



免疫层析试纸 快速检测技术

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC LATERAL FLOW STRIP TEST

张改平◎主编

中原出版传媒集团
大地传媒

河南科学技术出版社



国家出版基金项目
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

免疫层析试纸

快速检测技术

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC
LATERAL FLOW STRIP TEST

张改平◎主编

河南科学技术出版社
· 郑州 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫层析试纸快速检测技术/张改平主编. —郑州:

河南科学技术出版社, 2015. 8

ISBN 978-7-5349-7652-0

I. ①免… II. ①张… III. ①试纸-免疫测定

IV. ①TS761.2②Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 031558 号

出版发行: 河南科学技术出版社

地址: 郑州市经五路 66 号 邮编: 450002

电话: (0371) 65788613 65788622

网址: www.hnstp.cn

策划编辑: 周本庆 陈淑芹

责任编辑: 陈淑芹

责任校对: 崔春娟

整体设计: 张 伟

责任印制: 张艳芳

印 刷: 河南省瑞光印务股份有限公司

经 销: 全国新华书店

幅面尺寸: 170 mm×240 mm 印张: 16.75 字数: 400 千字

版 次: 2015 年 8 月第 1 版 2015 年 8 月第 1 次印刷

定 价: 298.00 元

如发现印、装质量问题, 影响阅读, 请与出版社联系并调换。

《免疫层析试纸快速检测技术》编写人员名单

主 编 张改平

副主编 王爱萍 罗 俊 郭军庆

编 者 (按姓氏笔画排序)

王 丽	王方雨	王自良	王选年
王爱萍	王德国	邓瑞广	卢清侠
史西保	邢广旭	乔松林	孙亚宁
李 鹏	李青梅	李学伍	杨苏珍
杨艳艳	杨继飞	宋春美	张改平
郅玉宝	罗 俊	赵 东	郝慧芳
胡晓飞	柴书军	郭军庆	职爱民
樊剑鸣	滕 蔓		

主 审 张龙现

本书编者主持或参与的有关研究项目

编者在免疫层析试纸快速检测技术研究领域取得的相关成果，得到了国家有关部委及河南省有关部门的项目资助，项目列表如下：

中华人民共和国科学技术部、农业部		
项目编号	项目名称	项目时间
2014BAD13B05	畜禽产品安全生产监控和检测技术研究	2014~2018
2013303033	新城疫新型快速检测技术及产品研发	2013~2017
201203039	重大动物疫病疫苗临床免疫评价技术与示范	2012~2016
201203082-5	猪乙脑诊断试剂盒和高效疫苗创制与产业化	2012~2016
201203040	兽药残留新型快速检测技术及产品研发	2012~2016
nycytx-009	国家现代生猪产业技术体系	2011~2015
201003008-09	畜产品中兽药和违禁药物残留的快速检测技术研发与示范	2010~2014
2011BAK10B01	食品中重要危害物抗体库的建立及其产品研发	2010~2013
2010GB2D000272	磺胺药多残留试纸检测技术研究的中试与示范	2010~2012
2007AA100606	重大动物疫病快速检测试剂的研发	2008~2010
国家自然科学基金委员会		
3127254	基于上转换荧光技术的快速定量免疫层析试纸的研制	2013~2016
31072121	基于荧光纳米颗粒标记的高敏感免疫学快速检测试纸研究	2011~2013
河南省科学技术厅		
2013M541980	基于核酸适配体技术的多残留检测技术	2014~2015
132300413222	大豆抗原免疫学检测方法的基础研究	2013~2014
121100110800	肉类质量安全检测及溯源技术与示范	2012~2014
122300410052	免疫层析试纸快速检测技术	2012~2013

前 言

免疫层析试纸检测技术是 20 世纪 80 年代建立并迅速发展起来的一种快速检测技术。该技术可定性和半定量地检测多种生物大分子或小分子物质。由于该技术具有特异、灵敏、简便、快速、成本低廉等特点,可实现“傻瓜式”操作而被广泛应用于疾病诊断、抗体评价、食品安全监测、微生物污染、违禁药物添加及药物残留的检测以及环境监测等多个领域。编者自 20 世纪末就开始系统开展免疫层析试纸快速检测技术研究,在国内率先建立了抗原、抗体、半抗原三大类免疫层析试纸快速检测技术体系,成功研制出了一系列的免疫层析试纸产品,先后获得了国家技术发明二等奖和国家科学技术进步二等奖,有效带动了我国免疫学快速检测技术相关研究领域的迅速发展,引领了行业发展方向,促进了行业科技进步。

基于在免疫层析试纸快速检测技术研究领域中近 20 年的研究经验,并结合最新的国际发展趋势,我们编写了《免疫层析试纸快速检测技术》一书。本书对免疫层析试纸快速检测技术及其产品的基本结构、检测原理、检测模式、材料设备、制备工艺、生产流程、应用领域及发展前景等多个方面进行了较为详细的总结和论述,特别是以多个具有代表性的研制实例分别对抗原、抗体和半抗原三大类试纸检测技术

体系进行了详尽地阐述。在本书编写过程中，编者力求内容丰富、层次分明、语言简练、理论与实践紧密结合，使其成为一本简明易懂的参考工具书。本书不仅可以作为生命科学研究各领域从业人员的参考书，同时还可供医药、农林、牧医、水产、食品、环保以及相关交叉学科专业的师生参考。

本书由张改平院士主编，各章负责人分工如下：张改平（第一章）、罗俊（第二章）、郭军庆（第三章）、王方雨（第四章）、李学伍（第五章）、胡晓飞（第六章）、杨继飞（第七章）、邓瑞广（第八章）、王爱萍（第九章）。由于参编人员的写作水平及经验有限，书中不足之处，敬请广大同行及读者能够多提宝贵意见，以便今后再版时进一步加以完善，以期更好地促进免疫层析试纸快速检测技术在我国的发展和应用。

编者

2014年12月

目 录

第一章 绪论	1
参考文献	4
第二章 免疫层析试纸的基本结构与检测原理	6
第一节 免疫层析试纸的基本结构	6
第二节 免疫层析试纸的检测原理	8
参考文献	11
第三章 抗原免疫层析试纸快速检测技术体系	12
第一节 检测靶标	12
第二节 检测模式	15
第三节 抗体的制备	16
第四节 抗原免疫层析试纸的研制实例	35
参考文献	40
第四章 半抗原免疫层析试纸快速检测技术体系	41
第一节 检测靶标	41
第二节 检测模式	43
第三节 半抗原的结构与分子改造	44
第四节 人工合成抗原的制备	60
第五节 半抗原单克隆抗体的制备	95
第六节 半抗原免疫层析试纸的研制实例	97
参考文献	100

第五章 抗体免疫层析试纸快速检测技术体系	102
第一节 检测靶标	102
第二节 检测模式	103
第三节 抗原的制备	104
第四节 抗体免疫层析试纸的研制实例	109
参考文献	114
第六章 标记物的筛选及标记技术	115
第一节 胶体金标记	115
第二节 量子点标记	120
第三节 磁微粒标记	126
第四节 其他标记方法	129
参考文献	130
第七章 免疫层析试纸的材料、制备及评价	139
第一节 材料	139
第二节 仪器设备	151
第三节 制备工艺	162
第四节 检验与评价	175
附录 体外诊断试剂生产用净化车间环境与控制要求	179
第八章 免疫层析试纸快速检测技术的应用	183
第一节 免疫层析试纸快速检测技术在人类医学领域中的应用	184
第二节 免疫层析试纸快速检测技术在动物医学领域中的应用	201
第三节 免疫层析试纸快速检测技术在农业生产领域中的应用	208
第四节 免疫层析试纸快速检测技术在食品安全领域中的应用	214
参考文献	224
第九章 免疫层析试纸快速检测技术的发展与未来	238
第一节 高敏感检测	238
第二节 高通量检测	242
第三节 数字化检测	243
参考文献	244
中文名索引	247
英文名索引	252
拉丁学名索引	259

第一章

绪 论

免疫层析试纸快速检测技术 (immunochromatographic lateral flow strip test, IL-FST) 又称侧流免疫检测技术 (lateral flow immunoassay, LFIA)。该技术是在单克隆抗体技术、免疫层析技术、新材料及标记技术基础上发展起来的一种新型免疫学快速检测技术。免疫层析试纸 (以下简称“试纸”) 不需要专业技能和昂贵复杂的仪器设备即可实现对抗原、抗体和半抗原等各种分析物的定性和半定量检测, 广泛应用于激素、病原微生物 (病毒、细菌、寄生虫等)、肿瘤标记物、违禁药物、兽药、农药、生物毒素、毒品等靶标的快速检测, 是理想的免疫学快速检测技术之一^[1,2]。该技术可实现现场实时检测, 尤其适合于医院、兽医临床、检验检疫等领域, 具有广泛的应用前景。

免疫层析试纸快速检测技术源于 Plotz 和 Singer (1956) 建立的类风湿性关节炎乳胶凝集试验 (latex agglutination assay), 该试验以惰性聚乙烯甲苯和聚苯乙烯乳胶颗粒替代红细胞进行凝集试验, 因而更易于操作和判定^[3], 该技术与放射免疫检测技术 (radio-immunoassay, RIA) 和酶免疫检测技术 (enzyme immunoassay, EIA) 等检测技术在同一时期建立。免疫层析试纸快速检测技术的基本原理形成于 20 世纪 80 年代。Leuvering 等 (1980) 报道了以无机 (金属) 胶体颗粒为标记的溶胶颗粒免疫检测技术 (sol particle immunoassay, SPIA), 他们用胶体金或银颗粒标记抗体, 建立了人胎盘催乳激素 (human placental lactogen, HPL) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, HCG) 的夹心免疫检测方法, 高浓度抗原的检测结果可直接通过肉眼判定; 利用炭棒原子吸收光

谱法 (carbon-rod atomic absorption spectrophotometry, CRAAS) 测定的 SPIA 抗原检测限与 RIA 相当; 以比色法测定的 SPIA 抗原检测限则优于夹心 EIA^[4]。随后, Leuving 研究小组 (1983) 利用单克隆抗体建立匀相 SPIA 方法, 对血清和尿中 HCG 和黄体化激素 (luteinizing hormone, LH) 进行鉴别检测^[5-7]。20 世纪 80 年代后期, 随着美国 BD (Becton, Dickinson and Company) 公司、联合利华 (Unilever) 和 Carter Wallace 等公司对免疫层析检测方法主要技术环节的专利申请^[8-10], 免疫层析试纸快速检测技术得以全面建立。1995 年以来, 已获得授权的试纸相关专利至少 500 项, 涉及免疫层析试纸快速检测技术的各个方面, 包括样品处理和基质等。

早孕检测是人们长期关注的热点, 20 世纪 70 年代人们对 HCG 生物学特性和检测意义有了深入了解, 抗体制备技术也取得了巨大进展, 但全面建立试纸检测方法仍需其他技术的支撑, 包括硝酸纤维素膜制备、抗体生产、液体喷点和处理设备以及试纸研发和制备工艺等。20 世纪 80 年代后期, 早孕试纸产品研制成功并进入市场, 有力推动了免疫层析试纸快速检测技术的早期发展和应用。随着试纸相关技术的快速发展, 免疫层析试纸快速检测技术及其产业开始不断发展壮大, 其应用由临床诊断逐渐拓展到动物医学、农业、生物、食品、环境等领域。

20 世纪 90 年代以来, 张改平等系统开展了免疫层析试纸快速检测技术研究, 率先在国内建立了抗原、抗体、半抗原三大类免疫层析试纸快速检测技术平台^[1,2]。①抗原快速检测技术研究, 建立了动物病毒的高特异性、高亲和力配对单克隆抗体制备新方法, 解决了试纸研制中抗原变异大、抗体亲和力低、识别谱窄等技术难题, 形成了抗原免疫层析试纸快速检测技术体系, 研制出动物疫病抗原快速检测试纸系列产品。2003 年“畜禽疫病快速诊断试纸条”获国家发明专利, 其中“鸡传染性法氏囊病病毒快速检测试纸条”是国内外第一个动物疫病快速检测试纸产品, 2003 年获国家二类新兽药证书, 2004 年获国家技术发明二等奖^[2]。上述研究开辟了动物疫病快速诊断的新领域, 为动物疫病的快速检测提供了新的技术支撑。②半抗原快速检测技术研究, 建立了小分子化合物的人工抗原合成, 以及高特异性、高亲和力单克隆抗体制备与鉴定方法, 解决了小分子化合物免疫原性差、抗体亲和力低等技术难题, 形成了半抗原免疫层析试纸快速检测技术体系, 成功研制了小分子化合物快速检测试纸系列产品, 实现了药物残留的

简便、低成本快速检测,其中“生猪主要违禁药物残留免疫层析试纸快速检测技术”2008年获国家科技进步二等奖,为动物源性食品安全监控提供了技术保障^[1]。③抗体快速检测技术研究,建立了口蹄疫病毒、猪瘟病毒、鸡新城疫病毒、旋毛虫等多种病原的检测抗原制备方法,解决了免疫检测抗原活性低、非特异性反应高、提取制备难等技术难题,形成了抗体免疫层析试纸快速检测技术体系,研制出动物疫病及人畜共患病抗体快速检测试纸系列产品,实现了动物疫病抗体水平的实时监测,其中“猪旋毛虫抗体快速检测试纸条”2007年获国家二类新兽药证书,2008年获河南省科技进步一等奖^[2],为疫苗免疫效果评价和动物疫病监测提供了先进的技术手段。上述试纸检测时间仅需要数分钟,无须任何附加试剂和设备,人人均可操作,解决了传统检测方法费时(数小时至数天)、成本高(需贵重仪器或试剂)、操作复杂等问题,真正实现了长期以来人们在检测技术领域所追求的“快速、简便、特异、敏感”的目标,提高了我国在该领域的研发水平,促进了免疫检测技术的进步。

免疫层析试纸快速检测技术是一种非常适合实时和现场检测的成熟技术,具有通用的检测模式,设备和工艺完备,研发时间短,产品上市快,易于大规模批量生产。试纸具有高灵敏性、特异性和稳定性,灵敏度与ELISA(酶联免疫吸附试验)相当,且无须冷藏,保存期长,试纸操作步骤简单,结果判定形象直观,易于现场操作,可实现低成本和快速检测,并可与便携式电子设备、阅读和信息系统集成,因此免疫层析试纸快速检测技术面临良好的发展机遇。传统的免疫层析试纸快速检测技术同时检测多个靶标尚存在困难,整合便捷式电子设备和质量控制面临挑战,定量检测受到限制。上述限制因素在常规胶体颗粒、材料和标记等传统试纸生产工艺和目视检测应用过程中日益突出,近几年系列新型材料、试剂、检测方法、读卡系统和生产工艺的改进使得免疫层析试纸技术取得很大发展,在各个领域均得到广泛应用。

随着该技术的广泛应用,进一步提高试纸的灵敏度、特异性,实现多重检测、定量检测是未来免疫层析试纸快速检测技术的发展方向,利用生物素-亲和素系统或免疫金银染色等信号放大系统,以及量子点(quantum dots, QDs)或上转换荧光(upconverting phosphor)等新型标记技术,结合相应的便携式仪器设备,实现试纸的高灵敏度检测;在检测膜上喷点不同的检测试剂建立集成化试纸,在

同一膜上进行多靶标测定, 实现试纸的高通量检测; 研究开发便携式试纸检测设备或应用程序, 实现试纸的数字化检测。

参考文献

- [1] ZHANG G, GUO J, WANG X. Immunochromatographic lateral flow strip tests [M] //RASOOLY A, HEROLD K E. Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2009: 169-183.
- [2] 张改平, 郭军庆, 李青梅, 等. 动物疫病免疫层析试纸快速检测技术概述 [J]. 河南农业科学, 2009, 9: 176-178.
- [3] PLOTZ C M, SINGER J M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis [J]. American Journal of Medicine, 1956, 21 (6): 888-892.
- [4] LEUVERING J H, THAL P J, VAN DER WAART M, et al. Sol particle immunoassay (SPIA) [J]. Journal of Immunoassay, 1980, 1 (1): 77-91.
- [5] LEUVERING J H, GOVERDE B C, THAL P J, et al. A homogeneous sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin using monoclonal antibodies [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 60 (1-2): 9-23.
- [6] LEUVERING J H, THAL P J, WHITE D D, et al. A homogeneous sol particle immunoassay for total oestrogens in urine and serum samples [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 62 (2): 163-174.
- [7] LEUVERING J H, THAL P J, SCHUURS A H. Optimization of a sandwich sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 62 (2): 175-184.
- [8] CAMPBELL R L, WAGNER D B, O'CONNEL J P. Solid-phase assay with visual readout: US, 4,703,017 [P/OL]. 1987-10-27. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/search-bool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN/4703017>.
- [9] ROSENSTEIN R W, BLOOMSTER T G. Solid-phase assay employing capillary flow. US, 4,855,240 [P/OL]. 1989-08-08. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=4,855,240.PN.&OS=PN/4,855,240&RS=PN/4,855,240>.

- [10] MAY K, PRIOR M E, RICHARDS I. Capillary immunoassay and device therefore comprising mobilizable particulate labeled reagents. US, 5,622,871 [P/OL]. 1997-04-22. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO1&Sect2 = HITOFF&d = PALL&p = 1&u = %2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsrchnum. htm&r = 1&f = G&l = 50&s1 = 5, 622, 871. PN. &OS = PN/5,622,871&RS=PN/5,622,871](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=5,622,871.PN.&OS=PN/5,622,871&RS=PN/5,622,871).
- [11] 张改平, 职爱民, 邓瑞广, 等. 兽药残留的免疫学快速检测技术概述 [J]. 河南农业科学, 2009, 9: 193-196.

第二章

免疫层析试纸的基本结构与检测原理

第一节 免疫层析试纸的基本结构

试纸由样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫四个基本结构单元组成，从测试端至手柄端依次叠加于支撑底板上，如图 2.1 和图 2.2 所示^[1,2]。样品垫为经过处理的纤维棉或玻璃棉，用于快速吸收待检样品溶液，使其通过虹吸作用向结合垫侧向流动。结合垫为纤维棉或玻璃棉，吸附有标记的生物活性材料（如胶体金标记的抗体），它可与待检样品溶液中的检测靶标结合形成肉眼可见的免疫复合物。层析膜为纤维素膜或尼龙膜，其上固定有两条或多条不同生物活性材料（如抗原或抗体），形成“检测线”（test line，简称 T 线）和“质控线”（control line，简称 C 线）印迹，用于拦截带标记的免疫复合物，直观显示检测结果。吸水垫为吸水纸板，用于吸收流过层析膜的待检样品溶液，以维

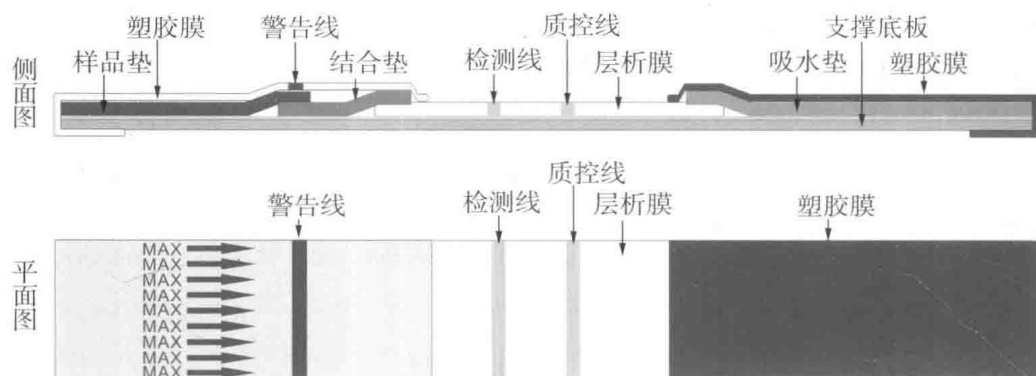


图 2.1 免疫层析试纸条的结构

持层析膜两端的压差，促使更多的待检样品溶液在层析膜上侧向流动。除了样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和支撑底板之外，试纸还包括一些辅助结构，如外层塑胶膜或塑料外壳等，以组装成不同类型的免疫层析试纸产品，如试纸条或试纸卡（图 2.3）等。

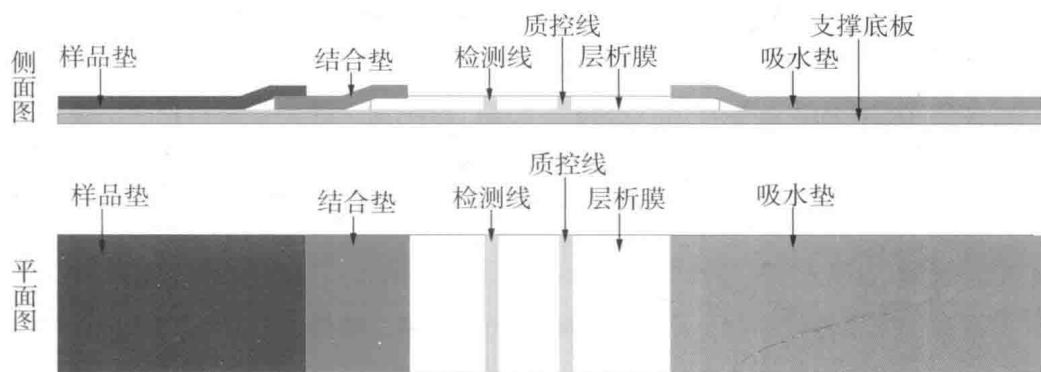


图 2.2 免疫层析试纸卡内芯的结构



图 2.3 免疫层析试纸条和试纸卡定型产品

第二节 免疫层析试纸的检测原理

试纸是基于膜免疫层析原理而建立的快速检测技术产品。试纸的特点是待检样品溶液在虹吸作用下由测试端向手柄端侧向流动,待检靶标在侧向流动过程中与结合垫和层析膜上的生物活性材料(抗体、抗原或生物大分子)先后发生特异性结合反应,并在层析膜上形成肉眼可见的检测线和质控线。该技术主要采用两种检测模式^[1,2]:一种为直接法(direct reaction),主要用于检测具有多抗原位点的生物大分子;另一种为竞争法(competitive reaction),主要用于检测半抗原,即不具备免疫原性的小分子化合物(如药物、毒素、糖类等)。

一、直接法

直接法检测模式为非竞争性的(non-competitive)免疫学结合反应,既可用于抗原的检测(如人类或动物蛋白质、病原微生物蛋白质以及其他生物标记物等),也可用于抗体的检测[如免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)、IgM、IgA等],已广泛应用于人类及动物疫病的早期诊断、生化分析、抗体水平监测等。

制备检测抗原的试纸时,通常将特异识别待检靶标的单克隆抗体1,简称“单抗1”(monoclonal antibody 1, mAb1),用胶体金或其他标记物进行标记,分散固定于结合垫上;在检测线固定特异性识别待检靶标不同抗原位点的“单抗2”(mAb2)或多克隆抗体[简称“多抗”(polyclonal antibody, pAb)],质控线固定抗种属特异性IgG的“抗抗体”(俗称二抗)。当使用这类试纸检测待检样品时(图2.4),结合垫中标记的mAb1首先与样品中的待检抗原结合形成抗原-金标抗体复合物并开始侧向流动。由于这类靶标抗原上存在多个抗体结合位点,抗原-金标抗体复合物被检测线上的拦截抗体(mAb2或多抗)特异拦截并聚集,最终在检测线上呈现标记抗体聚集显色。通常情况下,检测线最终是否显色与样品中是否含有待检靶标物一致,而未被检测线拦截的金标抗体mAb1及部分抗原-金标抗体复合物被质控线拦截并聚集显色。最终,阳性样品的检测结果为检测线和质控线同时显色,而阴性样品的检测结果只有质控线显色。