

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114718

衛生福利部疾病管制署 106 年科技研究計畫

計畫名稱：創新標定檢驗法之研究發展

106 年度 研究報告

執行機構：疾病管制署 檢驗中心

計畫主持人：楊志元研究員

研究人員：謝若郁、范文斌

執行期間：106 年 01 月 01 日至 106 年 12 月 31 日

目錄

壹、	計畫摘要.....	1
貳、	計畫內容.....	3
一、	前言.....	3
二、	材料與方法.....	5
三、	結果.....	9
四、	討論.....	11
五、	結論與建議.....	12
六、	重要研究成果及具體建議.....	13
七、	參考文獻.....	14
八、	圖、表.....	16

壹、計畫摘要

快速篩檢試劑能在臨床端應用，提供醫療人員作初步檢測，快速而方便，然而目前市面上所設計的傳染病快速篩檢試劑大多為膠體金之標定方法，雖然便宜且穩定，但在靈敏度上卻常常受限，或容易造成人為判定誤差。

本計畫執行目的在於研究發展創新標定檢驗法，希望以膠體金或新型標定方法，作為偵測傳染病之標的物(抗原或抗體)，並能配合可攜式儀器進行半定量方法，提升整體快速篩檢平台之靈敏度與再現性，達到低成本但又能增加現行檢測之靈敏度更加符合市場需求之快速篩檢平台。

目前以登革熱 NS1 抗原作為偵測標的，測試膠體金與乳膠粒子標定法，將標定完成之抗體塗佈於標定墊片後，組成測試片加入已知模擬檢體進行反應，以黑色乳膠粒子反應較為完整與明顯，且結果易於判讀，評估將來可配合後端讀取裝置，預計能提升偵測靈敏度。

Lateral flow assay tests are nowadays becoming powerful, low-cost diagnostic tools. The application of colloidal gold lateral flow assay is very widespread and popular in the fields of medical diagnosis. However, colloidal gold labeling shows some limitations especially when high sensitivity is needed. Labeling method is important for lateral flow assay and will affect the final result of the assay. The development of innovative conjugation methods for lateral flow assay has surged with the advances in detection methodology and instrumentation. Therefore highly sensitive assays using other labeling methods have been adopted for diagnostic purpose.

This project is going to combine the lateral-flow technology with automatic digital scan and interpretation of the test strip, which minimizes potential operator errors due to manual reading. In order to provide good quantitative and reproducible results, detection system should be sensitive to different intensities of colors. Optical standards can be used to calibrate an optical reader device for feature quantitative analysis.

Since we tested different labeling methods, including covalently gold nanoparticles conjugation, passive colloidal gold conjugation, commercial blue latex particles conjugation and passive latex (blue, red and black) conjugation. The result showed the black latex performed the best than others. In the future, the black latex conjugation may establish the sensitive reader device.

貳、計畫內容

一、前言

Point of care (POC)也稱作 Point of patient care，指在照顧病患的當下，即可使用的醫療診斷測試方法，這種測試在任何地方都可執行¹。例如常見的血糖測試、懷孕檢測，這種類型的測試速度快，能讓臨床人員在照顧病患可以得到更多資訊去判斷疾病，進而及早決定對患者的治療。

隨著現代化醫療的發展，診斷檢測通常需要在大型的實驗室進行，由專業的設備與訓練良好的人員執行，雖然具備良好的品管機制，提供高度準確檢驗報告，但卻耗時且高成本，常為醫療患者抱怨。相對於大型實驗室，POC 則能立即得到檢測結果，提供醫療人員作進一步處置之參考²。

POC 最常見為快速檢測試紙，從技術面而言，快速檢測試紙原理為橫向流動試驗法 (lateral flow assay)，是利用抗原與抗體結合後，以類似酵素免疫分析法之原理³，最終利用奈米顆粒聚集呈色方式顯示結果。抗體在檢測試紙製作時已先固化在裝置的內部，而抗原是來自病患在檢測時所提供的體液，或者依需求作不同位置進行調整⁴。快速檢測試紙能提供快速、單一步驟、低成本、簡易設備、低干擾、高專一性與可輕易攜帶等等的優勢⁷。快速檢測試紙組成為：檢體片(sample pad)、標誌片(conjugate pad)、硝酸纖維素膜

(Nitrocellulose membrane)與吸收片(Absorbent pad)，判讀有測試線(Test line)與對照線(Control line)。

目前多數快速檢測試紙，標誌片上抗體或抗原以奈米膠體金(colloidal gold nanoparticles)作為標定呈色方法，方便肉眼直接判讀¹⁰，如此一來雖然簡便，卻容易受到人為因素干擾。另一方面，由於呈色反應是以肉眼觀察後直接判讀，因此需要偵測標的物濃度達到一定程度以上，才足以被抗體或抗原偵測與最終判讀到反應線，因而增加了產生偽陰性的機率⁹。標定呈色方法能影響整體分析靈敏度，本計畫目的即在研究發展創新標定檢驗方法，改善現有快速檢測試紙膠體金呈色反應之敏感性，將來藉由搭配可攜式判讀儀器，以提升快速檢測平台穩定性與靈敏度。

二、 材料與方法

1. 測試抗體

由本署病媒病毒實驗室製作之登革熱病毒針對 NS1 蛋白之單株抗體，已經過純化置換於 PBS 緩衝液中，進行抗體標定方法相關實驗。

2. 市售膠體金標定套組

利用共價鍵結合膠體金粒子與待標定抗體。

- (1) 以不同濃度抗體進行膠體金標定，調整抗體濃度時，體積不變要固定為 12 μ l。
- (2) 將套組試劑由冰櫃取出回至室溫，以抗體稀釋液稀釋抗體。取 12 μ l 抗體加入反應緩衝液 42 μ l，混合均勻後取 45 μ l 加入膠體金反應管。
- (3) 以 40 nm 粒徑之膠體金進行反應，於回溶膠體金後，平緩的混合膠體金粒子。
- (4) 反應 15 分鐘後，加入 5 μ l 反應終止液，並平緩的混合均勻。
- (5) 終止液反應 5 分鐘後，為取得完全結合之膠體金溶液，進行清洗粒子反應，加入 500 μ l 稀釋 10 倍之反應終止液，再以 9,000 g 離心 10 分鐘。
- (6) 移除上清液後，拍散沉澱粒子，加入含有 1% BSA 之膠體金保存液，製備成為 20 OD 之膠體金標定抗體。

3. 市售乳膠粒子標定套組¹²

- (1) 為避免抗體與乳膠粒子反應受鹽類溶液影響，需要先置換抗體溶液為 10 mM HEPES 低鹽緩衝液。

- (2) 將套組試劑由冰櫃取出回至室溫，以套組中 A 緩衝液與 B 緩衝液分別進行抗體稀釋，將抗體調整濃度為 0.1~0.5 mg/ml。取 40 μ l 稀釋後抗體加入乾燥之乳膠粒子。
- (3) 以 400 nm 粒徑之乳膠粒子進行反應，回溶乳膠粒子後，平緩的混合乳膠粒子。
- (4) 室溫反應 15 分鐘後，加入 1 ml 反應終止液(已稀釋至 1 倍)，並平緩的混合均勻。
- (5) 反應 5 分鐘後，將反應完成之溶液，吸取至微量離心管，為取得完全結合之乳膠粒子溶液，以 10,000 rpm 離心 9 分鐘。
- (6) 移除上清液約 850 μ l，再離心 1 分鐘，盡可能的移除多餘之上清液。
- (7) 加入含有 0.1 % BSA 之 40 μ l 回溶緩衝液，製備為 1% 乳膠粒子標定抗體。

4. 標定測試

- (1) 稀釋反應緩衝液至 1 倍，並加入 1% BSA 作為阻斷劑。
- (2) 取 80 μ l 反應緩衝液(含 BSA)至 96 孔反應盤孔洞中，將測試反應片硝化纖維膜反應端置於孔洞中進行阻斷反應 1 小時。1 小時後取出測試反應片置於乾燥箱乾燥至少 1 小時以上。
- (3) 以步驟(1)反應緩衝液稀釋標定抗體，膠體金稀釋至 1 OD，乳膠粒子稀釋至 0.02%(或以上)。
- (4) 加入 40 μ l 待測標定抗體至 96 孔反應盤中。

(5) 取步驟(2)已乾燥之測試反應片，反應片上已有 protein A 及 protein G 反應線，將反應片放置反應盤上。

(6) 反應 10 分鐘後進行觀察結果。

5. 膠體金吸附標定

(1) 一組取兩管微量離心管，即 2 mL 膠體金溶液，進行膠體金吸附抗體標定製作。以 0.1M K_2CO_3 溶液調整膠體金 pH 值。

(2) 各取不同濃度單株抗體加入 1 mL 膠體金溶液 (OD530=1.3) 中，置於上下擺動震盪器均勻混合 30 分鐘。

(3) 加入 20 μ l 之 10% BSA，均勻混合 20 分鐘，使 BSA 最終濃度為 0.2%。

(4) 進行離心 8,000 rpm，30 分鐘沉澱結合之膠體金。

(5) 去除上清液，留下沉澱物。

(6) 加入膠體金稀釋液 1% BSA 之 PBS 緩衝液，將沈澱物混合為懸浮液，並將兩管懸浮液收集在一起。

6. 乳膠粒子標定

(1) 取兩管微量離心管，進行乳膠粒子抗體標定製作。乳膠粒子稀釋至 OD 值為 1 進行標定反應。

(2) 各取不同濃度單株抗體加入 1 mL 乳膠粒子溶液中，置於上下擺動震盪器均勻混合 30 分鐘。

(3) 加入 20 μ l 之 10% BSA，均勻混合 20 分鐘，使 BSA 最終濃度為 0.2%。

(4) 進行離心 8,000 rpm，30 分鐘沉澱結合之乳膠粒子。

(5) 去除上清液，留下沉澱物。

- (6) 加入乳膠粒子稀釋液 1% BSA 之 PBS 緩衝液，將沈澱物混合為懸浮液，並將兩管懸浮液收集在一起。

7. 測試片組裝

- (1) 標定墊片處理：切割標定墊片 300mm x 10mm，進行前處理，以 0.5% BSA 與界面活性劑之緩衝液塗佈標定墊片，完成後進行乾燥。
- (2) 切割 300mm x 20mm 檢體墊片及 300mm x 20mm 吸收墊片。
- (3) 將已經貼上硝化纖維膜的背卡黏貼檢體墊片、標定墊片及吸收墊片。
- (4) 將組裝好的測試片裁切成寬度 40 mm 的試劑條，放置於乾燥箱保存。
- (5) 測試膠體金或乳膠粒子標定，將已標定抗體塗佈於標定墊片上，測試線抗體則於加入保護劑後，集中滴於硝化纖維膜中央。

8. 測試血清

為本署病媒病毒實驗室歷年來以細胞培養方法分離所得各型登革熱病毒，於照射 UV 後去除毒性，以正常人類血清進行模擬反應。

三、 結果

登革熱抗原測試快篩原理如圖一，將標定抗體塗佈在標定墊片上，測試點抗體滴於硝化纖維膜中央進行反應呈色，檢體墊片吸收待測抗原後，透過毛細現象將抗原帶往標定墊片，與標定抗體進行反應形成免疫複合體，並在通過硝化纖維膜上測試點時，與測試點抗體結合，反應完成後顯示標定顏色。

以共價鍵接合法之市售膠體金進行標定，加入抗體濃度為 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 與 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 反應結果如圖二 A 及 B，可以觀察到抗體濃度需要至 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 才能呈色。另外以吸附法之膠體金進行標定，加入抗體量為 50 μg 與 100 μg 標定(最終以 100 μl 回溶抗體-膠體金)反應結果如圖二 C 及 D，標定結果並不明顯，惟肉眼可觀察到 D 之呈色反應。

調整吸附法之膠體金標定，圖三結果分別以 50 μg 與 100 μg 抗體進行標定，而以 25 μl 及 50 μl 膠體金稀釋液將最後沈澱物混合為懸浮液。圖三 B 反應結果以 50 μg 抗體標定後，25 μl 回溶膠體金沉澱物之條件，可以明顯呈色，增加反應抗體並無法增加反應呈色。為去除無法結合之抗體，期望得以加強反應，但在增加界面活性劑之步驟後，卻無法偵測到訊號。

將快篩測試片組裝於塑膠卡匣內，加入第一型及第二型病毒模擬血清進行反應，測試片之硝化纖維膜上出現強烈非特異性反應，結果如圖四，觀察測試點第二型病毒之反應結果皆較微弱。拆開塑膠卡匣以觀察測試片情形(圖五)，發現血清檢體多被滯留於檢體墊片上，而標定墊片上之膠體金殘留許多，顯示檢體無法完全與膠體金進行反應。因此需要變更檢體墊片組成，並增加血清檢體反應量。

以市售乳膠粒子進行標定，經過調整抗體鹽類濃度，並增加反應抗體量，結果皆無法呈色，以測試反應片進行測試，發現市售乳膠粒子與抗體接合反應相當微弱，需要大量乳膠粒子才能於測試片上觀察到結果，因此無法適用於後續開發。

而以吸附法進行乳膠粒子標定反應，分別以紅、藍及黑色乳膠粒子標定，結果如圖六，在反應時可觀察到藍色乳膠粒子於抗體混合反應後，即呈現大顆粒聚集現象，最後呈色時(圖六 A)反應亦較其他顏色微弱。紅色與黑色乳膠粒子則無此現象，抗體反應後仍維持均勻溶液，在測試結果時，可以觀察到黑色乳膠粒子反應點表現最強(圖六 C)，紅色乳膠粒子亦能觀察到測試點呈色(圖六 B)。

將四種型別登革熱病毒之模擬血清進行測試，吸附法膠體金僅能偵測到第一型與第三型(圖七)，紅色乳膠粒子反應顏色較弱，不易觀察(圖八)，黑色乳膠粒子能成功偵測四型病毒模擬血清(圖九)。

四、 討論

由本署病媒病毒實驗室研發之登革熱 NS1 抗原快篩試劑¹³，已授權技轉於亞洲基因科技股份有限公司，並於今年通過食品藥物管理署核可上市，成為國內偵測登革熱感染之一大利器。

執行計畫過程，測試不同方法進行抗體標定，共價法鍵結抗體與膠體金反應，雖然能成功呈色，但考慮到下一階段需要進行量產，評估其單劑成本過高，僅能作為反應之比對。以吸附法連結膠體金與抗體反應，雖已調整最適反應 pH 值，並測得最佳反應濃度與回溶條件，卻在測試不同型別時，無法偵測第二型與第四型之病毒，將來可能會產生偽陰性結果，因而不適合進行量產。

而在乳膠粒子反應中，藍色乳膠粒子原為後續偵測儀之最佳偵測顏色，但反應過程卻無法避免凝集現象，即使降低抗體濃度尚無法改善。紅色乳膠粒子反應結果較弱，而黑色乳膠粒子能清楚的觀察到反應結果，並在四種血清型病毒模擬血清皆能呈現易於判讀之反應。

將來欲進行快篩試劑偵測儀研發時，可選擇搭配黑色乳膠粒子，作為抗體標定方法，透過偵測儀內 LED 光源照射反應線與對照線，以光電二極體接收反射光之強度，將光轉換為電訊號，安裝於儀器中軟體則能將電訊號轉為數位顯示結果，使快篩試劑結果由偵測儀直接顯現，降低人為判讀誤差，並能固定反應時間，避免超過時間造成偽陽性等結果。現階段僅與廠商以諮詢方式討論快篩試劑偵測儀可行模式，將來會以公開招標方式，評估資格合適廠商正式簽訂合作關係。

五、 結論與建議

登革熱為政府新南向政策重要之傳染病防治，綜觀國內歷年登革熱病毒疫情的起始多為境外移入，在人體攜入病毒後經過病媒蚊叮咬傳播造成本土流行疫情，除了降低病媒蚊以減少傳播機率，需要在入境檢查哨之發燒篩檢補強攔查，輔以快速檢驗試劑，能避免等待後送檢驗確認空窗期。更甚者決戰於境外，發展便利快速之讀取儀結合快篩試劑，推廣於國人興盛於東南亞旅遊之國家，協助其登革熱防疫，方能大幅降低國人傳染登革熱之機會。而國內已有生技廠商針對快篩讀取儀之發展，並對傳染病於東南亞之市場具有相當願景，署內研究需要更貼近使用端之需求，於合法範疇下，協助本土生技產業研發。

六、 重要研究成果及具體建議

本計畫主要目的為配合全球衛生安全議程(Global Health Security Agenda)，發展新型標定方法，提升快速篩檢方法之靈敏度，快篩試劑應用能即時提供治療及相關防疫決策之參考，並有效控制及預防疫情之發生，且降低醫療和社會經濟成本。藉由本署現有資源—登革熱病毒單株抗體進行測試，目前可利用黑色乳膠粒子進行標定，能偵測四種血清型別，而偵測極限仍待進一步測試，並能著手準備銜接後端偵測儀。然而膠體金反應可偵測第一型與第三型登革熱病毒，第二型與第四型反應較微弱，將再持續進行改善測試。

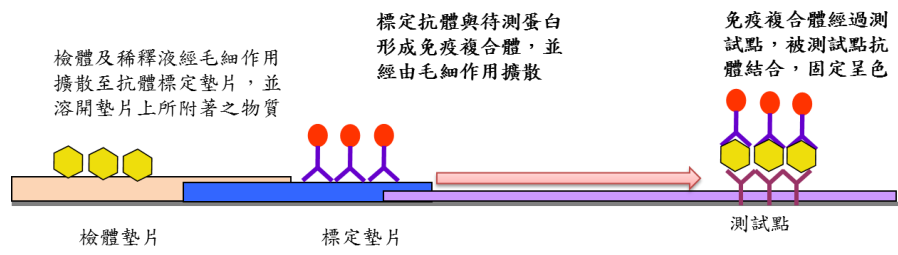
七、 參考文獻

- 1 V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Point of care diagnostics: status and future, *Anal. Chem.* 84 (2012) 487–515.
- 2 Navarro-Marí JM. Rapid diagnostic methods for acute viral respiratory infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 34 (2016) 329-30.
- 3 Kawde, X. Mao, H. Xu, Q. Zeng, Y. He, G. Liu, Moving enzyme-linked immunosorbent assay to the point of care dry-reagent strip biosensors, *Am. J. Biomed. Sci.* 2 (2010) 23–32.
- 4 I.Y. Goryacheva, P. Lenain, S. De Saeger Nanosized labels for rapid immunotests TrAC, *Trends Anal. Chem.*, 46 (2013) 30–43
- 5 Q.-Y. Xie, Y.-H. Wu, Q.-R. Xiong, H.-Y. Xu, Y.-H. Xiong, K. Liu, et al, Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 262–265.
- 6 W.C. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 40–46.
- 7 M. Sajid, A.N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Jour. Saudi Chem. Soci.* 19 (2015) 689-705
- 8 K.Y. Huang, S. Yang, K.C. Tsao, C.J. Chen, Y.C. Hsieh, C.H. Chiu, J.Y. Hsieh, J.Y. Yang, Y.C. Huang. Bedside immunochromatographic test for enterovirus 71 infection in

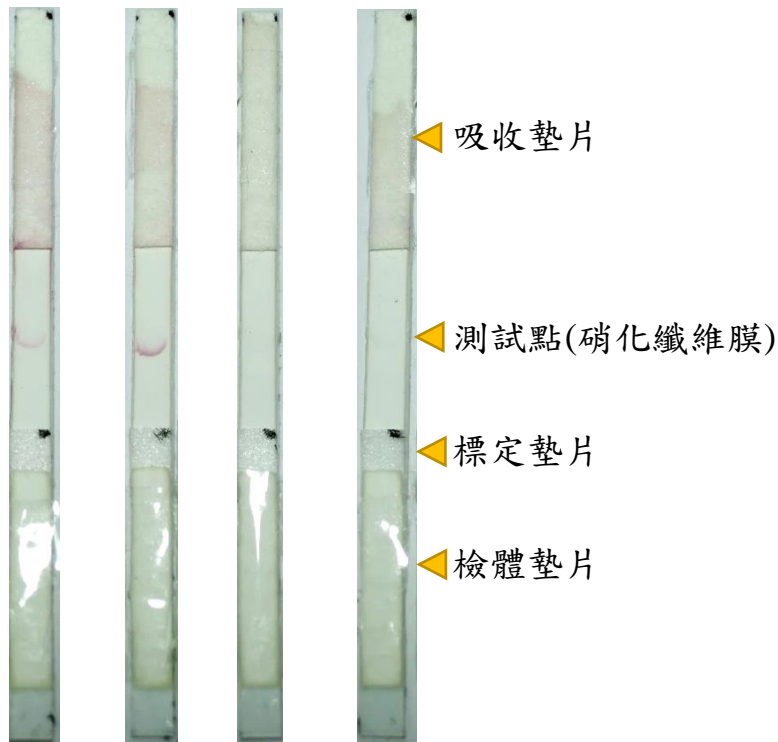
- children. *J Clin Virol.* 58 (2013) 548-52
- 9 Liu X, Xiang JJ, Tang Y, Zhang XL, Fu QQ, Zou JH, Lin Y. Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum samples. *Anal Chim Acta.* 745 (2012) 99-105.
 - 10 Krajaejun T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16 (2009) 506-9.
 - 11 Takeda K, Maruki M, Yamagaito T, Muramatsu M, Sakai Y, Tobimatsu H, Kobayashi H, Mizuno Y, Hamaguchi Y. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex transfer chemiluminescence enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 51 (2013) 2238-44.
 - 12 Seoho L, Saurabh M, and David E. Two-Color Lateral Flow Assay for Multiplex Detection of Causative Agents Behind Acute Febrile Illnesses. *Analytical Chemistry.* 88 (2016), 8359-8363.
 - 13 Shu P-Y, Chien L-J, Chang S-F, et al. Fever Screening at Airports and Imported Dengue. *Emerging Infectious Diseases.* 2005;11(3):460-462.

八、圖、表

圖一、



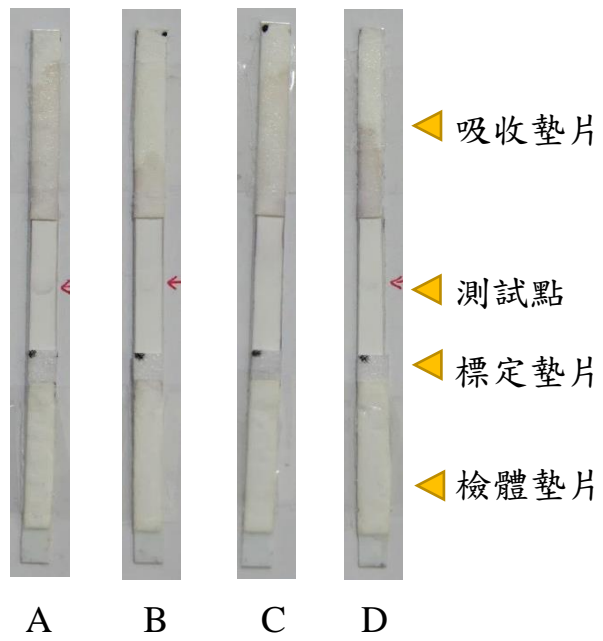
圖二、



A B C D

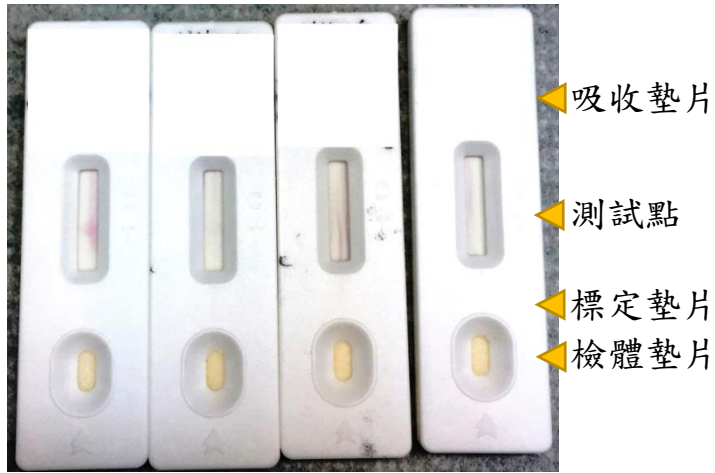
結果	2+	4+	-	+/-
----	----	----	---	-----

圖三、



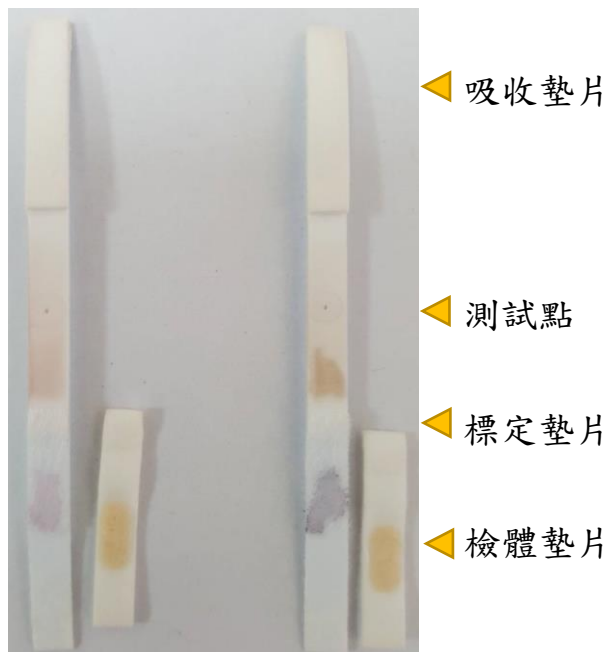
結果	1+	+/-	+/-	+/-
標定抗體量(ug)	50	50	100	100
回溶體積量(ul)	25	50	25	50

圖四、



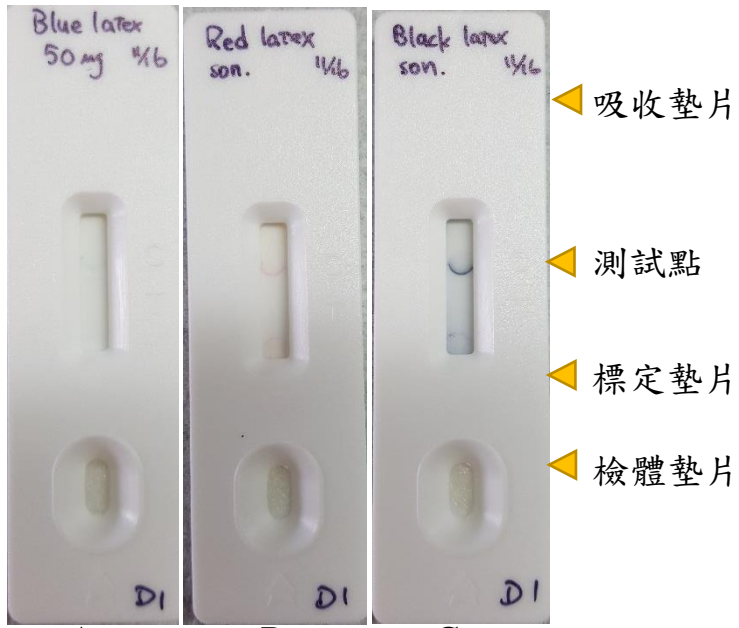
	A	B	C	D
結果	2+	1+	+/-	-
膠體金結合	共價法	共價法	吸附法	吸附法
登革熱血清型	第一型	第二型	第一型	第二型

圖五、



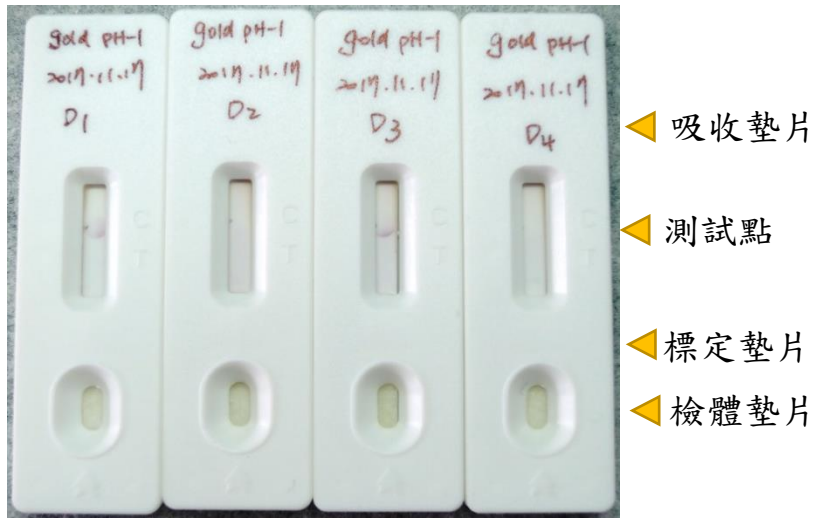
結果	1+ (非特異結合)	1+ (非特異結合)
----	---------------	---------------

圖六、



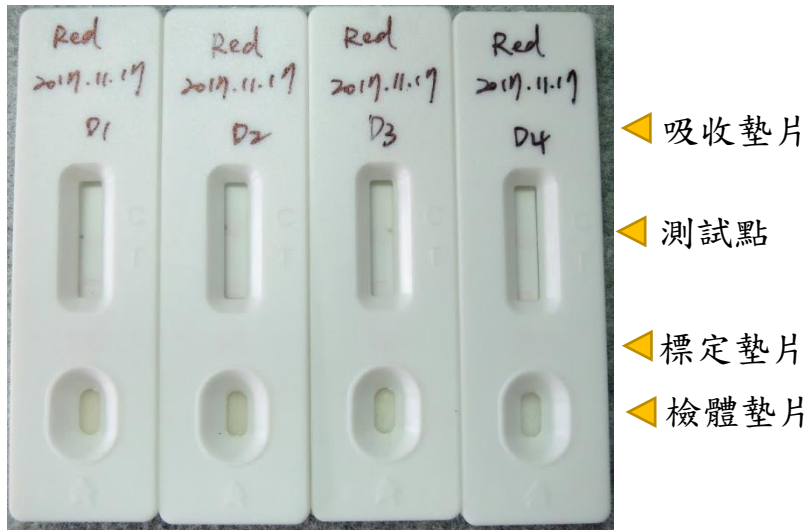
結果	+/-	2+	4+
----	-----	----	----

圖七、



	A	B	C	D
結果	3+	+/-	4+	-

圖八、



	A	B	C	D
結果	1+	1+	1+	1+

圖九、



	A	B	C	D
結果	4+	4+	4+	3+