

丁香园免疫学技术讨论版

胶体金文献翻译活动论文集

第二辑

(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
	waynepionnet	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，原文版权归原作者所有，丁香园不承担由此引发的任何版权纠纷责任。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

(第二辑)

综述篇

- 11、创造以方法为导向的诊断新思路 1
- 12、膜在分子诊断学中的应用 5

检测方法开发篇

- 13、免疫金标记技术在体外诊断领域的应用 15
- 14、免疫诊断试剂设计原则 21
- 15、对新生物性标志物免疫化学测定的标定方法 31
- 16、分阶段开发和商品化新型免疫诊断方法 39
- 17、基于胶体金技术快速检测试纸条的错误信号的处理 48

加工工艺

- 17、高质量金溶胶的生产 61
- 18、亲水性粘合剂对样品流速的影响 71

诊断经理人概述

- 20、展望未来 84

综述篇

创造以方法为导向的诊断新思路

Donal Quinn文

20021108 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。）

健康保健的大环境在各个领域不断变化的同时，大众对于技术革新的要求却依然很迫切。IVD产业对于健康保健革新的贡献无论是从他们的实践方面还是从用户的反映方面来看都是独一无二的。同时，他们通常不能得到认可，一部分原因是由于他们与临床实验室的密切联系。生物信息、蛋白质组学、基因功能以及网络数据的发展是革新的一部分，而这些革新有望成为患者护理以及以结果为依据的医学的影响指标。

由于可以更好的使实验室得到更准确的诊断结果进而在挽救生命的同时保持保健的费用不变，诊断新方法将会在所有这些领域起到非常重要的作用。在效率上来说，IVD 产业肯定是想管的，或者从对实验室字面上的理解来说，他们肯定会将用户的需要变成一些新的科技方法并且对于现存的拥护的问题提出解决办法，但是并不是针对从来没有人提出过的问题的。IVD产业已近更意识到，当革新与保健系统以及用户的需求与期望成为一体的时候他们已经达到了最大的影响。但是用户们还一直在讲需要 IVD制造业做的还有很多很多。



不断增大的期望

分子生物学、疾病管理研究领域、基因组学、蛋白质组学、网络资料等等都是一些 IVD 制造业为了回应以结果为导向的医学、市场导向以及药物遗传学等等而做出的一些新的技术。然而随着科技爆炸的出现，许许多多的操作难题要求实验室扩大他们的视野，不仅仅考虑到一些检测产品的新技术，而且还要考虑到能使诸如加工、财政、服务、经营等等环节进步的因素。

实验室检测经济状况仍然是保健的核心问题，退货的现实也更进一步要求他们更好的理解新技术会怎样转变成平常的实验室操作技术。IVD产业目前仍然没有完全适应这种需要。

Dade Behring 公司在美国发起了一项调查，用以确定实验室对于诊断改革的理解以及确定当前的 IVD 产业与客户期望值之间的差距。这次调查包括问卷调查，也包括集体采访，集体采访的主要目的就是为了保证参与调查的个人理解的真实性，同时也起到一个群体合作的目的。

医院实验室管理部门的代表参与了此次市场调查，包括大医院的代表，同时也包括一些小医院的代表。由于倡议革新的人把大部分的精力都集中在对于医院和教育部门上，所以这次调查的参与者主要是中、大型医院。其中 45%来自拥有400 张病床以上的一员，还有 45%来自于拥有 200-400 张病床以上的一员，另外10%是来自于少于 200 张病床的医院。这次调查的参与者包括很多实验室的管理者，并且是用不同品牌的产品。

调查结果

通过对用户认为每项革新的重要性的评比和给新娘的结果的标准，被调查者确立了 IVD 产业应该做到的底线。当被要求将用户集中反映的革新从 1-10 进行评分时，80%的被调查者评了8分或者更高（见图1）。这次调查结果证实了以用户为中心的产品发展过程，这正是IVD产业每年投入20亿元所期望看到的。这项调查也显示了实验室



图1 用户最关心的革新重要性的调查结果

希望与IVD产业有更紧密的合作，并且期望IVD产业能继续前进 以满足实验室的要求。更加紧密合作的结果在全体被调查者中是一致的。

实际上，实验室管理者在调查中表示， IVD 制造业需要付出更大的努力以更好的适应阵阵感动世界性的革新。在被调查的指标中，有 82%排在前三位，对于 IVD 制造业满足革新的能力之间的差距需要明确：那就是用户对于诊断产品发展的投入是不够的（见图2）。IVD 产业需要一个对于用户对于改革的定义和期望值的一个明确的定义。

这项研究同时也加强了普通的革新成分的钙尿，包括客户对于主要研究进行投入的期望，穿新型的想法，以结果为依据的科技的发展和新的诊断参数的发现等等。被调查者表示对于所有这些领域都愿意投入。有趣的前景是参与调查者能明确区分将来产品的发展和满足今天需要。这个区别表示：IVD 制造业需要更

多的投入到现实的、日益激烈的革新中区以快速回应市场需求。

根据这项调查，实验室管理者对于能对他们在平时实验操作所遇到的问题起作用的解决方法有所反映，他们希望这些方法能快速出台。大部分实验室管理者说：IVD 制造业应该集中精力做好目前的工作，紧跟



图2 IVD 制造业满足用户期望的调查结果

这个反映的就是认识到实验室需求以及开发高科技产品的改革。用户很少关注的革新包括服务改革、价格改革等等（见图3）。

总之，调查揭示了用户感兴趣的革新的4个方面。第一、诊断革新应该以用户的需求为依据。这一点可以定义为处理日常难题，提供简单易操作的新技术。第二、诊断革新力度应加大。对于一些新的但在用户的承受范围内。调查结果显示，如今的实验室管理者期待有价值的新技术的同时也能减少整个实验室的开支。最后一点，革新不应该局限在产品上，还应该包括培训、原料管理等等。实验室管理者对于能够改进操作的非产品类改革很感兴趣。

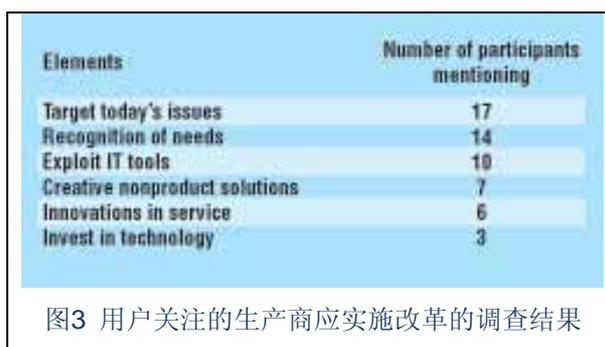


图3 用户关注的生产商应实施改革的调查结果

重新定义革新

实验室管理者面对经济和操作上的双重难题，一方面要经济实惠，另一方面又要求能够简单、实用。他们可以区分开长期与短期的解决方法，并且要求 IVD 产业是以用户为中心的。IVD 产业有很多机会与实验室进行紧密合作以制造出更适用的产品。这项调查是确定并且也是拉近公司与用户需要之间距离的第一步。

IVD 产业有责任对于他们在开发和提供革新方法中的地位进行评价，并且可以通过与实验室的胡作来了解新技术的实用性。

一部分 IVD 产业的责任是革新定义背后的，这种扩大不仅仅优先于技术创新，而且也优先于许多创新性的问题的解决，尽管这些解决方法可以满足用户最关心的革新。IVD 产业有责任来满足不断增大的保健市场的需求，通过提供新

技术，IVD 产业也对于分子技术做出了巨大贡献。临床实验室也承认这一点，并且也珍视制造业对于开发新的检测参数以及扩大的新技术视野。同时，用户仍然不断要求 IVD 产业注意不断增强的革新，而这新革新证实为了满足他们的日常需求。尽管说 IVD 产业已经为了突飞猛进的改革进行了大量的投入。IVD 产业必须要提供革新性的新技术来对于今天的实验室起作用，并且要保持价格的合理性。

结论

用户最感兴趣的革新是一个建立长期客户关系的产品，而且也是一个对于客户需求的一个独特的理解。基于这个理论，革新就需要产业与客户之间建立长期的合作关系，不仅要为他们的需求提供解决方法，而且要与他们共进退并且能预见到他们将来可能会出现的需求。当客户被放置在改革的核心位置的时候，就需要一种不仅仅能用科技表示的创新性的看法，并且还能为客户的不断遇到的困难提供解决方法。这一点处在提出处理日常难题解决方法的核心位置。从财政到加工、从服务到用户体验等等过程。

通过对于革新的一项承诺，IVD产业找到了正确的位置来生产新的实用的科技产品用以作为保健发展的跳板并且也为将来的以病人为中心的护理也创造了一个基础。IVD产业应该接近给革新距离并且提供更好的服务并且对于用户感兴趣的革新履新自己应尽的义务。

综述篇

膜在分子诊断学中的应用

Jason M. Alter 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。)

随着分子诊断学的不断发展，有人认为膜将逐渐失宠。然而，事实绝非如此。

在体外诊断(IVD)的发展过程中，膜材料和微孔材料一直长期占据中心地位。硝酸纤维、尼龙等材料制作成膜，这些膜的使用促进了以抗原抗体相互作用为基础的免疫检测的发展，并使这些测定获得了今天所拥有的市场优势地位。膜的使用也使免疫诊断学向侧流照护点检验的改进成为可能，比如今天人们所熟悉的家用孕检工具形式。

但是，随着分子诊断学逐渐商业化发展，一些分析家认为膜的作用必将逐渐消失。他们认为，基于抗原抗体相互作用的免疫检测将会被新兴的以核酸为靶点的分子诊断学所代替，在此过程中，一些未来技术，如微型制造的 DNA 芯片，将会代替膜而被使用。

然而，鉴于目前趋势，很难说上述预测会成为现实。事实上，随着分子诊断学进入市场，膜材料和微孔材料的使用更有可能不断增加。膜在分子诊断学领域已有令人瞩目的成就史，包括从实验室分子生物学研究到商业诊断学的重大

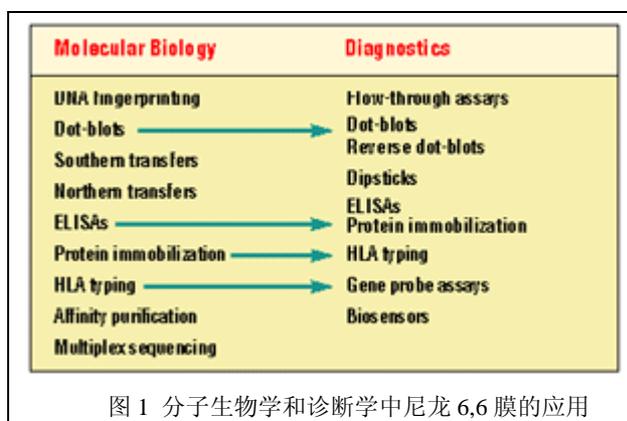


图 1 分子生物学和诊断学中尼龙 6,6 膜的应用

转变（见图 1）。例如，当首个聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳发展起来时，人们就选择硝酸纤维膜作为结合转移蛋白的介质。^{1,2} DNA印迹发展时，硝酸纤维膜也是最初被使用的膜之一。在此应用中，尼龙 6,6 膜凭借良好的DNA稳定性、灵敏的免疫检测特性和对反复探针损伤的耐受性，现已广泛代替了硝酸纤维膜。^{3,4}

如今，研究者们已把膜材料和微孔材料应用于分子领域，例如，DNA 检测用于诊断和高通量筛选（HTS）模式用于药物研发。将来，膜可能会远远超出最初设想的应用领域，而应用于其他领域。

本文调查了膜特别适用的一些关键分子应用，并标注了每个过程中适用的膜

（见表 1）。

应用	过程	Biodyne A	Biodyne A	Biodyne B	Biodyne Plus	Biodyne C
		0.45 μm	1.2 μm	0.45 μm	0.45 μm	0.45 μm
DNA	毛细 DNA 转移	3	1	3	3	0
	改进的 DNA 转移	2	1	3	3	0
	非放射性检测	3	1	2	3	0
	32P 检测	2	1	3	2	0
	碱性转移	2	1	3	2	0
	电子转移	2	1	3	2	0
	真空转移	3	1	3	3	0
	点杂交	3	1	3	3	1
	血清点杂交	0	3	0	0	0
	逆向点杂交	2	1	3	2	3
	毛细 RNA 转移	3	1	3	3	0
RNA	电子转移	3	1	3	3	0
	真空转移	3	1	3	3	0
	点杂交	3	1	3	3	0
	菌落转移	1	3	1	1	0

表 1 膜在分子诊断学中应用的适用性，范围从 0（不推荐使用）到 3（高度使用）。

样本制备

广义上，标本制备指复合标本的选择性分离，或指为后续检验而制备特殊分析物或成分。标本制备一般包括全血中血浆分离、血浆中肝素去除、DNA 分离、白细胞制备。许多正在发展的新诊断技术需要以某种方式选择性制备分析物。

标本制备的过程中，研究者经常要用到离心方法。然而，离心虽适用于实验室研究，但不易于自动化。而微孔膜适用于自动化处理和检测方案，并且其中一些类型可用于全血中血浆分离、DNA 或白细胞制备，以用于进一步检测。

许多微孔材料可用于全血中血浆分离。这些材料创造性地用于照护点免疫诊断中少量血液的快速血浆分离，可作为血液分离的非离心方法。

实际上，血浆容易通过毛细作用从一些（而非所有）血液分离材料移动到多

种固体载体上，因此这些分离材料可用于标本制备来检测细菌、胆固醇和多种血浆、胆固醇和多种血浆分析物，也可用于临床自动化筛查细胞外病毒，如肝炎病毒和 HIV 等。

初步实验显示，HEMASEP V 血液分离介质可用于细胞外病毒的非离心制备方法。此概念很简单。血液分离材料与低蛋白质键结介质接触，使血浆迅速与全血分离（见图 2）。然后血浆转移到另外的低蛋白质键结固体载体，并加入到聚合酶链式反应（PCR）工具以在平面区域中进行处理。

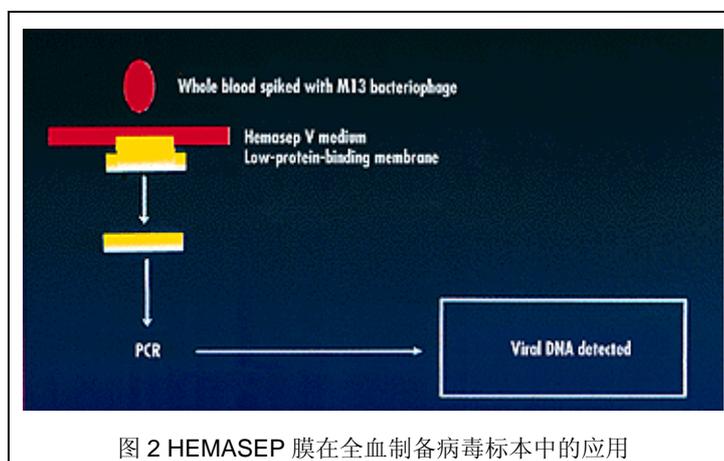


图 2 HEMASEP 膜在全血制备病毒标本中的应用

实验中，感染有 M13 病毒的全血应用 HEMASEP V 介质，使血浆成分移动到多种二级低蛋白质键结固体载体上，然后再进行 PCR 扩增。结果显示，HEMASEP V 介质可用于制备细胞外病毒 DNA 来进行扩增，而无须采用离心方法（见图 3）。

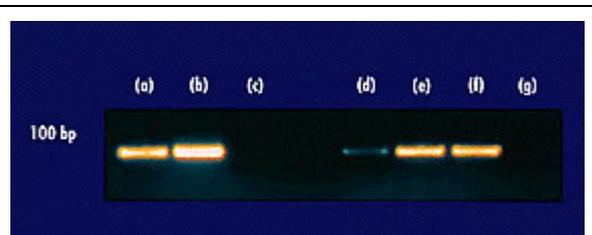


图 3 与 HEMASEP V 介质接触的诊断介质直接进行 PCR 扩增。1:25 的稀释溶液加入 40ml 新鲜人血，滴到 HEMASEP V 介质上。血浆带上 3cm 长的介质直接进行 PCR 扩增 (d)，或者一种诊断膜与 HEMASEP V 接触来收集血浆。二级介质包括 Premium Release 膜 (e)、LoProSorb 介质 (f) 和 LoProdyne LP 尼龙 6,6 膜 (g)。含有分离血浆的膜标本 (3mm) 也直接进行 PCR 扩增。PCR 反应池：(a) M13 DNA, 100 ng；(b) 溶菌液, 10^9 particles；(c) 无 DNA 或抗菌素。

在分离膜上进行 PCR 扩增的思想是非同一般的。许多文章中记载有评价此种方法的研究实例，其中成功的研究似乎很大程度上依赖于所使用膜的种类以及膜是否可阻滞扩增反应。

其他膜适用于从全血中分离白细胞以进行进一步分析。白细胞减数分裂过滤器广泛应用于生物制药，同样地，这些膜材料能够选择性结合白细胞，而使大多数红细胞顺利通过。

例如，白细胞吸附介质是一种平板纤维材料，可从全血中去除约 90% 的白细胞。此材料垂直叠放可提高白细胞的去除效率。

选择性结合白细胞的固体载体还可用于从全血标本中制备基因组 DNA，也可用于白细胞表面受体的检测。另外，细胞巨化病毒等等许多病毒主要位于白细胞内，白细胞结合固体载体可捕捉白细胞，以对细胞内病毒作进一步分析。

以膜为基础的 DNA 检测

以 DNA 为基础的分子检测中，多种理由都要求我们要利用膜。除了普遍易得性以及公认的性能记录外，膜还具有其他培养基无法可比的特性，包括：更快的检测结果、简化的筛查方法、与多种公认 DNA 和蛋白质检测系统的协调性。

目前，采用膜作为固体载体的分子检测以多种形式存在。例如，Orgenic 公司（Yavne,以色列）向市场推出了利用硝酸纤维膜的纸色谱杂交检测（PACHA）。这种快速检测利用了许多靶向特异的寡核苷酸探针，这些探针如条纹一样固定于膜上。DNA 经过 PCR 扩增，生物素化核苷酸在此反应中被整合进入。然后，生物素化的 DNA 应用于膜上，通过毛细作用与其上固定的探针相作用，在探针条纹处，生物素化 DNA 与相应的探针分子发生序列特异性杂交，而非杂交探针迁移游过探针条纹处。最后，链亲和素碱性磷酸酶轭合物被加入，信号从探针条纹处产生。

另一应用中，一公司以浸量尺方式，研究了利用 DNA 探针检测食品传播病菌的可能性。尽管此研究利用塑料条作为固体载体，但如果利用膜作为固体载体，也会同样有效。此检测方法利用的是一种混合探针，这种混合探针包含识别特殊病原的 DNA 序列和单个多聚脱氧核苷酸的末端，此末端可识别多聚脱氧核苷酸覆盖的固体载体。

DNA 检测

高密度微阵列正越来越广泛的应用于DNA测序、遗传学分析和药物研发。¹³尽管制造商正采用微型制造的DNA芯片等替代检测方法，但膜也同样在被使用。尼龙膜用于DNA序列杂交，也作为固相载体用于细菌菌落或组织特异性mRNA检测。¹⁴一些膜最初在免疫检测中作为横向流动材料应用，现在也正作为固体载体用于新的检测技术。¹⁵

越来越多公司开始提供商用 DNA 检测和膜上的细菌纯系“图书馆”。这些新产品大多以标准杂交原则为基础。此类基于膜的商用检测法可用于基因表达分析、疾病机制研究或药物研发中有效化合物的鉴定。例如，克隆技术实验室公司（PaloAlto, CA）提供了基于膜的核酸检测法，以用于基因表达的检测。这种分

析法利用了正电性的尼龙膜作为载体。此领域的其他公司中，Research Genetics (Huntsville, AL) 提供了一个 5×7 膜上超过 5000 个基因的高密度检测法，而 Display System Biotech (Vista, CA) 提供了以膜为基础的基因表达探针检测法。

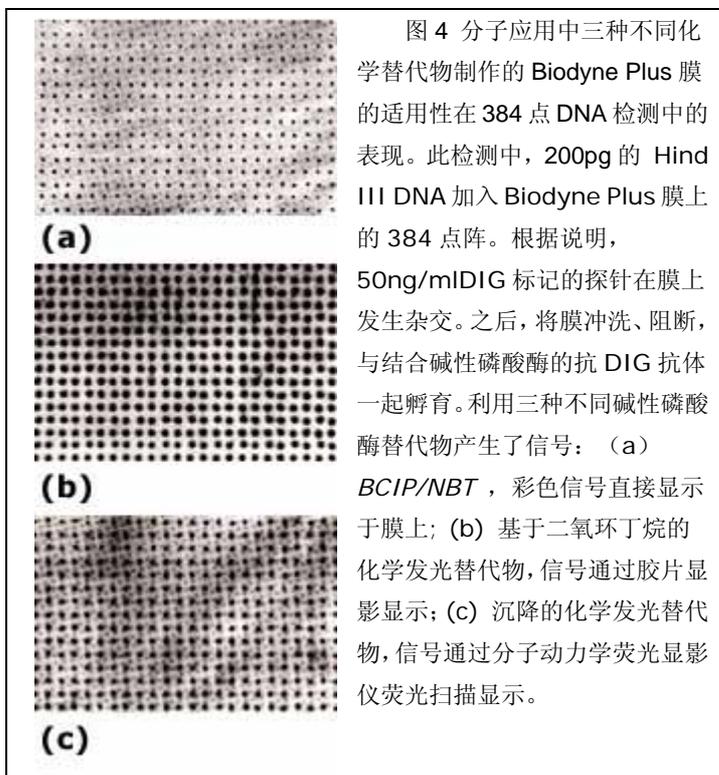


图 4 分子应用中三种不同化学替代物制作的 Biodyne Plus 膜的适用性在 384 点 DNA 检测中的表现。此检测中，200pg 的 Hind III DNA 加入 Biodyne Plus 膜上的 384 点阵。根据说明，50ng/ml DIG 标记的探针在膜上发生杂交。之后，将膜冲洗、阻断，与结合碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体一起孵育。利用三种不同碱性磷酸酶替代物产生了信号：(a) BCIP/NBT，彩色信号直接显示于膜上；(b) 基于二氧环丁烷的化学发光替代物，信号通过胶片显影显示；(c) 沉降的化学发光替代物，信号通过分子动力学荧光显影仪荧光扫描显示。

如何正确选膜？

许多公司将膜应用于 DNA 测序或药物研发，但几乎没有公司改善其设计参数，以致不能将膜的使用超出硝酸纤维和信号检测的放射性方法。然而，为优化产品性能，制造商须确保使用合适的膜和检测方法。例如，现有的尼龙 6, 6 膜可通过比色法、荧光法和化学发光法用于 DNA 检测（见图 4）。

16

以核酸为基础的分子检测设计时，若要采用固体载体，尼龙 6, 6 膜将是不错的选择。然而，并非所有的尼龙膜都相同。尼龙配方和生产过程不同，导致膜在同一检测条件下的表现不同。例如，尽管 Biodyne B 膜和 Biodyne Plus 膜都带正电，但由于生产方法不同，一个显示极好的敏感性和低自然干扰性，而另一个无此特性而不值得利用（见图 5）。其他尼龙 6, 6 膜因有不同的表面化学组成而使信噪比不同。这些不同使人们很难从一种尼龙膜推断另一种的数据及协议。

产品设计者将膜的选择和 DNA 检测草案完善后，可以获得更好性能的产品。

下面是在选择分子应用膜时开发者应考虑的几个方面。

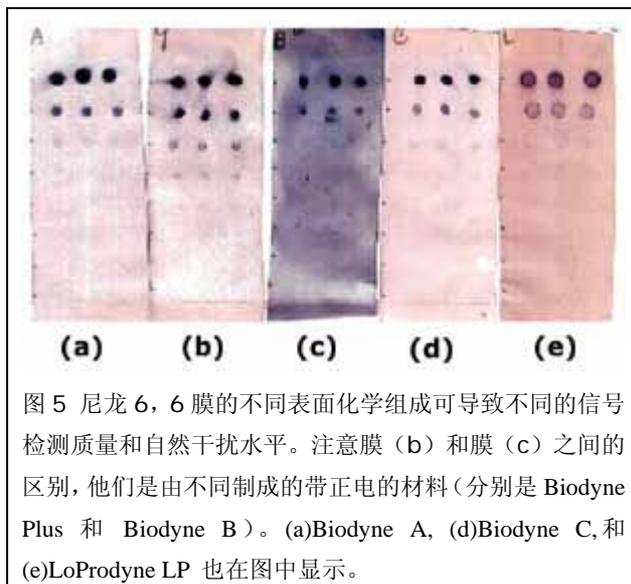


图 5 尼龙 6, 6 膜的不同表面化学组成可导致不同的信号检测质量和自然干扰水平。注意膜 (b) 和膜 (c) 之间的区别，他们是由不同制成的带正电的材料（分别是 Biodyne Plus 和 Biodyne B）。(a)Biodyne A, (d)Biodyne C, 和 (e)LoProdyne LP 也在图中显示。

表 II. 分子诊断学中常见协议和应用，以及相应的膜类型、膜的主要卖主。尼龙种类包含所有不同配方和加工过程的产品，不同种类会导致不同的检测结果。

主要应用	膜的种类	主要供应商
Southern transfers	尼龙	Amersham
Northern transfers		BioRad
Dot-blots		CUNO
		ICN
		Life Technologies
		MSI
		NEN
		Pall Gelman Laboratory
		Pall Specialty Materials
		Pierce
		Schleicher & Schuell
		Tropix
Western transfers	聚偏氟乙烯 (PVDF)	Amersham
		BioRad
		ICN
		Millipore
		NEN
		Pall Gelman Laboratory
		Pall Specialty Materials
		Schleicher & Schuell
		Tropix
寡核苷酸检测	Modified polyethersulfone	Pall Specialty Materials
血浆分离	Hemasep media	Pall Specialty Materials
	CytoSep media	Pall Specialty Materials
	Presense membrane	Pall Specialty Materials
	Hydrophilic polymer	Primecare Diagnostics
白细胞制备	Leukosorb media(白细胞吸附介质)	Pall Specialty Materials
Western transfers	硝酸纤维膜 (NC)	Amersham
		BioRad
		Life Technologies
		Millipore
		Pall Gelman Laboratory
		Pall Specialty Materials
		Pierce
		Sartorius
		Schleicher & Schuell

膜的特性 制造商可利用现有的膜来大幅缩短检测方法的开发时间。目前的协议和检测系统使现有的膜经过较少的研究和开发即可成为良好产品。检测法本身需要开发成本，但是现有膜无需另外的开发，因此也就无需额外的成本。

尼龙 6, 6 的例子可很好说明膜的特性如何有利于开发者。尼龙 6, 6 膜拥有很多以DNA为基础的协议和商用检测系统，其中许多协议有利于完善尼龙 6, 6 膜上DNA和蛋白质检测。¹⁷膜制造商已经利用了此尼龙 6, 6 膜的许多特性，但独立的研究者们在同类评述性文章中作了更多报道。除了尼龙 6, 6 膜的特定检测系统的报道外，还有相当多与此膜相关的应用，如用于DNA测序、复合序列中DNA检测以及临床诊断学中逆向点杂交技术。¹⁸⁻²²

表面化学组成 当前尼龙膜的一个主要优点是其表面组成的多样性。中性膜、正电性膜、负电性膜在分子诊断学中都能找到合适的应用。为确定何种表面化学组成是最合适的，开发商既须考虑特定协议的要求，又要考虑将要采用的DNA检测方法的要求。通常，检测过程中试剂间复杂的相互作用

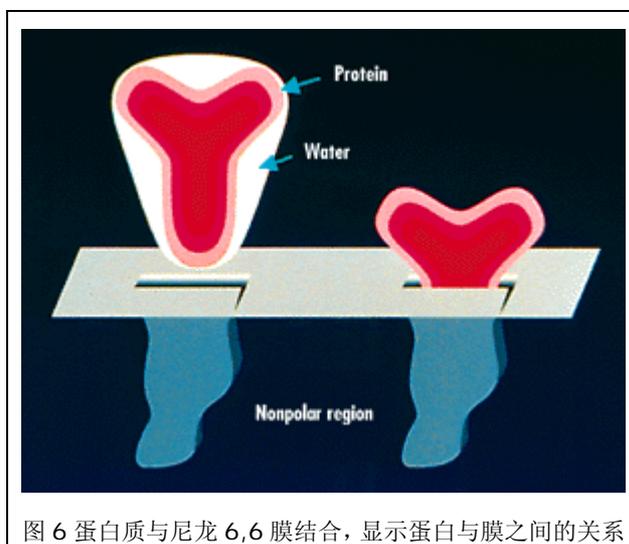


图 6 蛋白质与尼龙 6,6 膜结合，显示蛋白与膜之间的关系

决定着开发者如何选择膜的表面电性（见表 II）。

尽管人们使用“表面化学组成”这一术语，化学组成成分其实散布于膜的整个三维晶格。另外，电荷是膜上不可缺少的，不会被冲洗掉。通常认为，硝酸纤维素膜经过疏水作用与分子结合，而尼龙 6, 6 膜是通过离子作用或静电作用。²³然而，实际上尼龙膜的结合机制更加复杂。此膜的电荷组成虽有作用，但与尼龙膜结合主要是凭借疏水作用（见图 6）。其机制基于以下事实：相似条件下，正电性、负电性和中性的尼龙 6, 6 膜结合DNA或蛋白质的数量几乎相等。

自动化过程中的耐用性 一些尼龙 6, 6 膜既以载体形式生产，又以非载体形式生产。载体形式更加耐用，因此更合适须经历附加过程或装配的应用，也适用于自动化检测过程。与层压材料不同的是，其载体位于内部，尼龙材料位于表面（见图 7）。这使膜更加耐用，检测分析时也不会显露载体，并且膜没有极性，两个表面都可被利用。

检测敏感性 随着非放射性检测技术的发展，放射性方法在分子诊断学中的使用正逐渐减少。目前，三个最重要的非放射性检测技术是色谱法、化学发光法和荧光法。

放射性能否取代非放射性方法很大程度上依赖于新技术提供相似敏感性的能力。如今，基于膜的DNA检测利用化学发光法或荧光法、信号放大试剂，可获得与放射性检测相似的检测水平。特别是化学发光法，在临床诊断学中越来越被人们所接受，在抗体、维生素等等的筛查中都应用的越来越多。²⁴

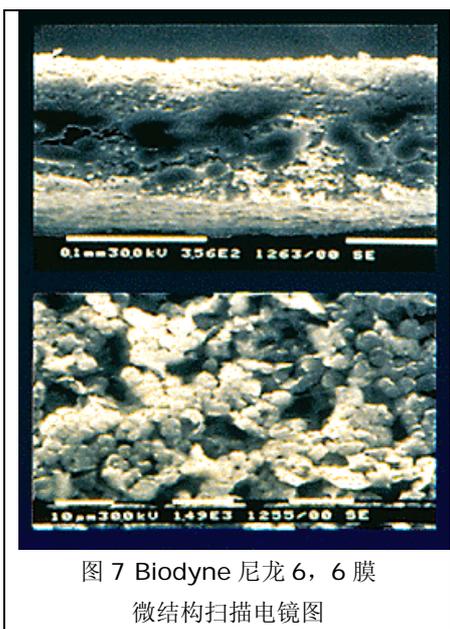


图 7 Biodyne 尼龙 6, 6 膜
微结构扫描电镜图

完善信号检测的关键是将所使用的膜的类型与可能提供最好结果的检测方法相匹配。与合适的检测方法联合使用时，尼龙膜将提供优良的信噪比（高信号、低自然干扰）。例如，在极度严格的司法领域，联邦实验室将一种中性尼龙膜用于非放射性的化学发光法检测，但却发现一种正电性的尼龙膜与放射性检测方法共同使用效果良好。²⁵⁻²⁷

新型膜的发展

现有膜技术为分子诊断学和 HTS 应用的发展提供了广泛空间。然而，随着这些发展领域的成熟，人们须开发新型膜以适应发展的特殊要求。

在分子诊断学领域，与非放射性检测方法一起应用时，膜须具有完善的检测能力。新型亲和分离膜也应加以开发，以用于样本制备中选择性加强或清除靶分子。

HTS 实验中，筛选化合物的数量仍不断增加，这使对更高密度检测的需求也不断增加。为满足这一需求，未来膜应向更优的可视性发展，以使点密度的增大成为可能。用于化学发光法和荧光法检测系统时，这种材料须提高其信噪比。

结论

随着 DNA 检测技术竞争进入市场，开发者不应忽视膜材料和微孔材料的潜力。这些材料在 DNA、蛋白质的实验室检测分析方面，都已有成功应用的记录，并且 DNA 检测时膜性能稳定、价格低廉，这些都保证了微孔材料将在分子诊断学和 HTS 应用领域能更多地被使用。

参考文献

1. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J, "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications," *Proc Natl Acad Sci*, 76:4350–4354, 1979.
2. Burnette W, "Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A," *Anal Biochem*, 112:195–203, 1981.
3. Dubitsky A, and Defiglia J, "Stripping of Digoxigenin-Labeled Probes from Nylon Membranes," *BioTechniques*, 19(2):210–212, 1995.
4. Noppinger K, Duncan G, Ferraro D, et al., "Evaluation of DNA Probe Removal from Nylon Membrane," *BioTechniques*, 13(4):572–575, 1992.
5. Alter J, "One-Step Separation of Plasma from Whole Blood for In-Vitro Diagnostics," *Gen Eng News*, 16(5):28, 1996.
6. Alter J, "Single-Step Vertical Plasma Separation of Whole Blood for Tests and Sample Prep," *Gen Eng News*, 16(20):30 1996.
7. Alter J, and Seeley K, "Automation of Viral Detection Utilizing Solid Support Plasma Separation from Whole Blood," *LabAutomation '98* (abstract), 146, 1998.
8. Oyofe B, and Rollins D, "Efficacy of Filter Types for Detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Water Samples by Polymerase Chain Reaction," *App Environ Microbiol*, 59(12):4090–4095, 1993.
9. Yourno J, "Direct Polymerase Chain Reaction for Detection of Human Immunodeficiency Virus in Blood Spot Residues on Filter Paper After Elution of Antibodies: An Adjunct to Serological Surveys for Estimating Vertical Transmission Rates Among Human Immunodeficiency Virus Antibody-Positive Newborns," *J Clin Microbiol*, 31(5):1364–1367, 1993.
10. Rice GPA, Schrier RD, Oldstone MBA, "Cytomegalovirus Infects Human Lymphocytes and Monocytes: Virus Expression Is Restricted to Immediate-Early Gene Products," *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6134–6138, 1984.
11. Reinhartz A, Alajem S, Samson A, et al., "A Novel Rapid Hybridization Technique: Paper Chromatography Hybridization Assay (PACHA)," *Gene*, 136:221–226, 1993.
12. Groody E, "Detection of Foodborne Pathogens Using DNA Probes and a Dipstick Format," *Mol Biotech*, 6:323–327, 1996.
13. Regalado A, "The DNA-Chip in Diagnostics," *Start-Up*, (September):18–25, 1996.
14. Drmanac S, and Drmanac R, "Processing of cDNA and Genomic Kilobase-Size Clones for Massive Screening, Mapping and Sequencing by Hybridization," *BioTechniques*, 17:328–336, 1994.
15. Stimpson D, *BioTechniques*, November 1998, in press.
16. Dubitsky A, "DNA Arrays on Nylon Membranes," *LabAutomation* (abstract), June 1998.
17. Dubitsky A, "Blocking Strategies for Nylon Membranes Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays," *IVD Tech*, 3(4):53–59, 1997.

18. Weiss N, Eggersdorfer I, Keller C, "Multiplex-PCR-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Protocol for Simultaneous Analysis of Up to Five Fragments of the Low-Density-Lipoprotein Receptor Gene," *BioTechniques*, 20:421–429, 1996.
19. Cherry JL, Young H, Di Sera LJ, et al., "Enzyme-Linked Fluorescent Detection for Automated Multiplex DNA Sequencing," *Genomics*, 20:68–74, 1994.
20. Martin C, Bresnick L, Juo R-R, et al., "Improved Chemiluminescent DNA Sequencing," *BioTechniques*, 11(1):110–112, 1991.
21. Zhang Y, Coyne MY, Will SG, et al., "Single-Base Mutational Analysis of Cancer and Genetic Diseases Using Membrane Bound Modified Oligonucleotides," *Nuc Acids Res*, 19:3929–3933, 1991.
22. Schollen E, Vandenberk P, Cassiman J-J, et al., "Development of Reverse Dot-Blot System for Screening of Mitochondrial DNA Mutations Associated with Leber Hereditary Optic Atrophy," *Clin Chem*, 43(1):18–23, 1997.
23. Harvey M, Audette C, and McDonogh R, "The Use of Microporous Polymer Membranes in Immunoassays," *IVD Tech*, 2(3):34–40, 1996.
24. Kricka L, "Chemiluminescence Takes Clinical Diagnostics to a New Level," *Advance*, (May): 10–13, 1997.
25. Giusti A, and Budowle B, "A Chemiluminescence-Based Detection System for Human DNA Quantitation and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis" *Appl and Theoretical Electrophoresis*, 5:89–98, 1995.
26. Giusti A, and Budowle B, "Effect of Storage Conditions on Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Bound to Positively Charged Nylon Membranes," *J Forensic Sci*, 37(2):597–603, 1992.
27. Benzinger EA, Shirley RE, Riech AK, et al., "Time Course and Inhibitors of Hae III Digestion in the Forensic Laboratory," *Appl and Theoretical Electrophoresis*, 4:179–188, 1995.

作者简介：Jason M. Alter 博士是 Pall 公司 (Port Washington, NY) 旗下的 Pall Specialty Materials 公司销售副总裁。作者感谢 Andrew Dubitsky 提供的 nylon 6,6 上的 DNA 检测结果照片。

检测方法开发篇

免疫金标记技术在体外诊断领域的应用

Nikki Robinson 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。）

生产企业必须能够克服大量的技术难题才能制备出能应用于诊断领域的免疫金复合物。

免疫金标记技术是一种将胶体金颗粒与包括抗原、抗体在内的许多蛋白质标记形成免疫金复合物的技术。虽然这种免疫金标记技术呈现出多种多样的应用方式，但目前主要应用是以快速检测试纸盒的形式使用于疾病的诊断和监测。¹

在过去的十年里，基于膜上的快速诊断技术（包括侧向层析和渗滤两种形式）的发展为金标免疫试剂创造了巨大的市场。使用该技术制备的标记物作为检测系统中的指示试剂使用在检测敏感症、传染病、环境污染物、毒品、心梗标志物、早孕以及兽医等领域。²

如同其他标记结合物一样，获得成功的结果必须通过采用优质的试剂（蛋白质和胶体金）、丰富的生产经验和对标记物产品最终结果分析的完整的知识结构，这需要与免疫金产品使用方法的终端客户培训一起进行。



蛋白质的标记

在体外诊断应用领域，通常采用抗原或抗体与免疫金结合制备免疫金结合物。采用单克隆抗体或多克隆抗体，是影响抗体标记的因素之一。

虽然诊断产品中大多数抗体标记采用 IgG 抗体，但 IgM、IgE 和 IgA 抗体也可以成功标记上胶体金。标记时，进一步必须考虑抗体的亚型。在鼠抗 IgG 亚型中，例如 IgG1 亚型成功率高，而 IgG3 亚型被证实有技术难度。

将抗原标记胶体金也面临技术难题。将常见的抗原标记上胶体金比较容易。但是受抗原与胶体金结合方式的影响，金标记覆盖的蛋白反应决定簇小于 50% 时才能高成功率制备出标记物。因此，考虑蛋白结合金的方式对标记开发人员非常重要。³

联接机理

研究人员普遍接受的理论为，三种特异的氨基酸残基在金颗粒与蛋白质的联接作用中发挥着重要的作用。而赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸这三种氨基酸与胶体金联接的作用机理各不相同。⁴

- 赖氨酸带有较强的正电荷，因而自然吸附带负电荷的金颗粒；
- 色氨酸主要通过疏水相互作用与胶体金相联接；
- 半胱氨酸通过 SH-与金表面以共用电子的形式形成配位键。抗体通过这几种作用力与胶体金颗粒牢固、稳定的、不易分离的结合在一起。在很大程度上，标记成功与否取决于上述三种氨基酸残基在被标记蛋白质上的结合位点。

在某种情况下，氨基酸联接于蛋白质的活性部位，从而干扰蛋白质的反应活性。空间位阻的限制，当这几种氨基酸残基定位于抗体的抗原结合部位或抗原的特异抗体结合决定簇部位时，可能出现这种类型的干扰。如果被标记的蛋白质分子未做特定的处理就几乎不可能克服这种干扰。

为了在免疫检测中获得最佳的灵敏，这三种与标记相关氨基酸的正确结合是非常重要的。就标记抗体来说，这三种氨基酸应定位于 Fc 区，而对于标记抗原，它们应远离抗原的反应决定簇位置。

标记方法的调试

为了开发、优化单一标记的胶体金结合物，研究人员通常制备小批量的多达 60 批次的不同胶体金结合物。每批次胶体金结合物在某一关键制备步骤上都与其它不同，各批次都被测试从而确定哪种标记技术对于最终的检测分析可能获得最佳的反应结果。

这类调试应该包括所有可以改善胶体金结合物的灵敏度、交叉反应以及潜在稳定性的技术参数。典型的测试应包含但不应仅限于抗体工作缓冲液、防腐剂的类型、盐度、表面活性剂含量、胶体金颗粒的尺寸、封闭剂的类型、总蛋白浓度、结合物工作缓冲液以及结合物的浓度。为了确定不同封闭剂的效果，建议考虑以下调试内容：

- 封闭剂的类型（如酪蛋白、BSA、卵清蛋白、人血清白蛋白、PEG、非特异性 IgG）
- 封闭剂的纯度

- 封闭剂的含量
- 封闭剂对整个测试反应的兼容性

研发人员应该根据在原型产品上的量的调节试验结果确定上述所有试验指标最佳值。最后，无论如何，唯一的检测方式是将结合物应用于尽可能模仿最终测试条 件制做出来的小型测试条前期产品中。对于基于膜基础 上的检测分析来说，最简易的方法是使用半试纸条形式 来做检测，仅需要使用捕获抗体和纯抗原（见图 1）。在 使用这种简单的测试形式下，很多小批量结合物就能被评估得到比较合适的测定结果，而可以避开一些普遍的问题例如：与干燥相关的技术问题或 者样品缓冲液的问题。

为了满足上述试验的要求，常需要 3mg 抗体或者 5mg 抗原。采用小样样本，能够获得 最优化的胶体金结合物制备参数，并能提供初步的评估样本。一旦使用优质的抗体或者抗原 用于标记，且确定了制备参数，生产商就能容易地制备重复性好和批量化的供选用的结合物。



图1.图示为用于测试标记物的半试纸

用于胶体金标记原料的品质

应用在制备免疫金结合物的特异性抗体的稳定性主要取决于检测试验的技术条件。对于侧向层析分析，最好的抗体形式是采用一般的单克隆配对。在这类检测分析中，一种单克隆抗体被标 记胶体金作为指示剂，而另一种被固定于硝酸纤维素膜 上作为捕获剂。每种抗体对于抗原表面的不同反应决定 簇都应该是特异识别，并且这些抗原决定簇在空间结构 上距离较远（见图 2）。

多克隆抗体也可以被使用，但至少是必须经过 protein-A 柱层析纯化。在多数情况下，抗体经亲和层析纯化后能制备出具有较高灵敏度和特异性的结合物。这当然取决于符合试验检测可接受交叉 反应的技术要求。

亲和层析纯化 硫酸铵沉淀法或 DEAE 纯化的血清，含有大量的杂蛋白将竞争性结合胶体金颗粒表面的 结合位点。这些杂蛋白拥有高含量的控制蛋白与胶体金结合的三种氨基酸残基，很容易与裸 露的胶体金颗粒结合。出现这种情况时，检测系统中指示剂的灵敏度水平降低。

同理，如果采用经A蛋白或G蛋白柱层析纯化的抗体，然后IgG片段中可能含

有大量的非特异性的IgG，而不是需要的特异性IgG。所有的IgG将与胶体金结合，结果可能是低灵敏度。

从亲和层析柱上洗脱下的高亲和抗体应该是高亲和抗体，从而可以产生高特异性的胶体金结合物。这些抗体可能需要进一步的处理以避免交叉反应。虽然亲和纯化法耗费大量的时间、经费、血清，但是通过该方法可以获取任何免疫分析必需的关键原料——高质量的结合物。

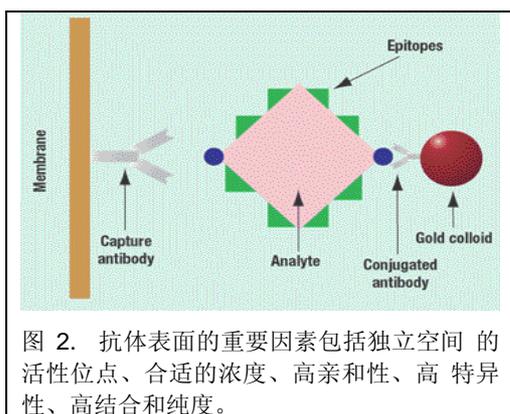


图 2. 抗体表面的重要因素包括独立空间的活性位点、合适的浓度、高亲和性、高特异性、高结合和纯度。

抗原的标记 成功制备抗原标记物依靠两个因素：控制抗原与胶体金颗粒联接的三种氨基酸残基的空间位置和抗原大小。

大多数的抗原标记物是被使用在快速检测试纸上，例如血清的双抗体夹心法或竞争法检测。

在这种情况下，通常选择 40nm 胶体金颗粒。直到最近，研究人员发现，40nm 胶体金颗粒标记的蛋白分子量下限为 30KD。然而在某些条件下，通过先进的标记技术可以将该限制降低到一半至 15KD。使用这些小颗粒标记的主要限制是被标记蛋白必须包含足够数量的赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸残基。抗原常不含有足够的半胱氨酸残基，以至抗原和胶体金颗粒之间的结合力相对较弱且容易断裂，尤其在样本中存在高亲和力的抗体时。

对于分子量低于30KD的抗原，通常采用其他技术方法，例如标记较小的胶体金颗粒。在检测线处由于胶体金颗粒过小使得可见度低很可能导致灵敏度降低。

对于含有较少或者不含上述三种联接氨基酸残基的抗原，一种有效的解决方法是通过将抗体与载体分子预先联接，比如BSA或KLH。然而这种技术不象说起来那么简单，不是业余的蛋白化学家所能做到的。必须谨慎考虑使用的联接物类型、联接物长度，半抗原与 BSA 的摩尔比例和载体分子类型等因素，确保暴露抗原活性反应决定簇部位的结合物可重复制备，且在测试中蛋白载体胶体金结合物具有最大的敏感性。

原料颗粒 胶体金颗粒大小的选择取决于胶体金结合物的用途。如下段落描述了两个最常用的胶体金应用领域：显微检测技术和快速诊断技术。

显微检测技术 任何1-40nm的胶体金结合物可以应用于电子显微镜和光学

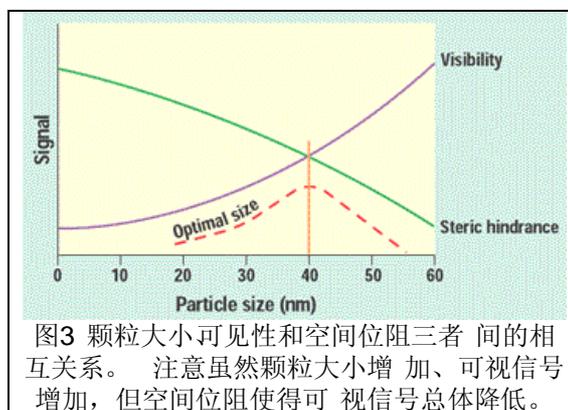
显微镜检测 领域。然而即使在透射电镜放大25万倍的情况下，也不可能观测到1或2nm的胶体颗粒。利用银增强胶体金技术可以让终端客户能够看到胶体金标记的这种较小的抗原性位点。

银增强染色技术是指通过银盐在胶体金颗粒表面沉积，使胶体金颗粒增大到在显微镜下能观察的尺寸。当所有的胶体金颗粒都是同样大小和形状时，该方法具有效率高、易控制的特点且低变异系数。使用如 1-2nm 的胶体金小颗粒时，由于空间位阻较大的胶体金颗粒不能标记的一些抗原决定簇位点，也变得容易接近。因而，一旦确定抗原位置，在银增强染色技术作用下，金标记变得容易联接和形成。

在不采用银增强染色电镜技术的情况下，几个不同的抗原反应决定簇可能被标记在相同的片段上。在这种情况下，采用可分辨出的不同尺寸大小的胶体金标记特异性抗体，该抗体对不同反应决定簇具有特异识别。

快速诊断技术（侧向层析和渗滤测试盒）。对于该应用方向，最常用的胶体金颗粒是40nm。⁴

在标记IgG时，40 nm的胶体金颗粒提供最大的可视性和最小的空间位阻。（见图3）分子量为160kDa 的IgG分子，长度大约为 8nm。40-100nm间的胶体金颗粒比较顺利标记到IgG抗体上。比40nm大的颗粒有较大的可视性，但较大胶体金颗粒在1ml溶液时520nm吸光度较小，因此较少在检测线处被捕获。综上所述，同40nm或60nm胶体金标记的抗体相比，较大颗粒的胶体金结合物对1-10ng/ml分析物具有较低的灵敏度。



60nm胶体金颗粒非推荐使用，但可以应用于快速诊断分析。其不同于40nm 胶体金颗粒，颜色偏浅。优质的40nm胶体金为樱桃红色，而60nm胶体金为深粉红色。在某种情况下，样品类型可使膜上残留背景底色，这种轻微的颜色差异可以使信号容易识别。比如，含有胆红素的样本将留下的背景底色，相对褐色，粉红色较红色容易被识别。

如果用于标记分子的分子量小于160kDa，20nm 胶体金颗粒更适合。20nm 胶体金颗粒通常用于标记链霉亲和素、A 蛋白和抗原，这些被标记蛋白的分子量小

于60kda。

灵敏度 随着快速诊断技术进步使胶体金结合物的灵敏度得到提高。目前，在大多数快速诊断分析中，检测下限达到1ng/ml。如果优质抗体，可以低到10pg。然而随着银增强技术的发展，检测灵敏度将进一步提高，可能提高10-100倍。⁴

结 论

胶体金蛋白质结合物的制备过程并非轻而易举的。制备优质的胶体金结合物过程以及缺乏经验的生产商将面临产品批次的重复性、规模扩大等技术难题。

参考文献

1. S Brunelle, "Electroimmunoassay Technology for Food-Borne Pathogen Detection," IVD Technology 7, no.5 (2001): 55 - 66.
2. S Wallace, "Bioterrorism Tests in Demand," IVD Technology 7, no. 6 (2001): 14.
3. J Chandler, N Robinson, and K Whiting, "Handling False Signals in Gold-Based Rapid Tests," IVD Technology 7, no. 2 (2001): 34 - 45.
4. J Chandler, T Gurmin, and N Robinson, "The Place of Gold in Rapid Tests," IVD Technology 6, no. 2(2000): 37 - 49.

Nikki Robinson, BSc, is custom conjugation manager at British BioCell International (Cardiff, Wales, UK). She can be reached via nikkirobinson@bbigold.com.

检测方法开发

免疫诊断试剂设计原则

Bonnie J. Stewart, Raymond L. Houghton, WJW Morrow, and Syamal Raychaudhuri 文

jevans_lee 战友译

只有当生产商对诊断试剂的设计过程有了彻底的了解，才能使检测技术不断发展，从而研制出更新、更有效的诊断试剂。

（声明：本文仅供丁香园战友内部交流使用，著作权属原作者。）

从20世纪60年代开始使用免疫学诊断方法检测胰岛素以及20世纪70年代检测甲状腺素到现在，免疫学方法作为一种检测手段已经经历了很长时间的发展。

1. 2

免疫检测使用抗原或抗体作为检测工具，并且基于这样一个前提：在系统中与固相对应的游离被测物的分布情况与其在系统中的浓度在数值上成正比。在使用抗体检测的同时，免疫检测偶尔也会以某种特殊的结合蛋白作为检测的基础。现在，免疫检测无论是否需要使用精密的仪器，其操作都已经程序化，简单如在现场或医生办公室就能进行的定性测试，复杂到在临床参照实验室或血库中使用机械化高通量仪器进行的先进临床诊断都是如此。免疫检测不仅在传染病诊断中占据了不可或缺的地位，而且彻底改变了内分泌疾病的诊断方法并在癌症和多种自身免疫疾病的诊断中起到了越来越重要的作用。³⁻⁶



由InBios国际公司（西雅图）建立的检测抗西尼罗河病毒IgM的捕获ELISA法，是一种夹心型竞争法。（照片由InBios国际有限公司授权）

随着科学技术的蓬勃发展和对疾病的全球性监控，免疫检测设计已经成为一个快速发展的领域。本文将集中介绍InBios国际研究所（西雅图）对全球性，主要是人类的，传染病的免疫诊断方法的研究。同时本文也将以FDA批准的西尼罗河病毒酶联免疫诊断试剂以及内脏性黑热病侧向层析快速检测（试纸）这两种免疫检测方法的研究发展为例，阐明小公司如何应对产品申报和市场营销的问题。

免疫检测的原理

鉴于免疫检测最主要的检测方法是抗原抗体反应，因此在讨论检测方法设计

之前有必要回顾一下有关抗原抗体反应的基础原理。

抗体是机体对出现在体内的外源分子（抗原）做出反应而产生的自身蛋白。它们结合抗原形成免疫复合物引导自身免疫吞噬细胞对其进行内吞和降解。抗体主要由B淋巴细胞系的终末分化细胞—浆细胞—合成，属于一类在结构和功能方面具有共同特点的糖蛋白超家族。在功能上，抗体的特点在于具有与抗原以及免疫系统的特异细胞和蛋白结合的能力。在结构上，抗体由以“Y”型为视觉特点的一个或多个相同的结构单位组成。每个“Y”型单位由四条多肽链组成：两条相同的重链和两条相同的轻链。抗体分成5个免疫球蛋白（Ig）类型：IgG、IgM、IgA、IgE和IgD。这是基于抗体中“Y”型单位的数量以及其所含重链类型进行的分类。在免疫反应中每一类抗体都有其特殊的作用，如在多数初次感染中最先产生的抗体是IgM。

抗原与抗体相互作用的部位称为“抗原决定簇”。只有存在与抗体结合位点的相互作用才能定义抗原决定簇，因此抗原决定簇并不是任何特殊结构的固有性质。因为抗体可以识别抗原分子上相对较小的区域，所以偶尔它们会在不同的分子上找到相同的抗原决定簇，而这就是交叉反应的分子基础。但是具有相似抗原决定簇并不一定意味着这些不同的分子在功能上就具有相关性。抗原抗体的结合完全取决于非共价相互作用力，并且产生的复合物和游离的抗原抗体处于动态平衡状态。

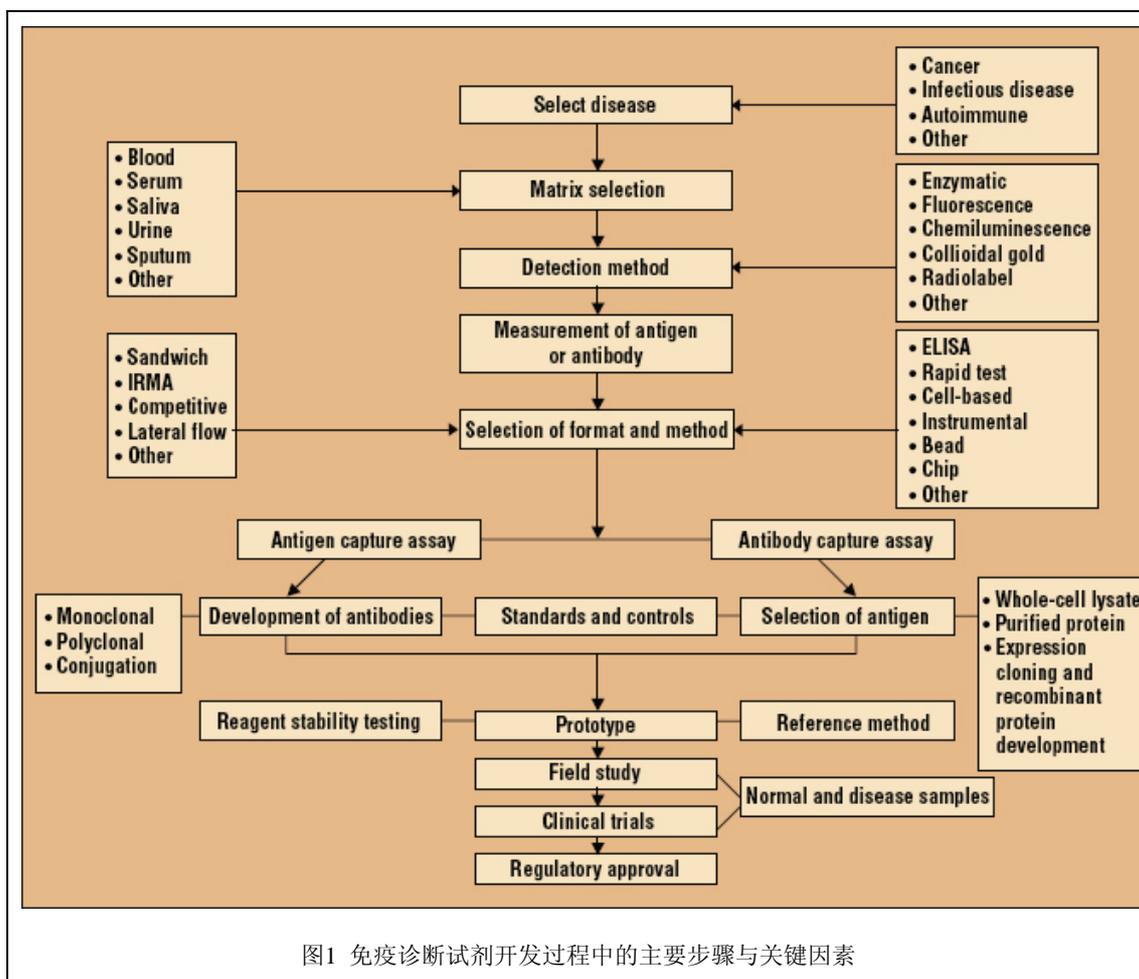
简而言之，免疫检测的原理就是使用一种分析物—要么是抗原要么是抗体—探测和捕获与其对应的另外一半。例如，在体外检测中可以使用源于某种传染性物质的抗原检测机体应对此物质的感染所产生的抗体。

选择基质

制造商品化免疫检测试剂盒时需要考虑大量的因素（如图1）。一旦决定了检测所针对的疾病，第一步就是要确定最有效的被测物是存在于体液里还是存在于组织中。鉴于被测物不同的定位，检测系统已经发展到利用血浆、血清、全血、脑脊髓液、痰液、尿液和固态组织提取物等作为被测物的来源（基质）。临床检测的灵敏度和特异性以及疾病的性质同时决定了检测所选介质性状的重要性。

被测物可能只存在于一种介质中，也可能以极大的浓度差别存在于多种介质中。因此，针对不同的介质应使用独特的检测方法，例如在下列情况中：

1、早孕测试中使用尿液或血液检测人促绒毛膜性腺激素



2、HIV抗体分析中同时使用血清和唾液

3、通过血清测试确定西尼罗河病毒感染情况以及通过检测脑脊髓液中的被测物诊断感染是否涉及神经系统

4、通过痰液检测以及对血液和尿液中针对相关蛋白或有机物的抗体检测诊断肺结核分支杆菌的感染情况因此，建立诊断检测方法关键的第一步是根据被测物的定位和疾病的症状选择一种或多种介质。

检测的方法

自从36年前放射标记法在免疫检测中第一次使用之后，已经有许多不同的检测方法被开发。氚、碘125、 γ 射线以及闪烁计数法等放射标记技术已经被没有放射性的新技术所取代。不过，有些对灵敏度要求极高的检测依然需要使用同位素。但总体而言新的探测试剂更安全更环保并且推动了更先进的高通量设备的发

展。

根据检测模式的不同，检测系统可分成两类。第一类是快速检测，使用可以目测的目标识别探测试剂，结合胶体金、硒或染色橡胶颗粒。⁷虽然这些颗粒灵敏度很高，但通常比不上ELISA的灵敏度。就像预料中的一样，可以目测、价廉以及可一步完成是定性检测的设计中必不可少的元素。

第二类是仪器兼容性检测例如ELISA，主要使用一个固相或液相系统。在这一检测模式中，目标识别试剂连接了各种各样的酶，其中包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶以及 β 半乳糖苷酶。在试剂与目标反应之后，酶的活力可以用其底物测定。这些底物可产生能用光吸收（光密度）测量法检测的可见光，荧光或化学性发光。同时，目标识别试剂也可与荧光、化学发光或生物发光类标记直接连接。

这种新一代检测试剂可使高灵敏度检测系统适用于高通量检测设备以及促进多目标物同步检测。

选择模式和方法

选择究竟是检测抗原还是检测抗体主要取决于诊断的目的。例如，在甄别滥用的药物时应该使用免疫抑制测定。在诊断疟疾、乙肝以及多种导致急性疾病的细菌性病原体侵染时，检测血液中存在的抗原，而不是抗体，是至关重要的。而内脏性黑热病、丙肝以及梅毒感染的诊断关键在于检测血液中存在的对应抗体。由于某些疾病可以诱发长期的免疫反应，因此辨别初次感染还是二次感染就非常棘手。基于细胞的检测已经在诸如肺结核等疾病的诊断中普遍应用，例如检测T淋巴细胞分泌的可以揭示阴性感染的细胞因子或 γ 干扰素。⁸

目前，免疫诊断方法的主要模式有两种：酶联免疫测定（ELISA）和杆式快速测定。在塑料板上包被抗原或抗体就可以创立一个酶联免疫测定反应，它的完成需要结合加入底物后会显色的酶检测技术。

ELISA既可以是竞争性的也可以是非竞争性的。非竞争性或夹心型ELISA是对血清中的抗原或抗体进行定量的标准方法。某种现成的蛋白“捕获”血清中与之互补的抗原或抗体，然后用第二种被某种检测方法标记的抗体与此复合体结合完成夹心。例如，InBios国际研究所（西雅图）研制的抗西尼罗河病毒IgM捕获ELISA试剂盒就是使用了这一检测方式。测定时将血清样本加入已包被抗人IgM

抗体的微孔板，然后加入重组西尼罗河病毒抗原与可能存在的抗西尼罗河病毒IgM—抗人IgM抗体复合体结合，最后加入被某种检测方法标记的识别西尼罗河病毒抗原的抗体完成整个“夹心”的过程并由此得到定量结果。

在竞争性ELISA中会使用已知量的标记蛋白与患者血清中的相同成分进行竞争。即便设计的目的是建立一个快速测定，其先决条件也是一个良好的ELISA方案的建立。这个ELISA方案可以帮助鉴定在后续的横向流或流通杆式测定方案的条件优化中使用的质控血清（无论是阳性的还是阴性的）。虽然ELISA模式对蛋白和血清的相互作用检测灵敏、描述详尽，但同时因为它对大型设备的依赖和过长的反应时间使其不能被真正的称为快速测定。

在类似于InBios公司开发的针对黑热病和查格斯氏病的快速诊断测定中，抗原和抗体的反应在膜状支持物上完成。这些测定被简称为“抗体捕获测定”。在测定的过程中，抗原被附着在固相支持物上用以吸附标记后的抗体（如图2）。

（在侧向层析快速检测中）当过量的抗体流过后可以通过测量显示条带的密度进行定量或者通过对有否显示条带的目测判断其阴性或是阳性。后一种方式适用于快速筛选和定性测定。



图2 由BioDot公司（Irvine, CA）提供的工作站可连续在线分割、包被和浸渍侧向层析膜

当今科技的发展已经创造出多元化的检测模式和实现同时对多种目标取样的设备。当多元化检测模式运用于96孔板时在一个孔内可以同时进行针对多达100个目标的免疫测定（如图3）。在某个特定的多元检测系统中，各种目标与内部精确染色但染色率却各不相同的微球相结合，然后荧光标记与被微球捕获的目标结合，最终通过相应的设备对荧光标记和微球自身光密度的辩读就可以清楚地分析在每个单孔的悬液内进行的每一个微型免疫测定。⁹这种技术看来不仅改善了检测的特异性而且还拓展了免疫诊断的范畴。



图3 由PTG Global(Santa Ana, CA)多重快速诊断试剂盒样品原型

单抗还是多抗？

如果测定方法的设计中包含了抗原的捕获，那么下一个步骤就应该是抗体的生产。用于免疫测定中针对目的抗原的抗体主要是IgG类单抗或者是多抗。一般绵羊和山羊等可以产生大量抗体的动物被用于多抗的生产。

通常当免疫测定需要使用多抗时，会利用相应抗原进行亲和纯化使多抗的特异性单一化。

单抗技术是利用小鼠以及成熟的杂交瘤技术创建和发展起来的，但诸如大鼠和兔子等动物也可以用于单抗的生产。可以通过设计产生结合同一抗原分子上不同表位（抗原决定簇）的不同单抗以满足夹心型免疫测定对抗体选择的需要。也可以通过设计使它们获得更强的亲和力和更高的特异性。相对而言，亲和纯化后的一种多抗就可以结合目标抗原上的多个表位，除非这种多抗是由特定的表位肽段免疫得到的或者是由此肽段亲和纯化以至于特异性被单一化了的。

在使用间接免疫测定法的情况下，例如，当要测定人体体内针对某个特殊抗原的抗体时，需要使用一种用某种探测系统标记的针对此免疫球蛋白的抗体，因此也需要进行抗体的生产。同时对目标免疫球蛋白进行选择时，所需考虑因素应包括分析如何在诊断中使用最有效和最具有相容性的测定方法。

选择抗原

在设计一个抗体捕获的检测时，细胞裂解液、纯化蛋白或重组蛋白都可以作为相关抗原的来源。有时使用细胞裂解液和初步纯化的蛋白就可以获得具有足够特异性的抗原。但当需要使用多种抗原时，交叉反应和高背景就会成为干扰因素，因此表达重组抗原是很值得的，尤其有利于未来向管理机构的申报工作。同时，克隆表达具有强免疫原性的表位所得的抗原往往可以降低检测的背景并同时增加灵敏度。能使抗原保持溶解状态的缓冲液也非常值得关注，在快速测定的设计中使用的典型缓冲液包括：10mM磷酸缓冲液、含NaCl的磷酸缓冲液（PBS）、硼酸缓冲液、含盐硼酸缓冲液以及醋酸钠缓冲液等。受抗原等电点的影响，缓冲液pH值的选择对保持抗原的最佳活性非常关键。测定中使用某些缓冲液时会出现一个特殊的问题：测定系统在溶液新配时工作性能良好，灵敏度高，特异性好，但在放置一段时间后系统的测定能力就会变差。

此外，缓冲液的选择完全取决于具体的抗原。某种抗原可以在pH7.4的PBS中保持良好的活性和令人满意的保质期，但是相同的缓冲液和pH却会使另一种抗原彻底丧失活性。因此在缓冲液的选择方面并没有一个通用的规则，只有实验结果才真正具有指导意义。

如果抗原在某种不合适的缓冲液中透析时会沉淀析出，这一现象初步揭示了

选择错误的缓冲液会导致抗原活性削弱的不良反应。

有关抗原等电点的知识可以帮助研究人员选择合适的缓冲液。类似InBios公司开发的针对内脏性黑热病的杆式快速诊断法中的设计，被检测的抗原可以是循环系统中针对某种特殊抗原的抗体。在这个抗体捕获测定中，一种以重复的抗原表位作为序列的重组蛋白rK39被固定在一个固相支持物上（膜或是96孔板），然后在加入内脏性黑热病患者的血清后培育，测定的最后，如果诊断的模式是ELISA则加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG后培育显色，如果是侧向层析快速测定则加入标记了胶体金的羊抗人IgG后培育显色。

测试原型

在设计过程中，有必要先建立一个满足所有测定所要求的测试原型。在这一阶段中需要对测定的灵敏度和特异性进行评估并对所用试剂进行调试。在进行临床试验之前测试原型必须通过实战检测。

为了使原型测试进行完全，必须使用强阳性样品和阴性对照建立灵敏度和特异性数据。（例如，如果特异性不够就有必要尝试更换抗原或者添加抗原表位）同时必须评估不同实验室之间、多次检测之间或者同一次检测内的数据重现性以确定检测的稳定性。需要在多种温度和环境条件下（如湿度）测试试剂盒的稳定性，并且用稀释法ELISA确定抗原和标记连接物精确的工作浓度。然后通过研究试剂盒在使用条件和极限条件下的稳定性来确定其保存寿命。最终的设计目标是在不损失特异性的前提下使测试具有最好的灵敏度和保存寿命。

现场测试和临床研究

临床试验可以验证检测的有效性并测定此试剂盒的各项指标为日后向管理机构申报做准备。通常临床试验需要在三个以上（含三个）的试验机构进行，试验地点必须与疾病流行地以及试剂盒的预计销售地区有关。如此进行试验的目的在于证明检测结果在不同地点的重现性以及确定其各项指标的稳定性与生产厂商无关。可以通过与成熟的参照技术进行对比来研究试剂盒的特异性、灵敏度、干扰物以及交叉反应性。例如，在西尼罗河病毒的诊断中，使用中和减斑实验（PRNT）作为标准的对比实验。

Clinical Category	PRNT Positive	PRNT Negative	Equivocal	Total
ELISA positive	172	0	0	172
ELISA negative	1	127	0	128
Total	173	127	0	300

由InBios国际公司研发的抗西尼罗河病毒IgM的捕获ELISA试剂盒的临床研究数据。
血清敏感性=99.4%，95%置信区间96.8-99.9%。血清特异性=100%，95%置信区间97.1-100%。

表I和表II显示了抗西尼罗河病毒IgM捕获ELISA和杆式快速测定的临床试验数据。每组数据都代表了在不同地点进行的某个临床试验。这样的数据是向管理机构申报过程中的一个重要组成部分并对未来的工作具有直接指导作用（例如是否需要改善测定的灵敏度）。地区的不同会影响到抗原和抗体的选择，由此导致在测定的灵敏度和特异性方面产生差异是很正常的现象。

Clinical Category	Microscopy Positive	Microscopy Negative	Total
Rapid test positive	225	14	239
Rapid test negative	0	190	190
Total	225	204	429

由InBios国际公司研制的黑热病kalazar式快速检测方法的临床研究数据。
血清灵敏度为100%，95%置信区间97.9-100%。血清特异性=93%，95%置信区间88.5-96%。

管理部门的许可

在美国，免疫测定试剂盒作为商品销售必须获得管理部门的许可。对于涉及人体检测的必须通过FDA的许可，而兽医使用的则必须通过美国农业部的许可。鉴于FDA的标准，本文谈及的大多数检测试剂盒都必须获得销售前的许可。一旦提交FDA，FDA将审查评估其临床数据并进行必要的附加试验以回答某些特殊问题，因此在做出最终的许可前需要3到6个月的时间。在整个过程完成之后，销售才可以开始，但是所有的试剂和试剂盒都必须贴上“仅供研究使用”的标签。获得管理部门许可的另一方面，生产厂商必须随时接受FDA或其他管理

机构的监督审查以保证产品的质量。检测试剂盒在欧盟或其他欧洲地区销售也需要通过相似的审批过程以最终获得强制性的CE标志（可售标志）。用一种

或多种被测物识别试剂为原料生产诊断产品并仅供内部使用的行为被称为“自产自销”，这在不发达国家和地区非常普遍。这些地方在保健领域投资的匮乏限制了商品化试剂盒的推广。虽然通常这些产品的质量很不错而且可以根据特殊要求定制，但是它们缺乏那些获得许可的试剂盒所有的标准化指标和质控保证。

市场营销

一旦获得管理部门的许可，诊断试剂的销售就可以开始了。大公司的产品通常由自己的销售部门进行销售，然而对于小公司而言只有销售量达到一定标准成立销售部门才是可行的。小公司必须依靠其他替代手段来推广自己的产品，包括通过在科技座谈会上设立展台提供产品信息以及发布介绍产品功能的科学摘要和讲演。越来越多的小型诊断试剂公司正通过互联网推广和销售他们的产品。当产品销往国外时，在那些国家建立自己的批发商是很明智的。这些批发商可以促进那些已获许可的试剂盒的进口以及它们在实验室和测试地的销售。如果有必要他们还可以帮助公司与当地相当于FDA的机构打交道。

结论

为了在全世界范围内抵御传染性疾病的流行急需发展可靠、价廉并且用户容易掌握使用的诊断工具和疫苗。目前，全球化的移民趋势已经使监控潜在的传染病大规模流行变得越来越困难，因此对传染病进行有效的隔离必须要有一种快速的诊断方法，而只有那种具有最好的特异性和灵敏度的诊断方法才是完全可靠的。以上所提到的免疫测定设计中的各种考虑因素仅仅只是对设计过程多面性的一个概括而已。

参考文献

1. RS Yalow and SA Berson, "Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man," *Journal of Clinical Investigation* 39, no. 7 (1960): 1157–1175.
2. RJ Ekins, "Radioimmunoassay of Thyroid and Steroid Hormones," *British Journal of Radiology* 43, no. 515 (1970): 828.
3. WR Robertson, A Lambert, and N Loveridge, "The Role of Modern Bioassays in Clinical Endocrinology," *Clinical Endocrinology* 27, no. 2 (1987): 259–278.
4. J Schmitt, "Recombinant Autoantigens for Diagnosis and Therapy of Autoimmune Diseases," *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57, no. 7 (2003): 261–268.
5. E Kawasaki and GS Eisenbarth, "High-Throughput Radioassays for Autoantibodies to Recombinant Autoantigens," *Frontiers in Bioscience* 5 (2000): E181–190.
6. SA Bogen and SR Sompuram, "Recent Trends and Advances in Immunodiagnosics of

Solid Tumors,” *BioDrugs* 18, no. 6 (2004): 387–398.

7. J Chandler, T Gurmin, and N Robinson, “The Place of Gold in Rapid Tests,” *IVD Technology* 6, no. 2 (2000): 37–49.

8. M Pai, LW Riley, and JM Colford Jr., “Interferon-Gamma Assays in the Immunodiagnosis of Tuberculosis: A Systematic Review,” *The Lancet Infectious Diseases* 4, no. 12 (2004): 761–776.

9. DA Vignali, “Multiplexed Particle-Based Flow Cytometric Assays,” *Journal of Immunological Methods* 243, nos. 1–2 (2000): 243–255.



（右起）Bonnie J. Stewart博士，项目经理；Raymond L. Houghton博士，新产品开发部主任；WJW Morrow博士，新技术引进部主任；Syamal Raychaudhuri博士担任首席科学主管，他们均供职于InBios国际公司（西雅图）。作者联系方式分别为：bonnie@inbios.com, raymond@inbios.com, wjwmorrow@inbios.com, raychaud@inbios.com。

检测技术开发篇

对新生物性标志物免疫化学测定的标定方法

David C. Sogin 文

lone_king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。）

理的标定方案需要大量资源，其研究的关键是能保证采用的分析方法得到可靠的测试数据。

临床研究中新发现的生物性标志物可用于辅助疾病的诊断与治疗。近年来已发现一些低水平的小分子物质(如同型半胱氨酸)具有诊断意义，但多数标志物仍为大分子蛋白。¹

科研实验室与体外诊断(IVD)试剂生产商经常一起合作鉴别与临床疾病相关的生物标志物。一旦确认有价值的候选标志物，前期测试厂商需要设计一套稳定的标定方案。

标定方案的关键在于建立一套有效分析方法，能够在特定人群中将某疾病患者与健康者区别开。该方案要求设定代替参照测定法，样品测试时其产生的信号和参照品产生的信号具有一致的相关性，且能证明具有良好特性标准的溯源性，这样能有利于新检测方法的调整通过。

样本中许多新生物性标志物的浓度在pg/ml水平。当新的蛋白标志物确认后，该分子经纯化处理至某一水平后，就能被作为抗原用于制备可识别并与之结合的单克隆或多克隆抗体。

通常，新的蛋白标志物的生物学功能未知，尚无特异的测定方法可用于评价被分离的蛋白保留正常的天然结构的程度。不了解天然结构相关知识并不影响方法的标准化，但是如果了解更多的生物物理信息，则定量测定可长期稳定进行。

虽然进入市场的速度是关键要素，但大家相互竞争的共同目标是发展一种有效的标定方法可以确保结果的长期一致性。由于最先进入市场的测定方法，可能要界定具有重大医学决定意义的检测单位，尤其是对于国际尚未可的物质，方法



蛋白试剂放入雅培公司设计的自动化免疫分析系统。

建立者需认真考虑标定的所有问题及相关的参考物质的溯源。

肌钙蛋白I的报告值范围较宽，在不同方法间的检测结果缺乏一致性，就是一个典型的例子。²基于以上共识，促成研究者共同努力寻找一种参考物质，作为提供众多商用测定产品的标准。

来自国家标准与技术研究院(NIST) 的SRM 2921 已被确认为候选参考物质。³这些物质来源于人类心脏，NIST在确定其浓度之前对该物质的性质进行过深入研究。在心肌损伤标志物标准委员会指导下，更进一步的研究正在进行。临床生化与实验医学国际联合会确认，使用该标准将提高不同方法测定肌钙蛋白I测定值的可比性。

建立基线

1998 年欧洲IVD指导方案中提出的溯源的概念引起广泛关注。⁴通过标定普通参考物质或参考方法的度量值，溯源使测定方法标准化。

根据国际测量学词汇的相关定义，溯源为某种测量值或标准值特性，这种标准与规定的参考物质(通常是国家或国际标准物)相关，通过一条不中断的相互比较链条(即所规定的不确定性链条)连接。⁵

理想的状态是将患者的结果上溯至最高测量等级的起始参考物质，其浓度以系统国际单位表示。对于大多数定量临床测定而言，当生物活性不能被测定时，测定单位被表示为质量单位。就测量学而言，确保测量值的真实性才可能比较各方法在不同时间点及地点的测定结果。这种方法不适于大蛋白的测定，是因为测定方法间在方法学上的巨大差异。此外，缺乏公认的参考方法也阻碍了对样本真值的明确测定。

ISO17511 文件涵盖了关于定量诊断方法的许多重要概念，如标准、可述性及有效性。⁶这一过程从被测变量的定义开始，即分析物的量，和分析物的基质，如每单位体积中蛋白X的质量或血清、血浆、尿液或脑脊液标本中的葡萄糖水平。

多数 IVD 制造商声称该方法可测定每单位体积标本的特异性蛋白含量，但实际情况要复杂的多。经典的免疫测定方法中，与固相结合的单克隆抗体用于捕获目标分子。经多次适当洗涤步骤后，加入已标记信号的第二单克隆抗体。

对这种双表位分析——我们假象是这样完成的：一毫升体积内表位A所捕获的蛋白量，是在XYZ型分析仪的连续控制下，检测识别表位B的可产生信号的标

记抗体总量来实现的。就这些抗原表位而言，无论目的表位的充分暴露，还是所选参考物质的稳定性都是非常重要的。ISO15194 文件指出如何确认某种参考物质，可辅助建立强大而又稳定的标定系统。⁷

选择持久的标准

被选作标准的物质其性质要达到标定物质的条件，可在一段时间内，不同试剂批号中使用(见图 1)。处在溯源链顶部的指定的物理参考物质以单独的实体形

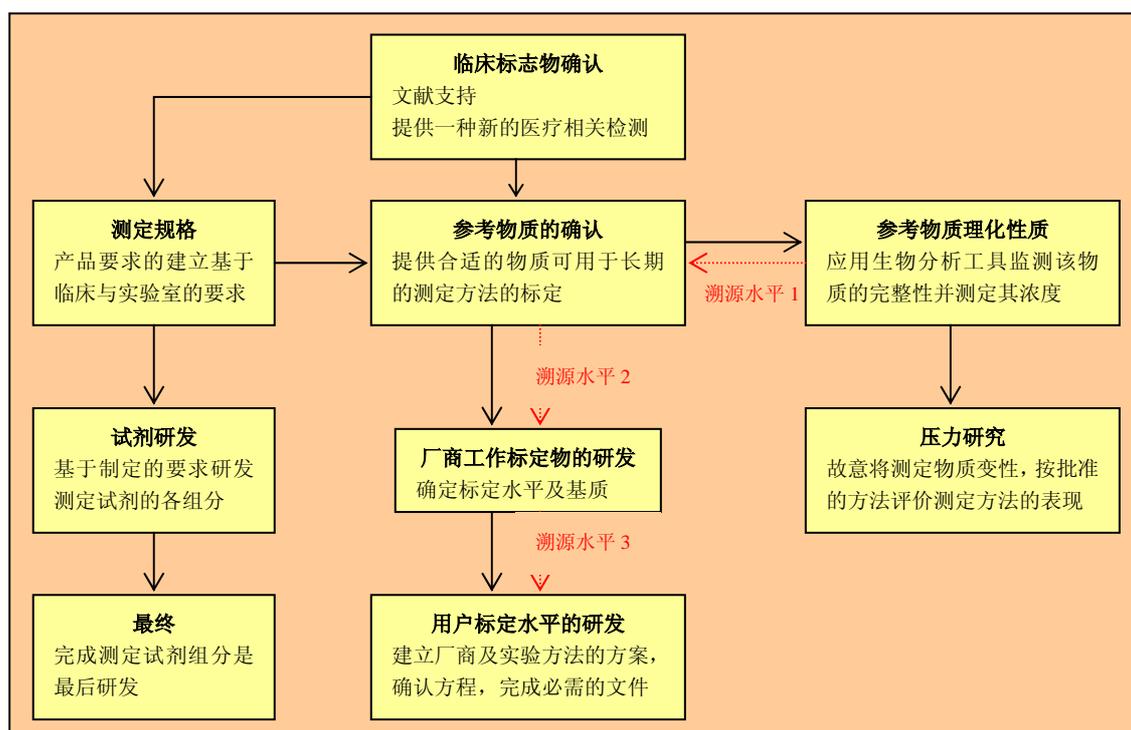


图 1 新的蛋白测定方法的标定

式存在，独立于其他批号或批次以相似方法分离的物质。对于替代品要充分了解其特性，且在一定范围内替代品的表现与前参考物质保持相关性，因此参考物质首次确认需谨慎，这一点十分重要。花大力气去选择合适的参考物质是必要的，这对预测将来要求并获得充分的支持至关重要。参考物质的物理特性为准备长期的计划提供有用的信息。

确定参考物质的主要要求是基于第一原则的独立的分析方法如：基本的物理化学方法可检测参考物质中的物理变化。这些方法独立于实地测定方法(field assay)，可作为典型的用于检测患者标本的商用免疫测定方法。此时的物理变化与方法的性能相关。

一些物理化学技术包括氨基酸分析、电泳技术、质谱分析及表位鉴定可以用

于评价蛋白的纯度及浓度，它们也适用于复杂的碳水化合物或核酸。

在强制变性研究中，有意将参考物质作变性处理，使免疫活性受损，这与一种独立于商用检测的分析方法相关，以上研究结果可用于发展必需的工具用于长期监测候选物质的完整性。

常用的方法是将参考物质以最稳定的形式存储(常为冻干粉末)，然后在各不同时间段，不同温度条件下孵育观察其生物物理特征的变化。虽然液体形式可在较高的温度条件下孵育，但可能会产生一种无关的非活性的产物。这些方法在制药工业上的应用可提供解决这类问题相关的指导。^{8,9}然而这些研究常用于估计保质期，其主要目的作为监测工具，用于分析变性的参考物质，并将其结果与实地检测的那些结果相比较。以上研究可预测可能发生变性的产品及其对测定方法标定的影响。

使用某种独立的参考方法评价参考物质的完整性，可确保该物质仍然可作为测定方法中的稳定物质。注意参考物质的物理化学法分析浓度水平不必同于患者的标本。用纯化的参考物质分析其特性，这些特性与建议的实地测定方法在期望的浓度范围内的表现相关。用独立的分析方法监测参考物质可提供关于参考物质何时需替换的早期预警，所允许的参考物质的浓度损失或变性等指标的要求是基于与临床应用相关的检测方法所允许的偏差。

参考物质一经确认，其使用仅限于制造商的工作标定，工作标定为内部使用，将值换算为试剂中的标定物。在缺乏数值测定的公认参考方法情况下，制造商确认完成值换算的方法。

通常用现场测定方法确定值的大小较为方便，但并不总是最好的选择。值换算的方法应遵循 ISO15193 文件所列出的要求。并非所有的要求都是相关的，因为该测定方法只适合制造商内部使用。但是，该文件确实提供一个有用的潜系列表。在建立标定数值换算法则时，由于分析的精确度和偏差将受检测系统影响，统计方法是严格的。

试剂盒标定物质可使用与参考物质相似的物质，或者另一种更适合某种特殊商品试剂测定的物质。如天然蛋白用作试剂标定物的成本不合适，或者天然蛋白作为商用标定物，在标定期内不稳定。因此，液体形式的试剂盒标定物——重组蛋白较天然蛋白更加稳定。只要该物质所提供的表位浓度稳定，在不同批号试剂

盒标定物和试剂的检测中表现一致，则纯度不是关键因素。

保证测定一致性

标定物应具有可转换性，相似浓度的人体样本的目标商用分析时分析信号为常数。可转换性为标定物质（或者是使用的参考物质或者是实际试剂盒的标定物质）的特性之一。

标定物质的选择与基质的组成可影响可转换的程度。常常假定不含目标分析物的血清或血浆是最佳的基质，但实际并非如此。基质也需要能支持标定稳定，有时该要求会减少使用天然的生物液体如血清。

当基质存在差异时，其对信号产生影响的特征十分关键。许多免疫测定由于基质的影响导致标定曲线正向或负向飘移。对某测定方法的表现的深入研究，取决于这些影响作用程度如何。分析物的标准加入量是另一种评价这些效应的方法。

标定物与实际标本在测定方法的表现特征上的比较用于确定合适的测量方程。方程记录标定分析物与标本产生的信号的结果对比差异。数据可确定方程的偏差及权重系数，为临床上一致的结果确定最合适的方程。

标定方程建立之后，试剂批次间差异影响，制造商工作的标定物质及试剂盒标定物质成为可换算记录。缺乏可转换性表明有必要作深入研究确定原因并弥补缺陷。

通过溯源链条，从患者样本开始到获得结果，标定物质必须证明其在每一步数值换算中都能够被换算。对于临床医师而言，人的样本中分析物的浓度测定必须具有一致性。

比较样本结果和每项参考的准备或上至溯源链的标定物质证明其可替代性，这些信号至标本结果的比率应相同。

此外，含相同浓度的分析物标本结果的数值应保持一致。某一批号的试剂，不同批号的标定物质的产生的结果应相同，不论参考物质的来源如何。以上均假定不同批号的测定试剂测定相似的样本时产生的信号不会发生变化。标定及向更高等级的标准溯源不能校正样本试剂变化的灵敏度。

测定方法的检测

假设标定方案的相关细节已充分了解，测定方法的表现也可接受，测定方法便可进一步确认。试验方案应详细描述测定方法标定的所有部分，并用足够批次的试剂在一定时间段内测定表现一致来证明。

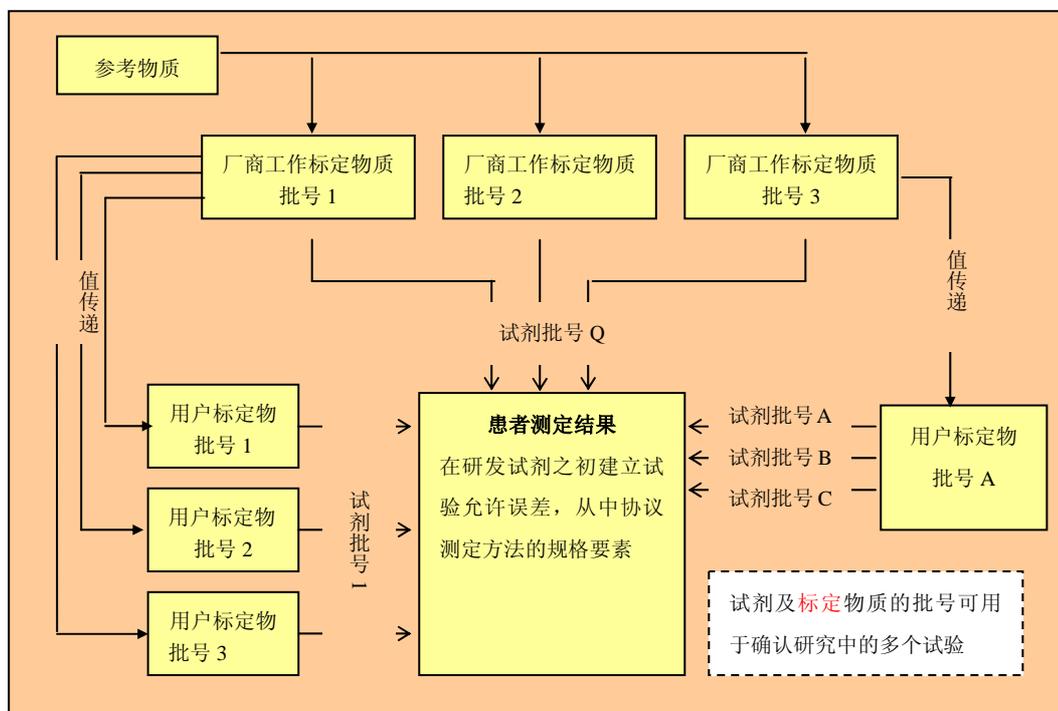


图 2. 检测方法的确认

确认方案如下所述（说明见图 2）。准备三个批号的制造商工作标定物质，其中一个批号用于准备三个批号用户标定物质。常用的改变标定物质关键成份的方法是合适的（除了用于工作标定物质的参考物质必须稳定外），所有三个批号的制造商工作标定物质用于标定某一批号的测定试剂，相同试剂批号用于测定覆盖一定范围的系列浓度患者标本。用三个批号试剂盒的标定重复试验，试剂盒的标定值由单个批号的工作标定物质换算。较为理想的是三个批号的工作标定物质所确定的标定物结果应相同(在规定的批间差异内)。可接受的标准是基于测定方法期望准确度上。

用户标定物批号与一组人类标本报告结果应具有一致性。注意，根据测量方程，从工作标定物质确定的标本值与用户标定物确定的标本值可能不一致。如换算是建立在单一批号的测定试剂与各种不同标定物批次的条件下，应考虑试剂批号的变异所致的影响。在确认阶段，单个批号的标定物质用于为三个或以上批号的试剂建立标定曲线，然后使用多批号试剂测定同一组人类标本，接受标准基于

所设计的测定方法的表现。

估计标定水平、标定过程、不同仪器及报告结果的不确定性是确立测定方法表现的可接受标准基本要素，这些标定过程需要了解由参考物质所确定的值、厂商处理（包括加工或检测）、仪器变量及实际测定方法的表现等信息。

定义相同患者群体时应比较各不同组分或不同批号组分的影响。不确定性估计可预测期望错误离差，因为各组分均可对测定结果产生影响。关于计算不确定性的指导可见 Eurachem/CITAC 指导中“化学测量的溯源性”。

其它安全措施

使用特性已知的稳定参考物质可使测定方法保持长期稳定，但仅参考物质不能保证充分区分健康与处于疾病状态下患者的标本。

为确保样本测定的一致性，冻存一组可信的样本用于确认同一群体的样本。当然，这种方法并不总是实用的，因为某些样本测定时要求样本新鲜，这些情况下，应考虑使用替代方法。

理想条件下，对每种蛋白分析物已确认的参考测定方法的有效性，可保证患者的测定值具有一致性。但遗憾的是对于多数特异蛋白高敏感性免疫测定而言，确认参考方法难以建立，直到现在为止，试剂厂商仍依赖于根据稳定的参考物质确标定定方法。

参考文献

1. Homocysteine in Health and Disease, ed. R Carmel and DW Jacobsen (New York: Cambridge University Press, 2001).
2. AHB Wu et al., "Characterization of Cardiac Troponin Subunit Release into Serum after Acute Myocardial Infarction and Comparison of Assays for Troponin T and I," *Clinical Chemistry* 44, no. 6 (1998): 1198–1208.
3. RH Christenson et al., "Standardization of Cardiac Troponin I Assays: Round Robin of Ten Candidate Reference Materials," *Clinical Chemistry* 47, no. 3 (2001): 431–437.
4. "Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on In Vitro Diagnostic Medical Devices," *Official Journal of the European Communities* L 331 (1998): 1–37.
5. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM), International Organization for Standardization Web site (Geneva: ISO, 1993 [cited 2 August 2005]); available from Internet: www.iso.org/iso/en/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=40721&scopelist=PROGRAMME.

6. In Vitro Diagnostic Medical Devices—Measurement of Quantities in Biological Samples—Metrological Traceability of Values Assigned to Calibrators and Control Materials, ISO 17511, International Organization for Standardization Web site (Geneva: ISO, 2003 [cited 2 August 2005]); available from Internet: www.iso.org/iso/en/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=30716&ICS1=11&ICS2=100&ICS3=10.

7. In Vitro Diagnostic Systems—Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin—Description of Reference Materials, ISO 15194, International Organization for Standardization Web site (Geneva: ISO, 2002 [cited 2 August 2005]); available from Internet: www.iso.org/iso/en/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=26306&ICS1=11&ICS2=100&ICS3=10.

8. DW Reynolds, KL Facchine, and JF Mullaney, “Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies,” *Pharmaceutical Technology* (February 2002): 48–56.

9. R Stevenson, “Stability Indicating and Forced Degradation Assays for Proteins '04: It's About Time,” *American Biotechnology* (November 2004): 5–6.

10. In Vitro Diagnostic Systems—Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin—Presentation of Reference Measurement Procedures, ISO 15193, International Organization for Standardization Web site (Geneva: ISO, 2002 [cited 2 August 2005]); available from Internet: www.iso.org/iso/en/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=26305&ICS1=11&ICS2=100&ICS3=10.

11. Eurachem/CITAC Guide: Traceability in Chemical Measurements, (2003 [cited 2 August 2005]); available from Internet: <http://www.measurementuncertainty.org/mu/search/index.html>.

作者简介: David C. Sogin博士, 是Abbott公司(Abbott Park, IL)的研发科学家, 他的联系方式为: david.sogin@abbott.com.

检测方法开发篇

分阶段开发和商品化新型免疫诊断方法

Richard F. Taylor 文

Lurenquan 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。）

稳步发展新的检测方法能帮助体外诊断试剂制造商实现更大的目标。

毋庸置疑，在未来很长时间内，免疫分析和免疫分析系统仍然会继续占据诊断应用中的主流地位。对分析系统的需求不仅刺激了投资市场，也鼓励了致力于开发新型免疫分析技术和产品的公司蓬勃兴起。

将实验室中的测定系统投向市场这个过程中涉及各种各样的技巧和经验。仔细计划、关键步骤以及其他产品目标在这过程中都很关键。此外，测定系统的开发所需在一些书中已有记载。除了这些基本的考虑以外，免疫测定系统开发也需要仔细的、一步一步地计划以确保投放市场的成功。本文的提纲列出一些最常用的分析物（如血液各种成分、致病原、肿瘤标志物、心肌标记物等等）免疫测定及其系统的开发和商品化是概括性的，分阶段实施的目标。TC联合公司(WestBoxford,MA)曾使用该办法成功开发了一系列的产品，例如：最近得到颇为称道的SpectralDiagnostics公司(多伦多)的革兰氏阴性细菌临床测定系统（见图1）和Response生化公司（Burnaby，加拿大）RAMP床边检验诊断平台（如图2示）。这些途径可以应用于测定系统的开发来满足绝大多数市场的需要。尽管这里所叙述的开发策略应用于免疫测定，当然它们也能用于核酸探针、生物传感器、微矩阵以及其他测定系统的开发。



理查德泰勒f.博士是TC联营公司（West Boxford, MA）总裁。联系方式：tcadtaylor@cs.com。

图1.Spectral诊断公司(多伦多)内毒素活性测定（对革兰氏阴性细菌的评价）

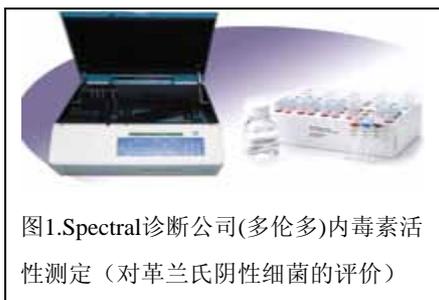


图1.Spectral诊断公司(多伦多)内毒素活性测定（对革兰氏阴性细菌的评价）

开发测定系统的基础

新的成功开发的免疫诊断系统须满足一个或两个基本需求。首先，如果新的测定系统会取代

已有系统，因为它有更好的操作性

能和更高的效率——如，每个测定成本更低而效率更高，并且，如果可能，更低的资本投资和更少的耗工。第二，如果新的产品声称有新的诊断功能，这就需要长期的积累试验。开始时，该系统投入较多的费用。成本就成了开发类似系统相互竞争的主要因素。

生产厂商必须仔细考虑新的诊断产品的开发和投放市场过程中的风险和利益。假阳性和假阴性的比例也必须作为投放市场前的考虑因素，因为最终影响到测定和其作为疾病的检测和预防的效用以及病人的管理。

在临床诊断上，风险/收益率的考虑不仅仅指实际测定方法的（如放射性同位素）因素，同时也与测定结果应用有关。后者的风险主要导致诊断错误，甚至导致当前正在治疗疾病的测定处于道德标准上的尴尬境地。

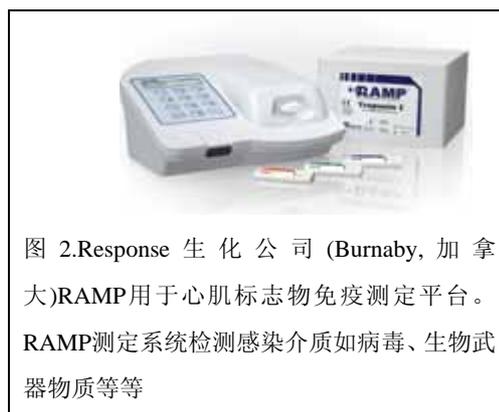


图 2. Response 生化公司 (Burnaby, 加拿大) RAMP 用于心肌标志物免疫测定平台。RAMP 测定系统检测感染介质如病毒、生物武器物质等等

例如，在美国，相当多的人反对用测定来诊断具有遗传性的疾病如囊包性纤维症以及营养不良性肌肉萎缩。这主要有反对人士指出，测定若表明父母是疾病携带者或显示胎儿带有疾病，可能会导致流产和涉及到生产厂商对这一法案的社会意义。反过来，如果测定用于遗传性疾病的检测但准确性较差同时不可预见，那该诊断试剂公司可能面临潜在的法律后果。至少在某些疾病，这样的社会政治因素，往往比用于病人具体的某一临床测定给其带来的生命质量的管理和改善更为重要。

测定系统的设计

在商业化进程中，对一个新的免疫诊断测定系统在早期进行评价和决定，这是至关重要的。这些考虑应包括对测定系统应用的市场进行调查，同时对市场上已有的测定系统的竞争能力的评估。这些分析有利于对未来市场占有率和投资回报率进行规划。

在一个已经建立了的免疫诊断系统进行一个新的测定项目的开发或者一类免疫诊断系统的通用的 OEM 试剂的开发，设计通过系统结构来示意因而是直观的。然而，系统所需的如测定方法和抗体的特异性，往往限制了该系统可以开发的新测定的数目。

免疫诊断试剂盒和单个测定系统又拓宽了设计特性的选择范围。近来，免疫测定试剂盒尤其是近阶段的应用抗体的微矩阵系统，设计用来满足应用选择自由和性价比日益增加的需求标准。这样的标准有如下：

- 高度灵敏性
- 高度特异性
- 快速的结果输出（从数秒到几分钟）
- 同一测定（组）测定几种分析物的能力
- 操作简单（均相）
- 无试剂模式
- 最少或无需上样的预处理
- 便携性
- 每一测定成本要低
- 对使用者无或低风险设计考虑主要集中在最终用户（例如内科医生、护士、技师或者看护人员）和测定使用地方（如内科医生办公室、临床实验室、重症监护室或家庭中）。

这些因素决定仪器的型号和测定中的培训材料。它也决定了在1988年临床实验室修改法案中规定的测定的复杂程度。公司也必须进行测定试剂盒的老化试验和单一成分的实际储存期限、贮存条件以及测定使用条件。这些数据对该测定和仪器使用的全面质控密切相关。

最后，处理方法也必须考虑并且要写进测定说明书中。例如，放射免疫测定需要执行放射性同位素的管理条例。在购买和使用时不仅要遵照联邦的处理规范，而且遵照各个州的相关法规。

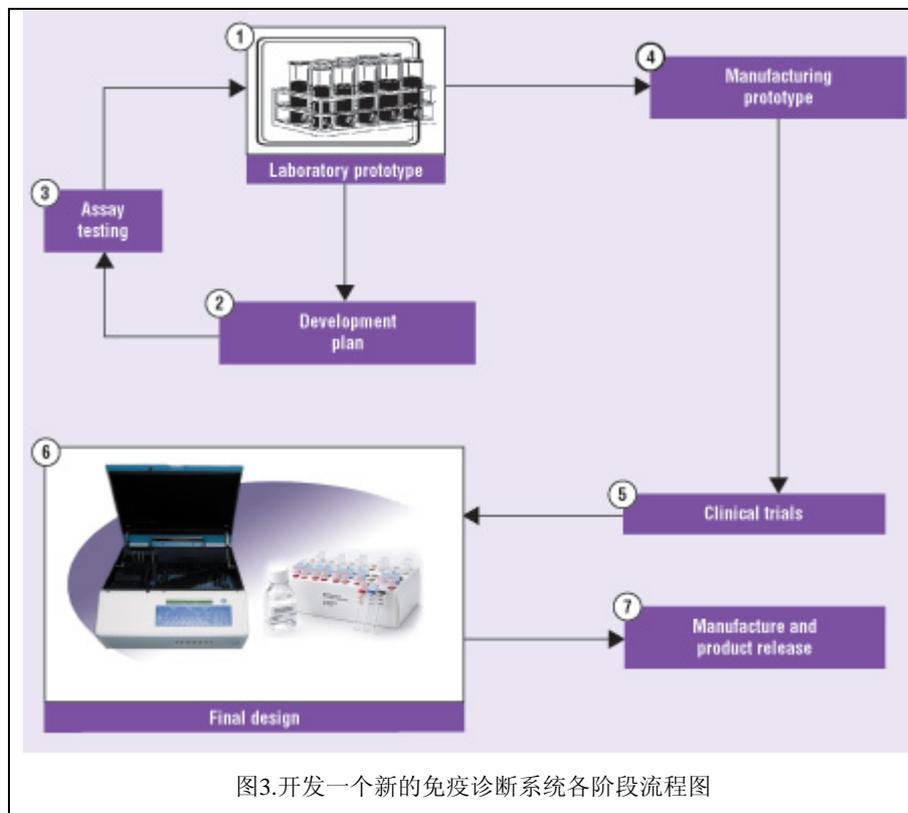
新诊断产品的商品化

将一个新的免疫产品投放市场往往需要一些跨学科的技巧和经验。这些需要包括：生化/免疫/电子学/工程学/聚合工业等方面的专家；质控/质量保证/规章制度；大规模的生产和加工经验/技术转让/包装；以及一些运输和配送的知识等等。对于临床诊断（用于人类检测），往往需要临床测定培训的经验。

在商业化过程中，开发组必须注意以下关键参数：

- 说明书的操作步骤

- 质量保证/质量控制的制度和方案
- 项目的规模/生产中的问题和解决方案
- 系统和系统组件的成本以及使成本最小化的措施
- 具有竞争力的设计和为使用者的考虑
- 生产过程
- 常规的交流（必需的）
- 包装
- 市场投放和监控许多时候，一些新成立的公司没有必要的内部经验，并且需要决定是否雇佣一些有经验雇员或者到公司外部寻找顾问提供帮助和建议。在早期项目设计阶段需要咨询外部顾问的。



本文中开发的程序，分阶段共有七个步骤，可用来指导免疫诊断产品的商业化，也可用来在开发程序中的每一步测试是否成功（见图3）。尽管这里主要是用于人类的临床免疫测定，若经过合适的稍稍改动，也可用于兽医/环境/食品/制药等的免疫检测中。然而，所有这一切，若是仅内部使用，投入市场.组装和发放阶段不需，临床应用的培训也并非必须，

第一阶段：实验室模型测定仪的初始研发

第一阶段的目标是研发实验室模型测定仪，将技术转化为实样，从而可验证

测定的效果。研发的成本包括耗费的时间、可获得的投资资金、投资回报的风险以及项目效应等等。仔细地预先计划好和管理好，可以降低开发成本和缩短开发周期。

第一阶段一般有以下过程：

- 明确市场需求和将研发的产品
- 进行技术论证和选择所需技术
- 进行研发以及计划产品模型
- 开发和测试实际的测定系统

•进行常规的述评和再回顾开发队伍在很多时候，测定所使用的技术可能是其他研究或需要的产物，也可能是一些偶然的发现。这种情况下，开发可能没有典型的组织或很明确的目标。

第二阶段：技术述评和设计理念的选择

如果生产商决定花时间和精力来开发一个实验室模型测定系统，那就可进入测定系统开发的第二阶段。这时，测定系统开始从最初的研究阶段进入到实质性的开发阶段。过渡阶段很关键，它往往须从学术研究成果和测度系统商业化所需达成一致。

第二阶段需完成以下目标：

- 将技术论证提上日程
- 对比该技术与那些这方面具有竞争力的产品存在的优缺点
- 选择设计理念
- 规定具体措施
- 制定开发和商业化的步骤，包括项目花费和时间
- 正式决定开发进程

•组建开发、管理、和营销队伍第二阶段的目标是建立开发计划，来明确设计理念 and 措施。本阶段通常需利

用开发公司的外部资源（第三方进行技术论证，OEM方提供原材料和试剂等等）。该步的产品框架、目标和完成时间需慎重考虑，以作出是否将开发计划进行下去。

第三阶段：测定系统开发细则

开发计划已经启动后，测定系统在使用测定系统的组成部件和试剂（例如：

免疫测定用的抗体以及结合物）时，也需达到实验室试验阶段的重复性和准确度。这些组件和试剂可以自己少量试生产或通过OEM公司购得。

该阶段有以下主要任务：

- 购买或试生产测定系统得组件和试剂
- 制定和实施所有得测定组件质量控制/质量管理的制度
- 测试测定系统的重复性和精确度
- 将测定系统的方法正规化和完成其包装
- 建立基于初步市场研究的市场计划初始表
- 选择临床试验点

第三阶段能证明测定是否能满足其设计和实施的细则。绝大多数时候，本阶段耗时较长，在一些看似小问题地方却很棘手而花费较预期多。一个内部联系紧密的开发团队在这些问题的解决上很关键。

第四阶段：最终设计和测试

第四阶段的目标是建成和验证测度系统的生产模型仪器。开发到这一步，最终的免疫测度系统的生产和完成工艺已接近尾声，就准备临床测试。本阶段生产商应完成以下任务：

- 完善生产的组件和最终产品的包装
- 生产至少三批的该系统的所有试剂和组件并细化成文
- 制造和测试最终的产品仪并细化成文
- 述评设计和生产中考虑到的措施以降低下游生产的问题以及花费
- 接洽合适的正规代理以讨论报送的规定(例如美国诊断试剂的510(k)或者市场前准许[PMA]申请)以及所需的临床试验
- 起草临床试验计划的最终方案，若要申请许可时，报送合适的机构去等待批准
- 在合适时，准备文件和设施，申请GMP或ISO认证
- 建立和提供站点来评价测定的性能

第五阶段：临床测试

一旦实验室的模型仪已建立和验证，测度系统的实际操作可以正式开始了。第五阶段主要是平稳过渡到临床试验的完成以及接受到测定系统的正式批文，包括一下内容：

- 培训临床测试点使用该测定系统人员
- 加强数据收集和整理
- 运输试剂盒和试剂
- 提供故障排除措施和测试点所需的技术支持在试验完成后，数据收集、校验，为申请批文做准备。所有需报送的文件均应有备份；此外，临床试验也考验测定试验团队，尤其是对该系统过程不是很有经验的人员。常常因为临床试验是非常耗时的，许多公司也就选择第三方委托其进行数据的收集和处理。

第六阶段：设计变更、测试和生产转化

绝大多数情况下，临床试验能反映测定系统各步和组件（或两者皆有）的变化，这也是必须的。例如，测定系统的灵敏度、特异性、阴/阳性预示值等需临床试验来校准。庆幸的是，这样的改动往往很小且很快。

第六阶段包含了所有测定仪为接受最终批文的一切必要过程和措施。该阶段有：

- 决定和实施测定系统设计和定案前的一切改动
- 将改动的部分进行必要的测试来达到规定的要求
- 报送初步的规定所需文件.
- 确定最终包装设计
- 完成最终的生产工艺
- 将第一批产品组成部件转给生产厂商
- 完成QA/QC文件
- 完成所有的GMP文件，准备GMP检查
- 完成市场化和排布要求

第七阶段：生产和投放市场

在开发阶段的最后一步也完成后，测定系统根据市场计划应已完成该项目的生产。配送和运输方式应适宜，GMP标准应已获得批准。第七阶段具体步骤如下：

- 组织测定系统的大规模生产和组装
- 承担信誉和质量保证的测试
- 技术文件和申请归档

- 安排配送和进入市场的各个环节
- 产品交付后六个月收集和评述客户的反馈意见

每个阶段的期限和花费经验表明，通常进行一个新的独立免疫诊断系统的开发和商业化，即从第二阶段到第七阶段往往需34—54个月，需资金340—730万美元左右（具体可见表1）。客观地讲，研发在开发一种测定技术的最终花费中是关键部分，特别关注其失败和评价研发过程能快速影响所有程序。经验表明，通常进行一个新的独立免疫诊断系统的开发和商业化，即从第二阶段到第七阶段往往需34—54个月，需资金340—730万美元左右（具体可见表1）。客观地讲，研发在开发一种测定技术的最终花费中是关键部分，特别关注其失败和评价研发过程能快速影响所有程序。

Phase	Activity	Milestone	Time (months)	Cost (\$ millions)
1	Initial R&D	Lab prototype	12-24	LOE ^a
2	Technical review; design concept and specifications	Development plan	6-10	0.5-0.7
3	Test to specifications	Meet performance specifications	8-10	0.8-1.5
4	Final design and testing	Manufacturing prototype	6-8	0.6-1.0
5	Clinical trials	PMA or 510(k) approval	6-12	0.5-2.5 ^b
6	Transfer to manufacturing	Final product	4-8	0.5-0.8
7	Full production	Product release	4-6	0.5-0.8
Total, 2-7			34-54	3.4-7.3

^aLOE - Level of Effort
^bThe higher estimate range reflects the requirements for a new product, PMA submission.

表1 预计开发一个新临床免疫诊断产品的时间和花费

当对一个已经存在的模式或系统建立一个新的体外诊断试剂花费要小得多。这时，测定系统的开发能缩短到10—15个月，同时节约一些资金花费。

有时，当测度系统需为其开发新的测定仪器(例如：比色仪、荧光或化学发光光度计等等)时，另外的花费从100万美元(不改变原来的基本技术或在原有的仪器上加以一些改动)到1200万美元(设计和生产一个全新的仪器。因为任何新的仪器准备为临床测试，开发步骤应从第二步开始。

结论

本文仅从第一层面上阐述了开发一个新的测定系统各部计划，以及在商业化过程中的关键问题。计划再进一步，就是每一具体测度系统解决其各部出现的问题，完成任务。这些任务就从计划直至投入市场的每一步直接完成实实在在的手

头工作。

一旦测度系统完成基础研究进入到开发阶段，团队应监测试验和生产的各个方面。商业化的临床测定系统也需要早期计划进行市场准许的申请。另外，通过特别关注测度系统开发的关键步骤，体外诊断试剂生产企业能降低不符合规定的产品的风险，同时也增加在有限的时间和成本的情况下，测度系统成功开发和商业化的几率。

参考文献

1. SS Deshpande, *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development* (New York: Aspen Publishers, 1996).
2. RF Taylor, "Chemical and Biological Sensors: Markets and Commercialization," in *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, eds. Richard F Taylor and Jerome S Schultz (Bristol, UK: IOP Publishing, 1996), 553–579.
3. D Wild, *The Immunoassay Handbook*, 2nd ed. (New York: Elsevier Science Publishing, 2001).
4. JC Marshall et al., "Measurement of Endotoxin Activity in Critically Ill Patients Using Whole Blood Neutrophil Dependent Chemiluminescence," *Critical Care* 6, no. 4 (2002): 342–348.

检测技术开发篇

基于胶体金技术快速检测试纸条的错误信号的处理

JohnChandler,NicolaRobinsonand KarenWhiting 文

liu_wei 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。）

对错误信号的处理和检测操作的优化的系统化处理方法的导言。

在近些年来，体外诊断产业（IVD）增加了巨大的投入来开发基于膜技术的快速检测试纸条。类似的检测已经应用在临床和非临床领域。在早期的论文中已有一篇是关于这些方法得到广泛应用的综述。

虽然基于膜技术的快速检测试纸条是相当简单的，但是此方法的实行的效果依赖于大量的关键参数，在《体外诊断技术》的早期论文中已经探讨了金标液（gold conjugate）的质量和与膜结合的蛋白捕捉的方式的重要性。此篇论文探讨了导致产生假阳性和假阴性信号的错误的检测操作的可能原因，并且提供了一套解决此类问题和优化检测效能的系统方法。虽然此文章是有针对性地说明了胶体金检测技术中的相关问题，但是在胶乳检测技术中也能发现类似的问题。为了避免重复，我们假定读者熟悉快速检测技术的机理和快速检测试剂的基本特性——尤其是抗体、金标粒子、硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫和吸收垫——并且熟悉检测中用于处理不同试纸条和硝酸纤维素膜的各种化学试剂。对于不熟悉这些概念的读者，在其他文章里已经对此进行了详细的解释。

假阳性结果和假阴性结果的特征

假阳性结果是样品中没有待检测物时在检测带上出现了一条彩线（对于金标而言是红线）。这条线可能在检测的初期或在一段明显的时间延迟之后出现。假阴性结果是有可检的阳性样品时在抗体捕捉点上没有出现一条可见的线。

假信号可能在许多种样品中发生，也可能仅仅发生在一种特定类型或来源的样品中。这个问题可能出现于一个单独检测批次的每个样品，也可能仅仅发生于一个样品检测中随机数量的检测带。后一种情况说明了对于整个操作而言在进行下一步前进行每个步骤时对大量检测带的处理的重要性。甚至在整个操作水平时

从标准阴性样品中也可能发现假阳性结果，同样对于标准阳性样品亦是如此。由于批次检测失败后的巨大的成本损失，因此在进行达到大量产生前对假阳性和假阴性结果准确判断和产生原因的了解是必要的。

假阳性和假阴性信号的产生有许多不同的原因。这些信号可能由样品或由检测技术本身的设计缺陷和操作不当引起。我们可以通过在研制时的每个步骤进行彻底的、反复的大量的检测装置的试验可以消除产生假信号的潜在因素。

当进行检测时，假阳性或假阴性结果产生的原因有时是由信号的观测产生，也可能由于流动相的特征导致假信号的产生。然而，假信号出现的理由一般并不经常是显而易见的。我们一般依赖于经验、系统和科学的方法、详细的故障排除预案可以

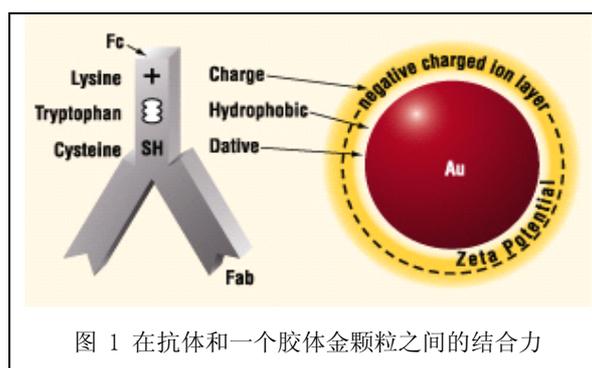


图 1 在抗体和一个胶体金颗粒之间的结合力

可以消除假信号的产生并且组织它们发生。在调整任何特异性参数之前，检测技术的开发者应当十分熟悉使检测技术更为可靠的因素和可能引起错误的因素。如果对快速检测技术有了充分的理解，那么没有必要采用经验的方法。

对于基于膜技术的快速检测技术工作机理的详细描述和对于假阳性和假阴性结果的详细的故障排除操作手册不在这个篇幅短小的论文讨论范围之内。相反，此篇论文扼要讲述了对引起这些问题的原因的典型特征并且主要说明了处理此类问题的方法。

假阳性产生的基本原因

大多数假阳性信号出现的原因是由于相似的问题，即在常规的结合步骤进行时蛋白与胶体金颗粒特异性结合。在此过程进行期间，蛋白质被三种主要的力吸收在胶体金的表面上（图1）。

电荷引力 胶体金颗粒带有负电荷，这是由于在将氯金酸钠转化为胶体金时，使用的还原剂（经常是柠檬酸盐）带有的一层负电荷被吸附在胶体金颗粒的表面。负电荷将吸引带有正电荷的蛋白并且足以使其靠近结合区的表面，这样就有可能发生假阳性。低于等电点的蛋白带有正电荷，因此可能会与胶体金颗粒表面发生强烈的吸引作用。尤其是带有富含赖氨酸和精氨酸的蛋白区域在低于

赖氨酸的等电点（pH 10.4）和精氨酸的等电点（pH 12.5）时会带有大量的正电荷。

疏水作用力 一旦蛋白质彼此十分接近（之间的距离大约小于 1nm），蛋白质的任何疏水区很有可能与胶体金表面的疏水区接触并且与之结合。因此富含非极性氨基酸（例如色氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸）的蛋白质会与胶体金表面发生强结合作用。

配位键结合力 配位键结合力是所有吸引力中最强的结合力。含有大量富含硫的氨基酸（由于存在半胱氨酸和甲硫氨酸）的蛋白质强结合胶体金颗粒表面。这是由于在金原子（具有传导带电子的能力）和硫原子（带有价电子）之间的吸引力造成的。

当这三种结合力作用于金标颗粒上，它们会产生如下所述的假阳性信号并且由此而对检测技术的效能产生不良的影响。

在采用系统的方法来诊断和消除假阳性信号之前，了解大多数（并不是所有的）假阳性信号可能的原因是十分重要的。

图2概要的描述了需要关注的主要区域，而下面所描述的概括了大多数普通的原因。然而，这些描述并不是一点也没有遗漏。总体上来说，所有可能产生假信号的原因与金标粒子、捕捉抗体、硝酸纤维素膜，所加的化学试剂和样品联系在一起。通过对这些潜在缘此的充分理解，在检测的操作过程中可以根据这些特征而做出迅速的判断。

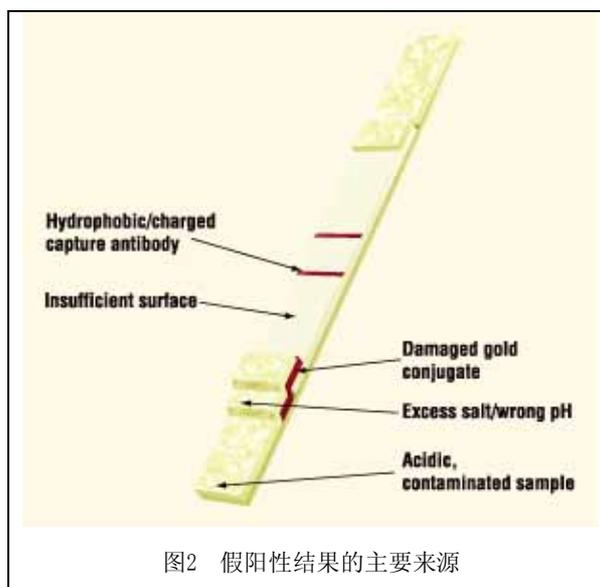


图2 假阳性结果的主要来源

由于金标粒子而产生的问题：由于某种原因金标粒子的表面由于没有被蛋白质覆盖而会部分裸露。在干燥金标液或者在检测过程中，或者在第一步中金标被涂得很少，这些都有可能导导致抗体被去除。无论哪种原因，裸露的胶体金颗粒将会被任何带有正电荷的蛋白质或硝化纤维素或尼龙膜所吸引。当胶体金颗粒通过捕捉线，由于距离非常小而物理接触的可能性的非常大，这特别明显。因此有

效地包被胶体金颗粒并且蛋白质在储存、处理或操作的过程中没有脱落，这两点是非常重要的。

除了胶体金颗粒对捕捉线的吸附外，标记抗体本身可能在特定的操作条件下被捕捉线吸附。这可能归结于电荷或疏水作用力，也可能是由于在此过程中的酸性或离子环境。

过量的金标粒子会产生几个问题。首先，它能够提高在捕捉线上假阳性信号的可能性，或则是由于大量的金标液通过这条线。其次，在检测期后，它也会提高胶体金标粒子回流的可能性。一个好的品质的金标液不需要使用过量。

胶体金颗粒也可能聚集成簇，一般来说有很多原因，通常是由于操作失误所致。胶体金簇如果多的话可能会堵塞膜孔。如果成簇的原因是由于胶体金的疏水作用力形成的，那么在金标液流动的过程中胶体金颗粒也会粘附在捕捉抗体上。无论待测物是否存在，金标的抗体都可能会与捕捉抗体发生非特异性免疫反应。虽然在 ELISA 技术中在一对抗体之间发生类似的反应可能不是经常发生的，但是这种方法会使硝酸纤维素膜上的标记抗体与捕捉抗体非常接近，从而提高了发生非特异性免疫反应的可能性。另外，特别是在使用多克隆抗体时，有可能会发生与样品中其它待测物的非特异性的反应，这种非特异性反应的发生与否主要取决于使用的抗体的纯度。

伴随捕捉抗体而产生的假阳性信号：有许多因素可能会影响捕捉抗体发生非特异性结合反应。产生假阳性信号可以归结于疏水作用力、非特异性免疫反应、抗体中的添加物、带有大量的正电荷、在与胶体金颗粒吸附的捕捉抗体中富有高浓度的含硫氨基酸。在标记过程中这些因素都会引起抗体与胶体金颗粒表面吸附并与其结合。在实际的工作中，作用于捕捉抗体的这些因素会危及到快速检测技术的效能。

与固相支持物相关的问题 硝酸纤维素膜非常脆并且在接触时很容易受到破坏。因此在撕开膜的过程中避免与膜发生任何可能的机械接触是非常重要的。如果应用捕捉抗体时膜被压制在捕捉抗体带上，那么在样品流动过程中，会提高金标粒子发生非特异性反应的可能性。

两个方面能够使残余的金颗粒附着在捕捉抗体带上——金标粒子在膜中的流速太慢或者是胶体金垫释放的速度太慢。如果膜的孔径太小或者在检测带上没有足够的活性物质，再就是硝酸纤维素膜与金标液或与吸收垫的接触不良，那

么这些情况就会发生。此外，由于硝酸纤维素膜是疏水的，因此会阻碍金标液顺畅的流动。再加一句，有些样品可能非常具有粘性的（例如血清），这种因素也会使流速减慢。当检测体系中足够的样品或活性物质来使金标沿着检测带移动时，胶体金颗粒也会粘附在捕捉抗体带上。

如果花费很多时间来观测检测结果（通常是超过 15 分钟）时，膜就会变干，多余的金标粒子很有可能开始从吸收垫向干燥后膜回流。由于干燥后的捕捉抗体非常疏水，胶体金颗粒从吸收垫流向干燥后的捕捉抗体带的可能性非常高。

化学试剂问题：一些快速试纸条的厂家在有一个对硝酸纤维素膜进行封闭的生产环节。当对特定的样品进行检测时，对硝酸纤维素膜的封闭将膜从层析分离器（吸水的物质）转变成非层析分离带（非吸水的物质）。这种设计是为了提高样品和金标粒子在膜带上的流速。

然而，采用在蛋白液或表面活性剂溶液中浸泡后对膜的封闭也有可能洗掉任何化学试剂，这些掺入进去的化学试剂是厂家让膜不至于变得完全干燥和疏水性。因此，在干燥的状态下这种封闭作用可能会让膜具有更强的疏水性，因此甚至能在捕捉抗体带引起更为普遍的背景染色或假阳性信号。

采用过量的蛋白或活性剂进行封闭的方式都能够在样品流动过程中产生高粘性，因此可能降低样品清除率。用不恰当的反应液进行封闭也会改变捕捉抗体的特性，通过电荷作用力、疏水作用力或氢—硫作用力的提高会使其更具有粘附性。封闭膜应当进京用于下面所述的理由，例如当需要提高样品或胶体金颗粒的流动性，和仅仅需要最低的反应物浓度。

一些保护剂，不论在捕捉抗体中的、标记抗体中的或者是样品中的都能产生假阳性结果。硫柳汞（含硫和汞的化合物）和赖氨酸（一般在 $\text{pH} < 10.4$ 下带有大量的正电荷）在检测中是特别要注意的问题。

样品的问题：许多样品中含有可能与金标粒子或捕捉抗体发生非特异性结合的物质，并且产生非特异性结果。举例来说，一些含有细菌的样品，而样品中的细菌可能被部分破坏成细胞碎片，并且这些细菌是非常疏水的。这些疏水的细菌碎片也可能与捕捉抗体和金标粒子发生交叉反应。

其它的一些样品可能含有高水平的硫或 SH 基团，或者具有高正电荷。此外，一些样品可能含有大量的分子或细胞分子，这有可能阻塞膜并且对检测带上的金标液的流动产生干扰。

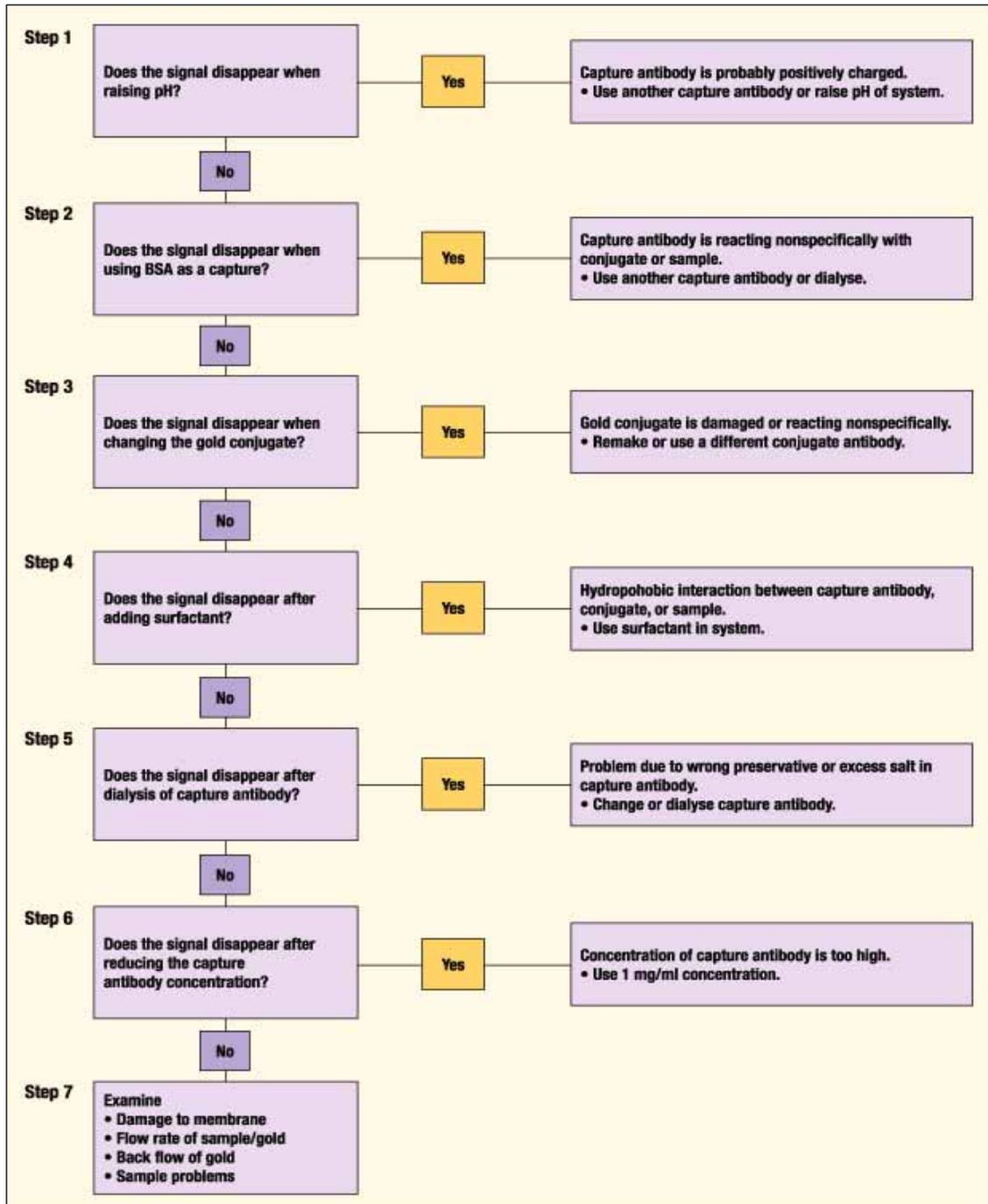


图 3 系统诊断假阳性信号的流程图

样品可能在酸性条件下变化非常大。例如，尿液样品最初的 pH 值是在 4~7 之间，然而随着细菌含量的增加，样品的 pH 值也随之降低。酸性样品在流动过程中在捕捉抗体表面产生正电荷，反过来这将引起与带有负电荷的金标粒子发生非特异性反应。

如果样品含有大量的酸性物质或者带有大量的正电荷蛋白质，它们在到达捕捉抗体区之前可能与金标粒子非特异性结合。这不仅能掩盖待测物与金标的结合

信号（因此产生降低特异性信号效果），也能增加与在膜上和捕捉抗体带上成簇物质的结合物。

对假阳性结果诊断的补救措施

无论偶而还是重复出现假阳性结果，采用对于此类问题的诊断的一套系统的方法也是为了实施最恰当的补救措施（见图 3）。最明显的原因首先是被注意到的，主要有金标与捕捉抗体的反应；特异性电荷吸引力、疏水作用力和金-硫结合力。

然后应当注意在抗体、特殊样品特性和跨膜流动特性的非特异性交叉反应。使用对照能够迅速地找到问题的根源。

下面是系统的诊断方法的说明和前面所列的可能原因的参考。当采用任何系统的诊断方法时，采用对照时，只能改变一个参数。采取这种方式，可以采取排除法。下面的问题可能会有些帮助：

1. 是电荷的原因吗？检测体系 pH 值的变化（pH5-11）表明了正电荷是否存在和胶体金颗粒与捕捉抗体是否结合。

2. 是疏水作用力的原因吗？这可能发生在固相中，捕捉抗体区或金标区。改变体系中活性剂浓度对于疏水作用是否是主要因素可以提供头绪。

3. 是金-SH 吸引的原因吗？最有可能发生在捕捉抗体带和样品浸入带中的半胱氨酸和精氨酸的基团中。如下面部分的描述对这两个区域的仔细检查可以揭示出问题的所在。

对于假阳性问题解决的系统方法

对于快速检测试纸条应用的大多数检测手段来说，一般只是采用一个测验条（或者是“半条”）。没有必要选择完全干燥的检测条。在检测的过程中，硝酸纤维素膜直接被放置于含有金标液、样品和化学药品的微孔中，化学药品正常被放在干燥箱里。以这种方式，可以迅速简便地进行几种检测，并且不需要全装配装置和干燥箱。然而，如果由于干燥步骤而引起许多问题，那么在检测之前必须进行完全装配。

这些关于系统方法的问题可以被划为下面与检测装置和元件相关的五个目录中。

产生的问题是与金标液相关吗？ 这个问题很好解决，换一种金标液就可

以了——举例来说，在相同浓度和相同的pH值下用 BSA-gold 替换最初的金标液。如果问题还是没有消除，那么最为可能的原因是所带的电荷效应。如果换了金标液后不再产生假信号，那么问题产生的原因最可能是最初的金标液的问题或者是标记抗体的问题。在这里其他的对照是相似的金标液和含有单克隆抗体和多克隆抗体的金标液。在市场上也有可用于此类检测的许多金标液。

下面是一个由于金标液而产生的假阳性信号的例子。应用的是针对于临床样品（血清）检测传染性疾病的检测条。在所有的非阳性样品中都看到了假阳性结果。当使用 BSA-gold 金标液后，假阳性信号消失了。而使用了另一种非特异性金标液后，假阳性信号也消失了。然而，当更换了非临床对照样品，PBS 在 pH7.2 下，使用特异性金标液假阳性信号仍然存在，在使用其它的金标液则没有假阳性信号。改变缓冲液的 pH 值为 10 后，减少了假阳性信号的发生，但是并没有消除假阳性信号。因此我们可以得出结论，问题的产生与样品或捕捉抗体无关，而是与对捕捉抗体席一行的高灵敏度的金标液。这些金标很可能含有裸金颗粒，这可能与捕捉抗体发生结合。使用新的金标液并且小心制备金标可以消除假阳性信号。

是捕捉抗体的原因吗？在这种情况下使用的对照是相似的捕捉抗体或其它种类的抗体。然而在使用这些对照前，剥去 BSA 捕捉蛋白可以说明是不是其它地方产生的问题。也有可能不是由于抗体本身而产生假阳性信号，而是由于在抗体中的一些保护剂的原因。在这种情况下，在适宜的缓冲液（例如 10mmol P04）中进行透析可以改善情况。如果用了其它的抗体假阳性信号消失了，那么显而易见是特异性捕捉抗体引起了假阳性信号，采取的措施是更换抗体或者清除它。举个例子，在实际操作中，兔的单克隆抗体有时会产生这种情况，这主要是由于疏水力的作用，需要采用特别的方法来处理。

检测尿中的βhCG 的妊娠试验中对于所有样品都发现假阳性信号，无论这些样品本身是阳性还是非阳性。改变 pH 值没有消弱信号，更换金标液也没有作用。甚至在使用 PBS 缓冲液对照样品也没有消除信号。

问题很可能是由于捕捉抗体引起的。剥去捕捉抗体带用 BSA 代替后所有的信号都消除了。在 10mmol 的 P04 中透析最初的捕捉抗体后，最终的结果符合样品的实际情况。综合以上情况，我们可以得出结论：这些抗体曾经悬浮于含有 SH成分的缓冲液（譬如硫柳汞）中，我们要消除或者避免这些因素。

是膜的问题吗？任何检测带的开发中最重要的过程是选择合适的膜。有些膜与其它的膜相比而言可能只适于特定类型的检测或者只适合于特定的样品。开发商应当有所有厂家的各种膜并且有各种孔径的膜，这样才能做出迅速的比较。举例来说，在干燥的过程中膜的疏水性是显而易见的，因此我们可以清楚地知道这批次的膜会产生随机的假阳性信号。

在选择快速检测技术所用的膜时不仅应当考虑到所要求的流速和蛋白结合特性，而且还要考虑到在制备过程中膜的均质性。在这里需要用的对照是不同孔径和不同来源的膜，还有就是同一批次的膜的不同区域。

对于设计 *H. pylori* 的检测抗体的血清学试验，最初的试验的开发的目的是在实验室设计阶段时不会产生假阳性或假阴性结果。只有进行全部测试合格后决定检测技术可以转移到生产设计阶段。

当成比例扩大至几千个装置来进行检测条的组装过程时，无论如何，我们都应当在每一批次的生产过程都要记录很多随机产生的假阳性结果。调整pH值、使用另一种金标液和对捕捉抗体进行两次检查都不能立即揭示假阳性产生的原因。重新在小规模的实验室设计阶段进行测试，由于假阳性结果的产生是在无c带时发生的，因此可以说明假阳性结果产生的原因是由于硝酸纤维素膜。

对于实验室设计研究，只是用了小批次的膜。这么小的量的结果并不能说明是否符合大规模的生产。已经发现了大批次的膜有明显的疏水区（例如，没有正常湿润的区域），这些疏水区会引起胶体金颗粒与捕捉抗体发生非特异性结合。

是化学药品的原因吗？在快速检测带的组装过程中，金标液和固相支持物（膜、结合垫或样品垫）可能用化学试剂预先处理过。所加的化学试剂可以包括盐、活性剂、蛋白质、糖和聚合物。一些化学物质能够提高假阳性的几率。

在针对血清中动物蛋白的研究用的检测带的开发中，会发生一些假阳性结果。在实验室设计阶段，在应用检测带之前，通过向血清样品和金标液中加入制备缓冲液后，然后再将检测带浸渍在微孔里来开始进行检测。更换金标液没有效果。改变缓冲液的酸度并没有影响到结果。再换捕捉抗体也没有消除随机发生假阳性结果。

此时用非阳性血清样品，在浸渍与血清样品之前，只有当缓冲液已经加入到血清样品几分钟后，才会观察到假阳性结果的出现。缓冲液中含有5%的强活性剂。降低活性剂的浓度至1%后，然后让血清和胶体金颗粒与缓冲液混合几个小

时，此时没有观察到任何假阳性结果。这说明了过量的活性剂会强作用胶体金颗粒，会去除颗粒表面的抗体并且产生裸金颗粒，从而使其与捕捉抗体互相作用。

是样品的原因吗？ 由于酸度、样品污染、或孕尿甙含量等诸如此类的因素的变化，正如前所述，样品能够引起不可预知的假阳性信号。为了确定是否是样品的原因，需要检测很多不同的样品，其中包括类似的样品，也包括不同来源的样品。除了样品的生物物质或有机物量外，问题也可能存在于所使用的缓冲液。如果是这个原因，需要用另一种缓冲液作对照。最简单调整的方式是改变样品的酸度，这种方法可以很快确定是否是样品中电荷吸引力的作用而产生的问题。也可能需要对样品进行过滤，过滤得步骤可以独立于检测程序，也可以作为检测步骤的一部分而使用。在生产开发中采用针对于尿液中激素的快速检测技术对大量不同的尿液样品进行检测，其特异性可以达到 97%，而其灵敏度可以达到 98%。然而，在以后测试阶段发现从储藏的样品中发现几例假阳性结果。

在对这些样品的酸度的测量后发现酸度有所提高，但是经过等酸度水平的对照缓冲液样品检测后可以排除酸度的影响。当对尿液样品进行过滤后没有产生假阳性结果。然后进行显微镜观察后发现样品的细菌污染是产生假阳性的主要原因。

这样，我们可以得出结论细菌含量的增加会提高样品的疏水性，这会引起胶体金颗粒和捕捉抗体的非特异性作用。新鲜的样品不会产生类似的问题。

假阴性产生的原因

与假阳性信号诊断流程图的制作相比，制作引起假阴性信号的诊断流程图需要考虑更多的因素，这超出了本文的范围。这主要是因为研究者常常在起始时没有可

见的信号的一无所知的情况下工作的。解决此类问题的方法也依赖于对照线的出现或不出现，然后样品和金标液沿着膜带流动。表 I 概括了假阴性信号产生的大多数可能的原因。

如同假阳性的诊断过程，也有特定的症状帮助我们诊断假阴性结果。逐步找出最可能的原因能够对问题进行分析并且作出改善。有人已经对类似的系统诊断方法进行的整理。本篇文章主要是对绝大多数阳性样品中偶然产生的假阴性结果

进行详细的分析。如果在阳性临床样品中所有的检测带都产生假阴性结果,那么可能是检测带的设计的问题。

检测区	原因	说明
标记的破坏	抗体丢失和抗体竞争 金颗粒表面抗体的疏水作用力的破坏 抗体的水解	标记不充分; 标记时糖的量不够 标记不充分; 标记时糖的量不够 干燥不充分; 不是在干燥条件下储存
捕捉抗体无效	没有结合捕捉抗体 抗体的疏水作用的破坏 抗体中和过量的盐对胶体金颗粒的抗性 对抗体的疏水性 抗体不纯	膜过高; 抗体中和活性剂作用 抗体疏水性高; 膜没有封闭 盐的疏水作用 储存条件不好(潮湿) 过量的非特异性蛋白掩盖了特异性抗体
标记物的释放不好	标记垫的疏水性 膜的疏水性 糖的结晶作用 标记垫于膜接触不好	标记垫中物质的原因; 在标记物中糖量不够 活性剂不够平; 膜的原因或者膜过于干燥 储存中过于潮湿 压的不够; 活性剂不够; 样品量不够
膜的效能不好	样品太粘 流速太快 金颗粒阻塞膜	膜孔径太小; 样品需要过滤 膜孔径太大 膜的疏水性; 活性剂不够

图 4 中概要地说明了假阴性结果产生的最为常见的原因假阴性产生的原因大多是捕捉抗体和金标液但是也可能是由于检测体系中膜的流动性不好(流速太快或太慢)、金颗粒的释放不充分、盐量不足引起的,或者是由于体系中酸度不适宜造成的。另外,需要对样品进行处理才能让抗体与抗原结合,或者需要对样品进行稀释以避免 hook 效应或者通过改变样品成分掩盖一些特殊的抗原。

捕捉抗体在储存的过程中时常变得不稳定并且会失去特异性活性,可能是由于水解作用(潮湿环境和干燥不充分),也可能是由于的疏水作用力的破坏(见图 5)。后者可能是抗体自身的特性,通过更换抗体或撕掉捕捉抗体层后用活性剂处理膜可以解决这个问题。抗体或金标液

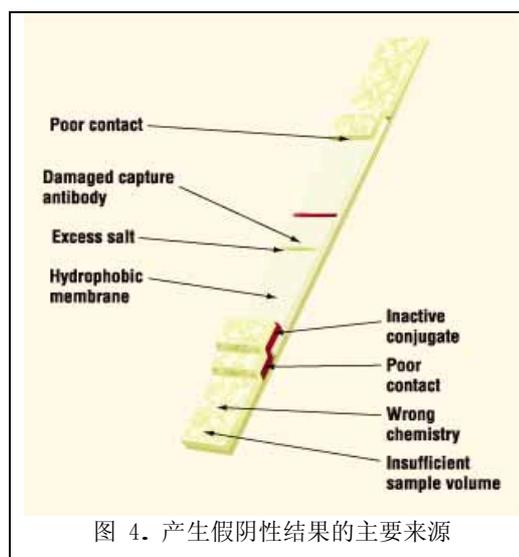


图 4. 产生假阴性结果的主要来源

潜在的不稳定性要说明了检测应当在可控的干燥环境的条件下进行。

假阴性结果的产生常常是由样品与金标的原因,或者是膜带的流动性的原因。很多的因素能够导致类似的现象。这其中包括样品的量不足、金标液或样品垫上糖量不足、标记垫和膜的结合不紧密或者是标记垫的材料不适合。这些样品可以通过用没有C带(总是阳性)的检测条证明。如果金标暴露于潮湿的环境,其中的糖很可能结晶,这可能会导致金颗粒不能在膜上移动。

假阴性结果产生的其它的两个原因其中之一是捕捉抗体或金标液没有发生免疫反应,另一个原因是在样品加入时膜上捕捉抗体的丢失(见图5)。假阴性结果的产生也经常是归于金标在干燥和水合过程中被破坏了。有没有C带将说明是否金颗粒在样品加入时被充分释放,但是并不足以说明捕捉抗体的效用或抗体的免疫活性大小。

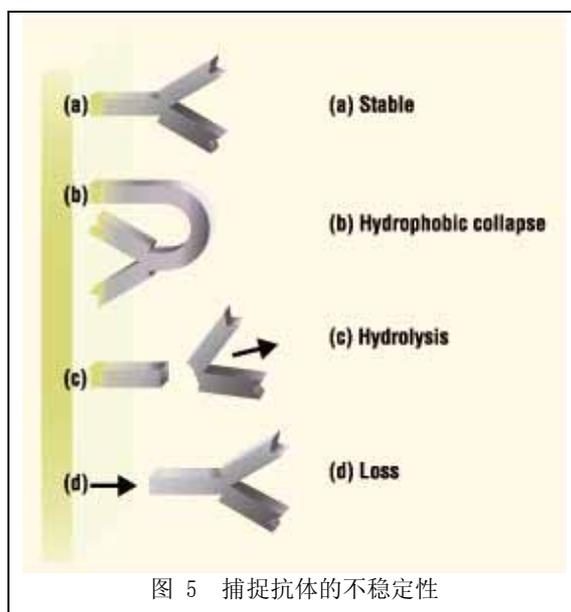


图5 捕捉抗体的不稳定性

结论

快速诊断试纸条的开发首先是实验室设计阶段,其次是实验性生产阶段,然后是实际试验阶段,确认质量符合后,然后再对每一步进行确认,最后是达到规模生产的过程。再此过程的任何一步中,果出现问题必须再经过几周甚至几个月的时间重新进行开发。

因此不仅在优化检测技术时完全熟悉机制需要很多的精力,而且诊断产生假阴性结果的所有可能的原因也需要大量的时间和精力。可以根据经验来对此进行诊断,但是不是每一个使用者都有丰富的经验。掌握检测效能的机理和知道产生问题的可能的原因可以有助于对假阳性和假阴性结果作出迅速诊断。这可以节约大量的时间、材料和金钱。

有系统地对问题进行处理非常重要,只是简单迅速的修正可能在后面的过程产生意外的相同的错误。具有对检测体系每一部份(影响到体系的稳定性)和所有元件的相互作用机理的很好的掌握,开发者可以列出一个有效地消除错误信号的产生。随意并且只是经验的方法仅仅能够提供提供一个短期的解决方案,而且

成本很高。

快速检测试纸条的原理和设计理论非常简单。总的原则是不能理所当然地认为一个检测中最佳的方案的每一步都是适合于其它的检测。样品和待检成分的种类非常多,不是所有的抗体是以同一方式作用的。每个生产商生产的膜都不一样,而且需要对同一来源的批次进行重现性分析。

最后,采用最佳的步骤和最合适的材料能够获得最佳的结果。高质量的快速检测试纸条的使用需要丰富的知识和所有参数的了解,并且清楚何种因素可以影响其稳定性。可信度和重现性与对灵敏度和特异性的需要一样重要。只有熟知每一个元件工作的机理,其中包括流体动力学和如何使用系统性的方法进行诊断,才能保证快速诊断试纸条检测的质量。

参考文献

1. J Chandler, T Gurmin, and N Robinson, "The Place of Gold in Rapid Tests," *IVD Technology* 6, no. 2 (2000): 37–49.
2. K Jones, "Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 1: Principles," *IVD Technology* 5, no. 2 (1999): 32–41.
3. K Jones, "Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 2: Common Problems," *IVD Technology* 5, no. 3 (1999): 26–35.
4. A Weiss, "Concurrent Engineering for Lateral-Flow Diagnostics," *IVD Technology* 5, no. 7 (1999): 48–57.
5. *Troubleshooting Guide for False Positives and False Negatives in Lateral-Flow Rapid Tests* (Cardiff, UK: British Biocell International, 2000).
6. *A Short Guide: Developing Immunochromatographic Test Strips* (Bedford, MA: Millipore Corp., 1996).



John Chandler, PhD,
is the founder and
technical director.



Nicola Robinson, BSc, is
the custom conjugation
manager



Karen Whiting, PhD,
is the product
development manager
at British Biocell
International (Cardiff,
Wales, UK

加工工艺

高质量金溶胶的生产

Basab Chaudhuri and Syamal Raychaudhuri 文

Rapidtest 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。）

理解了胶体金生产中的涉及到的一些关键工程学问题，就能优化金标成份（译者注：指胶体金）的品质和稳定性。

早在二十世纪初，人们就已经可用化学法生产出不到 10nm 的胶体金溶胶颗粒，然而直到 1971 年 Faulk 和 Taylor 发明免疫金染色方法后，胶体金这种无机胶体才用于蛋白标记。从此，借助电子显微镜，用纳米金颗粒对目标分子，特别是蛋白分子的标记技术彻底革新了细胞和组织成分的显影方法。银增强方法又进一步将金标方法的应用范围拓展至光学显微镜下也可使用。金标记物



的电子密度高及光密度高的特性也促进了检测技术的发展，如印迹、流式细胞计数、杂交分析。采用免疫金双标记或三标记方法甚至已经可以实现一次检测多种抗原。

最近有篇文章较详细地阐述了胶体金在快速诊断领域的地位。表 1 从该文中引述比较了快速检测中常用标记物，但还有个很值得讨论的话题在该文中并未提及，即决定胶体金质量的各种过程参数。

制备稳定的金—蛋白复合物，第一步就是制备出金颗粒大小和形状都正常的胶体金溶胶。胶体金溶胶实质就是由过渡金属金的细小颗粒组成的一种稳定、均一的分散系。常制备的金粒径大约都在 5~150nm 范围，诊断检测用金复合物的颗粒直径则大多在 20~40nm 大小。由于胶体金颗粒很小，表面积就非常大，这就意味着胶体金体系具有很大的表面积和很高的表面能，而任何高表面能胶体体系在生产时如果条件掌握不好，都会变得不稳定。

本文主要讨论胶体金生产中对分散系质量和稳定性有重要影响的一些过程工程问题，重点要谈的是金溶胶生产中一些关键的物理因素而非化学因素，但首先还是谈一下其中的一些化学问题。

基本的化学问题

许多化学方法都可用于制备单分散体系的胶体金，但只有 3 种方法最为常用，而且所得金颗粒大小可控。这 3 种方法都是用还原剂将 1% 氯金酸水溶液还原，制备出球状金粒。通常还原剂的还原力越强，浓度越高，所得分散系中的金颗粒直径则越小（表 2）。

表 1. 快速检测常用标记物特性比较（可以复制）

特征	金	银	碳	乳胶	染料	酶
可见度	★★★	★	★★★	★★★	★★★	★★★
灵敏度	★★★	★	★★	★★	★★	★★★
稳定性	★★★	★★★	★★	★★	★★	★
颜色	★	—	★	★★★	★★★	★★
重复性	★★★	★★★			★	★★
工艺过程放大	★★★	★★★	★★	★	★	★
一步反应	★★★	★★★	★★★	★★★	★★★	—
多对象检测	★★★	★★★	★★	★★	★★	★★
结果清晰度	★★★	★★★	★	★★	★	★
易制备性	★★★	★★★	★★	★★★	★★	★★
易用性	★★★	★★★	★★	★★★	★★	★
适用性	★★	★★	★★	★★	★★	★★★
低成本	★★★	★★★	★★★	★★★	★★★	★★
★有限；★★一般；★★★很好或广泛						

表 2 不同胶体金制备方法的重要特征

试剂和浓度	还原剂	参考文献	说明
1% 氯金酸水溶液	白磷的而乙醚溶液	Hermanson (1996) Hayat (1989)	5nm 颗粒，红色溶胶
1% 氯金酸水溶液	抗坏血酸水溶液	Hermanson (1996) Hayat (1989)	12nm 颗粒，红色溶胶
1% 氯金酸水溶液	柠檬酸三钠水溶液	Hermanson (1996) Hayat (1989)	15-150nm 颗粒，红色溶胶

大颗粒胶体金可用柠檬酸三钠还原氯金酸溶液反应制得，根据还原剂柠檬酸三钠的用量不同，所得颗粒粒径一般在 15~150nm 范围。6~15nm 的中等粒径金

可用抗坏血酸钠还原氯金酸制得，这种方法制得的金粒平均粒径在 12nm 左右。目前技术所能制出的最小金粒粒径可达 5nm 以下，这种粒径的金粒需在二乙醚中采用白磷或黄磷还原法制备。

这里主要谈谈制备 20~40nm 金颗粒，因为这种大小的金粒最适于快速诊断测试使用。前已述及，这种粒径的胶体金制备要用到氯金酸水溶液和柠檬酸三钠水溶液，要将这两种溶液混在一起反应，其中发生的反应大概可分为均相和非均相两种，下边就讨论胶体金生产中涉及的这两种反应：

均相反应 均相反应中，所有反应物混溶在一起形成均一溶液，反应产物也是水溶性的，因此在反应过程中整个体系始终保持均相。反应速率取决于反应物浓度和反应温度，温度主要影响反应速率常数。通常，反应温度升高 10°C，反应速率增大 2 倍。

在单级反应器中，要提高反应速度，获得高产率，就要考虑反应温度的影响。对于不可逆反应，即反应物基本可全部转化为产物的反应，反应温度上限就是反应器材质的最高可耐受温度，就是反应器的建造温度，但对于可逆反应，温度效应则比较复杂，因为反应速度和平衡转化率都受温度影响，反应时两者必须兼顾。对于可逆吸热反应，反应速度和平衡转化率随温度升高而增大，大量生产时常采用尽可能高的温度。然而对于吸热可逆反应，温度升高，平衡转化率下降，反应速度却增大。为解决这个矛盾，获得最大的反应速度和最大的转化率，通常反应过程中要变温。传导因子如传热、传质等在均相反应中对反应动力学影响不大。

非均相反应 在非均相反应体系中往往不止一相物质，反应可以在气-液、液-液、气-固、液-固、气-液-固、液-液-固或其它相态间进行，这里所讲的固相物质可以是催化剂，也可是反应物。均相反应那些简单的控制措施对于非均相反应并不适用，除了浓度和温度外，反应物的物理相变可能在非均相反应中对反应影响极大。

氯金酸水溶液和柠檬酸三钠水溶液的反应很有趣，反应初始时是均相反应，但一分钟内反应混合物即变成了非均相，这种从均相到非均相的转变非常迅速，因此胶体的制备过程很难有效监控。因为反应很快就已经结束，因此即使反应中发现产品不均一，操作者也根本没时间采取必要的纠偏措施。

胶体金生产

在加入还原剂之前，金离子 100% 都在溶液中，还原剂快速加入后，溶液中

开始出现金原子，并且金原子浓度很快升高，直到过饱和，随后发生凝集，即长晶核，晶核的中心是 11 个金原子聚集形成的二十面体。晶核形成非常迅速，一旦形成，溶液中其它金原子就不断结合到晶核上，直到溶液中所有金原子消失。

反应中，溶液中最初形成的晶核数决定了最终长成的金粒数量。如果溶液中氯金酸浓度一定，则还原剂浓度越高，初核数量越大。初核数量越大，最终的金粒则越小，因此，正确选择柠檬酸三钠的浓度就对胶体金生产至关重要。如果生产条件已优化好，所有的晶核将在瞬间同时形成，这样最终形成的胶体金颗粒将具有同样的粒径（即形成单分散胶体金体系）。实际中要获得单分散胶体金体系非常困难，很多时候胶体金体系不均一的原因就是因为没有把握晶核生长规律，结果制出的胶体金颗粒大小不一，用这样的胶体金多数情况下不能制出稳定的衍合物。

胶体金中心是金原子，周围吸附了一层 AuCl_2^- 离子，这些负离子使得胶体金带负电，这样静电斥力就阻止了金颗粒的凝集。所有的胶体金溶液都对电解质敏感，电解质会迫使双离子层距离拉近，从而减弱静电排斥作用，进而导致金粒凝集，发生凝集时会伴随有胶体金颜色的变化，并且出现沉淀。氯化物、溴化物、碘化物几种电解质对胶体金体系稳定性的负影响以氯化物最甚，碘化物最轻。

胶体金在可见区的 510~550nm 波长范围内呈现单一吸收峰，颗粒越大，最大吸收波长越向长波长方向移动，峰宽则与颗粒大小的分布范围有关。最小的颗粒（2~5nm）呈橘黄色，中等颗粒（10~20nm）呈葡萄红色，较大颗粒（30~64nm）呈青绿色。颗粒越小，形状越接近球状，30~80nm 的颗粒成偏心圆状，其偏心率与长轴和短轴比率有关。

研究者已经注意到影响胶体金质量及其稳定性的几种因素，制备过程中器具若全部使用干净的玻璃器皿，溶液一律用 0.2 μm 滤膜过滤后使用，水用玻璃三蒸水，推荐使用超纯水，采取这些措施后制得的胶体金很稳定。这些措施表明即使痕量污物都会对胶体金制备带来不良影响。虽然经常可见推荐使用硅化玻璃器皿的说法，其实使用普通玻璃器皿同样也能制出高质量高稳定性的胶体金。

试剂添加顺序 即把柠檬酸盐溶液加入氯金酸溶液还是把氯金酸加入柠檬酸溶液，这种添加次序对胶体质量有何影响也有人进行了研究，但最终怎样的添加次序制出的胶体金质量稳定，研究者并没有给出确切结论。

研究者也没有说明搅拌在溶液形成的作用，没有提及磁力搅拌器和搅拌子

（实验室制备胶体金时最常用的一种器具）对胶体金质量和稳定性的影响。但必须记住，大规模生产胶体金时，不仅仅是化学反应过程，甚至包括一些看起来似乎没有什么意义的物理参数对胶体金质量及其稳定性的影响都很大，有时即使一些微小的条件变化也可能对产品质量带来很大影响，以致这种产品终端用户无法去用。

批式/连续式生产

通常，生产可采用批式或连续式，具体用哪种方式取决于多方面因素影响，其中生产规模是决定生产方式的一个重要因素。

小量生产提倡用批式操作，所用反应器称为批式反应器。批式生产时，在合适的温度下加入反应物，反应开始进行。反应结束，移除反应器中的物料，产物通过一定方式分离，剩余的反应物有时还可再利用，但剩余物如果废弃，则必须遵守相关环保安全条例。在批式反应器内，因反应物和产物的浓度是随时间连续变化的，这样就可通过仔细观察反应物浓度的减小或产物浓度的增大，根据浓度和时间的函数关系对反应进行跟踪。

连续式生产用于大量生产，生产时反应物持续加入反应器，产物不断形成并且连续移出，液流的流动可采用以下三种模式的任一种。第一种是混合流模式，其特征为反应器内物料完全混匀，移出物浓度与反应器内物料浓度相等。第二种是平推流式，其特征为反应混合液被推过反应器时，反应物和产物的浓度不断变化，在纵向没有搅拌，但横向辐射状搅拌很充分；还可用介于混和流式和平推流式之间的第三种模式，在这种模式中，液流在反应器中未完全搅拌混匀，仅部分混合。声学试验方法可用于测定未知容器中的具体流模式，现在已有描述容器中流特征的模型。如果不能对反应器中的流模式特征正确理解，几乎不可能正确预见反应器中的反应。

胶体金生产量通常都在 1~100L，对这样的生产量，批式生产更适合些，生产商生产出胶体金后通常就卖给客户用于蛋白标记，其生产量往往取决于订单大小和反应器的可用情况。正常情况下对 100L 的生产量，用于搅拌的能消耗会很大。另外，反应器还需配备足够的管喷装置，以便将反应物、洗液等试剂泵入到反应器中。

每批生产后，反应器必须用碳酸钠溶液和洗剂液、蒸馏水彻底清洗，然后还要用挥发性有机溶剂清洗，如丙酮，之后最好再用超纯水清洗。

许多诊断试剂公司生产的胶体金是内部使用，对于这样的小规模制备，反应器的搅拌能耗不大，每批生产完毕将反应装置拆下，后也很容易对反应器彻底清洗。复杂的管喷装置多用于大量批式生产或连续生产，小批量生产并不用，所以小批量生产的设备清洗要简单一些。

用于胶体金制备的批式反应器最重要的部分是反应容器、搅拌系统、恒温浴槽，恒温浴槽可使反应体系一直在均一、适宜的温度下进行。批式反应装置安装很容易，唯一要注意的是反应器的各部分一定要细心清洗，所有玻璃器皿每次使用前最好高压热处理。

影响最终胶体金质量的因素

多种物理因素都会影响由氯金酸和柠檬酸三钠水溶液反应，从而影响到最终的胶体金的质量，需要注意的关键因素包括：

- 反应物浓度
- 混合方式
- 加入顺序
- 反应温度
- 液柱压力
- 反应器材质

反应物浓度 均相反应的速率都取决于反应物浓度和反应温度，浓度低，则产率低。因此，要实现高产率，就要提高反应物浓度。但是反应物浓度过高也会带来其它问题，尤其竟是竞争性反应，反应物浓度过高问题更多。反应物浓度过高，往往可能出现目标产物产率不够而副产物大量产生的现象。氯金酸和柠檬酸三钠法制备胶体，反应是单一反应，不存在竞争反应，但反应物浓度不够会使得金颗粒大小不对或形状不规则。

生产 40nm 金粒最常用的方法是 Frens 法，其操作如下：将 50ml 0.01%（重量/体积）氯金酸加热至沸，然后加入 0.5ml 1% 的柠檬酸三钠溶液，反应液开始是由灰白色变为深紫色，继续沸腾，在 1~3min 后出现红色调，所得颗粒粒径为 41nm。胶体一旦形成，无论是再延长反应时间或是再添加柠檬酸三钠溶液，金的粒径都不再变化。反应体积按比例增大后，最终的金粒径相应增大约 20%，而且此时即使氯金酸或柠檬酸三钠量有 20% 差异，也不会对金粒径造成实质性影响。因为在这一浓度范围内，最初的晶核形成速率几乎是相同的。

反应物搅拌 这可能是最关键的物理参数，要使晶核形成较好，反应物必须充分混匀，充分搅拌使得反应器各处浓度和温度一致。如果浓度各处有差异，则各处的反应速率也随之不同。

所有化学反应都伴随有放热和吸热反应，从而引起升温或降温，反应器内的温度不同会导致传质或传热差异。

对于一个慢速反应，反应物如何搅拌不是引起产物形状畸变的理由，但对于制金过程，反应在几秒内就已经发生，反应器中的反应物必须在反应发生前就达到浓度均一。因此，快速搅拌此时就显得格外必要，一定要有特别的搅拌装置来对反应器中的液体物料进行搅拌。

小规模生产时，可用搅拌子搅拌。反应器置于磁力搅拌器上，为了快速混匀，搅拌子要高速转动。（见图 1）仔细观察可发现有涡旋现象产生，这样其实是一种错误的搅拌方式，因为此时液体在很狭窄的区域转动，而不是在整个反应器内回流。反应器直径越大，涡旋有害效应越明显。在小容量反应器中，譬如 500ml，即使有涡旋现象，生产的胶体金质量也不会太差。但在其它情况下，譬如当生产规模达到 4L，涡旋的影响就很大了，所得金质量会很差，颗粒变大，并且偏心率很大。

即使是小规模生产，也不推荐用磁力搅拌器制金，原因很简单：这种搅拌方式有批间差异，很难获得可重复的操作条件。最好采用机械搅拌器，将机械搅拌器固定在马达上，借助马达将搅拌动力传给反应器中的液体物料使其混合。反应器要装备紊流片以免



图 1 磁力搅拌过程形成涡旋

搅拌时形成涡流，紊流片实际就是固定在容器壁上的一些片条体，它可以促进反应器内形成紊流，抑制涡旋。反应器中要实现均匀一致地混合，取决于几个重要因素：反应器直径，搅拌子直径，紊流片厚度，旋转及搅拌速度。

另外，液体物料的性质也很重要，液体粘度越大，搅拌功率就要相应变大，这样物料才能被充分混匀。液体粘度受温度影响非常大，如果可以升高温度，则液体粘度和搅拌能耗都会降低。对于特定温度下的特定液体，如果反应器直径、搅拌子直径、紊流器尺寸、搅拌速度都固定，则反应器内混合物性质也将相应的稳定。不稳定的设备更易产生不稳定的产品。因此，反应器要合理设计以保证操作条件一致。

可用一个简单实验（通常称作示踪研究）来探明特定容器的搅拌特性。进行示踪研究时，常常是将已知量的染料注入反应器内已知量的水中，等染料在水中分散均一时，其浓度很容易就可算出。通过建立染料浓度与时间的关系方程，然后将各种搅拌速度和各种搅拌子组合进行试验，选择染料达到均一分散所需时间最短的组合条件为最佳条件用于生产。

胶体金溶胶制备时，首先必须尽可能使反应物浓度均一，反应物浓度一旦均一，搅拌速度必须降低，否则金颗粒会彼此碰撞而形成大颗粒。因此，推荐在反应起始快速搅拌混匀反应物，随后慢速搅拌，不要形成湍流。

反应物添加顺序 反应物的添加组合方式是决定金溶胶质量的另一个重要因素，是不是柠檬酸三钠溶液加到氯金酸溶液中更好，或者反过来更好？似乎这两种添加方式没有明显差异，但实际中差异还是很大的。

有个假想实验可能有助于揭示这个差异。假如一个均相反应按以下方式进行： $A+B=C$ ， $A+C=D$ 。现在假如烧杯中只有 A 物质，我们将 B 一点一点地加入到 A 中，A 就与 B 反应生成 C，而 C 此时处于大大过量的 A 中，于是在烧杯中与 A 反应生成主产物 D；反过来，假如将 A 一点一点地加入到大大过量的 B 中，物质 C 将逐渐增加，随着 A 的一点点地加入，C 的浓度达到最大，在某个浓度时，B 和 C 将竞争性地与 A 反应，这个阶段的竞争反应特点使得我们可以作出两种选择：如果目标产物是 D，就应选择前一种接触模式，即将 B 加入到烧杯；但是如果目标产物是 C，就应选择第二种接触模式，即将 A 加入到烧杯，C 浓度达到最大时，将 C 从产物混合物中分离出来。这个假想实验是预测化学反应的一种方式，由此可获得目标产物最有效地生产方式。

尽管金制备过程中不象假设实验中的有多个反应，但反应物的添加顺序仍然很重要。如果少量柠檬酸三钠加入到大量氯金酸中，需要很长时间柠檬酸三钠才能分散均一，其间反应器中将出现浓度明显高低不等的小区域，这种情况将使得反应速率不一，进而导致晶核形成速度不一，因此，胶体金的质量就差。相反，如果氯金酸快速加入到柠檬酸三钠溶液中，形成浓度不均小区域的机率就很小。

反应温度 所有的经典教科书都讲将柠檬酸三钠加入到沸腾的氯金酸溶液中，然后保持沸腾 15min。而这个反应通常 5min 内已经完成，随后金颗粒大小不会再变化。那么如何沸腾，沸腾是否完全有必要呢？

在小实验室，反应容器放在带有加热板的磁力搅拌器上，通过加热板对液体

物料加热，但这种加热方式已经被发现对胶体金有不良影响，因为这种方式下反应器底部会产生细小气泡，这些气泡立即脱离加热面，加热面上随即出现短暂的干点，处于这些干点处的金颗粒将失水，从而丧失保持其稳定性所需的一些特性。

生产高质量的金，并不需要将反应器的液体物料加热至沸腾，只要液相温度控制在 95°C 左右，反应即可平稳进行。温控是非常重要的，要使反应器恒温就需要正确选择加热系统。为了保持温度均一，避免出现干点，应该用热的液体环绕反应器，这种加热用液体可选用高分子油。对于小量生产，可以用油浴恒温器，反应器置于恒温器内，油温可用温度控制器控制。

反应器的液柱压力 液柱压力仅在大规模生产时是一个需要考虑的重要因素。假如用批式反应器生产 100L 金，此时反应器内的液体物料很深。顶端物料的金是在大气压下制取的，而底部物料压力却是大气压与上边液柱压力之和，因此底部压力比大气压高，从而造成底部液体物料的沸点比顶部液体物料沸点高。

温度高于沸点时，金分散体系将被破坏。快速搅拌混合条件下，反应器内的液体物料温度各处相同，但晶核形成之后，各处常会出现较大温差，这时就有必要辅之以慢速搅拌。另外，反应器内壁也有可能形成干点，胶体金与干点接触后会失水。反应结束后如果有颗粒漂浮在液体物料表面，就表明所得胶体金的质量可能不好。因此大批量制备胶体金时，事前一定要充分考虑液柱压力问题。

反应器材质 除过以上因素外，也要充分考虑反应容器和搅拌装置的材质对胶体金质量和稳定性的影响。小量生产时，常用特富龙搅拌子搅拌，使用特富龙材质主要是为了保证系统清洁。但搅拌子和反应容器接触点处有时会因转动和升降产生剪切力，这种剪切力有可能造成搅拌子出现瑕疵，金属暴露，胶体金与瑕疵处暴露的金属接触后就会在此聚集。必须时刻牢记，任何污染都会破坏金溶液体系。因此，推荐使用玻璃器皿，如果反应容器是钢质，则应该有玻璃衬里，而且衬里要经常检查，确保其完好无瑕。搅拌器的材质也应注意类似的问题，搅拌器通常也应是特富龙材质，因为特富龙不会与化学试剂发生有害反应。

结 论

胶体金生产涉及一些简单的化学知识和一些复杂的过程工程学知识。对于化学及生物技术研究者而言，要生产出质量可靠的胶体金，就需要理解这些工程学问题。了解了各个过程参数对胶体金的影响，对解决生产中遇到的问题会带来有很大帮助。事实上，上面讨论的一些问题对于作者本人也很有挑战性，我只希

望看了这里的学习材料后，小生产商们生产的胶体金质量能有所提高。

参考文献

1. R Zsigmondy, *Zur Erkenntnis der Kolloide* (Jena, Germany, 1905).
2. WP Faulk and GM Taylor, "An Immunocolloid Method for the Electron Microscope," *Immunochemistry* 8 (1971): 1081-1983.
3. GT Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (San Diego: Academic Press, 1996).
4. J Chandler, T Gurmin, and N Robinson, "The Place of Gold in Rapid Tests," *IVD Technology* 6, no. 2 (2000): 37-49.
5. MA Hayat, ed., *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, vol. 1 (San Diego: Academic Press, 1989).
6. DA Handley, "Methods for Synthesis of Colloidal Gold," in *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, vol. 1, ed. MA Hayat (San Diego: Academic Press, 1989), 22.
7. G Frens, "Controlled Nucleation for the Regulation of Particle Size in Monodisperse Gold Solutions," *Nature Physical Science* 20 (1973): 241.



Basab Chaudhuri 博士, InBios 国际公司 (Seattle)的合作研究人员, 同时 Calcutta 大学 (India)化学工程系审稿人。



Syamal Raychaudhuri 博士, InBios 公司首席技术主管。

加工工艺

亲水性粘合剂对样品流速的影响

William G. Meathrel, Herbert M. Hand Sr., and Li-Hung Su 文

几凡木木 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。）

在以膜为基础的体外诊断试剂中，亲水性粘合剂能够提高测试性能，同时也能维持生产效率。



William G. Meathrel, 博士，医药研发团队负责人；Herbert M. Hand Sr.，医药产品研发科学家；Li-Hung Su 医药产品研发化学家，他们都是胶粘剂研发中心（Glen Rock, PA）的成员。作者特别感谢 David Schaefer 和 Towson 大学（Towson, MD）的物理、天文、地球系给予的技术支持--亲水性胶粘剂处理后的原子能显微成像。

侧向层析检测试剂条常被用在临床和其它应用中，这种方法可以既方便又简单地分析出一些重要的化学物质。这种条带式体外诊断方法经常被用来检测一些分析物，如营养素，激素类，治疗药物，滥用的药物，环境污染。在临床试验方法中，生物学液体如：全血、血浆、血清、鼻分泌物、痰、唾液、尿、汗、皮肤渗出物或脑脊髓等特殊部位被分析，这对于诊断监控是很重要的。另外，微生物悬浮液及组织均匀地混合在一起，形成稳定适合地溶液，用来分析特殊部位。通常情况下，将样本滴在合适的体外诊断试剂纸条的入口孔，并且，样本通过真空装置或者通过毛细管流等物理的方法被带到装置里。

在含水的生物性液体中，如血液、尿、痰中，强烈的分子间吸引力形成了强大的表面张力。通过比较，固体基板的表面能常常使得体外诊断试剂的速度变得很慢。为了达到测流和液体的芯吸，最好是在没有任何机械辅助的情况下克服生物样本和固体基板之间的表面能。

有两种处理方法可以用于提高样本通过诊断试剂的流速。第一，用各种的表面活性剂来增加基板的表面能量。第二，减少生物样本的表面张力。

这篇文章提供了用于体外诊断试剂的亲水涂料和粘合剂的结构。亲水结构减少生物样本的表面张力，因此增强了样本的测流速度和标本的芯吸效果。

胶粘剂是由松脂和表面活性剂的聚合物配制而成的，可以提供多功能的绑定性质。亲水粘合剂是通过热绑定或者是压敏法配制而成的。表面的亲水性通过改变化学组成，结构，浓度，还有改变粘胶涂层中表面活性剂的量而控制。

样本液体的流速

典型的侧向层析装置是有一个入口孔以接受生物标本（图 1），样本进样口可能接近配对垫，配对垫中拥有特殊的反应试剂。当样本从进样口流过试剂反应区，便会产生特殊的化学反应物或复合形成物。

反应产物或者络合物继续流过包被有分析物的检测区。样本继续流动并全部收集到吸附垫上。用于支撑所有组件的带有粘胶的 PVC 板在侧向层析装置中，是典型的装置。这些组件中有金标物的暂存区，包被有专一单抗的微孔膜，用以增加毛细吸附力的吸附板。

测定特殊分析物所需要的时间取决于样本的流速和分析物与抗体反应的速率。样本的流速是由通过微孔膜的毛细流控制的

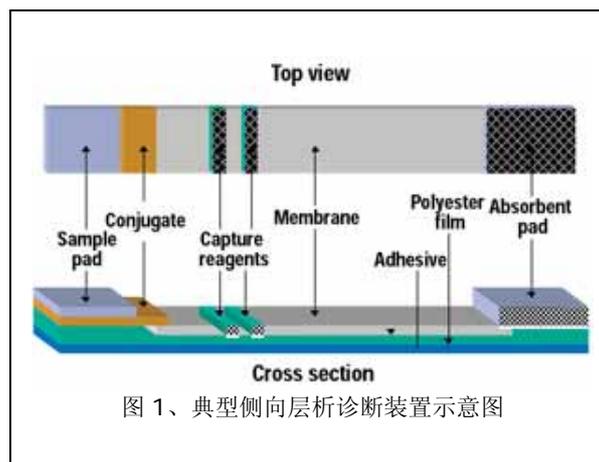


图 1、典型侧向层析装置示意图

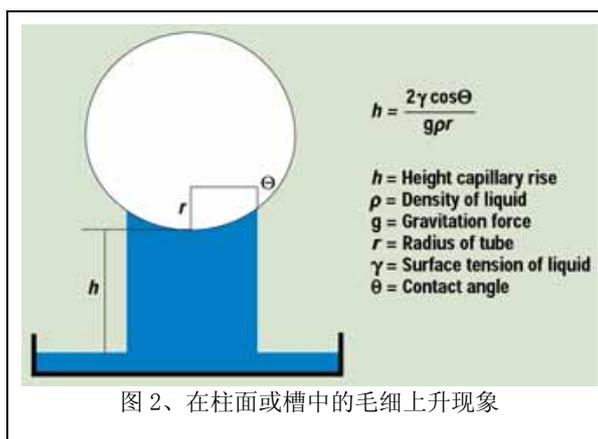


图 2、在柱面或槽中的毛细上升现象

控制表面张力来影响流速

液体的表面张力是一种液表面自身阻碍该表面延伸的能量。表面能是用来增湿表面的能。为了达到适宜的芯吸，湿润，扩散效果，液体的表面张力必须减小，以便拥有比湿润的表面能少的能量。

生物样本液体流经诊断设备通道时的芯吸作用产生了毛细管流。毛细管流是由液体分子间的内聚力的作用和液体与通道壁之间的吸附力共同作用完成的（见图 2）。

拉普拉斯方程 Laplace' s equation表明液体在槽内或圆柱内上升，直到液体的重力和推动它通过通道的压力之间的压差平衡，如下：⁷

$$\Delta p = \frac{(2\gamma \cos\theta)}{r}$$

在上述方程式中， Δp 表示通过表面的压差， γ 液体的表面张力， θ 是液体和通道壁的接触角， r 是圆筒的半径。

如果重力用 g 表示，毛细上升的高度用 h 表示，液体的密度用 ρ 表示，那么液体在圆筒中的重力就是 $\pi r^2 g h \rho$ ，或者是不同于 $g h \rho$ 的每单位面积平衡的压力，因此

$$g h \rho = \frac{(2\gamma \cos\theta)}{r}$$

或

$$h = \frac{(2\gamma \cos\theta)}{g \rho r}$$

如果要增大通过膜的芯吸作用，就要减小半径 r 和接触角 θ ，这样液体表面张力 γ 应该增大。

湿润是液体和固体之间接触的吸附。⁸

图 3 显示的是一个小水滴置于光滑均匀的固体表面。这种现象的理论解释可以用杨氏方程⁹表示如下：

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta$$

该图描述了接触角 θ 与液体表面张力 γ_{LV} 和固相 γ_{SV} 之间的关系。

在图 3 中，通过水滴做水滴与固体平面的接触点作水滴的切线，该切线与固体平面的夹角称接触角 θ ，液体的表面张力用 γ_{LV} 表示，固体的表面张力用 γ_{SV} 表示， γ_{SL} 表示液-固间的界面张力。

当液体和固体间的接触角 θ 接近 0° 时，液体在固体表面完全铺平。为了增大湿润性，液体的表面张力必须小于或等于固体的表面张力。这是固体的临界湿润张力。

变湿的自发过程可以由杜培方程式中的粘附功，内聚功表示如下

$$W_A - W_C = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} - 2\gamma_{LV} = \gamma_{SV} - (\gamma_{LV} + \gamma_{SL})$$

在这个方程式中 W_A 表示粘附功， W_C 表示内聚功。在公式中可以看到，如果固-液界面间的分离功大于液体内的分离功，液体便会自发的平铺在固体表面。

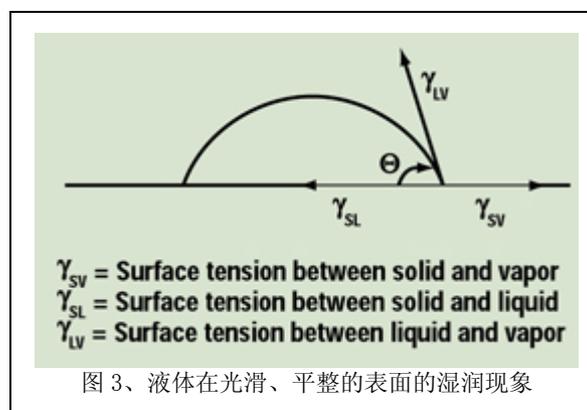


图 3、液体在光滑、平整的表面的湿润现象

因此，杜培方程式也可以进一步表示为由Harkins所确定的以铺展系数表示的方程式。如下：¹⁰

$$S = W_A - W_C = \gamma_{SV} - (\gamma_{LV} + \gamma_{SL})$$

液-固间的界面张力 γ_{SL} 与 γ_{LV} 相关性的变小时，初始铺展系数就会变为

$$S = \gamma_{SV} - \gamma_{LV}$$

铺展是液体在通过固体表面时产生的运动现象。接触角是湿润性的量度标准。随着接触角角度的增加，铺展也会增加直到完全湿润。

因此，当 S 大于 0 时铺展便会自然地产生了，这也表明固体地表面张力一定大于液体的表面张力，如以上方程式所表示。从这个初始铺展系数方程式中可以归结为，湿润性可以通过增大固体的表面张力或减小液体的表面张力来增加。

对固相的表面处理

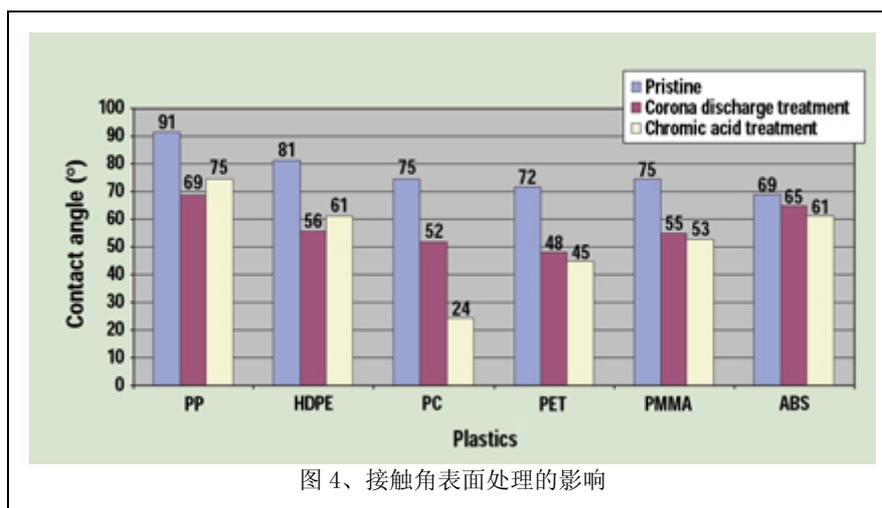
增加固体表面能的表面处理包括物理方法和化学方法。用于增加表面能的物理处理方法包括电晕放电，机械磨损，火焰，等离子体处理。¹¹化学处理方法包括净化，上底层油，涂层，浸蚀。

电晕放电在塑料制品的表面处理是用的最多的技术。在处理过程中，塑料制品的表面在高能辐射下接受氧自由基的轰击。塑料制品的表面的电质体和化学结构必然发生了改变。当然，这个结果也提高了塑料制品的湿润性。

另一个常用的方法是湿化学处理。这种处理方法可以通过浸泡在铬酸和磺酸的混合酸中以解决塑料表面的氧化部分。¹⁶

电晕放电处理和铬酸处理的效果

为了说明电晕放电和铬酸对固体基底表面底处理效果，对用这些技术处理的六种工业塑料进行了一项研究用。电晕放电处理是将每一个塑料板的表面暴露在频率约有 500kHz，电压为 10000-50000v 的放电电场中约 5 秒钟。铬酸处理方法要求塑料板的表面用铬酸冲洗 15 秒钟，然后用蒸馏水冲洗干净。再用异丙醇冲洗表面，然后擦干。以上每一种方法中，在处理完材料后应立即测量接触角。



测量水在未处理和处理过的样本材料上的接触角。电晕放电处理和铬酸处理都可以提高材料表面的润湿性（见图 4）。水的接触角的降低表明处理材料的表面能的增加，这样将会增加材料对生物流体的润湿性。

铬酸对含有一些聚碳酸酯，聚酯等功能团的塑料材料有很强的作用效果。而电晕放电处理可以增加含有聚烯烃（聚丙烯，高密度聚乙烯）的材料表面能。电晕放电处理方法可以通过定向表面电荷或通过材料表面引介氧来提高水的接触角。

每一种方法都将会增加塑料板的极性并且借此增加它的表面张力。当然了，由于减小固体塑料和水之间的表面张力 γ_{SV} 和 γ_{LV} 接触角将会变小。电晕放电方法的缺点就是它的不稳定性。对电晕放电处理后的基底材料需立即涂上一层物质。

表 1: 所选的表面活性剂的物理性质

化学名称	结构	离子型	分子量
2-乙基己基磺酸钠	分支型的	阴离子型	232
十二烷基磺酸钠	直线型的	阴离子型	288
Sodium nonylphenol ether sulfate	芳香族	阴离子型	498
Nonylphenol ethoxylate	芳香族	非离子型	704
Polyalkyleneoxide heptamethyltrisiloxane	modified 线性硅氧烷	非离子型	600

胶粘剂中的表面活性剂

表面活性剂用来降低液体的表面张力是众所周知的¹⁷⁻¹⁹。许多种阴离子和非离子型表面活性剂能用来降低房水的表面能（见表1）。

为了测定特性需要一种既有绑定又有亲水属性的粘合剂，为了了解用于制造胶粘剂的高分子材料和树脂之间的内部关系，进行了一些大量的有价值的研究。描述如下，研究表明利用表面活性剂在涂料和胶粘剂中是为了加强它们的增湿润性。流体的流率，和粘连性。每一种表面活性剂以不同的浓度按配比配制成粘连剂的基础物质。检测水的接触角是为了确定表面活性剂在减小水的表面张力的作用。

这项研究导致了专利技术的发展，这些技术迎满足了亲水性胶粘剂的需求，这些亲水性胶粘剂可以减少流体表面张力和提高在诊断试剂中的流率。

亲水性胶粘剂的制备

亲水涂料 热封口和压合胶粘剂在实验室中制备过。多聚树脂在有机溶剂中溶解，并且随后测量混合物的固体凝固性和粘滞性，其性能都超过了几个小时。

表面活性剂被介绍用于溶解有树脂的高聚合物的混合溶液。轻轻地搅拌几分钟，这样能充分地混匀溶液。亲水性的压感成分的准备是通过将表面活性剂加入到丙烯酸胶粘溶液和乳胶中配制而成，且胶乳随后要缓慢的搅拌混合直到分散或者溶解。

胶片的准备

在实验室中，亲水胶片是通过使用涂料设备来准备的。干包衣法的涂层有近似 0.0005 到 0.001 的厚度。亲水粘合剂涂料由一层低表面能的释放装置的膜保护着。

各种表面活性剂对水的接触角的作用效果

各种表面活性剂按配方制成压合胶粘剂胶乳。用去离子水测量这些亲水涂料的表面润湿性。利用泡滴法测量水流体在亲水薄膜表面的接触角。

一项对 HY-5 和 HY-10 这两种亲水热封胶粘剂表面润湿性的进一步研究展开了。这两种物质是用聚酯型树脂和阴离子表面活性剂壬基酚硫酸钠、SDS 分别组成的。

结果 当增加表面活性剂的浓度，大部分的样本显示出降低接触角的相同趋势（如图 5）。

在这个试验中，壬基酚醚硫酸钠显示出在三种表面活性剂浓度下能最有效的降低水的表面张力。在一项表面活性剂的评估中，壬基酚醚硫酸钠在阴离子表面

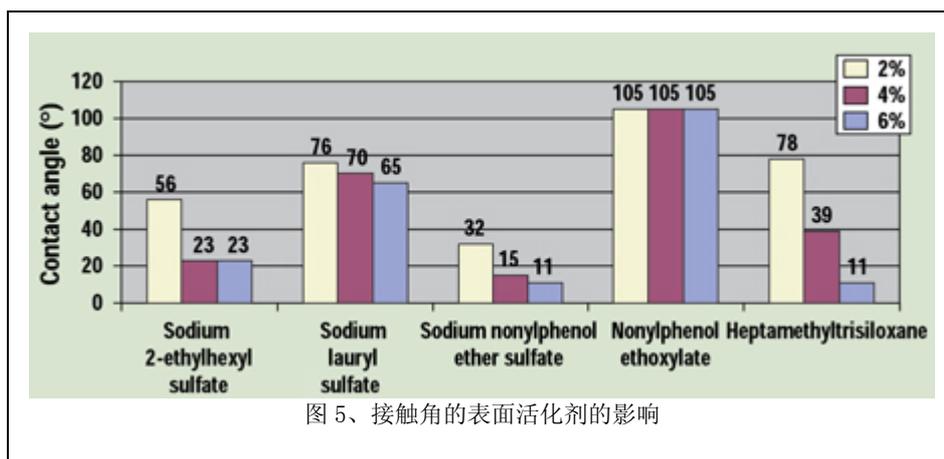


图 5、接触角的表面活性剂的影响

活性中拥有最大的分子质量。低分子量的阴离子表面活性剂能在胶粘的基板上很好的溶解，所以在水和胶粘基板之间就会有较下浓度的表面活性剂。

非离子型表面活性剂乙氧基壬基酚对去离子水的接触角几乎没有什么作用。这或许是因为它的高分子质量和相对于阴离子表面活性剂的亲水基来说它拥有较低的亲水基团。另外，壬基酚基团使得它增加了对聚合物表面的吸附性。

PMHS 同样是一种非离子型表面活性剂，相对于乙氧基壬基酚来说它可以减小水在胶粘表面的接触角。PMHS 拥有一个硅氧烷聚合物的主链，而不是有低表面能的烃链。另外，PMHS 拥有比乙氧基壬基酚还低的分子质量，乙氧基壬基酚可以增加它在胶粘的基板上的游离性。

线性结构的月桂磺酸钠会提高它在胶粘剂中的溶解度，所以它对胶粘剂表面的作用就会小于 2-乙基己基磺酸钠的作用。

表面活性剂的不同浓度对准备用于聚合树脂的涂料的表面润湿性的影响见图 6。

聚酰胺，乙烯醋酸乙烯共聚物，聚酯型树脂是由丁二酸二异辛酯磺酸钠按配方配制的。因为多聚树脂具有疏水性，所以涂料中在没有表面活性剂的情况下，接触角是大的。通过增加表面活性剂的浓度，会观察到表面会变得更加具有亲水性，水的接触角变小，这表明增加表面活性剂的浓度会显著提高表面的润湿性。在高浓度的表面活性剂作用下，湿润性效果的增加或是减弱取决于表面活性剂及其与聚合物基质的配伍性。

水在HY-5 和HY-10 型涂料表面的延伸性如下。当液滴接触膜表面的时候，最初会有一个很快的延伸速度。接触角会很快地减少到小于 10° 。在 30 秒到 1 分钟内达到平衡。这种延伸性是亲水涂料，热封胶粘剂和压合胶粘剂地典型代表。

通过微流控通道的流率

我们设计了一些实验，来测量在通过微流控通道时亲水涂料

和胶粘剂对蒸馏水的流率的影响。下列的筛查是针对不同型表面活性剂对接触角的影响，其中影响最大的表面活性剂用来配制胶粘带，胶粘带被用来做微流设备的盖子。在这一组实验中，一种亲水的压合胶粘剂由一系列浓度 0 至 6% 的壬基酚醚硫酸钠配制而成。

微流通道被做成聚苯乙烯设备，体积 $20\text{ cm} \times 10\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$ ，亲水带用于靠近通道，以产生微流装置。蒸馏水从一端滴进并将水通过通道的时间记录下来。

结果 当胶粘剂中没有表面活性剂时，水就不会通过通道。然而，随着表面活性剂浓度的增加，水通过微流通道的速率就会增加，因为他们之间的接触角变小了。

水流率的增加是因为减小了水的表面张力，这和毛细上升的原理是一致的。当水的表面张力接近毛细材料的表面张力时，水会前进的更远，毛细材料是由亲水的胶粘盖所决定的。

然而，当表面活性剂的浓度超过 4% 时，流率就会停止增长，因为它的浓度超过了临界水平。此外，在胶粘剂表面的多余表面活性剂不仅不会减小流体的表面张力，而且有可能会增强。²⁰

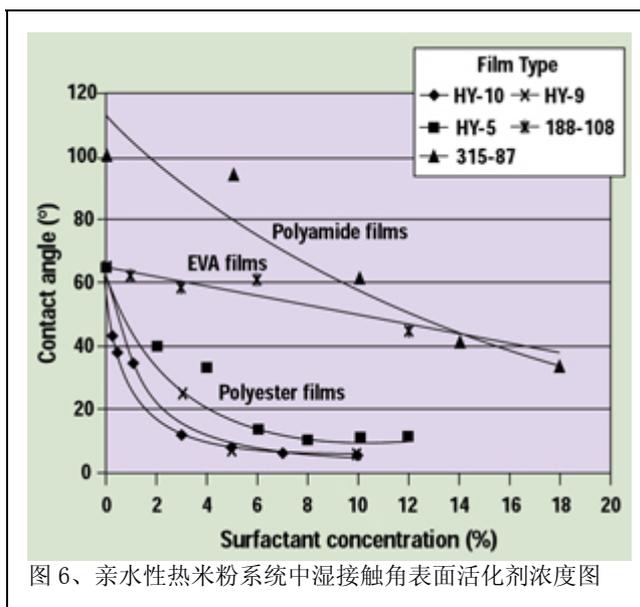


图 6、亲水性热米粉系统中湿接触角表面活性剂浓度图

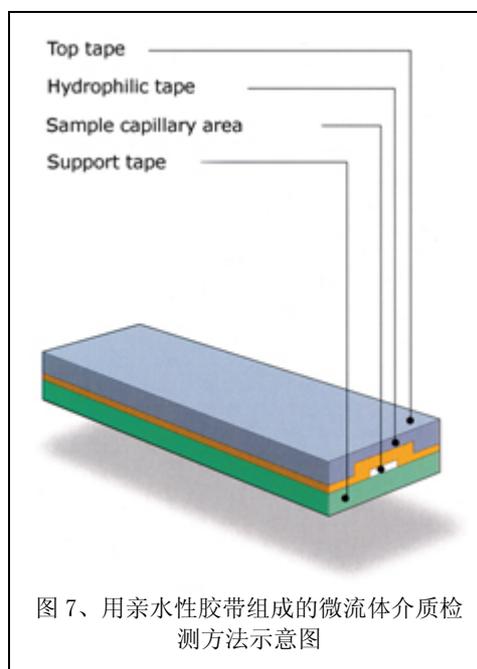


图 7、用亲水性胶带组成的微流体介质检测方法示意图

红外分析

为了研究在亲水涂料中表面活性剂的分布和活度，用衰减全反射-红外线光谱方法来完成亲水涂料中的表面化学分析。含有 dioctylulfo succinate 钠盐的热封胶粘剂的 FTIR-ATR 光谱已经记录下来。

结果 最初，琥珀酸二辛酯磺酸钠(sodium dioctyl sulfo-succinate, DOS)的吸收峰在光谱的指印区被检测到。然后冲洗并干燥HY-10膜的表面，另一个冲洗的表面的光谱接近最初的测量值。 methyl stretch 在 2967 cm^{-1} 和 S-O vibration在 $1047\text{--}1049\text{ cm}^{-1}$ 处的消失证明了表面活性剂的丢失，这就是冲洗这个步骤的结果。

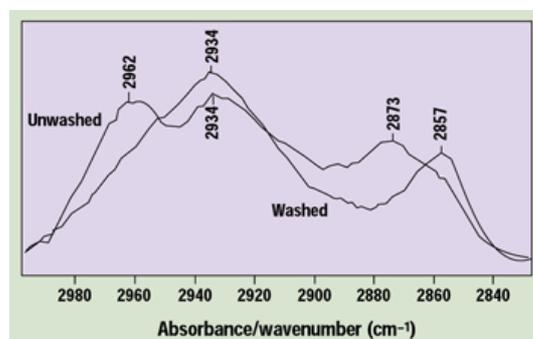


图 8、亲水性涂料HY-10的FTIR光吸收谱(C-H 范围为从 2980 cm^{-1} 到 2840 cm^{-1})

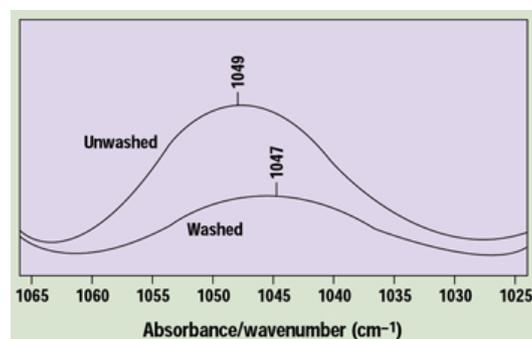


图 9、HY-10 的FTIR光吸收谱(S-O 范围为从 1065 cm^{-1} 到 1025 cm^{-1})

涂层的红外光谱表明了表层上的表面活性剂浓度有所增加。在ATR机 2958 cm^{-1} 处的吸收峰表明 CH_3 基团的C-H键在亲水粘胶的表面活性剂上，并且这个吸收峰用于监测表面活性剂在表面的积聚。C-H的吸收度曲线作为表面活性剂浓度的标志，在 0%、1%、5%和 10% 显示了一个扁平曲线的结果，这是由于表面活性剂在表面达到饱和而引起的（见图 11）。

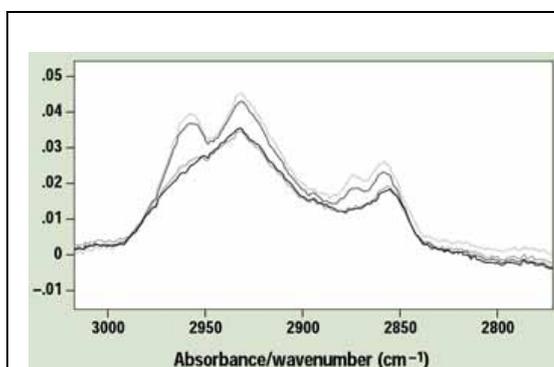


图 10、HY-10的红外光谱(C-H 范围为 3000 cm^{-1} 到 2800 cm^{-1})

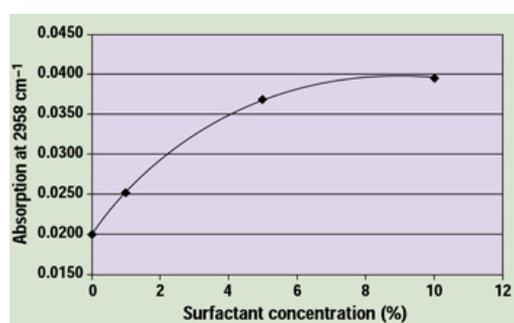


图 11、在亲水性涂料 HY-10 中木精表面活性剂浓度的吸收

在原子力显微镜下的表面形貌

涂层的表面形貌已经用原子力显微镜观察过了。亲水带包埋在 1-cm-diam 的金属线上并且通过轻敲扫描模式记录图象。轻敲扫描模式成像比直接接触成像模式有更多的优点。在直接接触模式里占据优势的侧流力的成像是被删除了的。另外，轻敲扫描模式对敏感样品的成像没有破坏性。最重要地一点是，相位显像能通过利用轻巧扫描模式另外给出关于样品表面的胶粘性和化学性的信息。

22

所有的样本最初在空气中扫描。亲水涂层 HY-10 用蒸馏水冲洗 10 秒，然后用擦镜纸擦干。样本干燥过夜并于第二天早上测量。

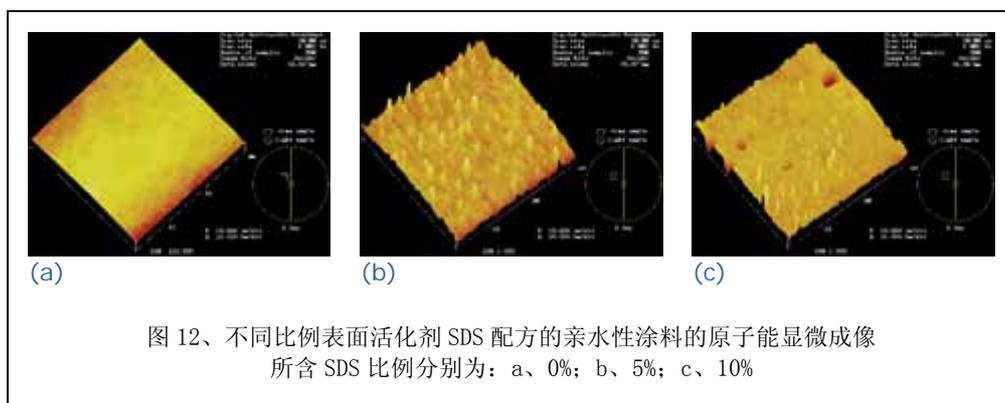


图 12、不同比例表面活性剂 SDS 配方的亲水性涂料的原子能显微成像
所含 SDS 比例分别为：a、0%；b、5%；c、10%

结果 原子力显微图象显示出了通过增加表面活性剂的量，使得在膜和空气交界处膜的表面面积增大，这个图象被介绍用于胶粘剂公式。不含有表面活性剂的涂层的原子力图象是一个相对平滑的表面(见图 12a)。当在胶粘剂涂层中掺入 1% 的表面活性剂时，涂层的表面会观察到有隆起特征的膜表面。加入 5% 表面活性剂的表面形貌会增加(见图 12b)。而当表面活性剂的量增加到 10% 时，因为达到饱和度的原因，膜表面会出现较平滑现象(见图 12c)。

表面峰的高度和接触角的比照作为表面活性剂浓度的函数显示在图 13 中，在涂层表面不含有表面活性剂时，图象是平滑的，几乎没有什么地势。在附加料浓度为 0% 时，及表面活性剂浓度为 0% 时，膜表面上水的接触角为 70–80°，这表明表面是疏水性的。当增加胶粘剂成分中表面活性剂的浓度时，可以观察到表面变得崎岖不平。当有 1% 浓度的表面活性剂时，横断层面的的高度从 0nm 增加到大约 5nm。横断层面的的分析显示车表面特征的积累，这与附加料的增加是相关联的。随着表面活性剂的增加，表面湿润性得到了改善且接触角以一个非线性形式减小，直到浓度达到 5% 和 10% 表面总湿润性完成。

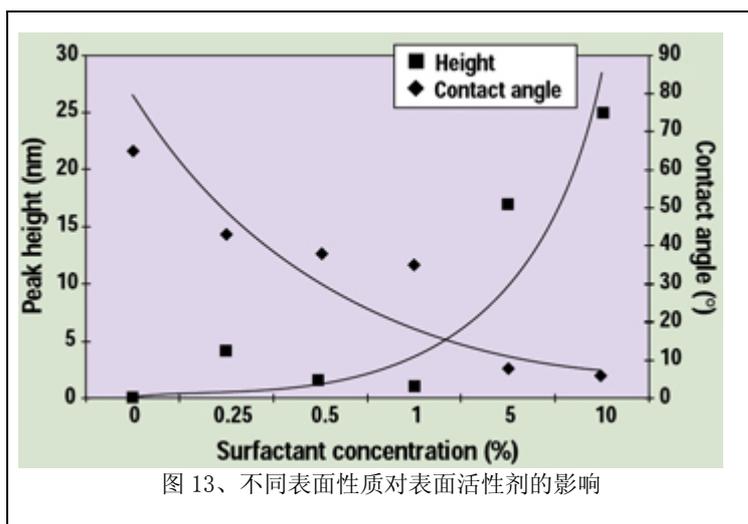


图 13、不同表面性质对表面活性剂的影响

为了观察 10% 浓度表面活性剂对表面地貌的作用效果，记录下了用水冲洗前和冲洗后含有 10% 表面活性剂的亲水涂层的原子力显微镜图象。图象显示没有用水冲洗的含有表面活性剂的亲水涂层的表面地貌集中在表

面。用蒸馏水冲洗过的涂层，表面活性剂溶解并且被从表面冲洗掉，只剩下一个更加粗糙的图象。

亲水性

体外诊断试剂制造商在提到产品中所使用的粘合剂时，总是要求粘合剂要具有很高的性能、良好的可湿性和优良的耐受性。对于以上要求，粘合剂制造商必须加以平衡和控制，以生产出易于加工的亲水性粘合剂。

但是，在选择用于体外诊断试剂的粘合剂时，必须考虑以下因素：被粘和的各种部件及其表面能、利用毛细作用泳动的液体种类及其表面张力、各种试剂的化学性质、粘合剂与各种部件的相容性、产品的使用条件、产品的保质期及包装。

在侧流检测试剂条所使用的膜制品是疏水性聚合物，具有较小的表面能，因此它们与生物的各种体液不相容。为了克服这些膜制品表面能低的问题，人们常常通过加入一些表面活性剂来提高它们的可湿性和毛细泳动能力。但是，加入这些表面活性剂后可能会降低蛋白质与膜制品之间的附着力，这些蛋白质对于诊断试剂条的功能起着至关重要的作用。另外，加入的表面活性剂会使反应的条带发生广泛的扩散，从而降低诊断试剂条的灵敏度。

将表面活性剂与聚合树脂混合后包被于膜制品的表面可以提高生物体液在诊断试剂条上的毛细泳动速度。采用这种结构将各部分粘接在一起的诊断产品利用这种结构所提供的亲水表面可以降低生物体液的表面张力。表面张力降低后，液体可以较快的从诊断产品的加样区到达反应区，从而缩短检测时间。液体扩散效率的提高可以减少样品的用量，从而为产品的设计提供更大的空间，为标本取样提供更多的途径以减轻病人的痛苦。通过提供一个良好的毛细泳动表面，可以

扩大样品区与反应区的距离，最终降低了诊断产品上各种化学试剂之间相互干扰的机会。所有这些优点可以提高生产制造的效率、降低生产成本。

亲水包被物和压敏、热封粘合剂可被用于诸如毛细流、侧流、微流和电泳等体外诊断产品。

结论

专利技术的发展使得亲水涂料、熔封盒压感胶粘剂能够按比例配制出，以提供能增强流体的湿润性和扩展的绑定表面，可以用到体外诊断试剂装置中。胶粘剂和表面活性添加剂的选择和其浓度对诊断试剂的性能起着关键性的作用。

实验结果证明了粘胶带结构的亲水性能能够用于体外诊断试剂装置。然而，为了确保相容性，不同的聚合物系统要选择正确的表面活性剂。在选择最佳的亲水性胶粘剂的结构时，表面活性剂的性质如，分子质量，带电类型和化学构造必须考虑到。

亲水涂料中添加表面活性剂已经被证明可以提高在体外诊断试剂装置中的芯吸效果和增大流体的流速。胶粘剂和表面活性剂的性质被选来与诊断试剂装置和它的化学试剂相一致。任何一种应用，条带的结构的合适性必须由诊断试剂的制造商来决定。

参考文献

1. SM Rosen, "Biomarkers of Chemical Exposure: A New Frontier in Clinical Chemistry," *IVD Technology* 2, no. 3 (1996): 22.
2. RA Esposito et al., "The Role of the Activated Clotting Time in Heparin Administration and Neutralization for Cardiopulmonary Bypass," *Journal of Thoracic and Cardiac Surgery* 85 (1983): 174–185.
3. CA McDonald et al., "A Rapid One-Step Colored Particle Lateral-Flow Immunoassay for the Detection of Group 1 Streptococcal Antigen Extracted Directly from Throat Swabs," in *Proceedings of the 93rd General Meeting of the American Society of Microbiology* (Washington, DC: American Society of Microbiology, 1993), 507.
4. C Huang and E Fan, "One-Step Immunochromatographic Device and Method of Use," U.S. Pat. 5,712,172.
5. A Pronovost and J Pawlak, "One-Step Urine Creatine Assays," U.S. Pat. 5,804,452.
6. N Vallespi i Salvado, VV Shah, and DA Werkems, "Surfactants in Pressure-Sensitive Adhesives," *Surface Coatings International* 4 (1999): 181–185.
7. Walter J Moore, *Physical Chemistry*, 3rd ed. (New York: Prentice-Hall, 1962), 730.

8. WA Zisman, "Influence of Constitution on Adhesion," *Handbook of Adhesives*, 2nd ed., ed. Irving Skeit (New York: Van Nostrand Reinhold, 1977), 33–64.
9. T Young, *Philosophical Transactions of The Royal Society* 95 (1805): 65.
10. WD Harkins, *The Physical Chemistry of Surface Films* (New York: Reinhold, 1952).
11. PH Winfield, AF Harris, and AR Hutchison, "The Use of Flame Ionization Technology to Improve the Wettability and Adhesive Properties of Wood," *International Journal of Adhesion and Adhesives* 21, no. 2 (2001): 107–114.
12. JM Evans, "Nitrogen Corona Activation of Polyethylene," *Journal of Adhesion* 5 (1973): 1–7.
13. JM Evans, "Influence of Oxygen on the Nitrogen Corona Treatment of Polyolefins," *Journal of Adhesion* 5 (1973): 9–16.
14. DK Owens, "Mechanism of Corona-Induced Self-Adhesion of Polyethylene Film," *Journal of Applied Polymer Science* 19 (1975): 265–271.
15. DK Owens, "Mechanism of Corona- and Ultraviolet-Light-Induced Self-Adhesion of Polyethylene Terephthalate," *Journal of Applied Polymer Science* 19 (1975): 3315–3326.
16. WP Townsend, "Metallization of Plastics," *Handbook of Adhesives*, 2nd ed., ed. Irving Skeit (New York: Van Nostrand Reinhold, 1977), 841.
17. MJ Rosen, *Surfactant and Interfacial Phenomena* (New York: Wiley, 1978).
18. THF Tadros, *Surfactants* (New York: Academic Press, 1984).
19. AC Clark and J Piolet, "New and Improved Waterborne Systems," *Adhesives Age* 42, no. 9 (1999): 33–40.
20. WA Zisman, "Influence of Constitution on Adhesion," *Handbook of Adhesives*, 2nd ed., ed. Irving Skeit (New York: Van Nostrand Reinhold, 1977), 46.
21. TA Thorstenson and MW Urban, "Surface and Interfacial FTIR Spectroscopic Studies of Latexes, IV: The Effect of Surfactant Structure on the Copolymer-Surfactant Interactions," *Journal of Applied Polymer Science* 47 (1993): 1381–1386.
22. A Doring, J Stähr, and S Zollner, "Atomic Force Microscopy: Micro- and Nano-Mapping of Adhesion, Tack, and Viscosity," in *Proceedings of the 23rd Annual Technical Seminar: Pressure-Sensitive Tapes for the New Millennium* (Northbrook, IL: Pressure-Sensitive Tape Council, 2000), 213–222

诊断经理人概述

展望未来

John Conroy文

Waynepionnet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。）

体外诊断试剂行业的高管们讨论如何根据初现端倪的产业化趋势来制定他们的公司战略规划。

“你要我回头给你打电话吗？” *Kenneth Buechler*（Biosite 公司总裁兼首席科学主管）在手机里频繁的问。为了给投资者发表演说，*Buechler*从公司总部来到芝加哥，而IVD产业的僵局使他的声音听起来好像正站在密西根湖边的凛冽寒风中。



对于任何一个拥有核心竞争力的企业领导来说，压缩一个采访是在发表股票增长演说前，还是在评论大赚一笔的暑假演说前，方案都是极类似的。而下面三位执行官在这里分享关于自己公司未来的规划和IVD行业扩大化趋势的思想也是颇为相似。

不过，与其他日程繁忙和充满挑战的主管们所不同的是，体外诊断行业主管们有种满足感，即他们的贡献在于那些意味着心脏病患者或癌症病人生死的产品制造。这种潜在性必然导致了FDA和投资者的怀疑，造成了开发费用的高昂，和在航班上通过隐形手机来衡量价值。

***Rob Lipshutz*（Affymetrix公司分子诊断和新兴市场高级副总裁）**

“Affymetrix动力”会成为诊断技术领域内类似于“Intel核心”那样的口号吗？*Rob Lipshutz*认为事实已经如此。

“在IVD产业中，我认为它们是类似的，”*Lipshutz*说，“这也是我们所期望的。”

1989年，Affymetrix发明了微阵列技术；1994年，也就是*Lipshutz*加盟该公司一年之后，公司就推出了它的第一个产品，而现在公司声称已有1200多个拥有基因芯片专利技术的诊断系统被销往全球。



“‘Affymetrix动力’计划证明了用于诊断方法中的微阵列技术的品质和力量。我们提供了基础的技术平台，而我们的合作伙伴正将这个平台推向前进，”*Lipshutz*说。

合作伙伴之一的罗氏诊断（位于印第安那波里），宣布一月份美国食品药品监督管理局（FDA）废除了一项基于Affymetrix公司微阵列技术的诊断应用。这个被称作罗氏AmpliChip CYP450的诊断系统可用来分析病人血样中源于染色体DNA的细胞色素P450的两种基因型：2D6和2C19。通过识别不同的药物代谢因子的变化，该系统能够帮助医生对于一些疾病，如精神沉郁、精神分裂症和内分泌失调等做出最好的治疗选择。

2004年9月，AmpliChip CYP450成为欧盟第一个基于微阵列技术而获得诊断用途CE标志的检测系统。虽然微阵列由包含数以万计DNA片段的玻璃微芯片组成，但其大小也只相当于一个拇指指甲大小。Affymetrix也推出了它的基因芯片系统3000Dx，是世界上第一个用于临床诊断的微阵列系统。该系统主要检测由于遗传变异而引发的药效阻碍和不良反应。

更多的新产品不断推出。六月份，Affymetrix推出了新一代的基因芯片扫描仪30007G。该装置可扫描5-微米的物体，与原先的微阵列系统相比，它的染色体容量增加了500%。扫描仪支持最新的高密度、高数据容量的可用于重叠、全组和单核苷多态性基因型研究的微阵列。

*Lipshutz*说，1993年当他加盟Affymetrix公司的时候，他的观点就很明确，“我们将继续沿着这条道路走下去，但很难说它是否能按着我所预期的时间表进行。”近来在P450基因上的研究成果是建立在20年来的研究发现基础上的。他又指出，“它是标记物与检测技术相互适应而完美结合的结果。”

*Lipshutz*说，半导体产业大幅度压缩装置大小的能力也不断地推动着生命科学的发展。“它使你能够了解越来越多的信息，越来越细地认识基因组，”他说，“这个技术理念也同样是把更多的信息打包存入一个更小的空间。”

*Lipshutz*称这是Affymetrix公司选择影印石版术而非其他可行的方法去生产微阵列的理由之一。这项技术与半导体生产相似，当我们在萨克拉门托建立第一家工厂时，就开始执行一个良好的既定生产流程。“在那里，我们建立整个生产流程的质量控制体系。”他说，“最近几年，由于我们开始和罗氏合作，为了符

合诊断产品质量标准的要求，质量体系变成了较为直观的步骤。”

*Lipshutz*认为分子诊断技术正处于不断上升阶段。“我认为人们对它认可度也在不断增长。”这项新的诊断方法在经历一段很长的临床实践基础研究后将会快速发展。“这是其他科学信息和临床结果在这一领域的逐步积累，”他说，“我想这些结果积累的加速度将会呈现在我们的面前。”

*Lipshutz*同时认为体外诊断试剂产业正处于在实验室、临床研究装置和医疗中心中优先完成大量工作的阶段。它必须正视的挑战是着手找出高优先级的项目和人们对健康预测愈来愈多的需求中的最大缺口。

*Lipshutz*说Affymetrix正处在展示这些技术和这类检测系统的开端。他相信微列阵的使用将成为诊断技术领域中的一个重要组成部分。

*Lipshutz*指出罗氏已经广泛公开的讨论了未来5年内将基于Affymetrix公司平台上开发多重检测系统的计划，他认为早期的产品将针对癌症，因为这项技术正好弥补了人们尚未实现的诊断需求。

Affymetrix公司正继续它的发展步伐。紧随公司五月份收购它的一个合作伙伴生物科技（位于旧金山，加州）——一直专门从事人类基因组多样性分析的突变生化处理工作的公告之后，6月份，公司和ParAllele宣布用于SNP基因型分析的MegAllele线。

*Lipshutz*说，这些成果“都是建立在我们完善的技术基础和正在丰富的分析产品组合的基础上的，我们可以开展的一系列在诊断学与应用领域里的应用。

William Kozy（BD诊断公司总裁）



在描述生物标记物和蛋白质组学时，William Kozy，BD诊断（富兰克林湖，新泽西州）总裁，将话题转移到经典的冰山故事上。“这就好比一个巨大的冰山，现在人们运用现有技术发现了大约几百个蛋白，”他说，“可我们知道世界上有成千上万的蛋白携带有价值的信息片段。”

BD诊断的自由流动电泳工具是设计用来帮助研究者们发现1/10伸出水面的冰山，同时恢复其他9/10低丰度的蛋白。“这些就是通往水下冰山的途径，在此之前从没人去过，”Kozy说。

最近，BD诊断已经采取了进一步的措施，以加强它在该领域内的竞争力。

五月份，身价49亿美元的医学技术巨人BD公司的分支机构用一笔秘密款项购买了慕尼黑FFE Weber公司的技术和其他资产。这家德国公司主要从事分离复杂蛋白的分离和分馏。

这次收购将帮助BD诊断进一步提升其在蛋白组学领域的竞争力，这一领域无论在诊断还是其他医学研究分支学科中都日趋重要。这无疑将促使其他致力于蛋白组学研究的公司改善蛋白分离能力。

就在收购FFE同时的一份声明中，Kozy指出改进并最终标准化Preanalytical流程对蛋白分析来说是十分重要的。临床样品的收集与处理都需要借助于新的技术，Kozy认为对FFE weber公司的收购将有利于增强新泽西公司的分离技术——这有助于蛋白组学家寻找新的生物标记物。

蛋白质组学是“纯粹地科研院所和政府性的研究，” Kozy重申道。FFE收购“是我们带着现成的技术进入该产业的第一步，然后我们会移向其他蛋白分析产品——那些按照我们对体外诊断产业发展的预测，人们更喜欢用的。” Kozy预测“真正的临床诊断应用”还要花5-10年时间。

临床诊断市场不乏其他的挑战，Kozy总裁说。“一般来说，主要障碍之一是可带来满意的经济收益和患者回报的可承受的科技革新。” Kozy说。“它不再仅仅是一个你说什么就是什么的问题，‘这是一个\$2000的测试。如果你用它，它将会起到帮助作用。’”

Kozy强调作为诊断公司的总裁，最大的挑战是像化学和微生物学领域那样，把革新的重心集中在“几类重要的成熟区域”。“你必须表明这种积极的收益不仅仅是临床，同时也不仅仅在经济层面上，”他说。

1月份，BD Phoenix自动微生物系统在美国的推介是我们的产品平台真正触及这些基础的最好实例，Kozy说。“我们要告诉客户，我们能帮他们得到良好的临床结果和同等的经济收益。”全自动检测系统可帮助实验室对临床相关细菌进行鉴定和开展药敏实验。

Phoenix系统发布或许是一个IVD企业如何打破传统格局的研究个案，特别是一个有开创性意义的产品。“在最近的一些年里，我们已经加重了在管制能力方面的投资，” Kozy说。“像这个行业里的所有人一样，我常猜想，我称它挑战性，我也会认为它适度可预测。”

在他们已有的市场格局中，BD诊断期望一个主要的新技术平台的发布，如Phoenix检测系统能很快获得市场份额。然而，Kozy说，“它花了比我们预期的更长时间和花费。”

“现在这是一个非常有趣的流程，因为Phoenix系统遇到了比此前所有自动化鉴定和抗菌敏感性检测系统都要高的一系列监管标准，”他说。监管门槛的不断提高不但延迟了发布时间，同时也增加了这种用于病变组织细菌学鉴定的仪器的开发成本，Kozy指出。

“这比我们预期的时间长很多，花费也多出很多，但是它现在是唯一的面对这些新障碍的仪器，”他说，“因为他们继续提高门槛。”清除这些障碍需要BD诊断公司在发展费用上比原来预期提高15-20%，Kozy估计说。

Kozy指出公司领导的指导方针有助于这类事件在规划阶段得到解决。“我们的挑战首先考虑的是病人，其次是考虑客户。”Kozy补充道，“人们太容易把视线从这个点上移开。所以我很担心常规的思潮，而且我也的确担心了。我很担心政府的健康政策，而且我也的确这么做了。但是在这里我们请求我们的领导，请不要在所做的任何影响健康事业的方面鼠目寸光，这的确关系到病人。”

***Kenneth Buechler* (Biosite公司总裁和首席科学主管)**

自从推出其第一款产品——滥用药物筛检考核盘七年后，Biosite公开了其当时的研究计划，即研究所内部会同学术研究者共同判定了蛋白水平与疾病之间的关系。Kenneth Buechler，该公司的创始人之一，称这一计划是圣地亚哥的公司走向成功之门的钥匙。



“我们投入了15%的收入在研发上，”Buechler说，“这是相当大的一笔钱，我们用它来发展所有这些我们感兴趣的产品和考核盘。我认为这就是我们与其他公司在做同类工作时的不同之处。”

Buechler总裁说该项计划打开了公司的机会之门。“这是我们获得标记物考核盘的途径之一，”Buechler说，“此外，我们注册了外部来源的标记物，所以我们有相当开放的思维尽快为发生这些特殊疾病的国家获得标志物。”

Buechler说，Biosite公司最近主要集中精力做三种标记物的研究：中风、急性冠状动脉综合症和败血症。公司的工作基于这样一个前提：单一的生物标志物

作为医学诊断条件来说是不充分的，因而疾病的复杂性是公司的在研问题，疾病也有不同的病原和不同的程度，他强调道。

使用各种标志物的考核盘同时检测，Biosite把这些不同标志物集中计算出“一个被称为复合标志物索引的单值”，Buechler指出，这个索引就如同单个分析。

Buechler认为Biosite想在蛋白组学界取得突破难以预料，因为“大多数的蛋白已经被鉴定，这些蛋白的基因组也已经被鉴定。问题是：还有人去寻找新的蛋白吗？我认为这可以去尝试。有那么多可用的蛋白，我们足以从中找到一种最好的来用于这些复杂疾病的诊断。”

自从第一个产品问世以来，Buechler说他已经看到“床边诊断越来越受重视。”依据产品说明，滥用药物检测考核盘“过去并不是真正用于床边诊断，而是用于医院的实验室。”

Biosite的诊断考核盘今天已不再主要用于实验室了，急诊科的用量急剧增加，其次是医院的病房。公司有5-10种诊断系统用于急诊科的不同方面。Buechler补充说，“这将给病人更好的护理。”

“我们相信用于疾病检测的诊断学方法尽可能的接近病人是非常重要的，”Buechler解释道，“因为与病人越近，就越能快速得到结果。那么医生就可以快速的知道结果，而尽快、尽好的做出治疗。众所周知，一个病人越是尽快的做出诊断和治疗，结果越是理想，尤其对那些急性病，比如中风、败血症和药物过量。”

医学实验室坚决抵制这种来自病人健康需求的趋势。“我还不能说我们已经克服了这个障碍，”Buechler说，“虽然现场诊断的需求在增加的趋势是客观存在的，但由于医学实验室的阻力，这始终是一场战斗。它们不想把他们的利益分给医院里的任何一个部门，这依然是一个挑战。”

2005年6月，Biosite公司发布一项新产品研发声明，补充了Buechler的观点。公司声称将开发第二代海葱次甘甲（cardio）筛检考核盘，该产品可能含有一种引发冠状动脉壁兴奋的生物标记物--绿过氧化物酶（MPO）。

根据Cleveland临床中心的研究结果，Biostie指出由MOP增强兴奋水平的人无论是心脏病还是心脏病发作都很危险。此外，《新英格兰医学杂志》刊登的一项研究显示，有25%的病人参与高MPO水平的研究，他们当中至少38%的人在16小

时内有一次心脏病发作，Biosite公司说，公司将在9月前开展升级后的考核盘的临床实验，并计划在2005年底前向FDA申请一个试生产的许可证。

当被问及他如何理解美国的政策环境时，Buechler回答说，“我认为FDA会对审核越来越谨慎，我想他们也担心安全，这是一件好事。申报合格的产品，这也正是我们作为一个经济实体的责任，让他们感到我们将要投放到市场上的产品事实上是要帮助人们的。”

——约翰康罗伊（来自洛杉矶的自由撰稿人）