


胶体金免疫层析技术

刘 丽◎主编

JIAOTIJIN
MIANYI CENGXI JISHU

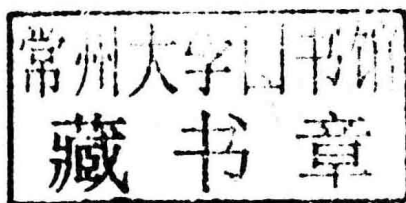
中原出版传媒集团
大地传媒

 河南科学技术出版社

河南省科学院学术著作出版资助

胶体金免疫层析技术

刘 丽 主编



河南科学技术出版社

· 郑州 ·

内容提要

《胶体金免疫层析技术》是介绍快速检测技术中的胶体金免疫层析技术的专业书籍。本书从胶体金在快速检测技术中的重要性、胶体金免疫层析技术中的抗原抗体原材料、胶体金免疫标记技术、胶体金免疫层析试纸条技术、胶体金免疫层析技术中几个关键问题的探讨、与胶体金免疫层析技术相近的即时检验技术、胶体金免疫层析技术的研发趋势和胶体金免疫层析技术的市场应用等几个方面对胶体金免疫层析技术进行了全面叙述。

本书对于临床医学、农业、环境、兽医学等领域的检验检测技术人员和想要从事快速检测产品开发的创业者都具有一定的理论和实践借鉴意义。

图书在版编目 (CIP) 数据

胶体金免疫层析技术/刘丽主编. —郑州: 河南科学技术出版社, 2017. 9
ISBN 978-7-5349-8899-8

I. ①胶… II. ①刘… III. ①胶体金-免疫测定 IV. ①R981 ②R446. 62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 203789 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) 65788001 65788613

网址: www.hnstp.cn

策划编辑: 杨秀芳

责任编辑: 田 伟

责任校对: 丁秀荣

封面设计: 张 伟

版式设计: 栾亚平

责任印制: 张艳芳

印 刷: 河南新华印刷集团有限公司

经 销: 全国新华书店

幅面尺寸: 185 mm×260 mm 印张: 13.25 字数: 305 千字

版 次: 2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月第 1 次印刷

定 价: 65.00 元

如发现印、装质量问题, 影响阅读, 请与出版社联系并调换。

《胶体金免疫层析技术》编写人员

主 编 刘 丽

副 主 编 王继雯 张娟丽 顾 玥

编写人员 (按姓氏笔画为序)

王利丹 王继雯 王雪妍 冯 菲

宁 萌 刘 丽 刘莹莹 孙玉飞

安明理 何蔚荭 张娟丽 李珊珊

杨文玲 陈晓飞 顾 玥 解复红

前 言

《胶体金免疫层析技术》是一本融基础理论、技术开发和市场应用为一体的，对胶体金免疫层析技术进行全面叙述的实用书籍。胶体金免疫层析技术作为一种即时检验技术，是检测领域中的重要组成部分，不仅方法简单、灵敏度高、结果报告及时，而且一般不需仪器设备或者只需一个小型读数仪即可完成样品检测，优点突出。在现代检验模式逐渐趋向小型仪器快速化和大型仪器自动化的两极发展过程中，该技术必将得到更广泛的应用和发展，在临床医学、农业、环境、兽医学等领域的具体应用中也将开创更加广阔的前景，创造更好的经济效益和社会效益。

本书编者基本都是多年来从事体外快速诊断试剂特别是胶体金免疫层析技术产品研发和生产的技术人员，在多年研发生产实践中，他们深感全面深入地了解某一技术对研发生产新产品和改进既有产品的重要性。虽然胶体金免疫层析技术作为一种较成熟的检测手段，在临床医学等许多领域已经发展应用了几十年，但目前已经出版的相关书籍绝大部分只涉及胶体金免疫层析技术中的某一方面，而全面系统叙述胶体金免疫层析技术的书籍几乎没有，于是编者遂萌生编写此书的想法。本书的文献资料以 Tom Bacon 等收集整理已翻译或者未翻译的《胶体金文献翻译活动论文集（第一辑）》《胶体金文献翻译活动论文集（第二辑）》和《胶体金免疫层析诊断试纸技术文献电子书（第三版）》为重要参考文献，另外还有与该技术相关、其他来源的中文和英文参考资料，再加上编者多年在生产研发及市场应用中的实践经验，对胶体金免疫层析技术这一实用检测方法进行了全面系统的整理。

由于编者收集整理的资料有限以及编写水平和狭隘视角等原因，若有错误疏漏之处还恳请读者提出宝贵意见，以便共同进步。如果本书能起到抛砖引玉作用，给读者工作生活带来些许实用便利，编者即不胜欣喜了。希望本书的出版不仅能够促进河南省胶体金免疫层析技术等快速检测技术的发展，而且也能为本行业的发展增砖添瓦。

本书在编写过程中，得到河南省科学院生物研究所各位领导和同事们的大力支持和帮助，以及许多其他同行们的无私支持和帮助。特别是得到河南省科学院学术著作出版费的资助，使得本书能够更加顺利地出版发行。在此编者表示诚挚的感谢！

最后，愿胶体金免疫层析技术的基础理论研究和实际应用更上一层楼！

刘丽

2017年于郑州

目 录

第一章	胶体金在快速检测技术中的重要性	(1)
第一节	使用胶体金标记的原因	(1)
第二节	胶体金的制造	(2)
第三节	胶体金颗粒大小的选择	(4)
第四节	胶体金交联物的制造和稳定	(5)
第五节	胶体金的大规模制造	(6)
第六节	胶体金的定量检测	(6)
第七节	胶体金标记信号的银增强作用	(11)
第二章	胶体金免疫层析技术中的原材料——抗原和抗体	(13)
第一节	抗原	(13)
第二节	抗原的分类	(21)
第三节	人工抗原的制备	(24)
第四节	抗体	(30)
第五节	抗体的分类	(35)
第六节	单克隆抗体的制备	(39)
第三章	胶体金免疫标记技术	(59)
第一节	蛋白质的标记	(59)
第二节	连接机制	(59)
第三节	标记方法的调试	(60)
第四节	胶体金标记原料及其质量影响因素	(60)
第四章	胶体金免疫层析试纸条技术	(63)
第一节	胶体金免疫层析试纸条组成及特点	(63)
第二节	胶体金免疫层析试纸条的原理及结果分析	(65)
第三节	胶体金免疫层析试纸条技术	(69)
第四节	胶体金免疫层析试纸条生产工艺	(89)
第五节	胶体金免疫层析试纸条应用实例	(91)
第五章	胶体金免疫层析技术中几个关键问题的探讨	(93)
第一节	高质量胶体金溶液的生产	(93)

第二节	亲水性黏合剂对样品流速的影响	(99)
第三节	胶体金免疫层析试纸条中假阳性、假阴性产生原因和处理 方法探讨	(108)
第四节	免疫层析检测技术中硝酸纤维素膜的几种限制条件	(117)
第五节	硝酸纤维素膜吸附蛋白的常见问题处理	(122)
第六节	产品稳定性及湿气处理	(138)
第六章	与胶体金免疫层析技术相近的即时检验技术	(149)
第一节	即时检验技术	(149)
第二节	与胶体金免疫层析技术相近的即时检验技术	(160)
第七章	胶体金免疫层析技术的研发趋势	(171)
第一节	现有胶体金免疫层析技术的提高	(171)
第二节	新型免疫层析技术	(174)
第八章	胶体金免疫层析技术的市场应用	(183)
第一节	胶体金免疫层析技术在临床医学中的应用	(183)
第二节	胶体金免疫层析技术在农业中的应用	(188)
第三节	胶体金免疫层析技术在环境中的应用	(194)
第四节	胶体金免疫层析技术在兽医学中的应用	(195)
参考文献	(197)

第一章 胶体金在快速检测技术中的重要性

胶体金免疫层析技术是一种国内外广泛使用的快速检测技术，在检测技术向着大型仪器自动化和小型仪器快速化的发展趋势下，未来胶体金免疫层析技术会得到更加广泛的应用。想要对该技术进行全面深入了解，首先要对胶体金这一指示剂在快速检测技术中的重要性有一全面了解。本章内容即是针对胶体金在快速检测技术中的重要性展开叙述的，即从使用胶体金标记的原因、胶体金的制造、胶体金颗粒大小的选择、胶体金交联物的制造和稳定、胶体金的大规模制造、胶体金的定量检测、胶体金标记信号的银增强作用几个方面对胶体金在快速检测技术中的重要性进行论述。

第一节 使用胶体金标记的原因

过去和现在的快速检测技术一直使用的是有色胶体（也称胶乳）作为可视信号，因为胶乳在结合成分中易于凝集，所以胶乳法是凝集反应的主要标记方法。对于快速检测技术而言，交联物的稳定性是避免假阳性的关键，而易于凝集可能是产生假阳性的主要原因。使用胶体金作为标记物则可在很大程度上避免这种情况的发生。

由于金具有更好的潜在稳定性，20世纪80年代，金标记被引入膜的快速检测中。在合适生产条件下，任何精确大小的金颗粒都可被重现制造，不同大小金颗粒可用于不同用途。其优良的稳定性、敏感性、精确性及可重复生产性等特点使得金适合于在快速检测技术中应用。金元素属惰性元素，被适当加工可形成完整的球形颗粒，当正确连接时，蛋白质能牢固地结合在金颗粒表面，无论液态或固态都能保持长久稳定性，且在生产过程中如果蛋白被精确固定，其与金形成的交联物的非特异性结合率可被减至零。表1-1列出了金、银、胶乳等不同的标记指示物与抗原抗体形成的交联物在快速检测技术中的优缺点比较。

表 1-1 快速检测中常用标记物的特征比较

特征	金	银	碳	胶乳	染料	酶
重复性	***	*	***	***	***	***
放大性	***	*	**	**	**	***
一步	***	***	**	**	**	

续表

特征	金	银	碳	胶乳	染料	酶
敏感性	*	—	*	***	***	**
多重分析检测	***	***	*	*	*	**
稳定性	***	***	**	*	*	*
结果清晰	***	***	***	***	***	—
易于制备	***	***	**	**	**	**
使用简单	***	***	*	**	*	*
适应性	**	**	**	**	**	***
低成本	***	***	***	***	***	**

注：*应用受限；**适于部分检测；***效果显著，适于大部分检测。

第二节 胶体金的制造

一、胶体金的制造原理

通常胶体金生产方法都是使用还原剂提供电子给溶液中带正电荷的金离子而产生金原子。金离子还原形成金颗粒的反应如下：

氯金酸+还原剂=胶体金



胶体金还原使用的还原剂通常包括柠檬酸三钠、黄磷、硼氢化钠、硫氰酸钠。尽管所有的生产方法都是依赖于还原 HAuCl_4 来形成金原子，但其物理条件有相当大的差异，如反应物的添加次序、还原剂使用的多少以及最终生产出的胶体金质量（大小、形状、变异系数等）。如图 1-1 所示为不同离子水平胶体金的还原过程。

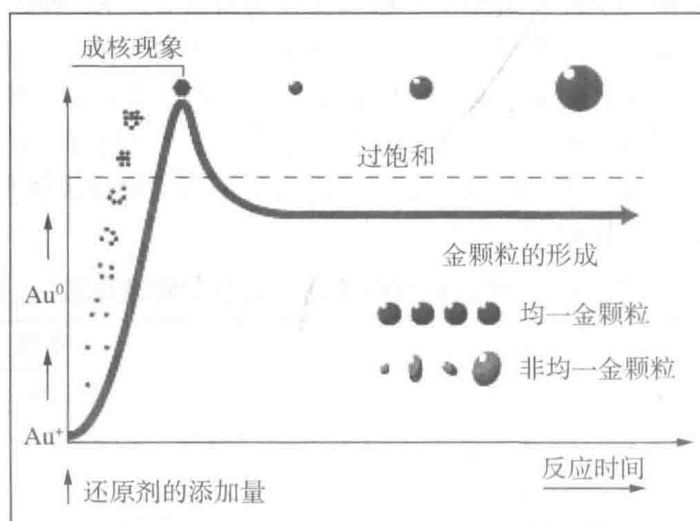


图 1-1 金离子还原成为金原子

每个胶体金颗粒周围都包绕着来自溶液的残留阴离子负电荷层的金颗粒悬液（图 1-2），这种被称作 zeta 电位的电子层使得金颗粒之间相互排斥并在悬液中任意分布。

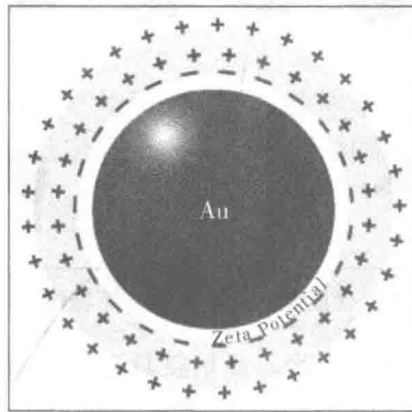


图 1-2 被双电子层包绕的胶体金颗粒

二、制造胶体金的注意事项

为了制造出适合商业用途的合格胶体金，应注意以下几方面：

（一）使用透射电子显微镜（TEM）评价胶体金超细微结构

胶体金及交联物的生产制造看似简易，若掉以轻心则可导致生产出劣质、性能差及重现性极差的产品。如果这种产品应用于快速检测中可导致产品低稳定性、低敏感性 & 特异性差。为防止这种情况出现，可使用 TEM 来评价胶体金的超细微结构。这种检测能使生产者得到球状胶体金颗粒、不规则胶体金颗粒及其直径变化，从而根据需要的标准选择适合的金颗粒直径。

（二）使用 TEM 控制好还原过程中核化作用及形成速度

如果还原过程中核化作用及形成速度没有得到很好控制，粒子的形成就会不均一。如图 1-3 所示，胶体金颗粒具有不同大小及形状（椭球形、四面体、长方体、多面体等）。这样的粒子在与蛋白结合过程中将无法被均匀结合，也不能在溶液中均匀分布，最终将影响产品的颜色、敏感性、特异性及稳定性。出现仅仅 5% 形状不均一的粒子就会影响测试结果，使其完全不具重现性。与代表着制作精良的直径 40nm 单分散性胶体金粒子的樱桃红色相比，由“劣质胶体金”所形成的信号常可见到淡蓝色或紫色。虽然在检测系统中白色背景膜上较暗的颜色更容易辨别，但较暗的颜色暗示着潜在的不稳定性，而这种不稳定性更容易造成错误结果的出现。更严重的是，粒子形状及尺寸的不均一会导致蛋白结合的不均一，这样会导致交联物长时间积聚与凝集，储存于溶液中的交联物可能几天甚至几个小时内就会出现这种变化。即使立即将交联物干燥固化于固相基质上也无法完全防止这个问题的发生。因为在干燥过程中，粒子在形状未稳定时结合的表面蛋白很容易分离，从而造成假阳性及高背景。

（三）使胶体金交联物从玻璃纤维结合垫上以适当速度完整释放

快速检测操作过程中一个最常见的问题就是胶体金交联物不能以适当速度及完整形式从玻璃纤维结合垫上释放，这个问题常常是由没有制备完好的胶体金颗粒直接暴露在玻璃纤维材料上而造成的。造成的结果是表面蛋白或者永久附着在纤维基质上或

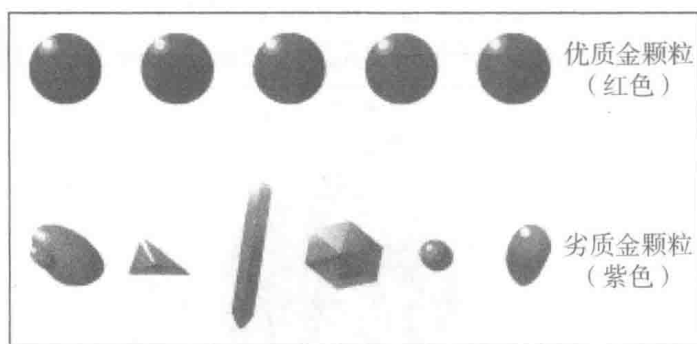


图 1-3 优质胶体金与劣质 (不稳定) 胶体金

者离开胶体金颗粒而自由飘浮。实验一开始就具有均一结合的单分散性球形粒子再加上制备完好的胶体金交联物，可大大减少这种问题的发生。

(四) 目测胶体金溶液的颜色

尽管 TEM 检测是决定胶体质量的唯一正确方法，但要鉴定胶体或交联物是否含有融合、凝集或者不均一粒子，抑或含有不同大小粒子，比较快速的方法是目测胶体金溶液的颜色。优质（检测应用中最常使用的粒子大小为直径 40nm）的胶体应该显示樱桃红色。如果胶体或交联物出现紫色，很可能说明所制胶体金质量低劣且不稳定。

第三节 胶体金颗粒大小的选择

检测信号是金颗粒聚集于检测线或控制线而出现的信号。只有直径达到 20nm 的粒子才会出现可见信号。随着粒子大小的增加，位阻现象又成了一个问題（图 1-4）。

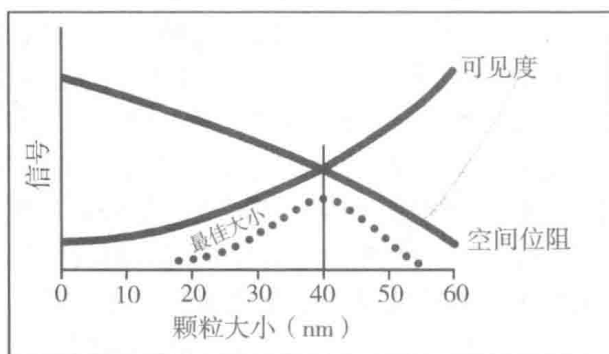


图 1-4 因优化信号可选择合适金粒子大小

对于使用的大多数免疫检测，最适粒子大小为直径 40nm。在某些情况下当位阻现象成为较大问题时（如针对较小抗原），20nm 粒子则更为合适；如果希望出现更深颜色或希望在分子表面较低曲率的情况下提高抗原抗体分子间的互相作用，那么较大的粒子更为可取。总之，最终应由实验来确定使用多大直径的胶体金颗粒，从而得到高灵敏度、浅背景色和高稳定性的实验结果。

第四节 胶体金交联物的制造和稳定

胶体金与蛋白等通过物理化学作用结合形成胶体金交联物。在整个免疫层析检测技术中胶体金交联物的制造和稳定是一个非常重要的环节。

一、胶体金交联物的制造

生产者要先了解蛋白与胶体金持久结合的物理及化学进程，之后不管是进行小批量胶体金溶液的制造还是胶体金溶液的大规模生产都会变得容易很多，产品的敏感性、稳定性、特异性或重现性也能得到保证。仅把交联物糅合到一起，虽然成本低廉且简易，却通常会导致聚集体的形成从而生产出劣质产品。通过 TEM 可观察到，每一个聚集体都是由 4 个或更多胶体金交联物分子组成的群体，而这种聚集体的存在通常预示着产品的不稳定性，其性能会随着时间而发生改变。虽然刚开始这种聚集产品比未聚集产品具有更高灵敏度，但这些聚集产品很快会出现稳定性和特异性问题。

一种好的交联物表现为蛋白吸附于金颗粒表面上，与胶乳不同，这种吸附是蛋白被动吸附于交联物表面，不是共价结合；但由于某些小分子，像激素、药物及其他小分子 ($< 10\text{KD}$)，与金表面没有足够结合位点，被动交联前必须先结合到大分子载体如 BSA (牛血清白蛋白) 上。在任何情况下位阻现象都会阻碍小分子升至 zeta 电位，而载体是惰性的，不会影响检测蛋白质的活性。由于抗体 Fc 片段紧紧吸附在金颗粒表面，这样围绕着金颗粒的双电子层表面的 Fab 片段就突出在外面，Fab 片段就能吸附分析物了 (图 1-5)。

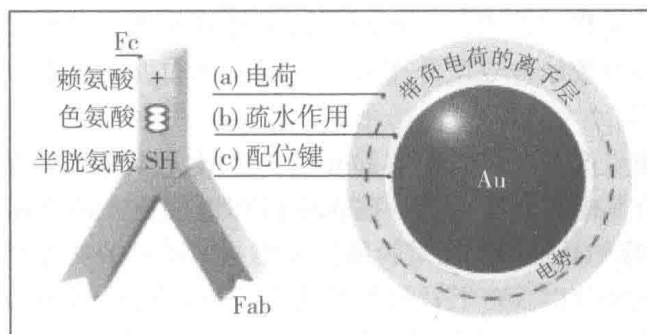


图 1-5 抗体与金颗粒的结合力

在胶体金上进行抗体标记时，不能有大量待标记抗体存在。因为过量游离抗体会与胶体金上的抗体和抗原发生竞争反应，导致出现假阴性，且过量抗体会影响标记物的稳定性。通常蛋白质和胶体金结合的最佳条件在蛋白质等电点附近。

通常蛋白质在几秒内通过以下机制吸附于金粒子表面：①金粒子所带负电荷与蛋白内氨基酸（如赖氨酸）所带阳性电荷最初的相互吸引；②蛋白通过某些氨基酸残基（包括色氨酸）与金粒子表面间的疏水吸附作用；③蛋白中半胱氨酸的硫基与金粒子间的配价结合。

二、胶体金交联物的稳定

随着与特异蛋白的结合，交联物必须用适当试剂进行稳定。通常使用的稳定剂有BSA、明胶、PEG（聚乙二醇）或酪蛋白。使用稳定剂有双重功能，一是可通过封闭胶体表面未和特异性蛋白结合的位点减少非特异性反应的发生；二是有助于更稳定的交联物悬浮液的形成。

一旦结合，金即被调整至预期浓度并混悬于相应缓冲液中。总的来说，最终的储存缓冲液不应含有高盐缓冲液和表面活性剂，因为这些高盐和表面活性剂有可能通过水解或置换抗体而造成交联物的损伤。含硫基或汞的防腐剂会造成交联物的完全毁坏。胶体金最常用防腐剂为0.1%叠氮化合物，如0.1%叠氮化钠。

专业制成的胶体金的储藏几乎是无限期的。通过计算有多少结合剂可吸附到金粒子表面，其形成的交联物比单独的抗体可储存更长久，可能会减少批间差；通过恰当干燥方法的固相金标蛋白可保存数年之久。

第五节 胶体金的大规模制造

尽管已经有技术及科学资料描述简单、小量胶体金和交联物的生产过程，但用于大批量商业生产（如100L的生产量）的方法仍存在所有权的问题。如果从氯金酸至胶体金的还原过程必须在微秒内完成，那么100L或更大量产品的生产则需要非常精细的技术而不是仅遵循小量产品生产原则。

由于这些技术仅为用于商业生产金交联物企业的专家所熟知，所以大多数生产者不会试图在企业内部选择这种艰巨任务而进行大批量胶体金的生产。相反，快速检测试剂的生产商会选择与胶体金专家合作从而降低成本和失败概率，同时也可使其生产的产品尽快进入市场。

这种合作通常由生产商进行内部实验开始，这些实验用商业用途的小量胶体金来决定何种抗体最适合其应用。接着，一些企业内部进行更大量胶体金交联的实验来决定按比例放大10倍或100倍的产品是否能生产出相同质量的交联物。在这个阶段，提高温度、应用不同缓冲液以及在干燥状态下进行严格的金交联物稳定性实验非常重要。质量控制应包括使用TEM检查有关聚集的产生情况、光密度、敏感性及特异性。大批量快速检测产品生产前，进行多批次、大量实验来验证生产的重现性很有必要。

第六节 胶体金的定量检测

对于快速检测技术来说，有色颗粒作为指示剂生产的很多产品仅限于定性检测。对于胶体金作为指示剂生产的免疫层析检测产品，不仅能用于定性或半定量检测，而且通过一些设备的读数仅等的参与可实现分析物的定量检测。

一、胶体金定量检测

大多数的快速检测试剂只能用于定性检测，如用于检测临床样本中是否含有超过检测浓度的特定生物成分存在；但有许多分析物的检测需定量检测，如监控疾病的临床指标变化或确定特定分析物的相对或绝对浓度等。

这种定量检测包括三种类型。第一种类型，测试时测试信号可出现的视觉上的对比，这种测试提供半定量结果，可分为阴性、弱阳性、中强阳性和强阳性。第二种类型，检测线反应剂量设计成只结合定量已知的分析物，任何过量分析物将会和下一条检测线结合，产生一个温度计式的条带梯度。第三种类型，测试样品所产生的信号由一个小型便携式分析仪读取，并由分析仪将颜色深浅不同的测试线转换为数字信号，如目前国内外市场上各种不同类型的胶体金读数仪。

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

二、关于自动读数仪

基于膜的免疫快速检测技术已成为医学诊断等许多领域的重要检测工具，试纸条自动读数仪是一种免疫层析试纸条生产厂家优化产品设计和控制生产质量的非常有用的工具。研发这种设备要进行重要的检测试验，有时需要按照稳定有序的实验步骤进行，且需要在反复试验基础上才能有所收获，在研发过程和质量控制（QC）中，通常经验比数据更有说服力。技术的进步使此阶段产品的开发更加趋于简单。

下面从自动读数仪在试剂应用、稀释、工艺、装置动力学方面以及自动读数仪作为一种工具在研发和QC中的使用情况做一叙述。

（一）快速检测试纸条的试验原则

免疫层析快速检测试纸条由多个组件组成，通常包括样品垫、结合垫、包被了捕获试剂的硝酸纤维素膜和吸水垫（图1-6）。实际工作中，使用者通常需要将样品加在样品垫上，样品流经样品垫到结合垫处，并在那里与检测试剂混合后释放，这种混合物流经硝酸纤维素薄膜，与检测线和控制线发生反应，当混合物与试剂结合并反应后形成一条检测线，也即显示检测结果阳性。检测线显色深浅与样品中分析物浓度成正比，多余样品则流经检测线和控制线到达吸水垫被吸水垫吸收。

虽然这种检测方法看似简单，但其各组成部分间复杂的相互作用对研发和生产环境都提出了许多要求，对于定量检测则要求更高，即要求在各生产批次间检测线显色颜色应重复一致。从发展的眼光看，创建一个成功的检测系统需要在原材料、组成成分与生产技术间达到最优化组合。

研发人员不管是开发只提供阳性或阴性结果的定性检测还是开发定量检测，都需要详细的相关资料来优化检测系统的每一部分。例如，通常很容易检测到由于非特异

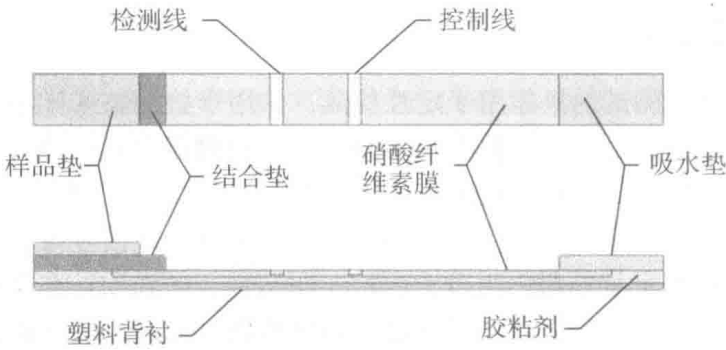


图 1-6 典型快速免疫层析试纸条的顶端及侧面示意图

性反应而引起的严重问题，但如果没有关于检测系统方面提供的相关信息则往往很难消除这个问题的存在。换句话说，为了优化检测系统的设计和生产过程，生产人员必须将凭经验进行的定性检测转向定量检测。定量检测中所进行的详细测量有助于生产设计者用准确和可重复性的方式进行系统验证。

免疫层析检测试纸条中的许多特性可通过试纸条读数仪进行展示和检测。例如，这样的读数仪可显示放大的捕获线并在水平坐标轴上提供准确的图像背景和信号情况，在进行检测时还可以显示捕获试剂的图形和最大定量值（数值）、实际显色强度（深浅）、捕获线的不对称性以及捕获线形成时的变化情况。

(二) 图像处理

适合分析快速层析诊断试纸条的图像处理系统通常由三个主要组件构成：电子摄像头、图像采集卡和安装在电脑上的图像处理软件。基于低成本电荷耦合器件 (CCD) 技术，多种电子照相机均可以在市面上买到。不同于正常相机的将图像聚焦在胶片上，这种照相机是将图像聚焦在 CCD 元件或像素 (图片元素) 上，像素可根据接收到的光数量大小比例将其转换成电信号，且增加其电荷或电压。照相机的分辨率是与图像大小、像素数量相关的一种性能。典型的低成本 CCD 照相机有大约 250 000 个像素，大多数电子相机还采用了自动增益控制开关 (AGC)，可根据接收到的光数量的大小调整相机的光量。因为在对系统进行标定时必须禁用此功能，所以对于包含有图像处理系统的快速检测诊断分析系统有一个 AGC 进行选择。

图像采集卡是一种电路板，可作为相机和软件间的接口添加到电脑中。图像采集卡作为一种转换器，能够读取由相机提供的图片资料，并且作为一个特殊硬件能够对图像进行快速处理，然后高速存储这些图像。

图像处理软件可使用存储在图像采集卡中的图片数据。商用软件包括一般图像处理软件和专门为快速层析检测试纸条设置的特殊软件，该软件包括显示相机记录的放大图像，且允许用户对其各种功能和测量进行操作。例如，该软件可去除背景、自动对线条进行查找和测量、对目前光水平进行校准、将测量数据导出到电子表格中，并且对图像进行保存和检索。更好的软件程序包可以对图像进行集成采集和处理。

此类应用软件的用户界面也很重要，因为它们一般都很复杂，并且有大量设定和选项。最基本的用户界面应能够显示图像，有一个叠加在图像上的可扩展处理窗口，

并且有一个显示随 x 轴变化的平均强度图表（或对话框）。

（三）自动读数仪的概念

任何专门用于快速检测试剂图像分析的第一个必要条件是在相机下定位且用可控光线照亮该部位，光照水平应相对恒定地跨相机整个视野。以美国 BioDot SR3000 为例，有一个灯箱挡光系统和一个可提供横跨视野、统一光照的多元照明系统。请注意本系统还采用单色光（单波长）取代宽带光。波长选择是为了提高检测线和控制线在背景（膜）上的对比。正确选择波长对于成像水平较低的信号来说至关重要，该系统还具有可调暗盒可使检测固定在某一位置，且电流能使试纸条上端表面与相机保持同样距离（在所需放大水平相机只有很有限的视野深度）。

1. 软件 两套操作系统需要将快速检测的图像变成有用数据，第一套操作系统是图像处理软件和测量软件，第二套是数据分析软件。

基于 SR3000 图像处理软件建立的试纸条显色的分析和测量，用户界面包括三个主要窗口：显示发现的任何线条的密度分布图（相对于 x 轴）的峰值和边缘值、试纸条图像以及检测结果。图表上的垂直线条和图像窗口显示线条边缘的产生位置。操作人员可通过覆盖一个测量窗口而直接到条带图像处选择感兴趣部分，此测量窗口可移动也可设置为所需大小。该软件可对测量窗口内的值进行操作，并沿垂直轴（或 y 轴）对密度进行平均，这个平均密度以图表形式显示，在图表数据中而不是在图像数据中可进行进一步数学运算。

2. 校准和可重复性 试纸条检测分析系统的一个要求是能够对图像密度（暗度）和标准进行比较，成像系统的另一个重要要求是能够对试纸条检测结果与在不同时间或不同地点生产的试纸条的检测结果进行对比，也就是所谓的校准功能。这种校准功能有空间校准和密度校准两种类型。空间校准用来校准距离和位置的成像系统，密度校准与带光学标准的成像系统的亮度或暗度相关。因此，所有检测都与行业标准相关（如电子工业协会的灰度测量通常使用的是一步密度图表）。在 SR3000 中，单个系统或多个系统之间测量的重复性大约是 99%，也就是说，系统的变异系数（CV）是 1% 左右。

3. 灵敏度 要在分析快速层析检测中 useful，成像系统必须具有足够灵敏度以便在定量检测中对各层次密度进行区分。BioDot 系统在整个密度值范围的分辨率约为 1%，就是说可在介于黑色和白色之间区分大约 100 种灰度。灵敏度是由每一阶梯尺寸大小或者一个灰度与另一个灰度之间尺寸大小决定的，如果缩小范围，可区分更细微的灰度。通过调整相机的光圈分辨率和范围可以互换。

（四）应用研究

在实践中，使用自动图像分析系统有助于研发人员衡量和评价可能会影响其产品性能的一些变量。下面是应用中常见问题的一些建议，这些建议能帮助厂家缩短产品研发时间或提高产品生产质量。

1. 线条形状的测量 控制工艺的措施之一是试剂结合到膜上的均匀性。图 1-7、图 1-8 显示了不同类型的检测以及由此产生的不同类型检测中不同试剂的检测线条的密度剖面图。不同的化学试剂和应用方法导致了密度分布上的差异。图 1-7 显示的是

理想的密度分布，近似于高斯波形，而图 1-8 显示的是一个偏斜或不对称的波形。

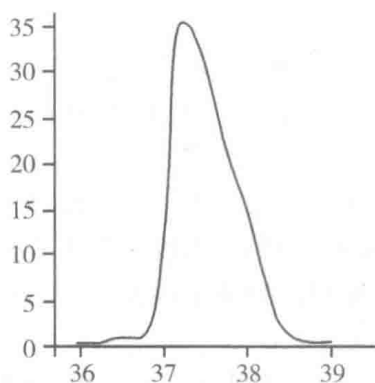


图 1-7 试剂线条的理想密度剖面图

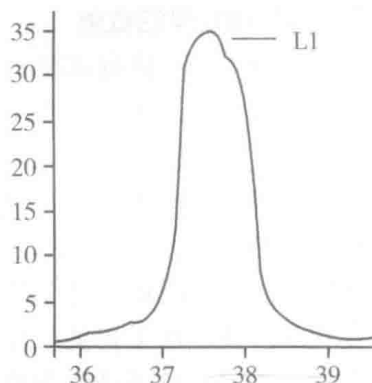


图 1-8 非对称波形

2. 生产中的质量控制 典型生产过程中的质量控制措施包括线条位置、线条宽度、最大暗度和光密度值 (IOD)。IOD 是产品的线条平均密度乘以线条面积，也就是图中密度曲线与 x 轴之间的面积。BioDot 系统不仅可以测量试剂线条的平均宽度而且可以测量试剂线条沿轴线方向的宽度变化。

3. 动力学研究 当试验进行时，样品通过膜的流速可影响检测线条显色强度，虽然显色强度与样品中分析物浓度成正比，但所有反应物的有效浓度还是会随着流速增加而呈线性减小。一般情况下，随着流速增加背景也会有所降低。因此，流速会影响检测线最终的颜色，也会影响试纸条灵敏度，而且试纸条灵敏度会随着流速增加的平方而减少。

不管是对已完成检测的试纸条还是正在检测中的试纸条，BioDot 试纸条读数仪在保证检测线条显色强度的准确性和可重复性以及背景方面都是有用的。虽然许多组成部分和性能需要进行检测以确定它们对检测结果的影响（膜孔径、表面活性剂浓度、缓冲液及样品液等），但只在定性检测中应用。试纸条读数仪提供在定量检测中的各组成部分间的相互关系以及处理方法，甚至整个系统的优化处理方法。

例如，BioDot 试纸条读数仪用于结合垫的两种加工方式比较，一种方式使用喷枪，另一种方式使用 BioJet 点式打印。随后用 200 μ L 样品液进行检测，且在 15min 内每隔 10s 成像一次，然后图像处理采用 IOD 作为时间函数，对线条宽度、最大暗度进行测量。分析结果与预测相符，每种方式的结合垫在达到相同显色强度时，点式打印方式的结合释放速度快于喷枪方式的结合释放速度。

样品稀释的动力学研究：试纸条读数仪也可通过测量样品浓度对试纸条颜色变化不同进行量化管理。要做这个试验需要准备一组相同的快速检测试纸条、浓度逐渐升高的样品液、200 μ L 样品量，实验时进行图像采集。

灵敏度研究：因为含有图像处理系统的 BioDot 试纸条读数仪能够检测到极低电信号，所以该仪器能够对浓度为 3%，200 μ L 样品液进行检测线的信号检测。跟人的眼睛一样，读数仪通过线条与背景之间的对比对检测线进行区别判断，未结合的反应物会提升背景信号并且降低对比度，使得系统对检测线的辨识造成困难。如果未结合的反