

2022年6月

关键词:

UniSart® 膜、侧向层析检测、表面活性剂

侧向层析检测的 表面活性剂选择指南

梁硕 博士

Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Strasse 11, 37079
Goettingen

联系方式

电子邮箱: shuo.liang@sartorius.com

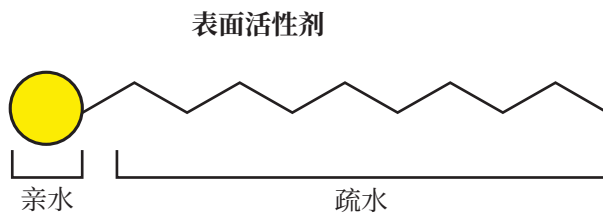


引言

侧向层析检测 (Lateral flow assays, LFA) 是一种免疫层析检测方法, 广泛应用于病原体、毒素、环境污染物等物质的快速检测。此类检测方法兼具易用性和准确性, 非常适用于即时检测POCT市场。在本研究中, 共采用了三种侧向层析检测。在样品垫预处理时加入不同的表面活性剂, 以考察各类表面活性剂对检测性能的影响。

1. 表面活性剂的分类及其在侧向层析检测中的功能:

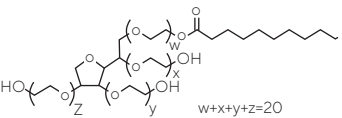

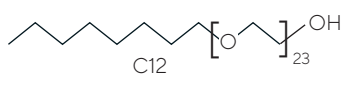

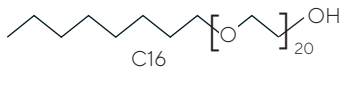

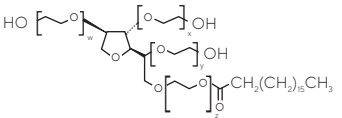

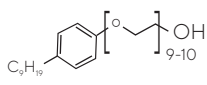

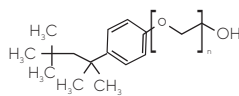

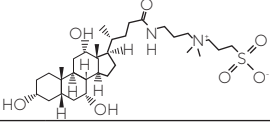

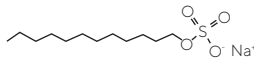

图1: 不同形式的表面活性剂



分类		在侧向层析检测中的功能
非离子型		▪ 增强或减弱检测线的信号强度
阳离子型		▪ 提高或降低背景消除的速度
阴离子型		▪ 减少非特异性结合
两性离子型		▪ 提高样品垫的润湿性
		▪ 增强阻断效应

所选用的表面活性剂如表1所示。在侧向层析检测中，以下所有表面活性剂均用作样本垫预处理环节中的添加剂。

表1本研究所用表面活性剂的概述

商业名称	化学结构式	类型	GHS	HLB	应用
Tween 20 (聚山梨酯 20)		非离子型		16.7	温和表面活性剂，常用于侧向层析检测 (LFA)
Brij 35		非离子型		16.9	性能优化 ¹
Brij 58		非离子型		15.7	性能优化 ¹
Tween 60 (聚山梨酯 60)		非离子型		14.9	温和表面活性剂
Tergitol™ type NP-40		非离子型		17.8	背景清除和结合垫释放
IGEPAL®CA-630		非离子型		13.4	背景清除和结合垫释放
CHAPS (3-[(3-胆酰胺丙基) 二甲基胺]-1- 丙烷磺酸盐)		两性离子型		/	蛋白增溶作用
SDS (十二烷基硫酸钠)		阴离子型		40.0	通常用于蛋白质化学

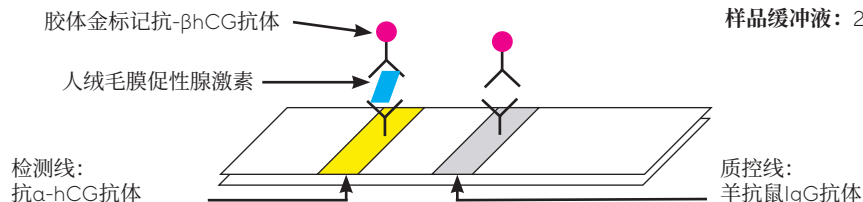
HLB: 亲水亲油平衡值—值高亲水（水溶性）、值低疏水（油溶性）

2. 不同表面活性剂对UniSart® 诊断膜性能的影响

2.1 人绒毛膜促性腺激素检测：一个展示表面活性剂对信号强度和背景消除影响的示例

众所周知，hCG检测方法具有较高的可靠性和可重现性。因此，我们选用hCG检测来考察表面活性剂对信号强度和背景清除的影响。按三种浓度水平添加表1中所列的表面活性剂：低浓度： $\leq 0.1\%$ (w/w) 或 (v/w)、中等浓度：0.2-0.5% (w/w) 或 (v/w)、高浓度： $\geq 0.5\%$ (w/w) 或 (v/w)。使用半试纸条 (half strip) 分析法来简化检测过程。这一方法通常用于缓冲液条件的初始筛选 (表2)。

hCG检测示意图



划线缓冲液：5 mM Borate, 150 mM NaCl, 1% sucrose, pH 8.2

样品缓冲液：20 mM Tris-buffer, 150 mM NaCl, 0.05 % BSA, pH 8.2

表2使用不同表面活性剂的hCG检测的结果汇总

标准	颜色	说明
效果差	深灰色	无信号/背景干扰严重
效果中等	浅灰色	低信号
效果佳	黄色	信号强/背景清洁

检测线信号和质控线信号 (肉眼观察)

UniSart® 膜	表面活性剂浓度	Tween 20	Brij 35	Brij 58	Tween 60	Tergitol™ type NP-40	IGEPAL® CA-630	CHAPS	SDS
CN95 带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN110 带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN140 不带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN140 带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN150 白色背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN150 透明背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN180 带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色
CN180DX 带背衬	低	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	中等	黄色	黄色	黄色	浅灰色	黄色	黄色	深灰色	深灰色
	高	深灰色	黄色	黄色	深灰色	黄色	黄色	黄色	深灰色

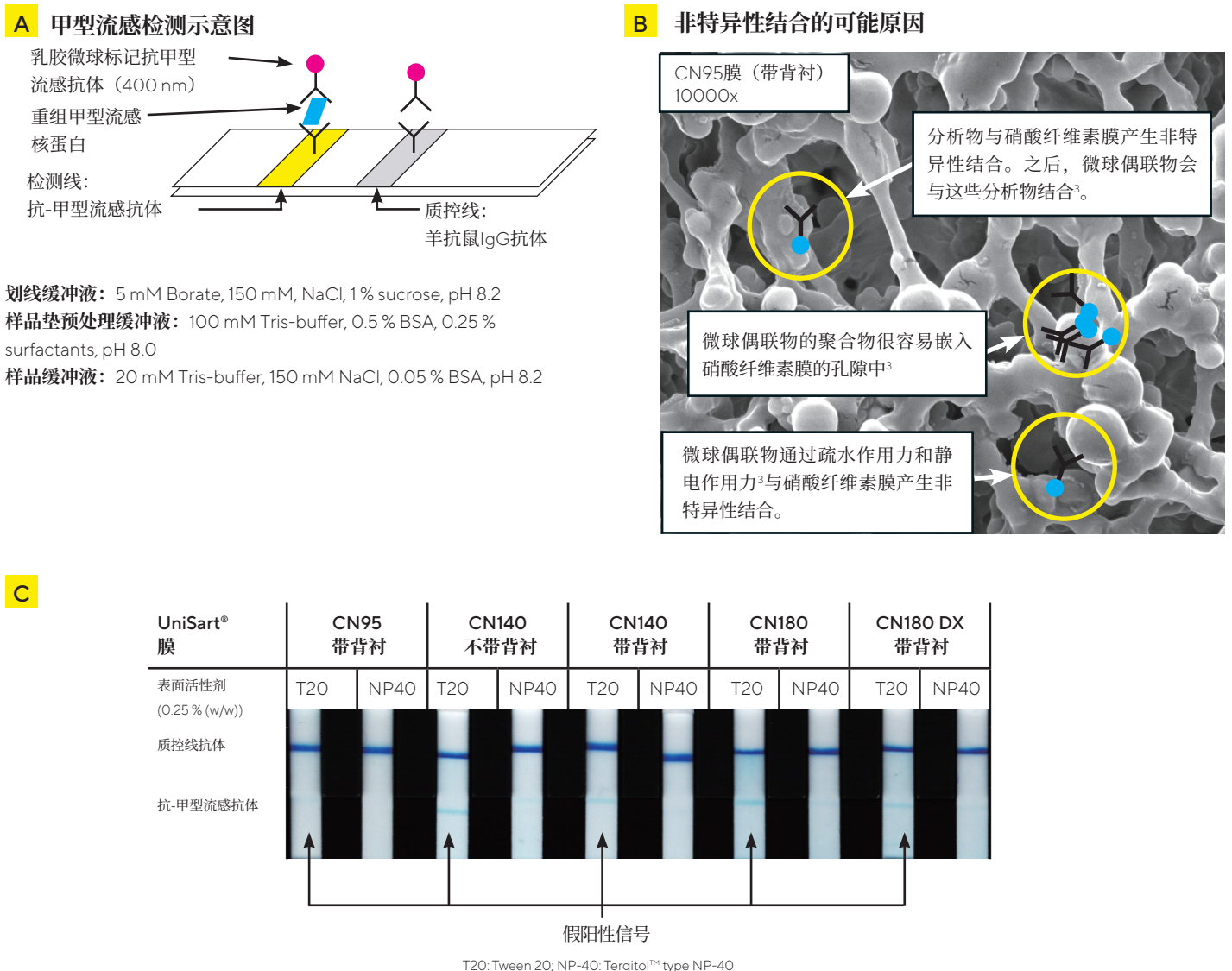
低浓度： $\leq 0.1\%$ ；中等浓度：0.2-0.5%；高浓度： $\geq 0.5\%$

就非离子表面活性剂而言, Brij 35、Brij 58、Tergitol™ type NP-40及IGEPAL® CA-630在所有测试的浓度范围内均实现了良好的检测效果。Tween 20可使用低浓度和中等浓度, 而对于Tween 60, 建议仅使用中等浓度。在高浓度下, 两种Tween表面活性剂都会产生假阳性信号。其原因可能在于, 高浓度的Tween表面活性剂会吸附在胶体金纳米粒子表面, 从而影响了偶联抗体的吸附²。两性离子表面活性剂CHAPS仅在较高浓度下才能优化层析检测的效果。阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)在信号强度或背景清除方面的作用不如其他表面活性剂。其原因可能因为十二烷基硫酸钠(SDS)会造成蛋白质变性。选用Tergitol™ type NP-40 和IGEPAL® CA-630以替代Triton X-100。

2.2 通过甲型流感(flu A)检测来考察表面活性剂对非特异性结合的影响

在人绒毛膜促性腺激素检测中, 中等浓度(0.25% (w/w))的Tween 20显示出良好的检测性能。然而, 在甲型流感检测中使用相同浓度的Tween 20, 却产生了假阳性信号。在甲型流感检测系统中, 采用直径为 400 nm的乳胶微球与抗体进行化学偶联。在检测过程中, 这种大直径乳胶微球可能会导致聚集或非特异性结合。非特异性结合(假阳性)的可能原因如图2B所示。使用中等浓度的Tergitol™ type Np-40可以解决非特异性结合的问题, 优化检测结果(图2C)。

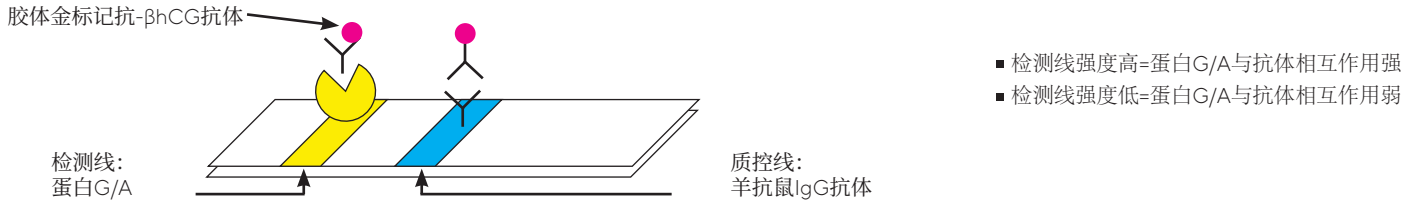
图2 表面活性剂对甲型流感检测的影响



2.3 蛋白G和蛋白A检测: 一个展示表面活性剂对载体蛋白与抗体相互作用影响的示例

在侧向层析检测中, 蛋白G和蛋白A通常用于增强灵敏度。这两种蛋白均可与抗体的Fc片段发生相互作用, 可使检测蛋白更好地结合在膜表面。在此类检测中, 蛋白G/A与抗体的复合物通过蛋白G/A固定在硝酸纤维素膜上。因此, 分析蛋白G/A在膜上的固定及其与抗体的相互作用对优化检测效果具有重要意义。本检测中, 我们评估了表面活性剂对蛋白质G/A及其与抗体相互作用的影响(表3)。表面活性剂的浓度采用0.25% (w/w) 或 (v/w), 因为该浓度在人绒毛膜促性腺激素检测中实现了良好的检测效果。

蛋白G和蛋白A检测示意图



蛋白G划线缓冲液: 100 mM Citrate, pH 5

蛋白A划线缓冲液: 5 mM Borate, 150 mM NaCl, 1% sucrose, pH 8.2

样品垫预处理缓冲液: 100 mM Tris-buffer, 0.5 % BSA, 0.25 % surfactants, pH 8.0

样品缓冲液: 20 mM Tris-buffer, 150 mM NaCl, 0.05 % BSA, pH 8.2

表3使用不同表面活性剂时, 蛋白G/A与抗体相互作用的检测结果汇总

Unisart® 膜	信号强度量级 (a.u.)											
	Tween 20		Brij 35		Brij 58		Tween 60		Tergitol™ type NP-40		IGEPAL® CA-630	
	蛋白G	蛋白A	蛋白G	蛋白A	蛋白G	蛋白A	蛋白G	蛋白A	蛋白G	蛋白A	蛋白G	蛋白A
CN95 带背衬	+++++	+++++	++	+++++	++++	+++	+++++	++++	+	+	+++	++
CN110 带背衬	+++++	+++++	+++	++++	++++	++	+++++	+++++	++	+	+	+++
CN140 不带背衬	+++++	+++++	++++	+++++	+++	++++	++++	+++	+	+	++	++
CN140 带背衬	+++++	+++++	+++	+++++	+++++	++++	++++	+++	+	++	++	+
CN150 白色背衬	+++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++++	+	++	++	+
CN150 透明背衬	+++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++++	+	+	++	++
CN180 带背衬	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	++	++++	+++	+	+	++	++++
CN180DX 带背衬	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	++	++++	+	+	+++	++

+++++: 相互作用最强, +: 相互作用最弱

结论

表面活性剂对检测性能的影响不仅取决于测定方法和膜的种类,也取决于表面活性剂本身的类型和浓度。使用高浓度表面活性剂时必须考虑生产成本因素。因此,建议对多种表面活性剂和浓度水平进行筛选,以确保最佳性能。

补充阅读资料:

1. L. Zeng et al., Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic strip for detection of vitamin B2 in an energy drink and vitamin tablets, *Food and Agricultural Immunology*, (2018) 29:1, 121-132.
2. Y. Zhao et al., Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules, *Nanoscale* (2010) 2, 2114-2119.
3. L. Zhan et al., Development and optimization of thermal contrast amplification lateral flow immunoassays for ultrasensitive HIV p24 protein detection, *Microsystems & Nanoengineering* (2020) 6:543.
4. Global Lateral Flow Assays Market By type, By Technique, By Sample Type, By Application, By End User, By Regional Outlook, Industry Analysis Report and Forecast, 2021-2027.
5. G.A. Posthuma-Trumpie et al., Lateral flow (immune)assay: its strengths, weaknesses, opportunities, and threats. A literature survey, *Anal Bioanal Chem* (2009) 393:569-582
6. Y. Liu et al., Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis, *ACS Nano* (2021) 15 (3), 3593-3611
7. F. Di Nardo et al., Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensor* (2021) 2921, 21, 5185

中国

上海市浦东新区盛荣路 388
弄百佳通产业园 3 号楼
7 - 11 层, 200120
电话 +86 21 6066 6100

Germany

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Otto-Brenner-Strasse 20
37079 Goettingen
Phone +49 551 308 0



更多联系请访问

visit www.sartorius.com.cn

