

Lateral Flow Immunoassay

侧流免疫分析

Raphael C.Wong, Harley Y.Tse
孙远明 雷红涛 徐振林/等译



科学出版社

本书出版得到NSFC-广东联合基金项目(U1301214)、
广东省自然科学基金团队项目(S2013030013338)资助

Lateral Flow Immunoassay

侧流免疫分析

Raphael C. Wong, Harley Y. Tse
孙远明 雷红涛 徐振林/等译

科学出版社

北京

图字：01-2017-1524 号

内 容 简 介

侧流免疫分析技术以其简单快速且结果准确率高而得到广泛的认可。本书详细论述了侧流免疫分析技术的发展演变，从检测流程所涉及的材料、设备等方面进行讨论，并介绍了检测平台的生产过程，还对一些常见问题进行了探讨。此外，本书还对侧流免疫分析技术的市场前景进行了介绍和预测。

本书适合化学、生物、医学及相关领域的研究者、从业人员及学生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

侧流免疫分析/ (美) 拉斐尔·王 (Raphael C. Wong), (美) 哈雷·谢 (Harley Y. Tse) 主编; 孙远明等译. —北京: 科学出版社, 2017.7

书名原文: Lateral Flow Immunoassay

ISBN 978-7-03-053726-3

I. ①侧… II. ①拉… ②哈… ③孙… III. ①横向流动—免疫测定—研究 IV. ①R446.61

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 137910 号

责任编辑: 郭勇斌 彭婧煜 / 责任校对: 邹慧卿

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 众轩企划

Translation from English language edition:

Lateral Flow Immunoassay

edited by Raphael Wong and Harley Tse

Copyright © Humana Press 2009

This Springer imprint is published by Springer Nature

The registered company is Springer Science+Business Media LLC

All Rights Reserved

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 7 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2017 年 7 月第一次印刷 印张: 12

字数: 225 000

定价: 78.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)



撰 稿 人

Michael C. Brown mbrown@sdix.com

Peter Chun, Ph.D. pechun2@yahoo.com

Michael Eberhard Michael.Eberhard@ese-gmbh.de

Konrad Faulstich Konrad.Faulstich@ese-gmbh.de

Roman Gruler Roman.Gruler@ese-gmbh.de

Klaus Haberstroh Klaus.Haberstroh@ese-gmbh.de

Kevin Jones Kevin.jones@whatman.com

Dirk Lentzsch Dirk.Lentzsch@ese-gmbh.de

Michael A. Mansfield, Ph.D Michael_mansfield@millipore.com

Brendan O'Farrell, Ph.D bofarrell@dcndx.com

Jennifer S. Ponti jponti@glprecision.com

Shara Rosen stratcom@total.net

Thomas C. Tisone, Ph.D tom.tisone@biodot.com

翻译人员名单

孙远明 雷红涛 徐振林

王战辉 孙秀兰 李向梅

肖治理 沈 兴

序 言

20 世纪 80 年代，侧流免疫分析技术一经问世，便以其构造简单而获得广泛认可。侧流免疫分析装置不仅小巧且便于携带，多数时候检测结果的获得无需额外试剂，液体样品直接加样便可实施完成检测，一般不需要仪器设备，便能快速获得结果且易于解读。这项技术也很强大，可以使用单个装置同时测试多种分析物，也很容易与其他技术结合，进行综合检测，如警察在路边检查中可以对毒品和酒精同时检测。侧流免疫检测产品的制造相对简单且成本低廉。检测技术的进步、材料组份的改进、更好的加工设备的适用性以及和生产质量的更多关注，都有助于提高该技术的可靠性、准确性和适用性。然而，对定量结果和更高灵敏度的持续追求，也给研发人员提出了巨大挑战。

在这本书中，我们介绍了这项技术当前状态的精髓，并解决了未来可以预期的问题。在介绍技术的演变之后，提供了一些市场信息。随后，讨论了检测所涉及的各种材料，生物和化学成分。在生产部分有一章专门讨论了生产设备及生产过程。后面的章节则重点介绍了技术开发人员经常遇到的问题。讨论了便携式读数仪的设计，假结果的产生原因及其消除方法，以及侧流免疫分析产品在开发和销售中的监管情况。我们希望本书能加深人们对侧流免疫分析技术的理解，有助于制造出更高质量的产品，进一步促进该项技术的进步。

Raphael C. Wong

美国加利福尼亚州尔湾

Harley Y. Tse

美国密歇根州底特律

目 录

序言

1 侧流免疫分析进展	1
1.1 引言：基于膜的即时免疫分析的历史	1
1.2 侧流免疫分析试纸条的构造原理	2
1.3 侧流免疫分析技术的实用性：优势和问题	4
1.4 开发和制造侧流免疫试纸条常用的材料与工艺	6
1.4.1 试纸条组分	7
1.4.2 加工方法	13
1.5 提高侧流免疫试纸条的效用和性能：新技术的开发趋势	13
1.5.1 基于核心检测技术的性能改进	14
1.5.2 设计的演变	16
1.5.3 侧流免疫分析的读数仪	18
1.5.4 新一代试纸条的新型标记物和读数系统	21
1.6 侧流即时检测产品的新应用	22
1.6.1 核酸的即时检测	22
1.6.2 蛋白质组学、治疗监测/治疗组学	23
1.6.3 传染病和慢性病	23
1.6.4 非人体的应用	24
1.7 结论	24
参考文献	25
2 侧流免疫分析市场趋势	27
2.1 引言	27
2.2 市场规模与趋势	28
2.2.1 侧流细分市场	28
2.2.2 市场布局	29
2.2.3 兽医学中的侧流检测	30
2.2.4 食品和饮料行业的侧流检测	31
2.2.5 制药工业的侧流检测	32
2.2.6 用于环境整治和水体检测的侧流检测	32
2.2.7 临床诊断中的侧流检测	33
2.3 未来前景	38

参考文献	39
3 侧流免疫层析试纸条组装的材料平台	40
3.1 引言	40
3.2 试纸条中材料的选择和安装	40
3.2.1 基板	40
3.2.2 背衬形式	41
3.2.3 诊断级黏合剂	42
3.2.4 衬垫	42
3.2.5 部件装配与合同制造	43
3.2.6 封面胶带	44
3.2.7 组装和层压	44
3.3 结论	45
4 抗体：强健侧流免疫分析的关键	46
4.1 引言	46
4.2 抗体的商业来源	47
4.3 抗体的筛选	48
4.4 动物物种的选择	50
4.5 抗体的纯化	52
4.5.1 抗体的亲和纯化	52
4.5.2 抗体的交叉吸收	53
4.6 可用来预测的方法	54
4.7 质量控制	55
4.8 结论	56
参考文献	57
5 胶体金和其他侧流免疫分析标记物	60
5.1 引言	60
5.2 脂质体	61
5.3 胶体碳	61
5.4 胶体金	62
5.4.1 胶体金的制备	63
5.4.2 胶体金结合物的制备	64
5.4.3 银增强胶体金	66
5.5 荧光探针	66
5.6 量子点	67
5.7 上转换磷光颗粒	68
5.8 生物发光标记	69
5.8.1 发光氧通道免疫分析法	70

5.8.2 发光测定方法的优点和局限性	70
5.9 酶标记	70
5.10 顺磁性颗粒	71
5.11 乳胶颗粒	72
参考文献	72
6 从技术角度论述用于侧流免疫分析的硝酸纤维素膜	76
6.1 引言	76
6.2 发展历史	76
6.3 膜的制备	77
6.3.1 原材料	77
6.3.2 膜铸造	78
6.4 膜测试	78
6.4.1 抽样方案	78
6.4.2 毛细流动时间	79
6.4.3 膜厚度	79
6.4.4 视觉质量	80
6.5 膜性能	80
6.5.1 蛋白结合	80
6.5.2 封闭	81
6.5.3 膜处理	81
6.5.4 膜存储	82
6.6 流动特性	82
6.6.1 多孔垫	82
6.6.2 膜流动	84
6.6.3 条带宽度	87
6.6.4 塑料壳设计	88
6.6.5 粒子流动	89
6.7 最终评论	89
6.8 总结	90
参考文献	90
7 FUSION 5: 侧流免疫分析检测的新平台	92
7.1 引言	92
7.2 FUSION 5 与传统侧流分析试纸的比较	92
7.2.1 材料的兼容性问题	93
7.2.2 接触问题	93
7.2.3 不良的材料特性	94
7.3 FUSION 5 在侧流免疫分析系统中的性能	95
7.3.1 作为血液分离器的 FUSION 5	95

7.3.2	作为结合物释放垫的 FUSION 5	96
7.3.3	作为反应膜的 FUSION 5	98
7.3.4	何时使用不同类型的应用技术	100
7.4	FUSION 5 故障排除	100
7.5	侧流免疫分析中 FUSION 5 的成本比较	101
7.5.1	生产传统的试纸条	101
7.5.2	生产 FUSION 5 试纸条	102
7.6	结论	103
	附录: 使用 FUSION 5 检测全血 hCG 的步骤	103
8	制造新一代高灵敏度和可重现的侧流免疫分析技术	104
8.1	引言	104
8.2	传统的侧流免疫试纸条制造工序	106
8.2.1	侧流免疫试纸条的基本生产过程	106
8.3	侧流免疫分析的高通量制造工艺	113
8.3.1	叠层装配	113
8.3.2	最终设备组装	120
8.3.3	结论	121
8.4	下一代侧流免疫分析生产工具的要求	122
8.4.1	材料和新产品设计	122
8.4.2	新的生产工艺	123
8.5	结论	125
	参考文献	125
9	用于侧流免疫分析的手持式和便携式读数仪	127
9.1	引言	127
9.2	总论	128
9.2.1	顾客的呼声	128
9.2.2	读数仪	128
9.3	读数仪设备系统	130
9.3.1	基于 CCD 的成像系统	130
9.3.2	扫描系统	131
9.3.3	其他系统	131
9.4	影响定量结果准确的因素	135
9.4.1	定位误差	135
9.4.2	离轴与共焦测定	136
9.4.3	样品的准确、充足和均匀光照	136
9.4.4	数值孔径、视野和灵敏度	137
9.4.5	校准曲线、分析物浓度和动态范围	137
9.4.6	其他因素	137

9.5 基于胶体金和荧光标记的便携式侧流免疫扫描读数仪	138
9.5.1 设计原理	138
9.5.2 ESE-Quant 读数仪	139
9.6 基于胶体金和荧光标记物的用于侧流免疫检测的手持式 扫描读数仪	142
9.6.1 读数设备的特性	143
9.6.2 荧光显微镜	147
9.7 用于磁性粒子检测的读数仪	148
9.8 总述	148
参考文献	148
10 现场药物筛选示范侧流免疫分析中定量、假阳性和假阴性问题	150
10.1 引言	150
10.2 药物筛选的背景信息	151
10.3 侧流免疫分析结果的统计分析	151
10.4 侧流免疫分析技术研发人员对临界值的阐释	152
10.5 影响侧流免疫设备测试结果的因素	154
10.5.1 制造问题	154
10.5.2 操作人员的失误	156
10.5.3 食物、补充剂和饮料的影响	158
10.5.4 环境因素	159
10.5.5 伪造样品	159
10.5.6 交叉反应	160
10.6 结论	163
参考文献	164
11 侧流免疫分析的市场营销和发展中的监管问题	166
11.1 引言	166
11.2 专利注意事项	166
11.3 行业特定监管要求	168
11.4 设计控制	169
11.5 商标	169
11.6 美国的产品许可	170
11.7 临床实验室改进修订豁免类别和非处方产品	171
11.8 CE 标志	172
11.9 国际标准化组织认证	173
11.10 FDA 设施检查	174
11.11 其他国家的要求	174
11.12 结论	175
参考文献	175

1 侧流免疫分析进展

Brendan O'Farrell

1.1 引言：基于膜的即时免疫分析的历史

快速免疫层析试纸条，即侧流免疫分析（LFIA）的起源可以追溯到 20 世纪 50 年代，它是多种分析方法交汇融合的产物。然而，基于体液快速诊断检测的概念可以回溯到更远的时间，以唾液和尿液为基础进行诊断的文献证据数千年前就已经存在了。中国古代是最早记载使用唾液诊断的，唾液测试被广泛用于快速判断是否患病。在“大米实验”中，有充分的理由说明产生的唾液不足以咽下一把大米的人患有疾病。这种诊断方法能够快速获得诊断结果，但通常具有不良预后。最早使用尿液进行妊娠诊断的书面记载可以在古埃及文献中找到，里面记载了一个试验，孕妇可以在几天内向小麦和大麦种子上排尿验证怀孕状况，结果如下：“如果大麦生长，意味着怀的是男孩；如果小麦生长，意味着怀的是女孩；如果两者都不生长，则说明没有受孕^[1]。”人们对将尿液作为各种疾病的快速诊断材料的兴趣一直持续到了中世纪，在欧洲出现了所谓的“尿液先知”，他们声称能够通过尿液颜色辨别各种疾病。伴随着许多医学观念的不断出现，成果也变得有所不同。尽管人们在不同时代都付出了巨大的努力，但直到 20 世纪中叶，大多数快速诊断技术才具备了真正的检测价值。

侧流免疫分析的技术基础来自 Plotz 和 Singer 于 1956 年开发的胶乳凝集法^[2]。在同一时期，以平板为载体的免疫技术也逐步发展起来。20 世纪 50 年代，Berson 和 Yalow 最先发明了放射免疫分析技术（radio-immunoassay, RIA）^[3]。相比于放射免疫分析技术，20 世纪 60 年代引进的酶免疫分析（enzyme immunoassay, EIA）技术体现出明显优势，包括用酶替代放射性同位素，更快的反应时间，更高的特异性，比 RIA 更长的保质期等。20 世纪 80 年代初期，侧流免疫分析技术的基本原理得以持续完善，并在 80 年代的后几年由 Becton Dickinson, Unilever 以及 Carter Wallace 等几家公司提交了该技术的几项主要专利，最终确立了理论基础^[4-6]。从那时起，围绕该项技术申请的专利至少达到了 500 项。

人类妊娠测试是驱动固相快速检测技术早期发展的主要应用，具有将尿液检

测用于医学诊断目的的历史意义。抗体制备技术的改进以及对人绒毛膜促性腺激素(hCG)生物学意义和检测方法的掌握使得这种特殊的测试应用在 20 世纪 70 年代取得了长足发展,这主要归功于 Vaitukaitis 和他的合作者的工作^[7]。然而,要全面发展侧流检测技术平台还需要其他各类技术的支持,包括硝酸纤维素膜的制造、抗体制备、流体点胶技术和加工设备等,以及开发和制造方法学知识库的发展。所有这些要素都需要将化学药品、生物制品、纸张、聚合物、操作人员和工艺流程等一系列复杂的因素转变为简单易用的检测方法,这样在各种关键应用中都能够得到充分地执行以提供预测结果。很多这样的技术在 20 世纪 90 年代初期逐步发展起来,到目前已十分成熟并实现了商业化生产。得益于所有相关领域的早期工作,第一批侧流产品在 20 世纪 80 年代末被引入市场,此后,侧流免疫分析在技术、应用和产业化等各方面都得以持续的发展。截至 2006 年,全球有超过 200 家公司在生产各类试纸条,其主要细分市场的总产值约达 21 亿美元(数据由 Stratcom 提供)。目前该技术的应用已经远远超出临床诊断的范围,涵盖的领域包括兽医、农业、生物、食品、环境健康与安全、工业监测,以及更新的领域如分子诊断与治疗。

本章的目的是向读者介绍侧流免疫分析技术的关键要素,描述侧流免疫分析的工艺流程,并了解为什么它能如此广泛地应用于如此多的市场领域中。本章还将讨论当前技术的局限性,以及这项技术在未来如何发展以满足日趋严苛的市场需求。

1.2 侧流免疫分析试纸条的构造原理

图 1.1 展示了侧流免疫分析试纸条的典型结构。传统设计的试纸条由多种材料组成,每种材料都起到一种或多种作用,各部分相互重叠,并通过压敏黏合剂组装到底板上。试纸条可划分为几个区域,每个区域通常由不同材料构成,这里作简要说明:检测时,将处理好的样品滴加到试纸条的样品垫上,在样品垫的层析作用下,样品迁移到固定有偶联颗粒的结合垫上。这个颗粒通常是胶体金,还可以是彩色、荧光或顺磁性的单分散乳胶颗粒(见第 5 章)。在分析方法中该颗粒已经与特异性生物成分偶联,根据检测形式,可以是抗原或抗体(见第 4 章)。样品液将结合垫上的偶联颗粒溶解,同时样品液中的待测物与偶联颗粒相互作用,两者一起迁移至试纸条作为反应基底的下一部分。该反应基底为多孔膜,固定有其他特异性生物成分,通常是抗体或抗原这一类的蛋白质。其已成条带分布在膜的特定区域上,用来捕获流经的待测物和结合物,过量的试剂流过捕获线后被棉芯或者吸水垫截留。结果可以通过肉眼观察或仪器读取反应基底上是否存在捕获结合物条带而获得。检测形式可以是直接的(夹心法,如图 1.2a)或竞争性的(抑制法,如图 1.2b),应该能够适应定性,半定量和在有限的情况下的全量化检测。直接检测法通常用于

检测具有多个抗原位点的较大分析物，如人绒毛膜促性腺激素（hCG）、登革热（Dengue）病毒抗原或艾滋病病毒（HIV），在这种情况下，测试线存在信号意味着结果呈阳性。直接法要求样品中的待测物不能过量，这样就会有更多的结合物不被测试线截留，而继续流向固定有抗体的第二道条带，即质控线。质控线通常包被有种属特异性的抗免疫球蛋白抗体，可特异性识别结合物上的抗体。竞争法一般用于检测具有单一抗原决定簇而不能同时结合两个抗体的小分子物质。在此种情况下，如果不出现测试线，则表明结果是阴性的，但无论测试结果如何，质控线都会出现。

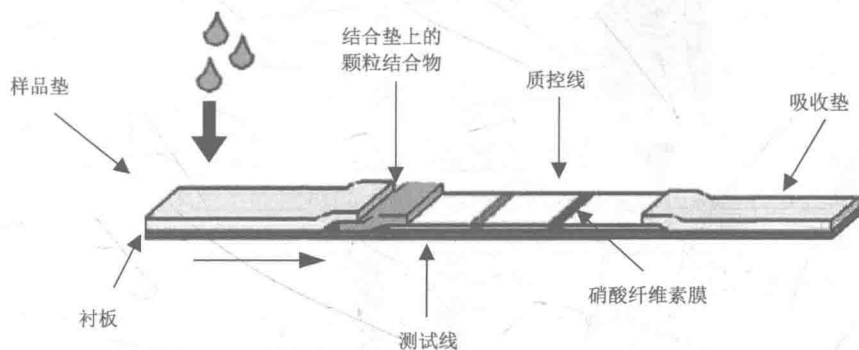
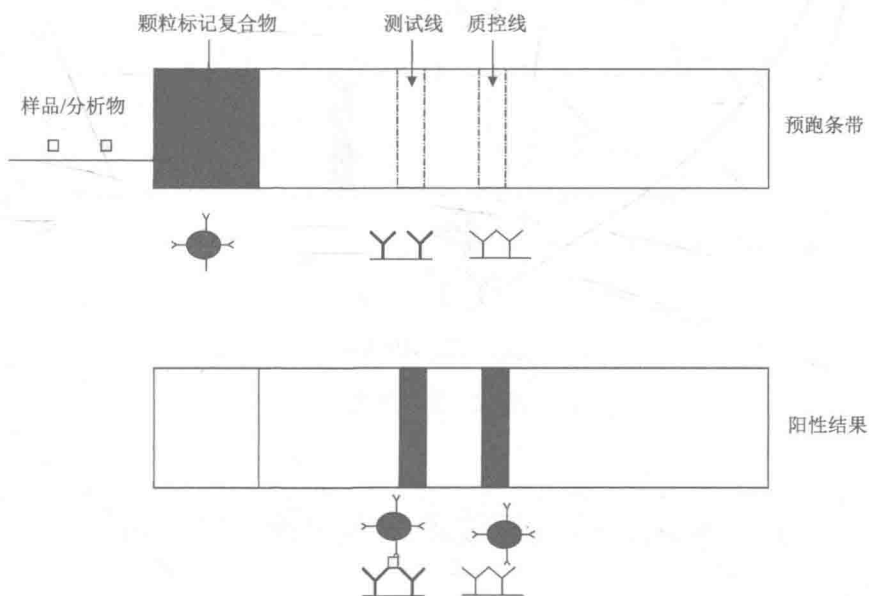


图 1.1 侧流免疫分析试纸条的典型结构



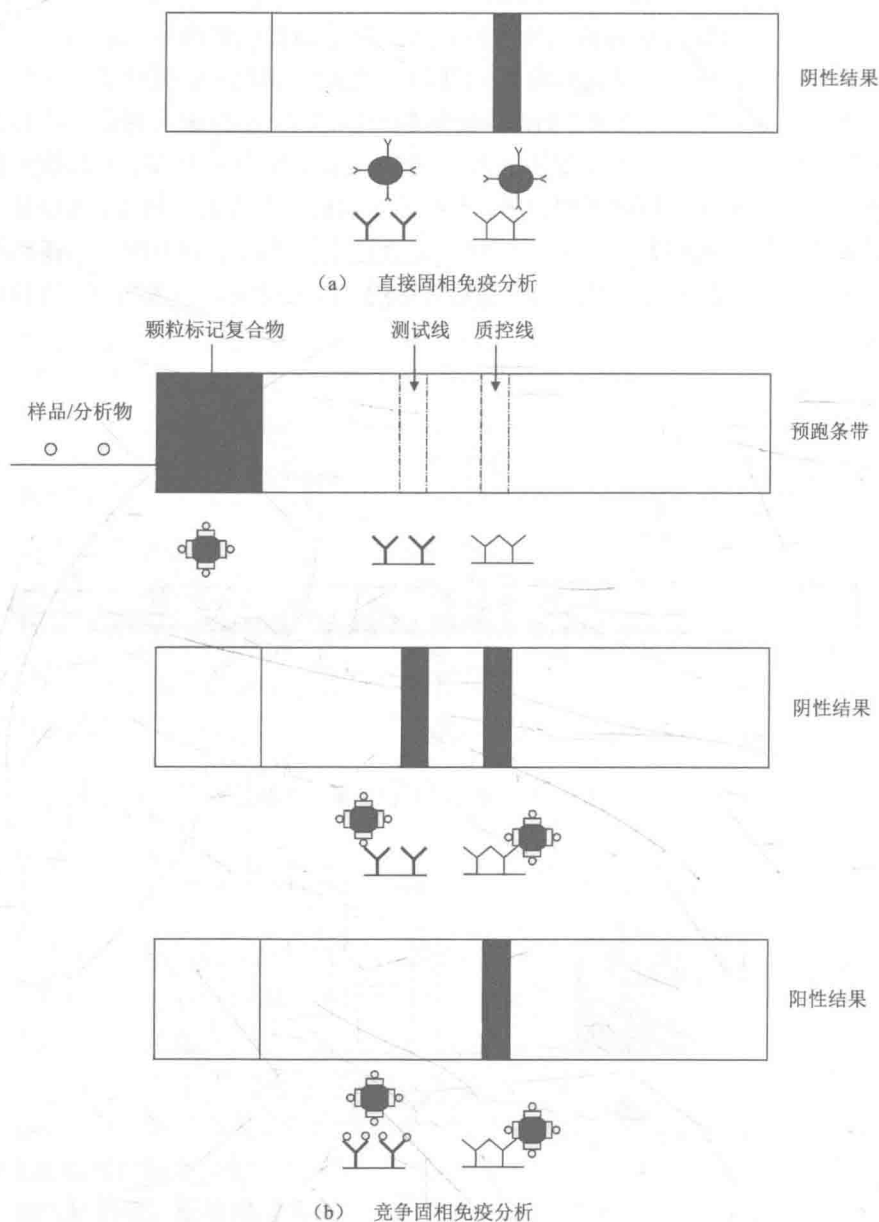


图 1.2 固相免疫分析

1.3 侧流免疫分析技术的实用性：优势和问题

侧流免疫分析是一种能够广泛应用于各种即时或现场检测的行之有效的技

术, 其优点也已经广为人知:

- 技术较为成熟
- 相对容易加工生产—已经开发了可用的设备和工艺
- 易于扩大生产
- 稳定性好, 保质期为 12~24 个月, 通常无需冷藏
- 使用简便: 检测步骤和结果分析对操作人员的依赖性低
- 只需少量体积便可以处理多种样品
- 可与机载电子、读数仪系统和信息系统集成
- 具有较高灵敏度、特异性和良好的稳定性
- 成本较低, 研发和审批周期较短
- 市场表现和接受程度: 使用者和监管人员专业要求低

这些优点中的关键是即时检测的性质和非常广泛的应用范围, 其可以很快地投入市场并且投资相对较小。这些优势是目前正在发展的其他假定的即时检测技术, 包括传感或阵列技术所不能比拟的。虽然微流控芯片、生物传感器和多元阵列技术仍然在不断发展, 但这些技术需要较长的研发周期、谨慎的市场选择、较大的技术与基础设施投入以及市场培训, 才能在诊断市场中占得一席之地。然而, 传统设计的侧流免疫分析技术也存在性能局限性, 最显著的问题是灵敏度和重现性。一些问题列举如下:

- 专利信息不明确 (见第 11 章)
- 样品量极小, 要求低于微升水平。
- 多联检测: 难以同时分析多重标记物
- 与机载电子以及内置质量控制 (QC) 功能集成所带来的挑战
- 在某些系统中存在灵敏度问题
- 测试批间的重现性具有挑战性, 限制了定量系统中的应用

继续沿用传统的制造工艺、材料、标记物和视觉读数系统使这些限制造成的问题更加严重。近年来, 市场压力推动了一系列新原料、试剂、检测方法、读数仪系统和制造加工技术的发展, 它们的共同作用显著扩展了侧流免疫试纸条性能改善的空间^[5], 这些将会在本章随后讨论。

尽管受潜在的或实际的性能问题所限制, 侧流免疫分析产品已深入各个市场领域, 图 1.3 列出了已经产业化或仍处于开发阶段的细分市场。虽然目前的制造工艺能够满足某些细分市场的要求, 但依然存在新的挑战。随着应用范围的扩大, 对技术方面提出了更高的要求, 需要进一步提高灵敏度、重现性和可制造性。现阶段人们正在研发与实验室信息系统 (LIS) 连接使用的定量和客观读数/记录技术。对于下一代即时检测技术, 应具备以下一些特征:

- 快速和便于使用

- 使用小体积的样品，可无污染地转移检测
- 制造和使用的成本效益高
- 可大批量生产
- 结果清晰且易于分析，灵敏度高且变异系数（CV）低
- 能够定量
- 可以通过内置连接与客观读数/记录技术集成
- 能够多联检测
- 检测技术必须体现利益和满足测试需求

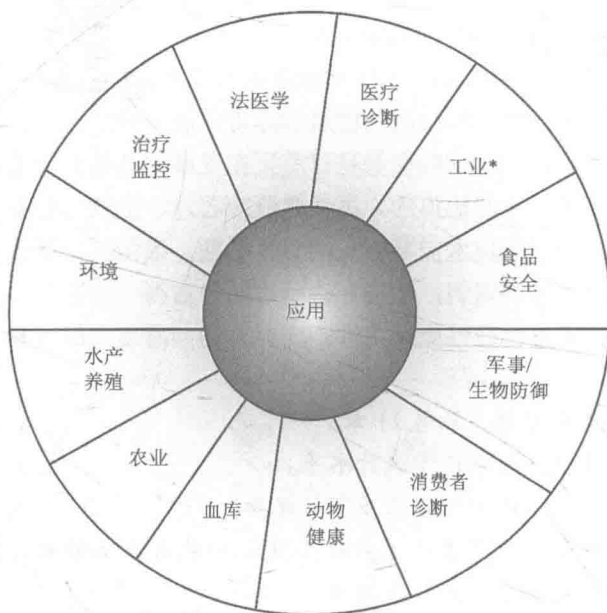


图 1.3 LFIA 和其他即时或现场检测技术的细分市场

* 包括质量控制、产品识别、环境监测和安全等应用

为了满足这些需求，在材料、检测技术、读取技术和制造工艺上进行改进愈加迫切，同时，对多学科交叉方法的需求也愈加强烈。在之后试纸条的组件及其制造方法这一章节中，将会讨论影响侧流免疫分析技术高度重现性的一些重要因素。

1.4 开发和制造侧流免疫试纸条常用的材料与工艺

这一小节主要介绍侧流免疫试纸条中的常见组分及各个组分所用的标准材料，同时还讨论了这些组分的加工方法，以及对于典型的侧流分析，材料是如何驱动制造和研发过程发展的。