的干燥方法总是表现出最好的结果。而对于长时间保存在不含干燥剂的铝箔袋中的那些负对照平板，则很容易观察到活性的明显丢失。

溶液状态的稳定性问题

虽然抗体、酶以及其他诊断用蛋白在水溶液中处于天然的机能状态，但这并不是它们最稳定的状态。在溶液中，有众多的因素影响蛋白的活性功能：

- 蛋白质分子变得更加柔韧易折，从而倾向于改变构象。
- 蛋白质分子和其他分子以及容器壁的碰撞频率增加了。
- 微生物污染的可能性增加了。
- 对温度升高和蛋白浓度降低造成的影响更加敏感。
- 蛋白质更易被氧化。

通常来说，溶解的蛋白质分子在较低的温度和较高的蛋白浓度下最为稳定。在刚好高于冰点的时候，蛋白质分子拥有较少的动能，而这些动能是蛋白质“摆

脱”其能量最低的功能构造所必需的。（前面的表述可能不是很好理解，解释如下：蛋白质的自然折叠结构是自由能最低的构象，若要改变蛋白质的构象，比如蛋白变性，则需要能量来实现；因此蛋白在低温下能量较低，也就不容易变性。）在溶液中，部分蛋白活性的损失是由容器壁的吸附、寡聚酶的解聚以及氧化剂、水解酶、微生物等痕量污染物对蛋白质的灭活等原因造成的，而在越高的蛋白浓度下（毫克每毫升范围或更高），损失的蛋白活性占蛋白总活性的比例也就越低。

正确的 PH 值的重要性

蛋白质分子的带电基团通过静电或者螯合键进行相互作用，从而使蛋白的功能构造稳定。^{7,8}众所周知，催化

酶对 PH 值或者氢离子浓度很敏感，这也使得几乎所有使用的缓冲液都要求维持酶溶液所需要的 PH 值。也许受到较少广泛关注的是酶对缓冲离子化学性质的敏感性。

以下数据来自一项对酶-抗体复合物的稳定性研究，其中复合

物溶解在具有不同 pH 值的缓冲液和盐溶液中，另外溶液中还含有 Stabilzyme Select conjugate stabilizer (SurModics Inc.)。这些数据通过酶联免疫直接测定法得到，即将羊抗兔抗体-辣根过氧化物酶偶联物用于检测新近包被兔源抗体的平板上。

试验中测试了 5 种 pH 值。虽然其中一些 pH 值明显超出某种特定缓冲液的缓冲范围，但仍纳入了不同缓冲液在这些 pH 值下的影响结果进行直接对比。受测试的 5 种缓冲液是：

- 柠檬酸盐
- 甘氨酸

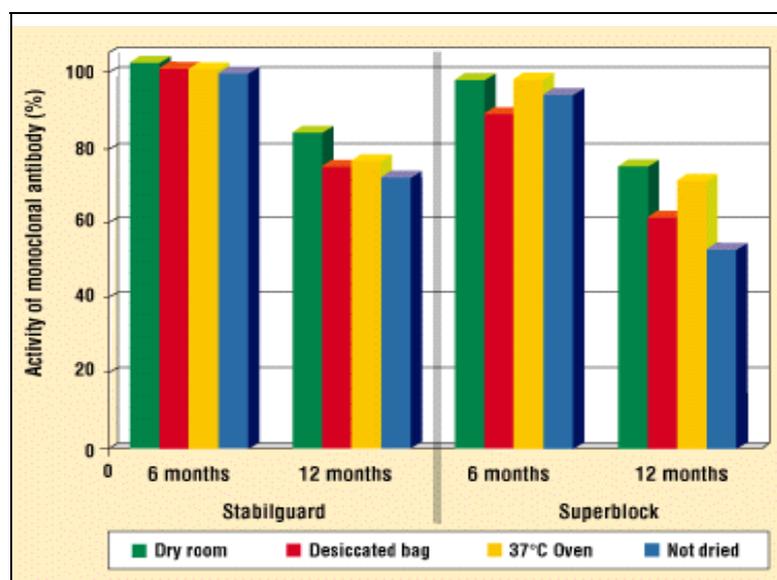


图 4. pH 值对稳定性的影响。进行试验的溶液包括 HEPES (a)、citrate (b)、MOPS (c)、glycine (d)、Tris (e) 和 saline (f)，并都与 Stabilzyme Select conjugate stabilizer 按 1:1 混匀，然后保存在 37° C。每一条曲线图表示受测试溶液相对于保存在 4° C 的对照溶液所保留的活性百分比。

- N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES)
- 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)
- Trizma Base (tris[hydroxymethyl]-aminomethane) (Tris).

第六种受测溶液为生理盐水。

这些缓冲液浓度均配制为 0.1M, 每种分成 5 份, 调节得到 5 个不同的 pH 值。然后这些缓冲液和生理盐水分别与另外准备好的无缓冲能力的 Stabilzyme Select 溶液按照 1: 1 混合。再测一次 pH 值, 若有变动则调回所需值。接着酶-抗体复合物用上述溶液按 1: 20000 稀释后分别在 4° C 和 37° C 保存。

在测试酶联免疫测定的活性前, 先将上述溶液平衡到室温。在每个测试时间点都要对 pH 值进行测定。虽然大多数溶液会保持在原始 pH 值的 0.2 个单位浮动范围内; 但在 37° C, 当柠檬酸盐溶液、甘氨酸溶液和生理盐水的原始 pH 值高于 7.0, 它们的 pH 值会随着时间迅速降低。在实验结果中, 在 37° C 保存的酶-抗体复合物最后保留的活性表示为对应的 4° C 保存的酶-抗体复合物保留活性的百分比。(见图 4)。

实验结果显示, 抗体-辣根过氧化物酶的活性回收率无论是在不同缓冲离子的溶液中, 还是在每种溶液的不同 pH 值中, 均有显著不同。HEPES 仅仅在所有测试的 pH 值中最低的 6.0 时才起到有效的稳定作用, 而柠檬酸盐在任何 pH 值时都无效。然而, 柠檬酸盐的效果与 pH 值的关系并不大, 也许造成其稳定作用微弱的原因是它会通过螯合作用竞争结合蛋白复合物稳定所需要的多价阳离子。虽然不是所有的 pH 值水平, 但其他的溶液有效地稳定了复合物的活性, 使其在 30 天后的活性回收率达到 75% 甚至更高。

MOPS 在 pH 值 6 到 7 之间具有最好的活性保持效果。甘氨酸、Tris 和生理盐水在 pH 值 6 到 7.7 之间具有最好的活性保持效果。意想不到的是, 生理盐水混合 Stabilzyme Select 后具有的稳定效果和其他缓冲液在 pH 值 6 到 7.7 之间时的稳定效果一样, 甚至在 pH 值 8.5 时效果更好。这项研究证明, 对于一个检测体系而言, 选择最适缓冲液和最适 pH 值同样重要。

稳定性问题的其他因素

蛋白来源、纯化方式以及化学偶联的方法都能影响蛋白试剂的活性和稳定性。例如, 碱性磷酸酶的来源就对复合物的稳定性有重大影响; 就溶液的稳定保存而言, 将所需蛋白与对蛋白有伤害作用的酶(如水解酶、氧化酶)从原料中分

离是非常重要的；若要保证溶液稳定，就必须去除或者灭活这些有害酶以及能产生这些酶的微生物。

在合成复合物时，大量的化学反应步骤已被证明能使酶和抗体分子之间形成共价键。其中的一些方法对某些酶-抗体复合物的稳定负面影响较低。如果一种酶联复合物丧失了酶联检测的活性但仍保持有酶活力，那么另外选择一种化学偶联方法也许能解决这个稳定性问题。

其他操作问题

有时候，被认为是稳定性方面的问题实际上是由其他变数造成的蛋白量不足。也许就是一个很明显的稀释错误。生产商必须弃用那些有可能吸收蛋白或者抑制蛋白活性的容器材料，例如未处理的聚苯乙烯、聚砜、聚碳酸酯或者玻璃。聚乙烯和聚丙烯是比较可取的容器材料。有色酶和其他含有氧化金属离子的蛋白溶液不能暴露在阳光下。在保存和酶检测反应阶段温度控制不好很容易引起变化。在酶活力测量阶段，定时上的疏忽也是一个影响因素。此外，就如之前提到的那样，在每一步操作步骤之间，若使包被的孔、试管或者微球变干，也会产生变数。

结论

在免疫诊断所用的原料中，主要部分都是抗体、酶、水溶性蛋白。为了保证诊断检测的有效期和精确性，这些原料蛋白必须保持稳定和有效。

除非蛋白得到适当的保护，否则干燥过程有可能使蛋白发生严重的变性。包被有蛋白的部件的干燥和保存方式同样非常重要。保存在密封、干燥的环境将有助于确保长时间的稳定。

而保存在溶液状态，潜在的危害因素将会增多。比如很简单的一个方面，pH值或者缓冲溶液的改变就能够使蛋白在溶液中的稳定性明显不同。

使某种溶液状态稳定的方法并不一定就对另一种溶液有效。商品化的可用的稳定剂专注于特别的稳定效果，因此测试大量的稳定剂产品或许就能找到针对某种需要的非常有效的稳定剂。

在生产过程中的其他因素也有可能影响产品的性能。这些因素包括原料来源、稀释和定时错误、温湿度不合适、曝光和容器材料等。最后，一个看似最基本的因素，当使用商品化的稳定剂时，一定要确保符合包装说明。

参考文献

1. A Sali, E Shakhnovich, and Martin Karplus, "How Does a Protein Fold?" *Nature* 369 (1994): 248 - 251.
 2. IM Klotz, "Protein Conformation: Autoplasmic and Alloplasmic Effects," *Archives of Biochemistry and Biophysics* 116 (1966): 92 - 96.
 3. T Asakura, K Adachi, and E Schwartz, "Stabilizing Effect of Various Organic Solvents on Protein," *Journal of Biological Chemistry* 253 (1978): 6423 - 6425.
 4. VP Torchilin, "Enzyme Stabilization without Carriers," *Enzyme and Microbiological Technology* 1 (1979): 74 - 82.
 5. MI Kanehisa and TY Tsong, "Local Hydrophobicity Stabilizes Secondary Structures in Proteins," *Biopolymers* 19 (1980): 1617 - 1628.
 6. SK Burley and GA Petsko, "Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization," *Science* 229 (1985): 23 - 28.
 7. FH Arnold and J-H Zhang, "Metal-Mediated Protein Stabilization," *Trends in Biotechnology* 12 (1994): 189 - 192.
 8. EC Dawson, JDH Homan, and BK VanWeemen, Stabilization of Peroxidase, U.S. Pat. 4,228,240, October 14, 1980.
 9. HU Bergmeyer ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. (Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie, 1983).
- Patrick E. Guire 博士是 SurModics 公司(Eden Prairie, MN)的首席副总裁、首席科学官员和创始人之一。

加工工艺篇

湿气处理

Stefan Dick and Jean Thomas Woynicki 文

keling2006 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原文作者。)

在新型免疫诊断产品的开发阶段，为保持蛋白质试剂在干燥和溶解状态下稳定而进行的实验至关重要。

对于 IVD 厂家来说，保持产品的质量和可信度是至关重要的。为确保他们生产出高质量的产品，公司实行严格的质量保证体系，关键步骤符合国际质量体系标准，如原材料采购、生产、软件验证。另一个同样重要的任务是确保在产品生产出来后一段长时间内，最终用户都能享受到高质量产品。公司为保证产品质量，在运输、仓储和产品使用过程中选择了合适的包装材料和方法。

包装为 IVD 制造商提供四个方面作用：保护（例如湿度、光、机械稳定性）、分装、安全性（幼儿防护、明显损害）和信息标识。虽然这篇文章主要描述干燥剂作为包装防护系统的组成部分，但也提到了不同包装方法的其他功能比较。

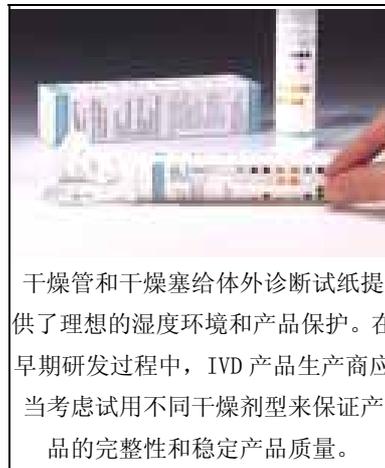
潮湿的危害

水分对 IVD 产品损害是多方面的，主要是减少保质期和质量。例如，实验表明水分对金标快速测试的可靠性有负面影响。除了破坏标记和通过液化抗体使捕获抗体失活外，储存期间过量水分可能导致糖结晶的产生，同时造成差的标记物释放。

潮湿可能也影响使用在侧向层析诊断技术上的粘合剂的老化、迁移。事实已经证明，这种粘合剂老化对保质期有重大影响寿命。

潮湿导致的老化可能影响膜的组分、影响膜固定效果、且水影响了通过氢键连接的蛋白和膜结合结构。

最后，缺乏防潮控制，无菌的 IVD 系统会由于微生物的活动而被破坏。



干燥管和干燥塞给体外诊断试纸提供了理想的湿度环境和产品保护。在早期研发过程中，IVD 产品生产厂商应当考虑试用不同干燥剂型来保证产品的完整性和稳定产品质量。

干燥剂种类

目前，有三种干燥剂常用于 IVD 产品的防潮：硅胶，分子筛和干燥土。每种干燥剂都在不同的温度和湿度中显示不同的特性（见表 1）。

• 硅胶

在这些干燥剂中，硅胶是最普遍被使用在 IVD 产品中的。它是一种氧化硅（ SiO_2 ）的人工无定性态产品，它是由众多能够有效结合水分子的中空孔组成。温度恒定测试时，在低湿度下硅胶的吸水能力相对较低，但随湿度增加而提高（见表 1）。由于硅胶在

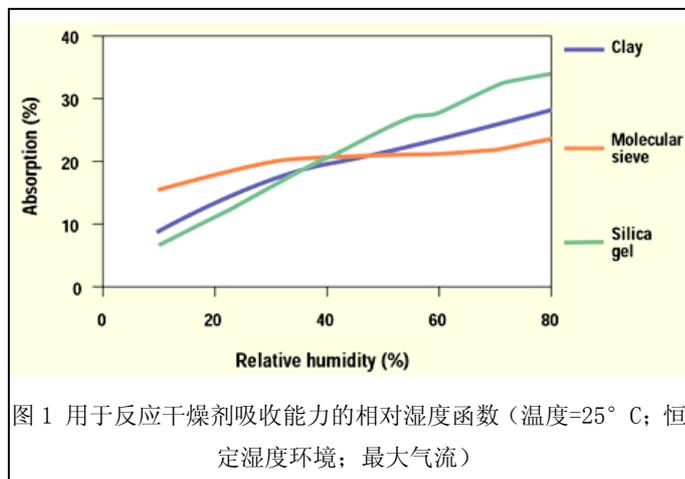


图 1 用于反应干燥剂吸收能力的相对湿度函数 (温度=25° C; 恒定湿度环境; 最大气流)

低湿度时反应慢，高湿度反应快，因此，它能在一个封闭环境内（如瓶子、袋子、管子）缓慢降低湿度，但它暴露在高度的潮湿环境中会快速的丧失干燥能力（例如，分装过程中）。

• **分子筛** 在同等当量下，分子筛比等量硅胶贵 25—50%，它是通过公式 $M_{x/y}^y [Al_x Si_{1-x} O_2]$ 合成的晶沸石。在公式中 4A-沸石的金属离子是钠离子，它是 IVD 产品最常用的分子筛。这些 4A 分子筛包含一个相互连接的微孔组成的网络，其孔径大小均为 4 Å (0.4 nm)，即使在相当低的湿度他们也能高效吸收水分。事实上，分子筛的吸收能力不受恒定温度下的相对湿度的影响。分子筛在高低湿度下都反应快速，因此他们能快速的把环境湿度降低到相当低的水平，但他们在缺少控制的生产中难以处理。

• **干燥土** 相对来说，干燥土较为便宜的选择，在相同量下它比硅胶便宜 5—15%。这种干燥剂来自天然的斑脱土，它的主要成分是层状的矿石钙高岭土，即 $Ca_{0.16} [Al_{1.68} Mg_{0.32} (OH)_2 (Si_4 O_{10})]$ 。水分子主要与细黏土晶体的阳离子夹层结合，随着湿度升高它的吸水性能提高，而且在相对湿度 30% 以下时它的吸水性能比硅胶好。和在高湿度下一样，在低湿度下黏土反应也相对较慢，它只能缓慢降低封闭空间内的湿度，但它比较容易处理。另外，干燥土的密度比硅胶或分子筛粒高 30%，因此他们会占用更小的空间。

干燥剂产品

为适应不同行业的要求，使用特殊材料将干燥剂制作成各种形状和大小。厂商应注意据其性能、加入过程、包装特性和成本考虑等因素选择适当的干燥剂形状和产品种类。在 IVD 工业中，干燥剂产品有干燥剂袋、干燥剂罐、干燥剂片、干燥剂帽、干燥剂塞和多聚干燥剂等(见图 3)。

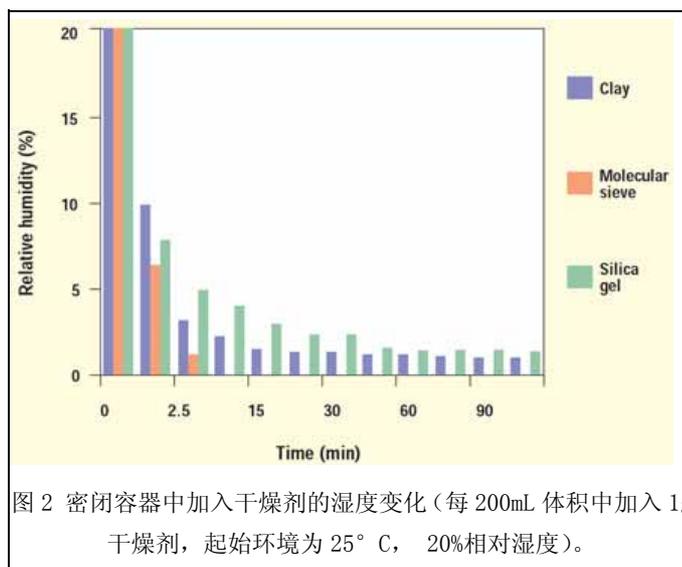


图 2 密闭容器中加入干燥剂的湿度变化 (每 200mL 体积中加入 1g 干燥剂, 起始环境为 25° C, 20%相对湿度)。

下面是每种干燥剂产品的说明。

• **干燥剂罐** 干燥剂罐被认为是在制药工业用的干燥剂的金标准。在美国, 最受欢迎的是尺寸 13.9X17.8mm, 13.9X25.7mm 和 19.4X15.8mm。厚度最薄 3.6mm, 直径最大为 62.8mm 的干燥剂罐也同样受欢迎。除了可以容纳重量在 0.25g 和 27g 之间的干燥剂外, 干燥剂罐是为了高速加入产品、降低污染几率和防止机械堵塞而特殊设计的。

• **干燥剂包** 干燥剂包可

形成单包或分切后进入包装带内长条。而这些包能容纳 0.25g 到 10g 重的干燥剂, 多种表面材料用来生产实际的干燥剂包, Gdtii (聚酯、聚烯烃无纺布)、Tyvek (spunbonded polyolefin) 是美国最常用的材料。每种表面材料不同程度的影响到干燥剂包的外观、封口力、吸收率、粉尘特性。IVD 厂商应特别考虑粉尘特性, 有报道干燥剂粉尘污染会影响测试条的可靠性。



图 3 体外诊断用的干燥剂产品 (顺时针方向: 干燥管、干燥塞、干燥罐、干燥包和干燥片剂)

• **干燥剂片** 干燥剂可制成药丸几乎任何大小和形状, 以适应 IVD 装置包装需求。添加这些干燥剂相对容易, 可以满足自动化高速生产的要求。一些 IVD 厂商发现用干燥剂片替代干燥剂袋能让他们自己包装过程大大加快。

•**干燥剂帽** 干燥剂帽通常在有旋帽的刚性容器中使用。在旋帽中直接填充干燥剂，这样干燥剂不会占用容器多余的空间，并且不必在包装过程中添加多余的设备来添加干燥剂。通常为一个特殊包装设计一个干燥剂帽使它能够精密的和容器匹配，因此，不能认为它是不用定制的项目。

•**干燥剂管和干燥剂塞系统** 干燥剂管和干燥剂塞系统是最先进的 IVD 测试条防潮包装解决方案。它与干燥剂帽相似，干燥剂被填充到帽内，不占用任何额外的容器的空间，而且它不需要多余的干燥剂添加系统。干燥剂和保护功能塞也带有儿童保护和 tamper evidence 的功能。

•**干燥剂填充的多聚体** 另一个防潮措施是将干燥剂整合到多聚材料中，而这些多聚材料就是测试试剂盒中的保存管所使用的管材。这些保存管和设备外围是一层防水层，内层是干燥剂填充的多聚材料。可以通过选择不同的塑材、干燥剂种类、干燥剂数量和活性来调整防潮能力和速率。特别要注意预先选择一个安全的防潮系统使它的干燥剂成分不会与测试条反应。在保存期内，如果添加物有可能产生水汽，测试条和保存管的直接接触和管内的空气的存在会出现污染。另一个可能的边际效果是粘合剂与膜的产生的反应和蛋白质的附着。

品质参数

干燥剂厂家通常对他们产品的吸收量和残留水分量加以详细说明。干燥剂暴露在特定和静止条件下通过测量干燥剂重量的增加量，将其换算为干燥剂原来重量的百分数就是干燥剂的吸收量。残留水分量是加热干燥剂使其达到复性温度并测量重量的减少量，将其换算为干燥剂原来重量的百分数就是干燥剂的残留水分量。

表 I 不同干燥剂在高湿度和低湿度下的反应速率
(本表显示了在恒定温度和湿度条件下干燥剂吸收 5% 的水分量所需的时间)

干燥剂	25° C, 10%相对湿度 (小时)	30° C, 60% 相对湿度 (小时)
粘土	48.0	3.5
硅胶	35.0	1.0
分子筛	12.0	1.0

在多数情况下，这两个参数是多余的。厂家对干燥剂的同一个品质参数进行测量，因为吸收量的减少等于残留水分量的增加。当干燥剂使用者要建立潜在的厂家或比较不同厂家的品质参数时，他们不应仅参考厂家提供的数据。他们还应

该确认厂家的生产工序。例如，残留水分量，特别时分子筛产品的残留水分量，对测试温度和工序的改变特别敏感。

选择正确的解决方案

对于干燥剂的选择最终要基于对 IVD 产品保护的特性。干燥剂的关键参数包括吸收量、吸收率、和相对湿度，它代表包装保存产品的能力。另一些需要考虑的重要因素是包装对重量、尺寸、形状的要求；粉尘限制；工序限制；造价。

吸收量 吸收量 (M_{total}) 是包装初始湿度 ($M_{initial}$) 与在反应架保存期期间流经包装的水量 (M_{inflow}) 的和。包装初始湿度 ($M_{initial}$) 是包装上方空间的空气湿度 ($M_{headspace}$) 与在产品中的有效残留水分量 (M_{rm}) 的和： $M_{total} = M_{initial} + M_{inflow} = (M_{headspace} + M_{rm}) + M_{inflow}$

$M_{headspace}$ 是在包装作业环境中经过包装上层空间绝对量和空气湿度。这对于总湿度通常是微不足道，因为在包装上层空间在设计包装或进行包装的低湿度条件下做到最小化。

M_{rm} 是在保存期间可以从干燥剂释放出的水分。这取决于产品生产出来后的总湿度、从产品释放的能量，和释放动力学。产品的残留水量通常在 110°C 测定并测定其上限。

M_{inflow} 是在保存期条件下的期望保存天数内包装的水流入量 (mg/day)。这个因素非常依赖于包装的种类 (如软包装、硬包装) 和所使用的包装材料。例如，多种软包装材料表现出不同的水气迁移率 (WVTRs；参考 Table II)。

从这些数据，只能大概估计进入软包装的水分量。原因是包装部分最多是以点状的形式侵入水分，这些不包括纯材料的数据。另一个水分来源是目前还不确定的因素，WVTRs 被报道它的条件与保存期间的条件不相似因此必须重新计算特殊的需要。

另一方面，硬包装，如保存管和塞系统，对水分侵入有优势，这种水分侵入不像 WVTR，它需要提供商特别提供并且不需要多余测试

相对湿度 为了计算用于吸收全部水分 (M_{total}) 的干燥剂的最小用量，必须知道在保存期内包装中允许的最大相对湿度。所需干燥剂的用量是 M_{total} 和干燥剂在允许最大相对湿度下的吸收量的商。

例如，如果 M_{total} 是 0.1g 并且在允许的最大相对湿度 20% 时干燥土的吸收量是 13%，那么最少的干燥土用量是 0.78g (0.1/0.13)。在同等情况下需要 0.87g

的硅胶或者 0.55g 的分子筛。必须记住，这些计算只有在使用单一干燥剂的时候是有效的。

我们也要考虑到干燥剂提供商常常强调的残留水分的影响。在多数情况下，足够找到最接近标准的干燥剂产品尺寸。在以上的例子中，1g 干燥土，1g 硅胶，或者 0.75g 分子筛能够满足需要。

另外，稳定的测试常建立在保质期内不可能超过的最大湿度情况下。检测是否在保存期间存在最低湿度是同样有用的，这样可以避免产品丧失水分造成的问题（例如改变膜和粘合剂寿命）。例如，在封闭空间内分子筛能将湿度降低到 0，而硅胶和干燥土会在空气和产品中保留小量的残留水分。因此，了解最小和最大湿度的保持能进一步改善对于干燥剂的正确选择。

吸收率 另一个相关参数是吸收率。在封闭空间内分子筛能在 5 分钟将相对湿度从 20 降低到 0%；干燥土能在 20 分钟内吸收水分；硅胶需要 60 分钟（见图 2）。然而，在多数情况下，这些时间的不同是不相关的，因为产品包装不对湿度如此敏感以致他们在 15 分钟内受到分子筛和干燥土的不同吸水能力。

在真实的保存条件下，包装的产品含有一些水分，或残留水分，干燥剂吸收这些水分增加了反应时间。在多数情况下，从产品中释放水分的动力比干燥剂吸收水分的动力慢，因此，释放反应是全部除湿的速率限制过程。这个因素消除了不同干燥剂反应速度，并导致反应时间从几天几小时变为几分钟。

处理限制 如同以上的讨论，在湿度提升期，不同干燥剂表现不同的反应速度，另一个影响湿度的因素是干燥剂产品在包装线上的暴露。在这个阶段水分会降低干燥剂的吸收量。因此这些吸收量的损失必须被考虑到计算干燥剂用量时，或者干燥剂在能控制湿度的条件下分装。例如，分子筛小包很难处理并且需要在湿度控制的条件下分装。

另外，选择干燥剂产品决定了在暴露时吸收量的损失。一般来说，干燥剂罐、干燥剂帽和干燥剂塞的反应比干燥剂片和干燥剂包慢。

湿度指示器 作为附加特征，包装的 IVD 测试条能加入湿度指示器。这个指示器允许消费者读取包装中的湿度并且能够指示测试条是否可以被使用或应该丢弃。定制的指示器能被设计为在产品或包装组合的特定湿度中改变颜色。指示器同时也包含附加的消费信息和指示，并因此增加了包装的信息价值。

总结

对水分敏感的 IVD 产品的有许多防潮措施。在这个包装过程中，干燥剂是其重要的组成部分。干燥剂的选择应在包装研发的早期加以考虑。这样，早期的计划可以使 IVD 厂家和干燥剂提供商根据性能、样式、市场需求和全部费用找到一种最适合的包装解决方法。完全的费用比较包括包装材料费用和与包装速度，潜在停工期和全效率相关的研发加工费用。

参考文献

1. J Chandler, N Robinson, and K Whiting, "Handling False Signals in Gold-Based Rapid Tests, " *IVD Technology* 7, no. 2 (2001): 34 - 45.

2. K Jones, and A Hopkins, "Effects of Adhesive Migration in Lateral-Flow Assays, " *IVD Technology* 6, no. 5 (2000): 57 - 63.

3. K Jones, "Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 1: Principles, " *IVD Technology* 5, no. 2 (1999): 32 - 41.

4. "Desiccant Tablet Boosts Throughput 3000%, " *Pharmaceutical & Medical Packaging News* 7, no. 5 (1999): 38 - 41.

5. "Desiccant Tablet Helps Streamline Production, " *Pharmaceutical & Medical Packaging News* 9, no. 3 (2001): 94.

作者简介：Stefan Dick博士，产品经理；Jean Thomas Woynicki主办会计主管，均供职于 Süd-Chemie Performance Packaging (Albuquerque, NM)。联系方式分别为：
sdick@sud-chemieinc.com 和jwoynicki@sud-chemieinc.com。

加工工艺篇

硝酸纤维素膜吸附蛋白的常见问题处理

第一部分：基本原理

Kevin D. Jones 文

phy128 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。)

基于膜的检测试剂研发人员应该严格考虑影响蛋白质在硝酸纤维素膜上结合众多因素，其中包括原材料的固有属性和处理过程等。

随着胶体金标记技术的发展、研发人员对胶体金快速检测技术深入研究，市场上基于膜的快速免疫层析检测产品的种类迅速增多。

虽然免疫层析产品的包装设计种类繁多，实际上目前主流的商品化检测试剂盒主要下面两种形式。最常用的检测形式为侧向层析

或者层析定量，这种检测形式通常应用于诊所或者由直销客户检测。另一种检测形式为竖向斑点渗滤，该检测形式需要较强的操作技巧，仅限于研究使用。

不管试剂采用那种检测形式，灵敏、可重复的检测试剂的生产需要试剂生产商采用有效的途径制备检测线工作液。快速诊断试剂生产商经常对如何优化检测线相关的文章非常感兴趣。这些文章可以有助于研发人员涉及关于蛋白质固着于硝酸纤维素膜基本原理的讨论，并对研发人员在开发免疫层析试剂中面临的常见问题给予强调。由于关于蛋白质吸附于 NC 膜的问题普遍存在于侧向层析，因此这篇文章重点讨论这方面的问题。

蛋白质吸附的重要性

在免疫层析检测中，蛋白质固着于 NC 膜作为待测样本的捕获试剂。由于检测结果完全取决于捕获试剂在膜上达到良好的吸附效果，因此蛋白质在膜上均一、良好的吸附对检测结果非常重要（见图 1）。

自从 NC 膜第一次应用于蛋白质吸附以来，已有相当多的关于蛋白质吸附于 NC 膜的研究，但蛋白质吸附

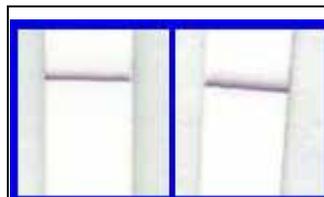


图 1 依靠在膜上适当的结合捕获试剂，用试纸条检测样本可以获得清晰、明显的结果。

于 NC 膜的确切作用机理仍然不能确定。虽然多种作用力在结合中起到作用，尤其比如疏水力、氢键、静电作用，但是每种作用力的重要性和明确的效果仍然让人难以琢磨。目前有两种比较合理的作用模式。

第一种模式认为，蛋白质最初通过静电作用被吸附到 NC 膜表面，而长期的结合作用是通过氢键和疏水作用完成的。虽然这一原理难以证明，但与已发表的文献实验结论一致，也是最为接受的作用机理。

表 2 在这几个例子中，样品检测结果的检测线存在明显的蛋白质结合问题。

第二种模式认为，蛋白质首先通过疏水相互作用结合到 NC 膜上，通过静电力牢固地与 NC 膜结合则。该结合模式同大量已发表的文献

结果一致，然而静电作用机理对于采用干燥或乙醇吸附方法到达的蛋白质长期稳定的吸附于 NC 膜上无法提高合理的解释。

不管蛋白质结合的作用力如何达到平衡，研究人员在优化蛋白质吸附于特定的 NC 膜时，必须综合考虑所有影响蛋白质吸附的作用力。这一观点不可避免的影响着试纸条板材的选择及其处理工艺。例如，如果产品开发人员选用可以极度降低静电相互作用或者疏水相互作用的缓冲液，那么蛋白质的吸附能力则剧烈的降低。同理，蛋白质点膜后充足地干燥对于确保蛋白质长期稳定地固着于 NC 膜非常重要。

生产商选用的材料能够有效地将蛋白吸附于 NC 膜上。影响蛋白质吸附于 NC 膜的材料通常有 3 种类型：非特异性的蛋白质、影响静电相互作用以及疏水相互作用的物质。常见的能够降低蛋白质结合的物质包括竞争蛋白质结合位点的其他蛋白，如 BSA、动物血清，干扰氢键的形成物质（如甲酰胺、尿素），影响疏水作用形成的物质（如 Tween、Triton、Brij）。人工合成的结合物比如聚乙烯醇、聚乙二醇以及聚乙烯吡咯烷酮也可以影响蛋白质的结合，它们的作用机理可能是抑制一个或者多个蛋白质与 NC 膜结合的共同作用的结果。

如果 NC 膜上结合的蛋白量不足或者蛋白结合力不够强，就会出现相当多的问题，在检测结果的检测线上非常明显（见图 2）。如果膜上结合的蛋白量太低，那么

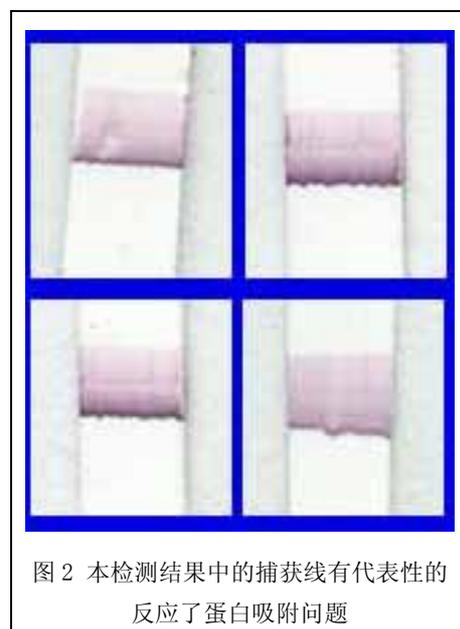


图 2 本检测结果中的捕获线有代表性的反应了蛋白吸附问题

在结果中检测线显色较弱而且检测灵敏度降低（见图 3）。如果蛋白不能牢固的吸附于 NC 膜，那么在蛋白吸附于 NC 膜以前发生扩散，从而导致检测线较宽、显

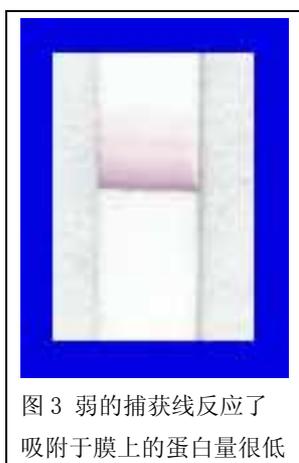


图 3 弱的捕获线反应了吸附于膜上的蛋白量很低

色较弱而不是鲜艳而清晰，使检测结果难以解释。在极端条件下，如果蛋白与 NC 膜的物理吸附作用太弱，流过的蛋白检测物和表面活性剂溶液可能将固着的蛋白从 NC 膜上洗掉，从而显示较宽或者根本不清晰的检测线，难以解释检测结果。

图 4 流过的待检蛋白和表面活性剂溶液洗掉 NC 膜吸附的捕获蛋白导致检测结果出现扩散的检测线。

体外诊断试剂研发人员经常遇到上述问题，而且这些问题明显地延长了免疫层析检测试剂的研发周期。为了了解如何解决上述问题，研究人员首先应该牢固的掌握影响蛋白与 NC 膜结合的各种因素，包括材料的固有属性及其检测前的处理过程。本文的第一部分就这些问题进行讨论，第二部分主要介绍在技术上如何解决这些问题（待发表于 IVD 技术杂志）。

影响蛋白质吸附的因素

当研究蛋白质捕获剂结合于 NC 膜时，研发人员应该考虑下面五个影响蛋白质结合作用机理的每一个关键因素。

- 溶解捕获蛋白的工作缓冲液；
- 用来固着捕获蛋白的 NC 膜；
- 捕获蛋白自身；
- 将捕获蛋白点样于 NC 膜的系统；
- 捕获蛋白点样时的环境湿度。

虽然很多研发实验室对于免疫层析检测中使用的工作缓冲液和膜的特性进行了充分的研究，但他们不可能全面的研究或优化他们使用的系统和捕获试剂。这些忽略的步骤通常由于在开发之前就已经考虑恰当，因此在开发中很少有机会进一步调整。由于疏漏了对那些因素优化，研发人员常常集中精力优化他们认为必须优化的方面。

捕获剂 随着检测项目的不同，作为捕获剂的蛋白质各不相同。即便捕获剂差异的稍微，也没有一个捕获剂与另外的捕获剂完全相同。不同的蛋白捕获剂对不同膜的吸附能力不同，或许这一因素至关重要（见图 5）。单克隆抗体作为较均一

的蛋白捕获剂，优化与 NC 膜的结合过程较为简单，而多克隆抗体由于含有针对大量不同的抗原决定簇的抗体，不同抗体的最佳结合条件可能稍微不同，从而导致蛋白与膜结合条件的优化过程较为复杂。比如 IgA、IgM 存在结构或者空间位阻等因素，其与膜结合条件的优化过程较为困难。比如 BSA、A 蛋白以及 G 蛋白由于化学性质或者分子太大较易吸附于固相载体，从而非常难将其吸附于 NC 膜。

仪器设备 捕获剂喷涂系统仍然存在某些问题，大多数商品化可用的（捕获剂喷膜、划线）仪器设备各有利弊。

其可变参数包括能否喷涂给定的体积，能否触及条、垫或膜，喷涂速度以及喷涂后处理过程。体外诊断试剂生产商需要的最佳解决方案即为找到能够最有效地解决实际生产过程中面临的问题，比如原材料问题、生产能力问题。优化其他因素也可以优化特定的捕获线喷涂设备。

环境湿度 点膜时的环境湿度严重影响捕获线的质量，尤其对喷膜系统影响严重。如果空气湿度太低，则 NC 膜上聚集静电荷，从而导致蛋白质喷涂于 NC

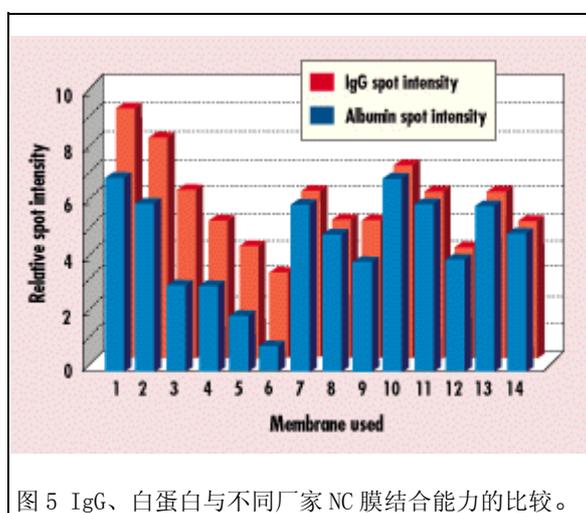


图 5 IgG、白蛋白与不同厂家 NC 膜结合能力的比较。

膜表面时容易产生斑点，NC 膜表面容易产生疏水斑。如果空气湿度太高，导致 NC 膜对捕获蛋白的毛细作用加强，从而容易引起捕获线变宽或者扩散。通常情况下，最佳的点膜环境相对湿度应保持在 45-65%。为了确保原材料的均一性，点膜前应根据相应试验确定的最佳平衡时间将 NC 膜在工作环境中平衡。

工作缓冲液的优化 由于蛋白质捕获剂千差万别，不同蛋白的最大结合量工作缓冲体系各不相同。影响点膜工作缓冲液的重要因素有两个。

- 蛋白质的可溶性（即用于吸附于 NC 膜的蛋白量）；
- 蛋白质分子的稳定性（即倾向于聚集或溶于水）

为了确保足够的蛋白喷涂捕获线，首先必须将捕获蛋白溶解于点膜缓冲液，而点膜缓冲液维持一定的离子浓度可以确保蛋白的可溶性。尽管点膜工作液具备

一定的离子强度有助于控制捕获剂的 PH 值，但也可以干扰蛋白质结合的静电相互作用。因此，确定维持足量的捕获蛋白浓度的最低可能离子强度至关重要。

如果特定浓度的蛋白质分子在溶液中稳定，那么就会溶解于溶液中。但是如果它的能量状态有利于形成固体，那么吸附到 NC 膜上的蛋白量多于稳定溶解在溶液里的蛋白量。采用破坏稳定剂或者沉淀剂能够诱导产生这种能量状态，但是如果诱导过度也可能引起其它的问题。如果蛋白在点膜以前沉淀，那么整个试剂系统就高度不稳定且几乎完全不可重复性，导致剩余的吸附到 NC 膜上的溶解蛋白量剧烈减少，而且沉淀物也可造成诸如堵塞喷涂设备管道或者 NC 膜微孔等问题。在某种情况下，点膜过程中为了达到适量的蛋白吸附必须将蛋白质处于不稳定状态，有些情况也有例外。

上述分析表明，通过调整蛋白喷涂工作缓冲系统的属性能够改变蛋白质与 NC 膜的结合作用，其中核心属性涉及缓冲液的离子强度、酸度及所用沉淀剂浓度。

离子强度 在给定的离子强度范围内，蛋白质溶解度随着工作缓冲液中盐浓度的增加按比例增加。为了降低溶液中捕获蛋白分子的稳定性，溶液的离子强度应该尽可能低，这样可以增加蛋白质与 NC 膜结合的速度。同时，研究人员也应该注意，高浓度盐能够引起蛋白沉淀，而且喷膜后的干燥过程中大量的盐能够干扰检测试剂的稳定性和灵敏度。

酸度 点膜工作液的 PH 值相当显著的影响蛋白质与 NC 膜的结合效果。通常蛋白质在等电点时的溶解度最低的。因此，研究人员为了降低溶液中捕获蛋白分子的稳定性，将捕获蛋白的等电点作为理想的喷膜工作缓冲液的 Ph 值。

共沉淀剂 研究人员通常选择添加不稳定剂或共沉淀剂降低溶液中蛋白质的稳定性来调整喷膜工作缓冲液。IgG 的 Fc 区和 F(ab) 区对共沉淀剂的稳定性不同，而且 Fc 区结构更可能被共沉淀剂降解，部分不稳定的 Fc 区导致更多在正常情况下隐藏在蛋白质内部的疏水基团暴露。因此，不管那种蛋白质与 NC 膜的结合机理被接受，由于采用共沉淀剂增加的蛋白质疏水性将提高蛋白质与 NC 膜的结合能力。

最常用的共沉淀剂时醇类，醇类有许多理由值得推荐。醇类的存在有助于 NC 膜的重湿润，减少 NC 膜可能带有的静电，而可以降低溶液中的蛋白质稳定性。在基于膜的免疫分析中，3-5%的甲醇可以极大地提高检测性能。

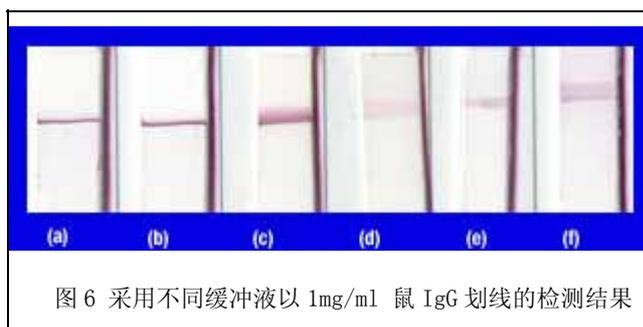


图6 采用不同缓冲液以 1mg/ml 鼠 IgG 划线的检测结果

在几年前，将醇类提高蛋白质与固相载体的结合性能应用于 ELISA 微孔板生产中，而现在这方法已经作为标准的操作规程。脂肪醇对 NC 膜结合蛋白的影响发表于 1980 年，加 1%异丙醇作为固定剂在 western blotting 实验广泛应用。

虽然其他物质如硫酸铵等作为沉淀剂有时也有很好的效果，但是它们通常不如醇类，这类型的试剂浓度稍微的变化都会严重影响蛋白质的沉淀效果。鉴于这种原因，通常不会使用醇类以外的其他共沉淀剂。

综上所述，新产品开发的喷膜工作缓冲液为：10mM PH7 磷酸缓冲液+3%甲醇。虽然这种缓冲液不是所有蛋白质的最佳工作液，但它为开发过程提供了一个极好的起始点。

膜对蛋白质结合的影响

在快速诊断检测中，NC 膜在三个方面显著影响蛋白质的结合。

- NC 膜的孔径
- 膜的后处理
- 膜的类型

由于作为捕获剂的蛋白质种类繁多，没有一种 NC 膜作为最佳 NC 膜适合于任何快速检测反应。不同类型的 NC 膜与蛋白质的结合能力差别较大（见图 5），这就意味着任何一个新产品的开发都必须重新筛选膜。另外，对膜等额外优化可能会进一步提高快速检测试剂的性能与重复性。

孔径 研发人员在侧向免疫层析中应谨慎的对待 NC 膜供应商提供的 NC 膜标称孔径。膜的实际孔径取决于采用的测量方法，而不同膜生产商采用不同的测量方法，因而两个相同标称孔径的 NC 膜采用相同的测量方法检测其实际孔径差异显著（图 7）。

通常在竖向过滤即根据 NC 膜的厚度检测 NC 膜的孔径,而竖向过滤测定的膜

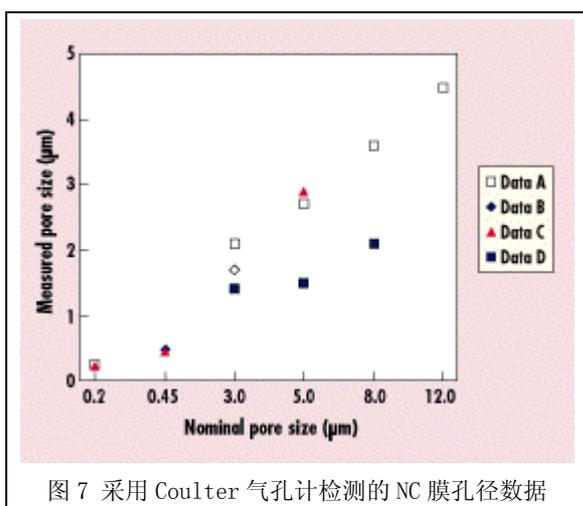


图 7 采用 Coulter 气孔计检测的 NC 膜孔径数据

孔径和类型与侧向过滤测定的膜孔径与类型没有相关性。因此,在侧向免疫层析中,常规方法测定的 NC 膜孔径与实际孔径有一定的差异。如果 NC 膜带有塑料底衬,则无法用竖向过滤测定膜的孔径。在这种情况下,供应商提供的膜孔径常常为基于侧向毛细作用进行估计。

研发人员也可以慎重地根据标称孔径区分同一厂家的 NC 膜,但不推荐采用这种方法区分不同厂家生产的 NC 膜。尤其对于侧向层析来说,标称孔径不是 NC 膜蛋白质结合能力的依据,建议研发人员进行新的研发项目前最好筛选最佳的 NC 膜。

尽管标称孔径实际意义较小,但 NC 膜的侧向孔径和膜的结构对于 NC 膜是否能应用于侧向层析有重要的影响。在一定的范围内,NC 膜的有效表面积随着标称孔径的减小而增加,从而 NC 膜的蛋白结合能力随之增加。不同孔径 NC 膜的近似表面积可以通过各种材料的比表面积率(SAR)进行估计。比表面积率即 NC

表 I Whatman NC 膜比表面积率检测值(BET 表面积检测方法检测数值)

标定孔径大小(µm)	比表面积率(SAR)
3	110
5	98
8	66
12	63

膜孔内的有效表面积与膜表面积的比率(表 1)。另外一个重要的因素即为随着 NC 膜孔径减小,侧向层析的毛细作用也降低(表 2),从而由于待检分析物与捕获蛋白较长的反应时间增加了侧向免疫层析的检测灵敏度。

图 8 后期处理过程中存在水,可能导致捕获线存在条纹或产生严重的批间差异。

上述两种现象的综合效应即为采用较小孔径的 NC 膜可以显著提高检测的灵敏度。作为常规的指导方针,如果研发人员比较关心最终检测的灵敏度,则应该

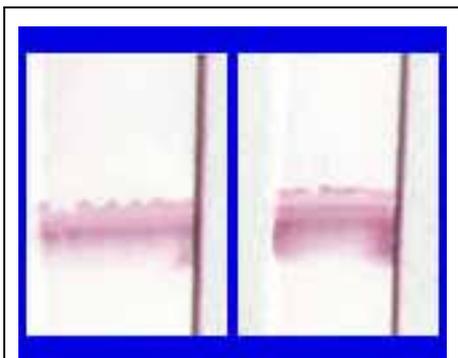


图8 处理后使用疏水膜切片,水的存在会导致捕获线出现抓痕或强烈变异

选择尽可能小孔径的 NC 膜;如果研发人员比较关心侧向层析的反应速度,则应该选择较大孔径的 NC 膜。在产品研发早期阶段,无论需要什么种类的 NC 膜,研发人员最好应该尽可能筛选最佳的 NC 膜。

后处理 NC 膜生产后通常进行膜的后处理,可以去掉膜表面的没有聚合的单体分子或者改善 NC 膜的重湿润性。另外,后处理可以为

NC 膜添加少量的化学试剂或其他物质以进一步提高最终检测试剂的性能。通常情况下,生产厂家应该知道在 NC 膜上添加什么物质,并掌握添加浓度和程序。在 NC 膜添加剂存在以及 NC 膜结合一定蛋白质的条件下,NC 膜添加剂对膜爬行速率、老化情况的具有明显的影响效果。

在生产过程中,大量的企业为了保持 NC 膜的亲水性而对其进行后处理。实际上,就捕获线点膜于 NC 膜等生产流程以后或到达终端用户以前是否对 NC 膜进行亲水性处理意见不同。由于减少了侧向免疫层析检测试剂生产商必须的膜处理程序,购买的经过预处理的 NC 膜拥有迷人的魅力。这种处理过的 NC 膜可以直接现货供应,从而免除了购置蛋白质喷膜后进行处理 NC 膜仪器设备的费用,并缩短的生产周期。在购买处理过的 NC 膜以前,研发人员应该考虑下列可能不适应生产的情况。

NC 膜的储存超过使用效期,导致在捕获蛋白喷膜以前 NC 膜的亲水性添加剂从膜上脱落,这是使用处理后 NC 膜的主要缺憾。NC 膜上亲水性添加剂的浓度改变也会影响 NC 膜的蛋白结合能力、膜的亲水性以及侧向爬行速度。因此,检测试剂的有效期取决于膜亲水性添加剂的含量、从 NC 膜生产到检测试剂生产的时间间隔以及检测试剂进行测试时面临的未知因素。另外,如果生产商购买后对 NC 膜进行后处理,研发人员应记录 NC 膜上亲水性试剂浓度并对其进行充分的稳定性研究,从而建立最佳的后处理程序确保膜的使用和长时间储存。

未处理的 NC 膜的亲水性与其孔径直接相关,但亲水性试剂处理的 NC 膜亲水性则由其处理试剂决定。如果 NC 膜在储存时处理试剂脱落或测试时被样本冲走,那么膜的实际性能与其标称性能相比发生剧烈的变化。通过原始质控检验,生产商可以确定亲水性处理和孔径结构对 NC 膜的综合影响。如果亲水性处理试剂老

化或从 NC 膜上脱落，从而使 NC 膜的性能取决于膜孔径的比例增加，导致原始质控检验无效。研发人员通过采用孔径结构一致的不同批号且未经亲水试剂处理的 NC 膜，以尽量确保产品的最小变异系数。

表 II Whatman 膜的典型层析率数据

标定孔径大小 (μm)	迁移至 4.5cm 时所需时间 (sec)
3	245 \pm 35
5	185 \pm 25
8	140 \pm 20
12	100 \pm 20

由于许多处理试剂都是水溶性的，喷涂捕获线时，任何水的存在均可冲掉捕获线处的处理试剂，导致膜上部分区域由于没有亲水性处理剂而高度疏水，使捕获蛋白不能与待测样本、胶体金结合物充分结合，严重影响试剂盒的敏感性和特异性。疏水斑点常常引起样品不均一通过捕获线，使检测结果产生条纹或显色深浅不一致（图 8），甚至检测结果呈现白色条纹。如果在喷涂捕获线后进行亲水处理，则可避免这些缺陷。

研发人员应该根据时间、成本权衡处理过或者没有采用表面活性剂处理的原料在确保试剂稳定性与精密性上的优势。

膜的类型 不管膜的孔径或者何种添加剂对其处理，NC 膜的类型显著影响着其蛋白结合的水平。图 5 显示不同制造商生产的不同标称孔径 NC 膜对免疫球蛋白和白蛋白的不同结合水平比较。一系列的数据显示了结合水平上的差异与 NC 膜标称孔径变化关系不大。通过对图表比较表明，免疫蛋白结合最佳的膜对白蛋白结合不一定最佳。因此，相关蛋白结合水平不仅受 NC 膜设计形式的影响，还受到生产商原料来源的影响。

对于有固定表面积的一系列 NC 膜来说，蛋白质的结合水平是由 NC 膜的聚合物类型与影响膜表面能量的处理试剂共同作用的结果。生产 NC 膜的基本聚合物可以适用于许多商业途径，而且不同使用途径性能上都有稍微差别，况且不同 NC 膜生产商采用不同的处理方法。因此，建议研发人员通过试验评价使用的 NC 膜及其对相关蛋白结合能力。

NC 膜的老化 如果 NC 膜未经过亲水性添加剂处理，新生产的 NC 膜将在其表面残留约 5-10% 的湿气。涉及 NC 膜老化的传统观念一致认为残留的湿气可以

挥发掉，因此，随着 NC 膜湿气的挥发，NC 膜渐渐变得疏水、聚集静电荷和易脆。实际上，并非如此简单。有些关于 NC 膜老化的研究认为，NC 膜残留的湿气是可挥发的，而最近研究表明，NC 膜在长期高相对湿度的储存条件下，仍然保持疏水效果。

经过亲水性试剂处理的 NC 膜稳定性取决于亲水性添加剂的性质。储存 NC 膜时，避免接触容易引起 NC 膜产生疏水作用的有机溶剂和膜聚合物断链的强光照非常重要。目前，在正确的储存条件下（45-55%相对湿度），NC 膜至少稳定储存 2 年以上。喷涂捕获线以后封闭的 NC 膜可以储存更长时间。

NC 膜爬行速度的优化 NC 膜的爬行速度是影响免疫分析结果的关键因素之一。在 NC 膜、检测线以及待测样本浓度确定的情况下，检测的灵敏度随着爬行速度的下降而提高，即随着 NC 膜爬行速度的下降，显示的待测样本浓度提高。

表 III 有效的膜封闭材料

材料	常用工作浓度 (%)
Tween 20	0.01 - 2
Triton X-100	0.01 - 2
PVA (15 kDa)	0.10 - 5
PVP (33 kDa)	0.10 - 7
PEG (20 kDa)	0.05 - 3
Brij	0.05 - 3

两者遵循一个与平方成反比的规律，即：

显示的待测样本浓度 $\propto 1 / (\text{层析速度})^2$

因此，若 NC 膜爬行速度提高一倍则待检样本浓度显示为原来浓度的 1/4。

封闭剂 NC 膜本身为疏水材料，而 NC 膜对水的层析作用主要由于其纤维间隙存在水份。NC 膜的疏水作用主要由以下三个因素造成：

- 疏水待测物与 NC 膜非特异性反应而产生的非特异性信号；
- 纤维间隙水份丧失引起的长期储存困难；
- 快速检测中的重润湿速度、爬行速度太慢

对喷涂捕获线后的 NC 膜封闭处理可以减少或消除这些现象。在理论上，研发人员应选择有助于确保产品的稳定性和可重复性的封闭剂。选择的封闭剂应同时降低非特异性背景，在长期保存条件下仍能结合在膜上，而且在样品检测时能

保持 NC 膜均一致的重湿润特性。同时，封闭剂也不应干扰捕获线处的抗原抗体反应而降低检测的信号强度。

鉴于理想封闭系统的关键特征，封闭剂的选择常常需要研发人员在以下四个方面寻找最佳的平衡点：

- 爬行速率
- 捕获线的强度
- 捕获线的宽度
- 非特异性背景的信号强度

不幸地，上述几个关键指标常常互相矛盾。比如，封闭剂减少非特异相互作用同时也会降低特异性信号，而增加膜

爬速的同时也会降低检测的灵敏度、增加检测线的宽度。笼统地说，这几种封闭剂主要分为三类：

- 表面活性剂；
- 人造聚合物；
- 蛋白质；

通常情况下，表面活性剂与人造聚合物至少两类封闭剂混合使用可起到较好的封闭效果（见表 3）。而蛋白质通常不是最有效的封闭材料，虽然蛋白质类封闭剂有助于减少非特异性信号，但是他们也会降低整个检测系统的爬行速度（图 9，10）。

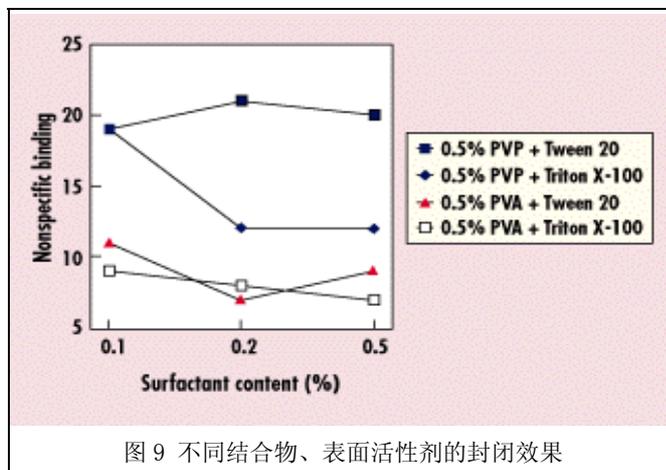


图 9 不同结合物、表面活性剂的封闭效果

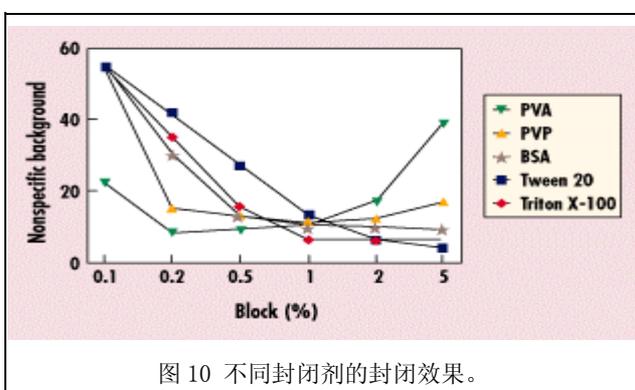


图 10 不同封闭剂的封闭效果。

封闭方法 如果 NC 供应商已经用亲水性试剂处理过 NC 膜，那么检测试剂生产商则不必重复这一过程。如果必须封闭，通常进行如下三个步骤执行。

- (1) 将膜浸泡于饱和的预定浓度的封闭剂溶液中；
- (2) 将含高浓度的试纸条下端部分（胶金垫或样品垫）干燥；
- (3) 检测待检样本时，干燥的封闭剂重润湿并随样本溶液层析。

无论采用那种封闭系统，研发人员都必须对检测试剂进行充分的稳定性评估。虽然加速老化试验可以用来评价检测试剂的近似有效期，在解释试验结果时必须仔细解释原因。在加速老化试验中，典型的换算参数为 37°C 条件下的有效期乘以 10。因此，在 37°C 下可保存 4 周的试纸条，在室温下则可保存 40 周。尽管行业内普遍以该参数作为可靠的转换方法，但并不能保证该换算的稳定性。

结论

该部分主要报道了影响蛋白与 NC 膜结合的主要因素。本文的第二部分将发表于 IVD technology，将提供如何解决在侧向免疫层析研发、生产中蛋白与 NC 膜结合面临的问题。

参考文献

1. MA Harvey, Optimization of Nitrocellulose Membrane Based Immunoassays (Keene, NH: Schleicher & Schuell, 1991).
2. Guide to Building Molecular and Immunodiagnostic Device Platforms (Keene, NH: Schleicher & Schuell, 1997).
3. Short Guide for Developing Immunochromatographic Test Strips (Bedford, MA: Millipore Corp., 1996).
4. KD Jones, Technical Application Notes, no. 1-3 (Maidstone, UK: Whatman International, 1997 - 1998).
5. The Latex Course, 1994 (Fishers, IN: Bangs Laboratories, 1994).
6. E Harlow and D Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press, 1988).
7. C Wallis, JL Melnick, and CP Gerba, "Concentration of Viruses from Water by Membrane Chromatography," Annual Review of Microbiology 33 (1979): 413 - 437.
8. WG Presswood, Membrane Filtration: Applications and Problems, (New York: Marcel Dekker, 1981).
9. SR Farrah, DO Shah, and LO Ingram, "Effects of Chaotropic and Antichaotropic Agents on Elution of Poliovirus Adsorbed on Membrane Filters," Proceedings of the National Academy of Science USA 78 (1981): 1229 - 1232.
10. B Batteiger, V Newhall, and RB Jones, "The Use of Tween 20 as a Blocking Agent in the Immunological Detection of Proteins Transferred to Nitrocellulose Membranes," Journal of Immunology Methods 55 (1982): 297 - 307.
11. P Tijssen, Practice and Theory of Immunoassays, 8th ed, (Amsterdam, : The Netherlands Elsevier, 1993).
12. HC Wood and TG Wreghitt, "Techniques," in ELISA in the Clinical Microbiological Laboratory, ed TG Wreghitt and P Morgan-Capner (London: PHLs, 1990), pp 6 - 21.
13. Z Schneider, "Aliphatic Alcohols Improve the Adsorptive Performance of Cellulose Nitrate Membranes—Application in Chromatography and Enzyme Assays,"

Annals of Biochemistry 108 (1980): 96 - 103.

14. R Bowen, private communication with author, Swansea, UK, February 3, 1998.

15. Technical Data: Nitrocellulose Membranes (Maidstone, UK: Whatman International, 1996).

16. KD Jones and AK Hopkins, "Protein Binding in Nitrocellulose Membranes 0.2 to 12 μ m: A Comparison of Commercially Available Membranes for a Novel Flow-Through Immunoassay," poster no. 21 (presented at the 1998 Annual Meeting of the American Association for Clinical Chemistry, Chicago, August 2 - 6, 1998).

17. Unpublished results (Maidstone, UK: Whatman International, 1998).

18. AM Campbell, Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1992).

19. KD Jones and AK Hopkins, "Evaluation of the Efficiency of a Range of Membrane Blocking Agents for Nitrocellulose Membrane Based In Vitro Diagnostic Devices," poster no. 3 (presented at the 1998 Annual Meeting of the American Association for Clinical Chemistry, Chicago, August 2 - 6, 1998).

作者简介: Kevin D. Jones 博士, Whatman 国际有限公司 (Maidstone, Kent, UK) 诊断技术经理。

法规与标准篇

出口管理条例：体外诊断产品的相关问题

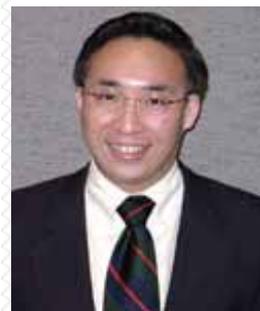
Philipp Novales-Li 文

Joni 战友 译

(声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原文作者。)

市场分析专家预测，到 2008 年全球体外诊断检测的需求量将保持每年 7% 左右的速率增长。随着更多分子标记技术、先进的检测技术以及自动化技术的引入，此增长率可能还会继续上升。美国仍是主要的体外诊断 (In Vitro Diagnostic, IVD) 产品制造商，在 2003 年总价值为 260 亿美元的全球市场中，美国就占了 104 亿的份额。美国制造的 IVD 产品大约 40% 出口到国外，其中日本、加拿大、欧盟 (主要是德国、法国、英国、西班牙、意大利) 是其最大的海外市场。

随着 IVD 产品出口市场机会的增多和其生产技术规格复杂性的增加，一些制造商开始接受工业安全局 (BIS) 的审查。BIS 是商务部的一个分支机构，职能是加强《出口管理条例》(以下简称《条例》) 的实施。尽管这些规定从未频繁处罚 IVD 产品制造商，但在过去的二年里此情况有所改变，对制造商的行政传票事件屡有发生。即使大多数 IVD 产品制造商可以免除《条例》许可证要求的限制，但他们应该了解这些规定，并至少遵守其基本要求。



Philipp Novales-Li, 药学博士、公共卫生博士、哲学博士, Bio Genex Lab 公司 (San Ramon, CA) 科学与法规事务顾问, 联系方式: philippn@biogenex.com

《出口管理条例》

管理美国商品出口的主要立法是 1979 年制定的《出口管理法案》(EAA), 此法案随后在 1991 年、1998 年和 2000 年被修订。根据此法案,《条例》应执行该法案的基本要求。然而,《出口管理法案》的时效是 2001 年 8 月 20 日即截至。在该法案终止实施之后,布什总统连续发布总统令(最近一次是在 2004 年 8 月 6 日)来延长《条例》的有效期。依据《国际紧急经济权力法》,这些基本上都是通过《条例》来确保《出口管理法案》的继续有效执行。

除了 BIS 外，其他一些机构也有对少数种类产品的出口管辖权，如美国食品药品监督管理局（FDA）和药品监管中心可对相关种类产品的出口进行监管。因此，BIS 规定的条款被称为有双重作用，因为它们可能应用在军事、治安、战略性用途（如核能）以及民用商业（如诊断）等方面。

《条例》下的出口管制

《条例》制定出口管制规定的本意是为了防止有人利用美国的出口，开展与化学战、生物战、恐怖主义、核扩散等相关的危害国家安全的活动。

然而，美国 911 事件之后，随着政府反恐议程的进行，很多先前不在《条例》管理范围之内的产品也被列入其中。这些产品即使本不打算用于军事目的、核技术、导弹技术以及化学武器和生物武器等方面，也还是被列入了《条例》。

实际上，《条例》的出口管制规定只适用于限制两用产品的出口，尤其是当其可能危害美国利益时。此外，美国的一些政策决定，如经济制裁，可能会对某些国家（如伊朗）的两用产品扩大出口限制。

因此，不管 IVD 产品是否已经确立预期用途或者已被批准用于临床诊断，都需要经过《条例》的审核。IVD 产品被列入《条例》是可以理解的，最主要是因为诊断产品从简单的测试，到高度复杂的带有多元技术平台的诊断系统，都是各种手段的混杂组合。例如，当前一套工艺先进的可用于分析生物样品的数字图像分析系统，可配备数台高清晰度数码摄像机和一台功能强大的计算机组件。它们也可用于非诊断用途，如在武器制造中检测出有缺陷的部件。

另外依据《条例》，“出口”这个词还有更广泛的涵义，已超出了“把美国制造的产品运输到国外”这一传统的定义。那就是产品不管以怎样方式输出美国，都可称为“出口”。因此，某些被认为与出口无关的行动，在某一背景下根据《条例》也可被视为“出口”。例如，一小瓶 IVD 试剂通过航空邮寄或随身携带空运，会被视为出口而受到出口管制。同样，将产品技术规格的包装说明以传真或电子邮件方式向海外客户传送，或客户下载来自美国制造商网站的产品说明，都可被视为出口行为。

美国生产商运送给其国外子公司的产品也要受到出口管制，即使这些产品仅仅是去鉴定或参加贸易展览。甚至其他国家的产品运送到美国，然后返回原生产国也被视为出口。并且，在美国通过口头介绍或产品展示，把技术或源代码泄露给外国公民同样被视为出口活动。2

商业出口许可证

IVD 产品既然已进入《条例》管理范围之内，就需要商用出口许可证，以便能出口或转口到其他国家。然而，由于 BIS 只能颁发几种现存的经营许可证，所以只有一部分美国出口和转口产品须持有此许可证。尽管如此，美国 IVD 产品制造商还是应该确定他们的产品是否需要持有出口许可证。这样，制造商可以提供证明文件来支持自己严格遵守《条例》规定，从而减轻任何制裁，如违规罚款、刑事起诉和剥夺一段时间的出口权等等。

为了确定是否需要持有出口贸易许可证，IVD 产品制造商必须解决四个关键问题：出口什么？出口到哪里？最终用户是谁？用来做什么？

BIS 制定有商业管制清单（CCL），把不同产品分成几类，可以协助 IVD 产品制造商确定哪些产品在出口范围之内。CCL 把产品分类并为其编上代码（见表 I）。在 CCL 每类产品里，一种产品被给定一个出口管制分类编号（ECCN）。不在 CCL 项目里的产品，其出口管制分类编号被统一定为 EAR99，大多数 IVD 产品都属于这种情况。

表 I : 出口产品分类代码(来自 BIS 的商业管制清单)

Code	Product Category
0	Nuclear materials, facilities, and equipment
1	Materials, chemicals, microorganisms, and toxins
2	Materials processing
3	Electronics
4	Computers
5	Telecommunications and information security
6	Sensors and lasers
7	Navigation and avionics
8	Marine
9	Propulsion systems, space vehicles, and related equipment

即使大多数 IVD 产品没有一个专一的 ECCN 代码，而被编为 EAR99，IVD 产品制造商在做此假设之前，也必须说明要将其产品出口到哪里。因为，美国通过制裁和禁运手段来限制甚至禁止 IVD 产品出口到某些国家，如古巴、伊朗、利比亚、韩过、苏丹、叙利亚。

由于被制裁国家的名单会经常变化，如伊拉克，所以制造商应参考 BIS 网站的最新信息，来选择出口对象。当制裁实施时，制造商可能被要求出示出口许可

证，或者得到政府特别批准才能出口其产品。遇到这种情况，IVD 产品制造商应该努力与商务部、律师以及顾问来共同协商解决。

即使一件 IVD 产品被编为 EAR99，也不能被运送到一个禁运国或制裁国，它仍需要有出口许可证。否则，一些终端用户将被禁止接收美国的出口和转口商品，但其他用户可接收持有出口许可证的出口和转口商品。因此，制造厂商必须确定谁是他们产品的终端用户。下面的名单是定期修改和更新的，作为遵守《条例》的一部分，制造商应参考这张名单。

《条例》的实体名单里含有一些组织机构的名字，它们因参与大规模杀伤性武器扩散活动，而必须持有许可证。³ 这个实体名单里包括的国家有中国、印度、以色列、巴基斯坦、俄罗斯。《条例》中有美国财政部特别设计的侨民和禁止过境人员名单，此名单中包括一些与恐怖主义或毒品贩卖相关的个人和组织的名

字。⁴ 未核实名单中列有一些公司的名字，这些公司尚未经 BIS 的最终检查核对，尚不可信，因此 IVD 产品制造商必须对其进行更多调查。此时，制造商应对这些进口公司的商业行为、规范运作和经营模式进行调查。被禁的名单列有的个人和公司，其出口权已被 BIS 所剥夺。不论未核实名单还是被禁名单都可以在 BIS 的官方网站上查到。

此外，一种产品出口是否需要许可证，还取决于它的用途。例如，某一产品如果可用于大规模杀伤武器相关的活动，那么不管是什么产品，它都必须有出口许可证。关于违禁出口产品的最终用途，《条例》第 744 条有更多关于禁止出口产品终用途的信息。

推荐解决方案

IVD 产品制造商应该立即采取以下三个措施，以符合《条例》的标准：

- **产品分类** IIVD 产品制造商应该利用 CCL 对其产品进行正确分类。尽管制造商可以按照自己的标准把产品分类，但他们还是应该按照 BIS 的规定对产品进行正式的分类。对于后者，制造商必须花费更多的时间，因为后续问题和 BIS 专家对其他材料的新要求都可能出现。IVD 公司应该使用向 BIS 申请的多用途表格 (BIS-748P)。另外，IVD 产品制造商可通过简化的网络申请程序

(www.bis.doc.gov/snap/index.htm)，对产品进行在线分类。向 BIS 申请产品分类，为了确保能得到其快速回复，对于要分类的各种产品，制造商应附上技

术规格或产品说明的复印件。BIS 的专家会打电话给申请产品分类的 IVD 公司，特别是当这些专家需要更多信息来办理公司的申请时。一旦产品分类完成，公司就会收到 BIS 的正式通知，通知中会说明每种产品 ECCN 代码。

• **目的地管制说明** 在与产品一起运送的发货清单、空运提单或其他出口管制文件中，IVD 产品制造商至少应列入下面的陈述：“这些从美国输出的商品、技术或软件符合《出口管理条例》规定。禁止违法转运。”

• **终端用户说明** IVD 产品制造商应采用 BIS-711 表格或最终收货人及买家的陈述的形式，让其国外经销商和海外客户填写和签署文件。这种形式的目的，是要让收货人以书面文件形式，记录下相应出口产品的处理或使用情况。

以上几项仅仅是建立全面合法出口方案的第一步，该方案应集中解决 IVD 产品出口涉及的设计、制造、生产和分配等问题。通常向多国输出其产品的 IVD 生产商可能会考虑购买或租赁适应出口的工具，来对不断变化的政府数据库进行自动检索。

结论

上述执行方案并不全面，IVD 制造商必须努力选择符合其自身情况的最佳方案，并且在方案实施后，仍要不断监控针对自己产品出口中的任何可疑行为，以免这些活动造成产品的非法转运和使用。一些危险信号如下：产品的预期用途与买方业务不符；即使有其他付款条件，顾客仍愿支付高额现金；一些日常安装、培训或维修服务被顾客拒绝；买方地点与交货地点不同；所订购产品与产品出口国的技术生产力和设备不符。

参考文献

1. E Sholk, “IVD Market Continues an Upward Climb,” *Advance for Administrators of the Laboratory* 13, no. 2 (2004): 10 - 14.
2. “Export Administration Regulations,” U. S. Government Printing Office Web site (Washington, DC: GPO, 2005 [cited 4 August 2005]); available from Internet: <http://www.access.gpo.gov/bis/%20ear/pdf/730.pdf>.
3. “Part 744 - Control Policy: End-User and End-Use Based,” U. S. Government Printing Office Web site (Washington, DC: GPO, 2005 [cited 4 August 2005]); available from Internet: www.access.gpo.gov/bis/ear/pdf/744.pdf.
4. Office of Foreign Assets Control, “Specially Designated Nationals and Blocked Persons,” the U.S. Department of the Treasury Web site (Washington, DC: 2005); available from Internet: <http://www.treas.gov/offices/enforcement/%20ofac/sdu/t11sdn>