

表面活性剂在快速诊断试纸条中的应用

目前免疫层析产品的市场正在快速增长,而表面活性剂在免疫层析快诊试纸条中起着不可忽视的重要作用。表面活性剂的物理、化学性质对试纸条产品的亲水性、跑板速度、灵敏度、特异性、均一性和稳定性等性质有着影响。而快诊试纸条中其他成分会相互作用,从而影响表面活性剂对产品性能的作用。本文主要概述表面活性剂的基本概念,重点介绍常见的五种表面活性剂在样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜上的应用,对于试纸条中经常出现的问题加以分析和讨论,并给出可能的解决方案。

1. 表面活性剂概述

表面活性剂 (surfactant 或 amphiphiles) 是一种主要的精细化学品,具有优良的润湿、乳化、去污、分散及渗透等特性。其应用范围涵盖甚广,在纺织、造纸工业中常用作蒸煮剂、施胶剂、柔软剂和消泡剂等;在医药行业用作消毒杀菌剂、药物增溶剂、助悬剂等;在食品行业用作清洗剂、乳化剂、分散剂和稳定剂等。此外在皮革、金属加工、石油开采、橡胶、塑料、建筑等工业也起着十分重要的作用。

目前国内外科技发达国家的表面活性剂品种向专业化、功能化高度发展,并不断开发新技术,表面活性剂的理化性质研究亦日趋完善。

1.1 表面活性剂的定义与结构

凡是能吸附在溶液的表(界)面上,较低浓度就能极低的降低表(界)面张力的能力和效率的物质就称为表面活性剂。

表面活性剂分子结构具有一个共同的特点,即可以分为两部份(图 1),一部分是亲水基团,这是表面活性剂的亲水极性部分;另一部分是疏水基团或者亲油基团,这是非极性部分。因此,表面活性剂既可以在极性溶剂(最常用的溶剂是水)中,又可以溶解在非极性的油相中,具有两亲性质,故油被称为两亲分子。

表面活性剂的亲水基团种类很多,包括极性基团和离子基团。极性基团如聚氧乙烯基和糖基等,离子基团如羧基、硫酸基、磺酸基、磷酸基和季铵基等。亲油基团主要是长链烷基碳氢链、碳氟链、聚硅氧烷链以及聚氧丙烯等。

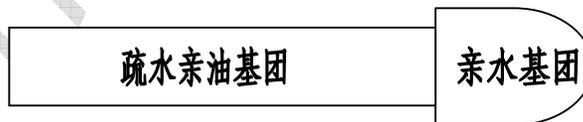
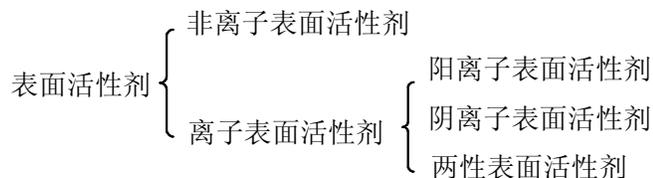


图 1 表面活性剂分子结构示意图

1.2 表面活性剂的分类

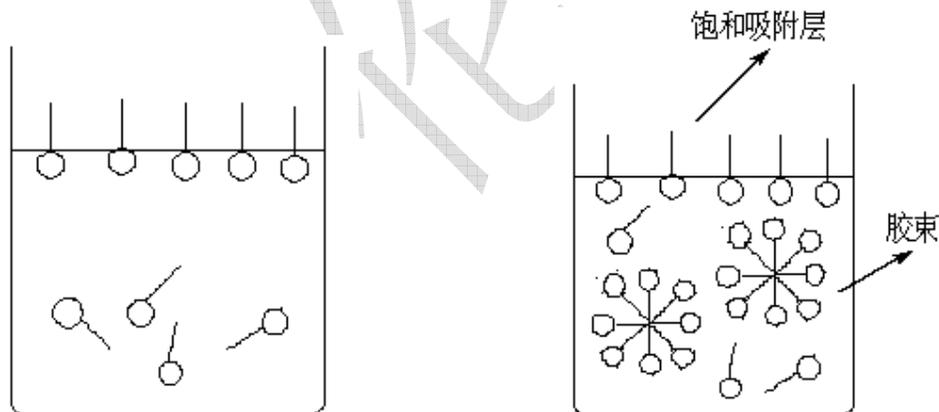
表面活性剂的性质主要由亲水基团决定,因此,表面活性剂通常按照亲水基团结构和性质分类,而亲水基团的结构变化多端,所以总体可以分为两大类:溶解与水后能理解成离子的离子表面活性剂和在水中不能溶解的非离子表面活性剂。离子表面活性剂按其所带电荷种类,还可再分为阳离子、阴离子和两性表面活性剂。

在非离子表面活性剂中，常见的是**聚氧乙烯醚型**。在离子表面活性剂中，常见的阳离子表面活性剂有**季铵盐类、硫铵盐类、磷铵盐类**等，常见的阴离子表面活性剂有长链烷基羧酸盐、长链烷基磺酸盐、长链烷基磷酸盐等，常见两性离子表面活性剂有甜菜碱型、氨基酸型等。



1.3 表面活性剂的作用原理

表面活性剂能在极低的浓度下显著降低溶液的表面张力，与其分子结构特点密不可分。它由疏水基团和亲水基团构成，这两部分分处于分子两端，形成不对称结构（图 1）。因此，这样的分子结构使得表面活性剂一部分与水分子具有很强的亲和力，赋予其分子的水溶性，而另一部分因疏水基团有排斥水分子的性质，使得其分子在水溶液体系中（包括表面和界面）发生定向排列。它们从溶液的内部转移至表面，以疏水基朝向气相（或油相），亲水基插入水中，形成紧密排列的单分子吸附层（图 2a）满足疏水基逃离水包围的要求。这个溶液表面附着表面活性剂分子的过程就是使溶液表面张力急剧下降的过程。因为非极性物质往往具有较低的表面自由能，表面活性剂分子吸附于液体表面，用表面自由能低的分子覆盖了表面自由能高的溶剂分子，因此溶液的表面张力降低[1]。



(a) 溶液表面表面活性剂分子的定向排列 (b) 溶液内部表面活性剂胶束的形成

图 2 表面活性剂分子在表面的吸附和胶束形成示意图

随着表面活性剂浓度的增加，水表面逐渐被覆盖，当溶液浓度增加到一定值后，水表面全部被活性剂分子占据，达到吸附饱和，表面张力不再继续明显降低，而是维持基本稳定。此时表面活性剂的粘度再增加，其分子会在溶液内部形成胶束，排列成另外一种方式（图 2b）。而这个开始形成胶束的最低浓度就被称为**临界胶束浓度度(critical micelle concentration, CMC)**。

表面活性剂的强弱和临界胶束浓度的大小，与其亲水性密切相关。通常用 **HLB (hydrophile-lipophile balance)** 来表示表面活性剂的亲水性，它是亲水基和疏水基之间在大

小和力量上的平衡程度的量度。很明显，HLB 值是一个经验相对数值。目前规定，表面活性剂的 HLB 值的变化范围为 1—40，HLB 值低说明表面活性剂的亲油性强（油溶性的表面活性剂），HLB 值高说明是水溶性强（水溶性的表面活性剂）。根据以上标准，可以估计处每一中表面活性剂的 HBL 值，以及大致估计其相应的应用。HLB 值与表面活性剂性质之间的关系如表 1 所示[1,2]。

表 1 HLB 值的范围与适宜的应用

HLB 值	应用	HLB 值	在水中分散现象
1—3	消泡作用	1—4	在水中部分散
3—6	乳化作用 (W/O)	3—6	分散性不好
6—9	润湿作用	6—8	剧烈振荡后成乳色分散体系
7—15	渗透作用	8—10	稳定乳色分散体系
8—18	乳化作用 (O/W)	10—13	半透明到透明分散体系
12—15	润湿作用	>13	透明溶液
13—15	去污作用		
15—18	增溶作用		

1.4 表面活性剂的功能与应用

1.4.1 润湿功能

1.4.1.1 润湿过程

所谓润湿就是当固体与液体接触时，原来的固—气和液—气表面消失而形成新的固—液界面的现象。通常可用液体在固体表面受力平衡时形成的接触角大小来判断润湿与不润湿。

把不同液体滴在固体表面可以看到两种情况，一种是液滴很快在固体表面铺展形成新的固—液界面，在气、液、固三相交界处的气-液界面与固—液界面之间的夹角叫接触角(θ) (如图 3)。产生润湿的条件是：

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} \geq 0$$

θ 与 γ_{SV} 、 γ_{SL} 、 γ_{LV} 的关系可表示为：

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos\theta$$

(γ_{SV} ：气—固表面张力， γ_{SL} ：液—固表面张力， γ_{LV} 气—液表面张力)

可以看出，在润湿的情况下接触角 θ 是小于 90° 的。

另一种情况是液滴不在固体表面上铺展，而是在固体表面上缩成一液珠，如同水滴加到疏水塑料大卡表面时看到的现象，这种情况叫不润湿，不润湿时接触角 θ 是大于 90° 的。

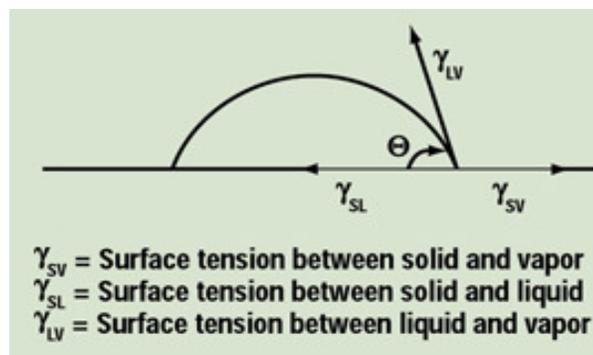


图3 液滴在平滑表面的润湿与接触角

1. 表面活性剂的润湿作用原理

表面活性剂的润湿作用具体表现在两个方面

(1) 在固体表面发生定向吸附

表面活性剂以极性基团朝向固体，非极性基团朝向气体吸附于固体表面，形成定向排列的吸附层，使自由能较高的固体表面被碳氢链覆盖而转化为低能表面，达到改变润湿性能的目的。这种吸附通常发生在高能表面。例如云母为硅酸盐矿物，表面自由能较高，水在其上可以铺展。把云母片浸入离子表面活性剂的溶液中，当溶液浓度达到接近临界胶束浓度时，云母片表面变成疏水表面。这是由于表面活性剂的作用，以亲水的极性头吸附于云母的表面上，以疏水的碳氢链伸入水中，以但分子层覆盖了云母的高能表面，使其自由能和水的相容性降低，水不能在其上府展，润湿性变差（如图4a）。

但当该离子表面活性剂的浓度大于临界胶束浓度以后，表面又变得亲水，水可以在其上铺展。这是因为表面活性剂的粘度增大使，活性剂的负离子的碳氢链可以通过疏水基质检的相互作用（分子间力），在云母表面形成双分子吸附层，活性剂的负离子极性头伸入水中，构成亲水表面，能够被水润湿（如图4b）。可见表面活性剂在固体表面的吸附状态是影响固体表面润湿性的重要因素。

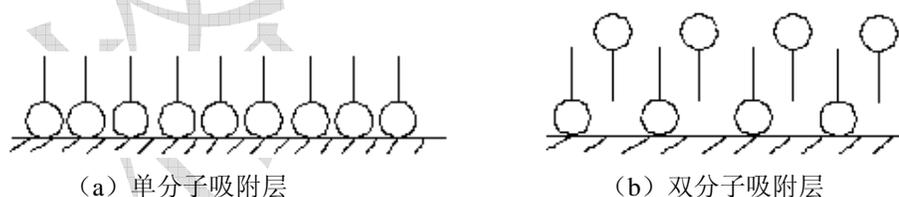


图4 离子表面活性剂在云母表面的吸附

(2) 提高液体的润湿能力

水在低能固体表面（NC膜、玻纤、聚酯膜、无纺布等）不能铺展，为改善体系的润湿性质，常在水中胶乳表面活性剂，降低水的表面张力 γ_{LV} ，使其能润湿固体的表面。

1.4.1.3 常见润湿剂

一种好的润湿剂通常其碳氢链中具有分支结构，且亲水基位于长碳链的中部。润湿剂不仅具有较高的表面活性，还有良好的扩散和渗透性，能迅速地渗入固体颗粒地缝隙间或孔性固体的内表面并发生吸附。

目前作为润湿剂的主要是阴离子和非离子表面活性剂。阴离子型润湿剂有磺酸盐型、

硫酸盐型、羧酸盐型和磷酸盐型，非离子润湿剂有烷基酚聚氧乙烯醚型、脂肪醇聚氧乙烯型、失水山梨酸聚氧乙烯醚单硬脂酸酯型和聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物。

通常表面活性剂在润湿方面常应用于矿物的泡沫浮选、金属的防锈与腐蚀、织物的防水防油处理、农药润湿等方面。

ii. 乳化作用

1.4.2.1 乳化过程

乳化作用是指两种不相混溶的液体(如油和水)中的一种以极小的粒子(粒径为 $10\sim 1\mu\text{m}$)均匀地分散到另一种液体中形成乳状液的作用。把油滴分散到水中称为水包油型乳状液(O/W)，水滴分散到油中则称为油包水型乳状液(W/O)。把能起乳化作用的表面活性剂称为乳化剂。

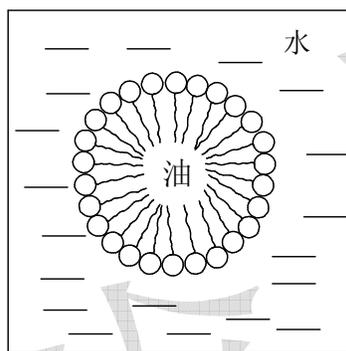


图 5 乳化剂分子在乳液液滴表面定向吸附示意图 (O/W 型乳液)

1.4.2.2 表面活性剂的乳化作用原理

作乳化剂使用的表面活性剂有两种主要作用。一是降低两种液体间界面张力的稳定作用。因为当油在水中分散成许多微小粒子时，就扩大了它与水的接触面积，因此它和水之间的斥力也随之增加而处于不稳定状态。当加入一些表面活性剂作乳化剂时，乳化剂分子的亲油基端吸附在油滴微粒表面，而亲水基端伸入水中，并在油滴表面定向排列组成层亲水性分子膜，使油水界面张力降低，并且减少油滴之间相互吸引力，防止油滴聚集重新恢复水油两层原状。

二是保护作用。表面活性剂在油滴周围形成的定向排列亲水分子膜又是层坚固的保护膜，能防止油滴碰撞时相互聚集。如果是由离子型表面活性剂形成的定向排列分子膜还会使油滴带有电荷，油滴带上同种电荷后斥力增加，也可防止油滴在频繁碰撞中发生聚集。

1.4.2.3 乳化剂

乳化剂在乳液的形成和稳定中起着十分重要的作用，乳化剂种类很多，主要分为表面活性剂、高分子化合物、天然化合物和固体粉末四大种。其中表面活性剂类如画机主要失阴离子型和非离子型表面活性剂，阴离子型润湿剂有羧酸盐型、磺酸盐型、硫酸盐型和磷酸盐型，非离子乳化剂有聚醚型和 Span、 Tween 等聚酯型表面活性剂。

1.4.3 悬浮分散作用

1.4.3.1 悬浮分散过程

把固体微粒均匀、稳定地分散到液体介质中，形成悬浮体的作用叫分散作用。表面活性剂有促进固体分散形成稳定悬浊液的作用，所以添加的表面活性剂又叫分散剂。

分散剂的作用原理与乳化剂基本相同，不同之处在于被分散的固体颗粒比被乳化的液滴的稳定性一般稍差些。图 6 为表面活性剂在固体微粒离子分散过程中的稳定作用的分散。

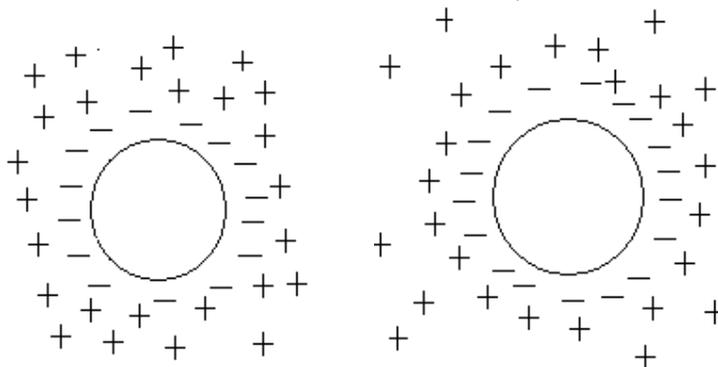


图 6 表面活性剂在离子分散过程中的稳定作用（静电斥力作用）

1.4.3.2 表面活性剂的悬浮分散原理

固体颗粒在外力的作用下，分散于液体介质中，得到一个均匀的分散体系。但是若分散的固体微粒聚集成聚集体，该分散体系就不稳定。导致不稳定性的主要原因有两方面：一是受重力影响粒子会发生沉积，多数情况下分散相粒子较小，布朗运动可在一定程度上阻止粒子下沉。但一经碰撞仍会使其聚集；另一方面由于具有较大的相界面和界面能，固体颗粒总会有自动相互聚集、较少界面的趋势，即热力学不稳定性。

表面活性剂在固体颗粒表面的吸附，能够增加纺织微粒重新聚积的能障，降低粒子聚积的倾向，提高分散体系的稳定性。在水介质中，表面活性剂主要通过范德华力以疏水基吸附于粒子表面，而以亲水基如离子基、聚氧乙烯链伸向水介质，以静电斥力使分散体系稳定（图 6）。在有机介质中，表面活性剂则以极性德亲水基团与粒子通过氢键。离子键等结合，而非极性碳链伸向介质中，其分散作用主要使靠空间位阻产生斥力来实现的。

1.4.3.3 悬浮分散剂

对固体粒子其分散作用的分散剂主要有阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂和有机胺类阳离子表面活性剂。也有采用高分子表面活性剂，以获得更大的空间稳定效应。在应用过程中，必须针对不同的分散体系的特点，选择适当的分散剂。

1.4.3 增溶作用

1.4.3.1 表面活性剂的增溶过程及原理

增溶作用指表面活性剂有增加难溶性或不溶性物质在水中的溶解度的作用。例如苯在水中的溶解度仅为体积分数 0.09%，如果在水中加入少量表面活性剂(油酸钠)，即可使它的溶解度增加为体积分数 10%，而且溶液透明好像真溶液。

增溶作用的发生与表面活性剂在水中形成胶束分不开，胶束内部实际上是液态的碳氢化合物，因此苯、矿物油等不溶于水的非极性有机溶质较易溶解在胶束内部的碳氢化合物中。增溶现象是胶束对亲油物质的溶解过程，是表面活性剂胶束的一种特殊作用。增溶具有以下特点：

(1) 增溶是一个自发过程，该作用发生后，体系更加稳定。其实质是增溶物进入了胶束，而不同于在溶剂中溶解度的提高。

(2) 增溶作用与乳化作用不同。乳化作用是一种液相分散到水(或另一液相)中得到的

不连续、不稳定的多相体系，而增溶作用得到的是增溶液与被增溶物处在同一相的单相均一稳定体系。有时同一种表面活性剂既有乳化作用又有增溶作用，但只有当它的浓度较大，溶液中存在较多胶束时才有增溶作用。

(3) 只有溶液中表面活性剂浓度在临界胶束浓度以上时，即溶液中存在较大较多胶束时才有增溶作用，而且形成的胶束体积越大，增溶量越多。

1.4.3.2 增溶剂

在试剂应用中，表面活性剂的添加两一般都不大，其在相应的溶液中很难达到临界胶束浓度。特别是常见的阴离子表面活性剂，它们的临界胶束浓度普遍较高，如十二烷基硫酸钠，十四烷基硫酸钠和十二烷基磺酸钠。当使用非离子表面活性剂时，由于此类物质的临界胶束浓度较低，在添加量不打的额条件下，容易形成胶束，如脂肪醇聚氧乙烯醚系列表面活性剂等，在使用过程中就有增溶作用。

1.4.4 发泡作用

1.4.4.1 表面活性剂的发泡过程及作用原理

“泡”是液体薄膜包围着的气体。气体分散在液体中的状态称为气泡。如果某种液体容易成膜且不易破坏，这种液体在搅拌时就会产生许多泡沫。泡沫产生之后，体系中液—气表面积大大增加，使体系变得不稳定，因此泡沫易于破裂。

向含有表面活性剂的水溶液中充气或施以搅拌。可形成被溶液包围的气泡。表面活性剂分子的疏水碳氢链伸向气泡的气相中，亲水的极性头伸向水中，在气泡的气—液界面形成定向吸附的单分子膜。当气泡上升至液面时，进一步吸附液体表面的表面活性剂，露出水面与空气接触的部分形成了位于液面两端的双分子膜，此时的气泡由于表面活性剂分子吸附在气体与液体的界面形成定向排列的单分子膜，不但降低了气—液两相间的表面张力，而且由于形成一层具有一定力学强度的薄膜，而使泡沫不易破灭，有较长的寿命。随着气泡不断产生，堆积在液体表面形成泡沫（图7）。

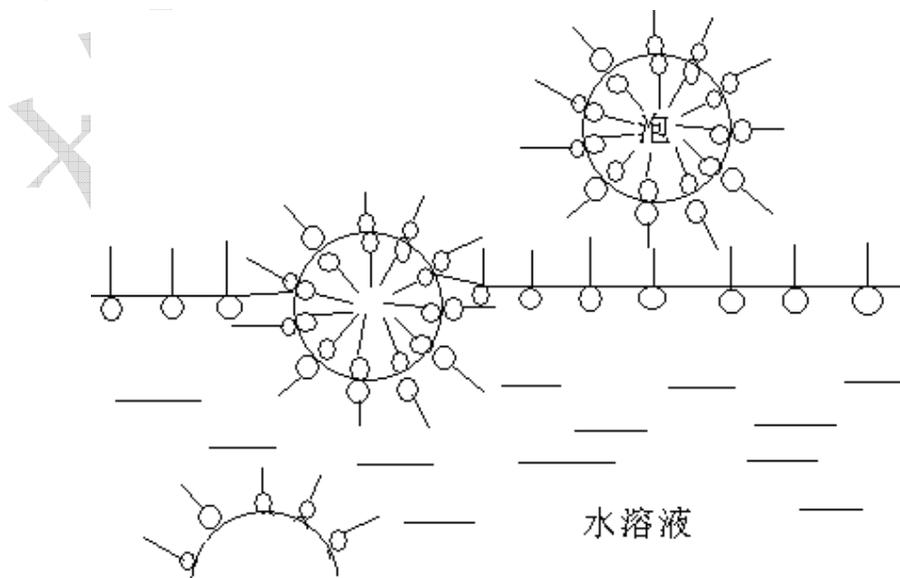


图7 泡沫形成示意图

1.4.4.2 起泡剂

作为起泡剂的表面活性剂要具有较高的表面活性，降低水的表面活性能力越强，越有利于产生泡沫。此外，起泡剂容易在气-液面形成定向排列的吸附膜。目前的研究和应用结果均表明，具有良好起泡性的通常是阴离子表面活性剂。

2. 表面活性剂在快诊产品中的应用

表面活性剂的发展是国内外精细化工发展的一个重要方向，目前已广泛应用于纺织、造纸、医药、食品、皮革、石油开采、橡胶、塑料等行业。

而最近十年来，随着检验医学的蓬勃发展和对疾病的全球性监控，快诊产品有了突飞猛进的发展，从而使免疫检测设计已经成为备受瞩目的领域。特别是胶体金\乳胶免疫层析试纸条在快速诊断产品中占据了大壁江山。表面活性剂由于应用在快诊试纸条各个部件中，其在快诊产品中的应用与研究也越来越广泛和深入。

2.1 金标\乳胶快诊产品简介

在过去的十年里，以硝酸纤维素膜为载体的侧向层析快诊技术为免疫金标试剂开创了巨大的市场份额。该产品可检测多种分析物，简单快速，单份测定、除试剂外无需人员培训和专业设备，因而广泛应用于诊断和检测感染性疾病、药物、心肌标志物、肿瘤、早孕以及兽医等领域。

该产品主要由五个部件组成(见图8)：样品垫 (sample pad)、标记垫 (lable pad) (一般为标记好蛋白的金标或标记好蛋白的乳胶)、点好蛋白的NC膜 (striped NC)、顶部垫 (top pad) (一般为滤纸)和作为背衬的塑料大卡 (plastic pad)。

该产品的作用原理是：往样品垫 (sample pad) 滴加一定数量的血清\血浆\全血、尿液或唾液，由于毛细管作用，样品将会与lable pad上标记好的金标\乳胶一起向前移动，当移动至固定有抗体\抗原的T线区域时，样品中相应的抗原\抗体即会与该蛋白发生特异性结合。由于使用免疫胶体金\免疫乳胶染色，T线区域就会显示一定的颜色，从而实现特异性的免疫诊断。根据标记物显色方式的不同，可分为夹心法 (双抗原夹心法和双抗体夹心法)、竞争法和间接法。

这种方法只需一步加样, 30 min内就能判定结果,因而具有敏感性高, 特异性强, 稳定性好, 操作简便、快速,分析结果准确, 易于判定的优点。当然随着胶体金快速检测技术的逐步完善, 还可以对一个样品进行多项检测[3], 也可以进行半定量或定量检测等, 使其更易得到市场的青睐, 实现多项检测即在同一膜上作多种项目测定, 一次检测可同时得到一组结果, 这对于检测某些具有联检意义的物质具有很大的应用价值。

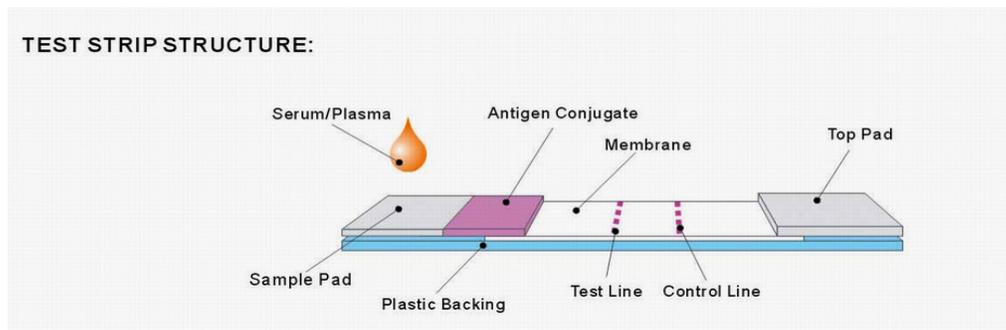


图 8

2.2 快诊产品中常用表面活性剂种类及作用

2.2.1 常用表面活性剂简介

在胶体金/乳胶快诊试纸条产品的研发过程中，不可避免的都会用到表面活性剂。各个公司的研发人员纷纷选用不同的表面活性剂，添加到 sample pad、lable pad、NC 膜、膜封闭液和跑板 buffer 中，以改善产品的性能，得到质量优异的快诊产品。通常在研发阶段，研发人员会就产品的某一部件进行优化，常常会添加许多不同的表面活性剂，进行表面活性剂的筛选工作。由于表面活性剂种类和规格众多，这无疑是一项耗时费力的工程。但是对于具有一定研发经验的人员而言，表面活性剂的筛选一般在一定范围内进行。该范围的选择通常视公司和产品开发的需求所定。相对而言，筛选工作缩小到一定范围，大大提高了工作效率。目前来看，每个公司的表面活性剂筛选范围各有差异，但是大同小异。

在研发阶段，筛选表面活性剂工作一般围绕一个表面活性剂的套装范围展开。这个套装就是 BIODOT 很早以前出品过表面活性剂的套装，分别以 S 开头来编号，共 25 种，即 S1—S25，其基本介绍见表 2。此套装原来在国外有销售，国内只有少量代理经销商有货。

纵观国内外各大 IVD 公司的快诊产品，不难发现，**表面活性剂 S9 (Tetronic 1307)、S14 (TRITON X-100)、S19 (TWEEN 20)、S20 (TWEEN 80) 和 S21(BRIJ 35)应用频率极高**，所以通常研发人员在开发新产品或改进老产品时，在一定的表面活性剂范围内，首选以上这几个表面活性剂先进行相应的研究实验。

表 2 BIODOT 表面活性剂套装简介

编号	商品名	种类	HLB 值	分子量	作用
S1	NINATE 411	A		385	溶剂相容性，良好的增溶剂和乳化剂。
S2	Pluronic F68	N	>24	8400	卓越的增溶剂和去污剂；可能具有非溶血性。
S3	Zony FSN 100	N			低浓度时是卓越的润湿剂，可溶于 30%酒精和碱液。
S4	Aerosol OT100%	A		445	在溶剂/TMB 系统中具有功效，优良的润湿剂和乳化剂，具有优良的防雾、典型的释放和分散性质。
S5	GEROPON T-77	A		425	具有良好的润湿和扩散性质。
S6	BIO-TERGE AS-40	A		315	温和，溶剂相容性。
S7	STANDAPOL ES-1	A		345	强阴离子表面活性剂。结构中含有两部分月桂醇硫酸五钠盐。
S8	苯 甲 胺 氯 (C8-C18)	C		混合物	抗菌，溶剂相容性。
S9	Tetronic 1307	M	>24	18600	非溶血性，溶剂相容性，抗静电，优良的消泡剂和分散剂。
S10	Surfynol 465	N	13	混合物	非溶血性，优良的润湿剂和消泡剂。
S11	Surfynol 485	N	17	混合物	非溶血性，酶相容性，优良的润湿剂和消泡剂。
S12	IGEPAL CA210	N	4.6	272	溶剂相容性，优良的乳化剂。

阳离子和阴离子表面活性剂，不但毒性大，而且还有较强的溶血作用。吐温类的溶血作用通常比其他含聚氧乙烯基的表面活性剂小，其溶血作用的顺序是：吐温 20>吐温 60>吐温 40>吐温 80。

Tween 80 含亲水性和疏水性的长链，在使用过程中最好控制浓度，不要一味追求高灵敏度，添加该表面活性剂浓度过高。因为它的分子结构中 PEG 长链带来过多的空间位阻，从而会影响了活性蛋白之间的作用，降低产品的灵敏度。

2.2.2.2. Triton X-100

Triton X-100 外观为棕色油状液体，能溶于冷水，并有强烈的起泡性能，是优良的乳化剂、润湿剂和分散剂。

Triton X - 100 是一种不带电荷的非离子型表面活性剂，对氨基酸、蛋白类物质没有类似的变性作用[7, 8]。这点性质对于其应用于免疫层析领域有着主要作用。因为像常见的十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)属于带负电荷的离子型表面活性剂，是一种破坏性较强的蛋白变性剂，所以在免疫层析检测中绝对慎用此类表面活性剂。免疫细胞化学中，Triton X-100 常用浓度为 1%和 0.3%，但通常是先配制成 30%的 Triton X-100 储备液，临用时稀释至所需浓度。它能溶解脂质，以增加抗体对细胞膜的通透性。1%的 Triton X-100 常用于漂洗组织标本，0.3%的 Triton X-100 则常用于稀释血清，配制 BSA 等。

2.2.2.3 Tetronic 1307

Tetronic 属于聚氧乙烯型两性离子表面活性剂，具有较高的相对分子质量，可达 30000。由环氧乙烷与环氧丙烷与二元胺发生共聚反应，环氧乙烷与环氧丙烷的比例可以从 50：50 至 90：10 或 10：90。Tetronic 为其商品名，其结构如图 10。

Tetronic 为聚乙二醇辛基苯基醚，其亲脂端为聚乙二醇辛基苯基，亲水端为醚链，其分子式为 $C_{34}H_{62}O_{11}$ ，结构式为 $(CH_3)_3CCH_2C(CH_3)_2C_6H_4(OCH_2CH_2)_{100}H$ ，是常用的非离子性表面活性剂，增溶作用较离子型表面活性剂强[9]。由于氮原子上有孤对电子对，所以具有弱氧离子的效应，但相对分子质量较大时，氮原子上的孤对电子对被掩盖，几失去氧离子的效应。因此 Tetronic 产品常用作消泡剂和破乳剂。Tetronic 1307 是环氧丙烷-环氧乙烷-乙烯基二元胺共聚物，属典型的两性离子表面活性剂。其 HLB 值大于 24，是在免疫层析技术范围内少见的水溶性极为优越的表面活性剂。

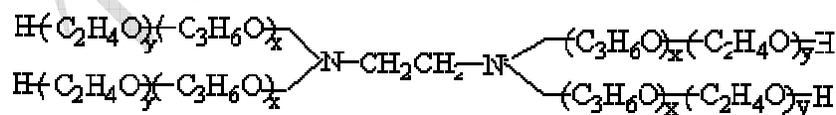


图 10 Tetronic 的结构

Tetronic 1307 既具有良好的界面活性，又兼备阴、阳离子表面活性剂的优点，同时还具有良好的乳化能力、分散能力和抗静电作用等[9]。与其他表面活性剂比较，两性表面活性剂既不易受无机电解质的影响，又无浊点现象，而且无论吸附到正电荷还是负电荷的界面上都不会形成疏水表面，这些特点使其在许多领域比非离子表面活性剂具有更广泛的应用潜

力[10-12]。所以，Tetronic 1307 (S9) 在快诊断试纸条产品中的应用频率略显大于其他表面活性剂。这也是研发人员喜好首选此表面活性剂的原因之一。

但是两性离子表面活性剂的生产和研究起步较晚，品种远少于非离子型表面活性剂，因而限制了它们的应用。目前在使用的试剂盒中，25 种表面活性剂仅有一个 Tetronic 1307 为两性离子表面活性剂，而非离子表面活性剂居多。

2.2.2.4 BRIJ 35

Brij 35 是十二烷基聚乙二醇醚，其亲脂端为硬脂基，亲水端为聚乙二醇 PEG (poly ethylene glycol) 1000 长链，属于非离子性表面活性剂。由于其亲脂端与蛋白的疏水基团一致，这样其亲水端 PEG 可以有效地与样品中的液体结合，从而起着一定的润湿作用。另外，用带有 PEG 长链的非离子性表面活性剂 Brij 35 通过在蛋白的表面形成水化膜来提高蛋白的稳定性。商品名为 芊泽、布里杰。

Tween 80 和 Brij 35 均是常见的药用活性剂，含亲水性和疏水性的长链，在使用过程中最好控制浓度，因为浓度过大，产品的灵敏度不仅不会按照预期的增大，反而会下降。其原因很可能是由表面活性剂高分子中的 PEG 长链带来过多的空间位阻，从而阻断了活性蛋白与标记物表面受体蛋白的作用。

2.3 表面活性剂在快诊产品的样品垫中的应用

2.3.1 样品垫 sample pad 简介

样品垫 (sample pad) 是免疫快速测试试剂条中重要组成部分。样品垫作用通常为接手待检样品，使样品均匀分布，一般含有化学试剂可以修饰样品组成，还起到预过滤作用。

样品垫有许多不同材质，常见的有玻纤 (glass fiber)、滤纸 (filter paper)、无纺布 (nonwoven fabric) 等，其中以玻纤居多。以下的介绍也以玻纤为主。样品垫的物理性质、化学成分、处理方式以及样品垫材质本身的材料质地都对测试试纸条的实验结果产生重要的影响。大量的实验表明：样品垫材料的特性直接影响快诊产品的灵敏度和特异性，这恰恰是产品质量好坏的标准。所以在调试快速测试试纸条产品的时候，不能忽视该部件的作用。另外，在对产品改进的同时，该部件是一个重要的环节。

玻纤是一种性能优异的无机非金属材料。它是以玻璃球或废旧玻璃为原料经高温熔制、拉丝、络纱、织布等工艺，最后形成各类产品。玻璃纤维单丝的直径从几个微米到二十几个微米，相当于一根头发丝的 1/20-1/5，每束纤维原丝都有数百根甚至上千根单丝组成。玻纤在处理前称为光玻纤，通常光玻纤不能用在测试试纸条中，必须经过一系列的工艺处理之后，才能使用在快诊断测试试纸条中。通常处理玻纤溶液含有添加蛋白质、去污剂、粘性增强剂、缓冲盐等物质。

2.3.2 表面活性剂在玻纤中的应用

2.3.2.1 玻纤处理液构成

光玻纤要可使用一些化学物质浸渍处理，减少样品成分的差异并提高试验的灵敏性。通常加入表面活性剂、粘度增强剂、封闭剂和盐溶液润湿玻纤然后加以干燥。这个处理避免了使用复杂的缓冲溶液，并使之成为真正的一步检测。下面主要结合本人在乙肝 HBsg-302a 产品基础性实验的玻纤优化部分作一介绍。

一般缓冲液的构成是：磷酸缓冲液（或其他缓冲液）+ 作用物质（针对某一特定问题）

+pH调整。通常而言，配方宜简不宜繁，根据需要调加作用物质，原来很多需要添加的作用物质，由于目前膜制造技术的改进已经不需要再添加（这个在后面内容会有涉及）。总之，优秀的样品垫，是以上几种物质作用综合的结果，而并不只是单一物质发生作用。

2.3.2.2 玻纤处理液的缓冲盐成分

在设计快诊产品的玻纤溶液时，首先考虑选用一定的缓冲溶液。推荐的缓冲体系为 0.01MPBS pH7.0-7.4 这样的环境下，许多抗原抗体都有较好的适应性。但是是否这个缓冲环境最好，很难确定。因为对于不同的抗原抗体，都有各自的特性，筛选最合适的缓冲体系，还是需要作进一步的考察。

目前产品的玻纤缓冲溶液一般为 PBS 磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液和硼砂缓冲液。例如对于人的尿液等标本，要求比较稳定的玻纤系统，尿液 PH 值在 5 到 10 之间，PH 值和离子强度的变化会影响产品的灵敏度和特异性，增强蛋白质的非特异性结合，所以一般在吸收尿液的玻纤中加入适当的硼酸盐缓冲液，可以增加稳定性。

本人在近期的乙肝 HBsg-302a 基础性实验中发现，对乙肝表面抗原的玻纤溶液体系，磷酸缓冲盐溶液、Tris 盐酸缓冲液和硼砂缓冲液对蛋白的特性影响均不明显，三种缓冲液在配加相同浓度的表面活性剂（S91%）处理的玻纤，搭配相同的片材和金标，灵敏度和特异性均没有出现差异。所以推测可能乙肝表面抗原抗体对缓冲体系的适应性较好，一般常见的缓冲体系均能作为乙肝 HBsg-302a 产品玻纤处理液的缓冲成分。

当然研发人员在筛选缓冲体系过程中，倘若发现同时有几个缓冲体系适合，就可能会根据个人或公司风格，综合考虑成本因素，确定某一缓冲体系。多数产品的样品垫处理液是选用 Tris-Casein 体系，即在样品垫中添加的缓冲盐成分为 Tris。像在传染病产品中的 HP、丙肝、爱滋、StrepA、Mono、RSV 还有心肌产品大多就是使用 Tris 体系的玻纤作样品垫。而乙肝快诊试纸条中，需求最多的产品是 HBsg-302a，其玻纤的缓冲体系是硼砂缓冲体系，而乙肝的其他产品，特别是乳胶产品，大多数选用 Tris 缓冲体系。

2.3.2.3 玻纤处理液表面活性剂成分

A.表面活性剂的大致作用[13-17]

而对于作用物质而言，一般肯定会添加表面活性剂，以增加亲水性，还可避免线条中空现象，还可增色。

a. 增加亲水性

这一点特性，显而易见。

因为光玻纤是一种多孔性物质，有着巨大的表面，且光玻纤很难快速吸收水分子。这对于光玻纤能否应用于快诊试纸条无疑是个致命弱点。但是，往玻纤处理液中添加一定的表面活性剂之后，光玻纤难以润湿的现象立刻改观。因为当添加有表面活性剂的玻纤与滴加的液体标本接触时，原来的固-气和液-气表面消失而形成新的固-液界面，当溶液沿着玻纤铺展时会渗到纤维的空隙里并将空气驱赶出去，把原来的空气-玻纤接触面变成液体与玻纤的界面，玻纤被润湿。而样品溶液同时会进入玻纤内部，玻纤被渗透。这样有助于更多更快地吸收样品标本，并实现快速地与玻纤内各种组份发生作用，在一定的缓冲体系下，抗原或抗体维持一定的空间构型和构象，连续均匀地释放到快诊试纸条的上一部件标记垫中，有助于待

检测物质与金标/乳胶标记物发生结合。

膜方面的作用同样值得指出，应用于快诊断纸条的硝酸纤维素膜是疏水性的，虽然膜制造商会应客户要求对 NC 膜进行一定的亲水性改进，但是对于快诊断产品的跑板而言，这没有太大作用。所以，往玻纤中添加一定浓度的玻纤十分必要。添加了表面活性剂的玻纤，在进行测流检测时，大大改善膜的疏水性，赋予其一定的亲水性，有助于样品标本和金标/乳胶标记物在 NC 膜上以适当的速度跑板并发生特异性结合，显示一定的灵敏度。

另外一方面，由于光玻纤一般不会直接应用于快诊断纸条，所以通常会采用配置玻纤处理液，人工手动加液或机器浸泡处理光玻纤。但是由于玻纤处理液中一般会添加了盐、蛋白、防腐剂、粘度增强剂等成分，使得处理光玻纤时浸润过程较为困难，添加一定的表面活性剂后，处理过程的润湿渗透环节相对快速容易了。

还有一点，某些快诊断纸条的玻纤中会添加有一定量的抗原或抗体或是某些蛋白 (BSA, Casein, Goat serum)，**表面活性剂的存在也起着一定的稳定作用。**

最后还要说明的是，在检测快诊断纸条的时候，某些试纸条会出现略微的 T 线反白现象，这点本人在乙肝 HBsg-302a 的基础性实验中就遇到过（见图 10）。当确定下玻纤处理液的缓冲盐成分后，接下来开展的表面活性剂筛选过程中，就有好多添加了表面活性剂的玻纤出现反白现象，而且有些严重些，有些程度较轻。关于反白现象，在试验摸索和研究过程中，慢慢作出总结和体会。

首先，**在玻纤处理液中只含有缓冲盐成分不添加表面活性剂，相应的试纸条会出现很明显的 T 线反白现象，还出现背景不干净，金标残留现象**（见图 10）。之后，往含有缓冲盐成分的玻纤处理母液中添加 S9 (Tetronic 1307)、S14 (TRITON X-100)、S19 (TWEEN 20)、S20 (TWEEN 80) 和 S21(BRIJ 35)这五种表面活性剂，当然每种表面活性剂的添加浓度设立一定梯度，搭配同样的片材和金标，T 线会出现不同的状况。对于 S21(BRIJ 35)，在 0.1%—3% 范围内，所有片材均出现反白现象。说明该表面活性剂不合适应用于此 HBsg-302 玻纤体系。而对于 S9 (Tetronic 1307)、S14 (TRITON X-100)、S19 (TWEEN 20) 和 S20 (TWEEN 80)，发现低浓度添加量下，片材会有反白现象，表面活性剂浓度增大，反白现象有减弱，当添加量增大到一定浓度，反白现象可以消除，且背景干净。但是不同的表面活性剂，关键浓度有不同。

在 HBsg-302a 基础性试验中经过摸索发现 S9 (Tetronic 1307)、S14 (TRITON X-100) 当浓度达到 1% 以上时，无反白现象。而 S19 (TWEEN 20) 和 S20 (TWEEN 80) 添加量达到 0.5% 时，就可改善 T 线反白现象。

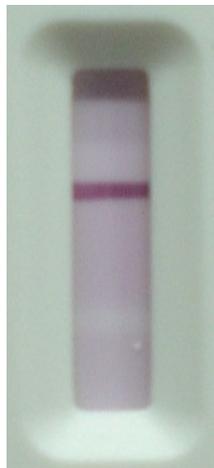


图 10 出现 T 线反白现象的快诊断试纸条

一般而言，对于成熟的产品，若是按照正常程序添加适当浓度的表面活性剂，配制玻纤溶液，处理玻纤，最大限度的减少 NC 膜对被检测物质和金标的吸收，得到的试纸条一般不会出现异常现象，背景干净且无 T 线反白（见图 11）。

但是在调试过程中常会有产品出现反白现象。对于这类产品，T 线反白现象是一直存在。其主要原因应该是该产品的缓冲系统不匹配造成的（C/T 线稀释溶液，金标稀释溶液等）；特别是这类产品的 Sample Pad 是未经处理的滤血纸，相对来说就没有缓冲能力。

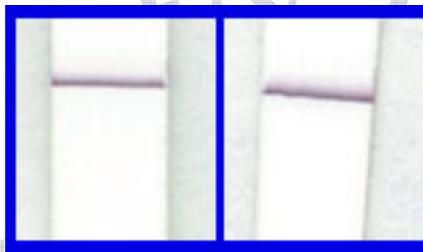


图 11 优质快诊产品背景干净

所以，出现 T 线反白现象的原因有多方面，一种原因是膜的供应提供的批次膜质量不均一，在对膜进行表面活化处理的时候，添加的物质不均匀，导致一卷膜的某个区域疏水性大，某个区域疏水性小。一般这种状况出现得较少。另外一个原因，也就是最重要的问题就是表面活性剂的问题。如果在产品的玻纤溶液中添加的表面活性剂浓度较小，或是搅拌不充分，或是处理玻纤过程中没有均匀处理玻纤，就有可能导致异常现象。产生 T 线反白现象，主要是由和膜所结合的蛋白（抗原或抗体）的疏水性质导致的。蛋白质是两性物质，和表面活性剂一样，它既有亲水键也有疏水键。蛋白质与疏水的硝酸纤维素膜通过一定的静电力、疏水作用力等分子间作用力相结合，当含有一定表面活性剂的流体流过 T-线位置时，亲水键裸露在外空间的蛋白质可以很容易的被润湿。而对于疏水键裸露在外空间的蛋白，由于表面活性剂的疏水链会与蛋白的疏水键相结合，表面活性剂的亲水链与流体的水分子结合，也能够被润湿，从而实现蛋白与标记的金标或乳胶的特异性结合，在 T 线位置显色。但是，倘若该种蛋白疏水基性能较强，疏水基链长且在膜上空间裸露较多，那么以通常情况下的表

面活性剂浓度作用而言,是难以克服反白现象的。这是只要适当的增大相应表面活性剂的浓度,反白现象就会有改善。

b.避免线条中空和现象,

这也是表面活性剂的一大功能。线条中空,C/T线显色时,信号中间好像有些地方没有覆着金标或乳胶,而信号不饱满,也就是测试条的C线或T线颜色不均,线条中间有明显的空白区域。在开发某一快诊产品过程中,也会出现线条中空现象。

一般有两原因导致此现象。一是是表面活性剂的亲水作用不够,而是金颗粒或乳胶颗粒太大或不均一导致。一般的解决方法一是适当的增大表面活性剂的浓度,提高金标的再溶解能力,增大产品的亲水性能,二是采用质量较佳的金颗粒或乳胶颗粒,大下尺寸尽量一致,CV值要小。如BBI公司提供的胶体纳米金颗粒就可以保证CV值小于8%。动态光散射结果显示每一批次的金颗粒大小均在窄幅区间内波动。

一般可通过以下措施优化进行优化:①提高C/T线的点膜原料浓度;②在C/T线中加入一些物质改善溶液性状,如:各种表面活性剂,甲醇/乙醇,糖等;③可优化改变金标或乳胶的原料包被比例。

c.增色和增加灵敏度

关于增色,就是线条强度增加,也就是说适当的添加表面活性剂,还可以提高一定的灵敏度,且在一定浓度范围内,表面活性剂浓度增大,灵敏度相应提高。

各大公司在开发新的快诊试剂条时,都纷纷亲睐选用S9(Tetronic 1307)、S14(Triton X-100)和S19(TWEEN 20)这三种表面活性剂。而且在研究过程中发现,以上这两种表面活性剂的确对许多产品都有很好的提高灵敏度的功效。

但是就某些表面活性剂和某些产品的抗原抗体而言,添加量超过一定浓度后,表面活性剂浓度越大,灵敏度反而会略有下降。所以不能一味的追求灵敏度的提高而添加大量的表面活性剂。添加大量的表面活性剂可能会带来一些预料不到的麻烦,例如假阳性、灵敏度下降、跑板速度变慢或便快等。

我们在HBsg-30a的基础性试验中,发现S9(Tetronic 1307)增色效果特别突出。我们选用了不同浓度的S9、S14、S19、S20和S21分别添加在Tris、硼砂两个玻纤系统中。产品在跑板过程中,仅仅从产品的可视窗口就会发现,添加S9的产品,其对应的液流的颜色最深,金标和添加的样本结合最为完全,流速适中,最后的读数结果显示,相同浓度的表面活性剂,添加S9的产品线条强度一般高半个或一个档次。而且对于S9(Tetronic 1307)这一表面活性剂,我们发现,浓度从5mg/ml增大到40mg/ml,HBsg-30a产品的灵敏度有了很大的增大。如表3所示,浓度从5mg/ml增大到20mg/ml,T线强度缓慢递增,当浓度从20mg/ml增大到40mg/ml,T线强度明显快速增强。随着浓度增大,不难发现,会有假阳性现象出现。如在30—40mg/ml浓度中,产品的灵敏度提高很大,但是假阳性现象频率液增大。这个可能是表面活性剂浓度过大,过多的暴露出活性蛋白的结合位点,包括特异性结合位点和某些非特异性结合位点。所以如此高的浓度是不能选用的。

对于S19(Tween20)的研究表明(见表3),浓度增加可以提高灵敏度,但是增加到一定程度,灵敏度就处于同一水平,很难再有提高。因为当表面活性剂浓度超过其临界胶束浓度(CMC)后,再增加表面活性剂只能增加液相主体内胶束的浓度,而界面吸附量并无多大改变,此时已达到最佳助溶效果,故再增加吐温—20对提高产品的灵敏度无明显作用。对于吐温80和Brij 35,也有着类似的规律。

对于S20(Tween 80) 和S21(Brij 35), 如表3数据显示, 在硼砂缓冲盐和Tris缓冲盐体系中, 在浓度0.1%—2%范围内, 表面活性剂的用量与产品的灵敏度的提高呈正比趋势。这与一般规律是符合的。即使用表面活性剂作为增溶剂和亲水剂, 需要加入足够的量, 才会有最佳效果, 从而是活性蛋白的结合位点充分暴露, 与目的结合蛋白充分接触。但是当浓度增大到较高的3%时, 产品的灵敏度不仅没有按照预期的增大, 反而会下降半个档次。当然产品灵敏度下降, 这在设计产品中是非常不愿意呈现的一面。其原因很可能是由S20(Tween 80)和S21(Brij 35)结构中的PEG长链导致的。表面活性剂高分子PEG长链会带来一定的空间位阻, 当然在表面活性剂低浓度时该位阻作用对产品灵敏度的影响未能体现, 当表面活性剂浓度增大到一定范围时, 位阻作用较强, 对产品的影响较强, 从而屏蔽了抗原活抗体与标记物表面受体蛋白的作用。当然在这方面的研究的确不多, 可能受试验条件的局限影响, PEG链的形状和作用机理都有待进一步的考察。

Table 3 Performance of different surfactants on HBsg-302a products

1. Striped NC* matched with Label pad (semi-product, CG07070089 HBSG)

No.	Surfactant Con.	Background	T-line white	Flow rate	2 ng/ml	20 ng/ml	Negative samples	Specification
Reference EG07070013	/	Clear / Weak pink	No	OK	G3 ↓ — G3	G7 ↓	G1 × 20	Background showed streams
A*-S9-1#	S9 5mg/ml	Weak pink	No	OK	G3 ↓	G6	G1 × 20	Background showed streams
A-S9-2#	S9 10mg/ml	Weaker pink	No	OK	G4	G7 ↑	G1 × 20	Background showed streams
A-S9-3#	S9 20mg/ml	Weaker pink	No	OK. A little lower than that of reference	G4 ↑ — G5	G8 ↓	G1 × 20	Background showed two or three streams.
A-S9-4#	S9 30mg/ml	Weaker pink	No	OK A little lower than that of reference	G6 ↓ — G6	G8	G1 × 18 G2 × 2	Background showed one stream.
A-S9-5#	S9 40mg/ml	Clear	No	OK A little lower than that of reference	G6 ↓	G8	G1 × 18 G2 × 1 G3 × 1	
A-S14-1#	S14 10 mg/ml	Clear	No	OK	G3 ↑ — G4 ↓	G7	G1 × 20	Stirred for hours, mixed well.
A-S14-2#	S14	Clear	No	OK	G2 —	G6	G1 × 20	Mixed unwell.

	10 mg/ml				G3			
A-S14-3#	S14 20 mg/ml	Clear	No	OK	G4 ↑ — G5	G7 ↑	G1 × 20	Mixed unwell.
A-S14-4#	S14 20 mg/ml	Clear	No	OK	G3 — G4	G6 ↑	G1 × 20	Mixed unwell.
A-S20-1#	S20 mg/ml	Clear	No	OK	G4 — G4 ↑	G7 ↑	G1 × 20	Gold and sample flow are separated a little.
A-S20-2#	S20 mg/ml	Clear	No	OK	G4	G7 ↑	G1 × 20	
A-S20-3#	S20 mg/ml	Clear	No	OK	G4 ↑ — G5 ↓	G7 ↑	G1 × 20	
A-S21-1#	S21 mg/ml	Unclear	Exhibit	OK	G3 ↓ — G3	G7	G1 × 20	
A-S21-2#	S21 mg/ml	Unclear	No	OK	G3 ↓ — G3	G7	G1 × 20	
A-S21-3#	S21	Unclear	No	OK	G3 ↓ — G3	G7 ↓	G1 × 20	
A-S21-4#	S21	Unclear	No	OK	G3 ↓ — G3	G6 ↑	G1 × 20	
A-S21-5#	S21	Unclear	No	OK	G2 — G3 ↓	G7	G1 × 20	
A-S21-6#	S21	Unclear	No	OK	G3	G7	G1 × 20	
B*-S9-1#	S9	Clear	No	OK	G3 ↑ — G4	G7 ↑	G1 × 20	
B-S9-2#	S9	Clear	No	OK	G4 — G4 ↑	G7 ↑	G1 × 20	
B-S9-3#	S9	Clear	No	OK	G6 ↓ — G6	G8 ↓	G8 ↓	
B-S9-4#	S9	Clear	No	OK	G5 ↓ — G6	G8	G8	
B-S9-5#	S9	Clear	No	OK	G7 ↓ — G7	G10	G1 × 15 G2 × 1 G3 × 4	
B-S14-1#	S14	Clear	No	OK	G3 —	G6 ↑	G1 × 20	Gold and

					G3 ↑	-G7		sample flow are separated a little.
B-S14-2#	S14	Clear	No	OK	G2 ↑— G3	G7	G1×20	
B-S19-1#	S19	Clear	No	OK	G4 ↓— G4	G7 ↓	G1×20	
B-S19-2#	S19	Unclear	No	OK	G4 ↓— G4 ↑	G7 ↓	G1×20	
B-S20-1#	S20	Weak pink	No	OK	G3— G4 ↓	G6	G1×20	After 15min, the background is OK.
B-S20-2#	S20	Weak pink	No	OK	G3— G3 ↑	G6	G1×20	
B-S20-3#	S20	Weak pink	No	OK	G3 ↓— G3	G7 ↓	G1×20	Gold and sample flow are separated a little.
B-S20-4#	S20	Weak pink	No	OK	G3— G3 ↑	G7	G1×20	
B-S21-1#	S21	Clear	No	OK	G2-G3	G6	G1×20	Gold and sample flow are separated a little.
B-S21-2#	S21	Clear	No	OK	G2	G6	G1×20	
B-S21-3#	S21	Weak pink	No	OK	G2— G3	G6	G1×20	
B-S21-4#	S21	Clear	No	OK	G2	G6	G1×20	

PS:

Striped NC(pre-sample) self-made

No.	T-line code	Original Conc. (mg/ml)	Working Conc. (mg/ml)	Spray Vol. (ul/cm)
NC1#	1020000301(HBsAg-1)	6.0	2.5	1.0
T-line buffer	2010001501	/	/	
NC membrane	1030005500	MilliporeHF135	Provided by Pluto Cui	

A: 硼砂缓冲盐体系 B: Tris 缓冲盐体系

d.避免背景 stream 现象和背景不净现象

stream 现象就是在跑板过程中发现窗口出现融合了金标的样品流体在向上跑板过程中,背景出数条深浅不一的竖直方向的线条(见图 12 A、B),而正常情况下背景应该是跑板过程中,金标和样品标本以基本一致的速度向吸水垫方向流动,且流体深红色色泽,且色泽均一。这种情况在调试过程和完成品的跑板过程中也会有出现。

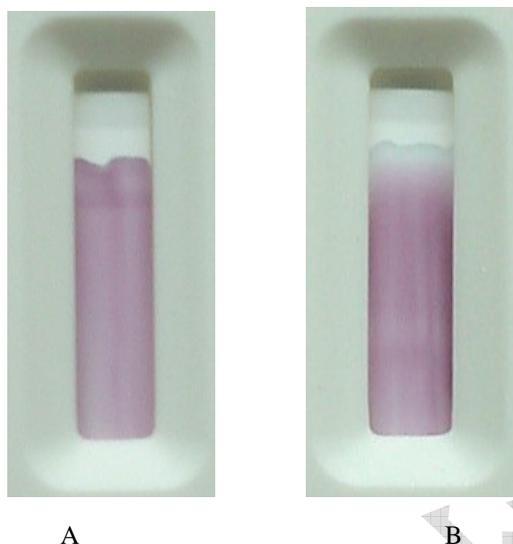


图 12 跑板时出现 Stream 现象的快试试纸条背景

导致 stream 现象的原因可能有三，一是表面活性剂的浓度偏小，亲水性能不够，一般这个原因的可能性较小，但也是有一定的作用。还有一部分原因可能是玻纤中的粘度增强剂 (PVP) 的添加量不够所致。PVP 有助悬、增稠和保护胶体作用，也有一定的金标粘合作用，提高金标的再溶解能力，在跑板过程中，有助于标记物与滴加的样本中成分结合，也有助于标本的均匀释放。所以适当的添加表面活性剂和 PVP，能在一定程度上改善 stream 现象。最后一个原因在于承载金标的是聚酯膜。这也是可能性最大的原因。由于聚酯膜是一种聚合物，表面非均一，具有众多孔结构，点有金标的聚酯膜，在遇到溶液，释放金标过程中，由于表面结构有差异，从而使金标释放出现差异，直接导致快诊产品跑板出现 stream 现象。一般这种现象在金标 OD 值较高时候会出现。Flu 产品虽然是使用金标的，但是由于该产品是将金标直接处理在滤纸上，所以没有出现过以上现象。判断是否是聚酯膜结构引起 stream 现象的方法，可以在快试试纸条上，取下点有金标的聚酯膜，直接用吸管滴加少量金标，观察背景。若此时背景良好，无深浅不一的线条，则说明聚酯膜的孔结构是直接原因。对于出现这种现象的解决方法，一般若是在判读时间背景无 stream，则该产品质量仍合格，若是 STREAM 严重，则需要改进工艺，或直接换一批聚酯膜，降低金标 OD 值。

在使用快诊产品过程中，在观察跑板现象时，会有金标（或乳胶）和样品液分离的情况。如图 12，A 图为金标和样品液结合较佳的产品，B 图金标和样品液分离明显。一般分离较为厉害的产品，其相应的灵敏度会受到影响，与正常结合的产品比较，灵敏度一般都有下降。有时候在研发或调试产品时会发现试纸条的背景很不干净（见图 13），金标有时会滞留在膜上，导致判读受到极大的影响，由于背景留有金标或乳胶的颜色，人为判读通常会下降半个到一个档次。

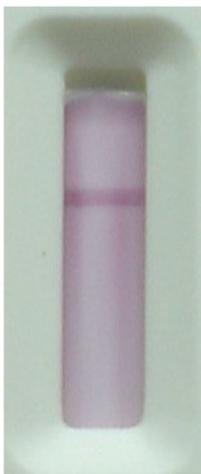


图 13 背景不干净的快诊试纸条

导致背景不干净的原因有好多，比如膜孔径太小，金标颗粒太大，在向上测流过程中直接堵住了膜；试纸条装配过程中出现拱板现象，使得试纸条不是正常情况下的平置而是以一定弧度放置，流体在流经试纸条时会有金颗粒流动滞留现象；还有可能是二次跑板或含液现象出现，导致背景不干净；当然也不能忽视表面活性剂的作用。前面我们做过试验，在玻纤内完全不加任何表面活性剂时，试纸条在接受液体标本后，流体向吸水垫流动过程中，可以非常明显的发现，背景呈现金标颗粒的红色，说明金标颗粒无法跟随流体一起向上跑动，且 NC 膜是疏水膜，会直接导致颗粒会全部滞留在膜上，未能实现与 T 线蛋白的特异性结合。当在玻纤中添加低浓度的表面活性剂时，会发现试纸条背景不干净现象有所减轻，但还是会略有部分金标残留在膜上，背景泛红，当增大表面活性剂浓度后，可以完全改善，表面活性剂的存在，促进了金标颗粒和液体标本的融合，一起实现在疏水 NC 膜上的测想流动。所得的试纸条背景干净，不会影响测试结果的判读。

e.特殊作用

在最近的丙肝产品 HCV-302d 调试过程中，发现假阳性现象严重。仅跑 Buffer，测试条背景的 T 线强度甚至高达 G9，所以直接导致不能满足丙肝需求，无法出货。但是往原有 Buffer 中再添加 0.5% 的 Tween20 之后，跑 Buffer 背景很干净，假阳性消除。至于为何添加这个表面活性剂就有此效果，现在还没有确定的说法。可能是吐温 20 可以使丙肝抗体上的某些会与杂蛋白结合的非特异性结合位点构象发生变化，从而降低其非特异性结合性能，减少杂蛋白的结合，改进假阳性现象。

但是在最近的新 Buffer 加速稳定性试验中发现，在原有 Buffer 中添加吐温 20，短期内可以有助于消除假阳性，但是 Buffer 加烘一周后就发现 HCV 产品还是会有假阳性。这个可能与 HCV 产品使用的抗体有关。可能 Buffer 加烘后，某些性质改变，从而无法如当初那样，实现使丙肝抗体的非特异性结合位点最小程度暴露，从而减少假阳性现象。

B. 表面活性剂的作用机理

表面活性剂的作用机理有多种假设，大多数人比较赞同的是表面活性剂改变了蛋白的表面电荷分布，使得抗原抗体有更多的反应簇暴露，所以增强了抗原抗体与标记蛋白的特异性结合。但是当过量的表面活性进入标本流体时，蛋白构象会发生一定的破坏性改变，暴露出

一些易非特异性吸附的基团，反而增加了一些非特异性蛋白与其结合，导致假阳性升高。当然也有可能蛋白构象发生改变，使原本暴露在外的反映簇减少，导致灵敏度有下降。这个假说未经过专门的验证和输入研究，所以还有待证实。总之，不同的产品有不同的特性，不同的反应体系有不同的配方，所以多多研究和考察不同表面活性剂对产品性质的影响十分必要。

C. 表面活性剂使用浓度

关于表面活性剂使用浓度问题，浓度范围很难说，要看具体的情况。因为不同的抗原抗体有不同的特异，在应用过程中，很可能同一浓度的表面活性剂对于某一种抗体蛋白是适宜的，但是对另一种抗体蛋白的作用就不尽人意。根据各种产品的表面活性剂添加情况来看，有一定开发经验的研发人员一般会在 0.2%—2% 的浓度范围内设立一定的浓度梯度，确定最适浓度。而且在我们的 HBsg-302s 基础性试验最终确定的最适浓度 S9 10mg/ml，S14 10% 就在此范围内。

在使用过程中最好要控制表面活性剂的浓度，不要一味追求高灵敏度。添加该表面活性剂浓度不宜过高。比如前面说到的 S20(Tween 80) 和 S21(Brij 35)，因为它们分子结构中 PEG 长链带来过多的空间位阻，从而会影响了活性蛋白之间的作用，降低产品的灵敏度。当然过高的表面活性剂浓度，即使不会降低产品灵敏度，但是会给以后实际批次生产产品带来不曾预料的麻烦，而且会增加产品的实际成本。还有一点就是大多数表面活性剂的粘度较大，一旦在样品垫中添加的浓度太大，会影响样本在测流检测时的流速，从而影响产品的性能。所以表面活性剂的浓度还是需要认真考虑综合各个方面因素，才能确定最终使用浓度。

当然一旦在研发过程中或是在实际生产过程中，若是发现仅仅添加一种表面活性剂仍然不能使产品达到一定的灵敏度时，就会选择使用混合表面活性剂。因为选用两种表面活性剂考察对产品的作用已经是较为庞大的过程，所以一般不推荐使用三种或三种以上的表面活性剂。

研究报道，混合表面活性剂体系的性能往往优于单一表面活性剂[5~8]，因而可以通过复配得到性能优良的产品，同时可降低使用成本。但是在实际产品开发过程中，一般在单配方表面活性剂的玻纤达不到产品要求时，才会考虑使用混合表面活性剂体系的玻纤。而且一般只会选择两种。通常会在前面提起的五中常用表面活性剂中筛选一种再配上吐温20。由于对于混合表面活性剂界面性质的研究并不多，而且工作量相对于单一表面活性剂而言相当大，所以双配方表面活性剂的玻纤开发相对较少。现有总多产品中，玻纤系统中添加双表面活性剂的产品有 IHP-402b，在玻纤处理液中添加有Brij35 (S21)和 TWEEN80 (S20)，还有 IHI-U302a，在其玻纤中就含有Tetronic (S9)和STANDAPOL ES-1 (S7)。

另外还有类特殊的产品其样品垫中不添加任何表面活性剂，如ISY-U302b和IHI-402g。

D. 表面活性剂的种类筛选

关于表面活性剂种类方面，一般开发新产品的玻纤时，会首选非离子表面活性剂。非离子类表面活性剂高分子化合物在水溶液中不离解，此类化合物的特殊性能值得关注：不存在静电；在电解质中的特殊性能；不规律的溶解性。常见的非离子类表面活性剂高分子化合物有：聚乙烯醇、聚醚、纤维素衍生物、聚酯，糖基非离子类表面活性剂高分子化合物也有报道。使用频率最高的五中表面活性剂中就有 S14 (TRITON X-100)、S19 (TWEEN 20)、S20 (TWEEN

80) 和 S21(BRIJ 35) 四种为非离子表面活性剂。

何以会优选非离子表面活性剂，其中一大原因是因为产品中的抗原抗体蛋白是两性蛋白，具有亲水键和疏水键，分子一端带正电荷，一端带负电荷，容易形成水化层，易于受离子性表面活性剂的离子键影响，构型或构象发生改变，导致蛋白表面的决定簇未能暴露或其他非特异性结合位点暴露。还有就是离子型表面活性剂与蛋白质之间能发生反应，蛋白质在酸性或碱性介质中，可发生解离而分别带有正电荷或负电荷，可与离子型表面活性剂发生反应；使蛋白质变性而失去活。

阳离子和阴离子表面活性剂，不但毒性大，而且还有较强的溶血作用。吐温类的溶血作用通常比其他含聚氧乙烯基的表面活性剂小，这点非常重要，因为有许多产品是用于检测全血的。使用的表面活性剂当然最好不宜溶血。这样会导致红细胞释放，跑板的背景非常红，会极大的影响判读，严重的会掩盖 T 线原有颜色，直接分辨不出 T 线。

另外，两性离子表面活性剂的开发程度不如非离子表面活性剂也是一个原因。虽然研发人员发现 S9 (Tetronic) 这种两性离子表面活性剂的功能不错，但目前市面上可供选择的两性离子表面活性剂种类不多，该类型的表面活性剂种类和作用还有待继续研发和探索。

E. 表面活性剂使用注意事项

在配制玻纤处理液时，由于人员会在搅拌状态下，往处理液中添加一定量的表面活性剂，所以必须要注意尽量避免泡沫的产生或尽量减少泡沫。因为在配制过程中，小体积的配制玻纤处理液是使用磁子搅拌，大体积的配制处理液是使用搅拌浆，一般状态下为了保证处理液中各种物质溶解完全，搅拌状态较强，所以在添加表面活性剂时，难免会产生泡沫，尤其是对于那些本来就具有起跑性质的表面活性剂，泡沫产生更加明显。像 STREP A 的 Buffer 液就会有泡沫

但是泡沫的产生会带来诸多影响。比如给后续生产操作带来麻烦，测量体积和读数带来困难，会将溶液中某些不稳定的试剂会吸附在泡沫上从而浮在溶液上方，导致这个溶液体系浓度降低或不均一。特别是当样品垫中还含有蛋白类物质时，会导致蛋白溶解不完全，直接导致的结果就是产品的消假阳性效果变差。

还有一点就是在使用表明活性剂的时候，必须取保表面活性剂的完全混合，搅拌时间最好长一点。因为常用的五种表面活性剂，大多密度较大，粘度也大，特别是 S9 和 S14，前者为颗粒状固体，后者为高粘度液体，若搅拌不够充分，不够充分溶解，会发现表面活性剂沉降在容器底部，这样直接导致玻纤处理液的实际表面活性剂的浓度降低，随之而来的是产品的跑板状况不佳、灵敏度降低等异常现象。这点在我的乙肝 HBsg-302a 基础性试验中就出现过此类状况（见表 3）。

2.3.2.4 其他作用物质

在设计玻纤溶液中，添加的作用物质除了表面活性剂外，还会添加其他一些物质。第一类物质就是蛋白质，如常用的牛血清（BSA）、酪蛋白(Casein)、鱼胶冻，都可以特异性吸附杂蛋白（非特异性蛋白），减少杂蛋白非特异性结合，消除假阳性或假阴性。

第二类物质糖（常见蔗糖、海藻糖，还有果糖）作为保护剂，有时也会添加在玻纤溶液

中，糖可减缓老化速度，同时也可以增加亲水性。

第三类物质就是盐类物质。如添加少量的 NaCl 有时可以减少信号强度，消除假阳性。无水碳酸钠添加在 ISY-U302b 中作缓冲盐成分，起着调节 pH 的作用。

其他还有在全血玻纤中添加少量的抗红血细胞剂可以促使跑板背景干净，减少背景不清晰带来的影响。

还要强调的一点就是在快诊产品玻纤中，常常会添加 PVP。对于 PVP，一般将其归为人工多聚物类别，但是其功效与表面活性剂相似。因为作为高分子的 PVP，的确在低浓度下可以降低水的表面张力。在某些领域（如 NC 膜处理），发现 PVP 与表面活性剂作用一致。鉴于 PVP 在快诊产品中的作用，本文还是简要介绍一下。聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)是由 N-乙烯基吡咯烷酮(VP)聚合而成的（如图 14 所示）。

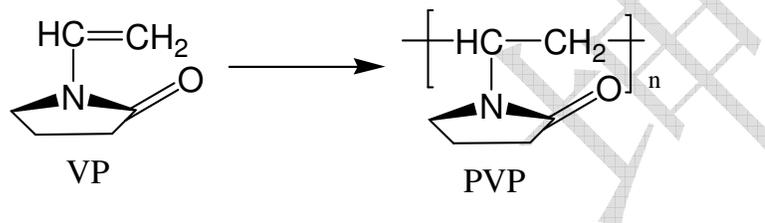


图 14 PVP 的分子结构式

PVP 具有增溶作用，能增加某些基本不溶于水而有活性的物质的水溶性；具有分散作用，可使溶液中的有色物质、悬浮液、乳液分散均匀并保持稳定；吸附作用，吸附在许多界面并在一定程度上降低界面表面张力。

目前多使用 PVP-100，这是低分子量 PVP。低分子量的 PVP 除了用作增溶剂、分散剂，一般认为 PVP 具有特殊的电子供体结构，蛋白可以与 PVP 的 N 原子和 O 原子形成氢键而发生复合作用，是蛋白稳定分散在流体中。某些难溶于水的成分，能与 PVP 形成粉末或共沉淀而极迅速地溶解，从而提高利用率。它是一种对 pH 变化和添加电介质不敏感的粘度改善剂，也是固体颗粒的粘合剂，促使金标或乳胶颗粒与标本液体的融合和作用。在的快诊产品中，常常会添加 PVP，玻纤中添加的浓度一般为 0.5%。

2.3.2.5 pH 调整

对玻纤处理液还要进行 pH 调整，因为有时候溶液的 pH 调整到某个位置，可以消除假阳性，有时候可以改变蛋白构象，促使更多的结合位点暴露在外从而更易于和标记物结合，导致产品灵敏度的提高。

概括地说，玻纤在检测试纸条中有多种作用：首先，可以提高标本的均一性，控制标本释放速度，使标本连续均匀地释放到聚酯膜中。其次，当在玻纤中添加其它成分，增强玻纤的粘性，调节标本的释放，提高被检测物质在玻纤中的溶解能力，消除一定的假阳性，使最终 T 线上的免疫蛋白结合物更加稳定。表面活性剂的添加可以很好的促进产品的性能，但是在使用过程中尤其要注意表面活性剂与玻纤处理液中其他成分的相互作用，某些时候添加不当达不到预期目的，还会导致干扰作用。大多数产品的玻纤溶液，pH 调整一般为 7.0—8.6 左右。

2.3.3 表面活性剂在滤纸、无纺布中的应用

由于不同公司有不同的设计风格，所以有些快诊产品选用滤纸或是无纺布作为 sample

pad。

像某公司的 Flu 和 Malaria 快诊产品，就是选用未经处理的滤纸作为样品垫。而有些公司产品就是用经过浸泡处理的滤纸作为样品垫的。选用的滤纸有经处理和不处理的差异。某些公司的 Flu 和 Malaria 产品选用未处理的滤纸的原因，主要是在加样的同时，额外在样品垫上直接滴加 Buffer 帮助跑板。而两类产品均选用滤纸主要是由于它可以承受的标本体积较大。而另外一些公司的 Flu 产品就是选用未经任何处理的无纺布作为样品垫的。所以选用何种材料作为样品垫，关键看材料可以承载的标本体积，以及公司的研发风格。

2.4 表面活性剂在标记垫（label pad）中的应用

2.4.1 常用表面活性剂种类

表面活性剂在标记垫上的应用一般是直接添加在标记液载体的处理液中（聚酯膜居多、也有 FLU 和 StrepA 产品选用滤纸作为金标载体）。Triton X100(S14)， Tween 20(S20) 和 Triton X305(S15)等公司都有应用在产品标记垫中。

目前对于标记好的金标溶液和乳胶溶液，大多数是通过机器直接喷在聚酯膜上，也有少数产品（如 FLU, IHI-402g）是人工片处理用移液枪将金标溶液处理到滤纸上的。直接购买来的聚酯膜具有一定的疏水性，需要进行一定的处理，通常聚酯膜处理液中会含有一定浓度的表面活性剂，如 Triton, Tween。

2.4.2 标记颗粒要求

还有在快诊产品的开发和生产过程中，胶体金颗粒大小应该保持批次之间的一致。因为劣质的金颗粒会发生膜上的聚集，无法在膜上自由跑板。所以作为体外检测产品的生产公司，必须保证生产所使用的胶体金颗粒尺寸符合要求且批与批之间尽量一致。如图 15 对于同样标注尺寸为 40nm 的优质和劣质金颗粒的尺寸分布比较显示：劣质金颗粒虽然标为 40nm，却可能包含有多种尺寸（CV 值很大），其平均直径可达 143nm，所以这样的宽范围的尺寸，会导致错误的测试结果。同样标注尺寸为 40nm 的金颗粒，BBI 公司的胶体金颗粒的大小分布相对集中，经检测在 40nm 处的峰形较窄且高，CV 值小，而其他公司市场的金颗粒峰形较宽且低，CV 值较高。

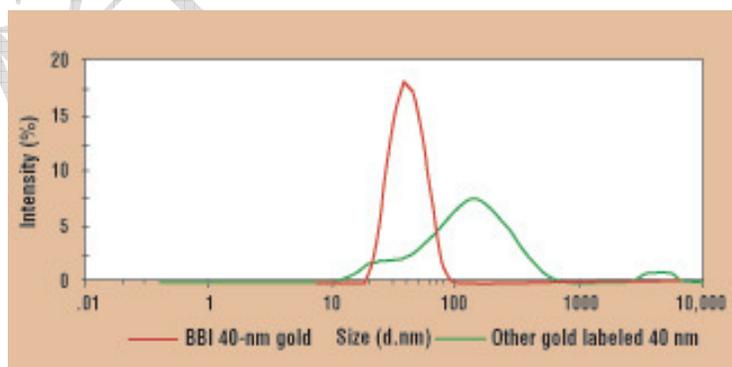


图 15 BBI 公司和其他公司 40nm 金颗粒的分布扫描图

2.4.3 标记颗粒在载体表面作用机理

金颗粒或乳胶颗粒从聚酯膜表面的作用过程与液体微粒的作用过程机理有些不同，它们粘附在物体表面主要靠分子间作用力的吸附作用而不是靠静电引力。当产品跑板时，金标或

乳胶释放过程中，含有表面活性剂的水溶液首先把金颗粒及聚酯膜表面润湿，接着表面活性剂分子会吸附到金颗粒（乳胶颗粒）和聚酯膜表面上，由于表面活性剂吸附层的形成加大了金颗粒（乳胶颗粒）与聚酯膜表面间的距离，从而削弱了它们之间的分子间吸引力。由于金颗粒（乳胶颗粒）与聚酯膜表面所带电荷一般相同，从而增强了它们之间的排斥力，使微粒粒子在聚酯膜表面上的粘附强度减弱，在毛细层析外力作用下就容易从表面上去除，并被表面活性剂稳定地分散到跑板的样本水溶液中。

还有一点需要指出，固体颗粒越大，越易被去除，而小于 $0.1\mu\text{m}$ 的颗粒由于会牢固地吸附在物体表面就很难被去除。而标记好的金颗粒和乳胶颗粒由于尺寸较小，在跑板过程中，除了表面活性剂的润湿、分散作用之外，毛细层析的作用也很重要。当然在使用快诊产品过程中，可以发现，若是金标或乳胶颗粒太大，会较强的吸附在聚酯膜上，出现释放不干净的状况，直接导致产品的灵敏度降低。

注意事项

2.4.4 注意事项

对于标记好的溶液，需要尽量避免表面活性剂。

标准金颗粒表面包被一个负离子层。在离子结合中，蛋白质的正电荷紧密结合在颗粒表面上。当使用柠檬酸盐处理金颗粒时，颗粒会与赖氨酸之类的氨基酸结合。疏水氨基酸（如色氨酸、酪氨酸）通过疏水作用与金颗粒表面结合。对于氨基酸含量很高的蛋白质（如免疫球蛋白）来说，疏水作用起着重要作用。这也是结合颗粒长时间接触含有表面活性剂的缓冲液后反应活性降低的原因。

金硫键平分了金颗粒和巯基之间的一对孤对电子对，形成一个牢固的链接。金颗粒与免疫球蛋白中的半胱氨酸残基结合，这可能是其吸附抗体或是抗原的最重要作用力。因此，应该避免沾到含有巯基的缓冲液或表面活性剂。所以这是我们在聚酯膜上添加表面活性剂而不是在标记溶液中直接添加的根本原因。

2.5 在硝酸纤维素膜（Nitrocellulose Membrane）上的应用

2.5.1 硝酸纤维素膜简介

制作膜的原料是硝化纤维和硝化纤维/纤维素醋酸盐混合物，这些原料都是疏水的。所以对于供应商提供的 NC 膜，若是直接应用于快诊产品，由于其疏水性较强，会影响跑板和蛋白结合，很难达到使用要求。

目前我们的硝酸纤维素膜之所以很容易被润湿，是因为在 NC 膜的制造过程中加入一些表面活性剂，而且不影响蛋白质吸附和测试功能。虽然大多数情况下膜中加入一些表面活性剂不能完全改善亲水性，快诊产品的技术人员还是会根据具体的快诊产品特性，进一步改进膜的性质。当我们利用表面活性剂和某些封闭剂进行后期处理，可以改善颗粒流动性，消除测试组分间的非特异性相互作用。当然在膜的制造过程中，表面活性剂具体使用的种类和浓度是根据免疫层析检测的需求而调整的。主要有四个方免需要注意，包括表面活性剂对膜毛细速度、蛋白质吸收、C/T 线条和线条结合宽度的影响，在下面会有详细阐述。另外，必须指出，快诊产品中，膜的孔径是重要的性能参数，决定了可供蛋白质结合的面积以及样品通过试纸移动的毛细流速。

由于 NC 膜具有疏水性能所以表面活性剂的应用十分必要。所有的表面活性剂都会和膜以及蛋白作用，由此会减少蛋白的结合特性。膜和 IVD 制造商对于他们使用的表面活性剂都是保密的。实际的应用策略就是鸡尾酒法，即混合应用不同类型的表面活性剂和添加剂，以促进总体上的蛋白结合，并保持较佳的层析跑板速度，同样，另一个措施就是膜表面的优化改进，可以是添加交叉结合的聚合物或者通过物理性质的处理[18]。

2.5.2 表面活性剂对膜毛细速度的影响

表面活性剂只要在很低的浓度就可以使得原本疏水的硝酸纤维素膜变成亲水性的。一旦表面活性剂在膜中的浓度达到这个低浓度之后，继续增加表面活性剂的浓度对膜的亲水性改进就不会明显。但是在膜生产中，为了够保持膜毛细速度的稳定，表面活性剂的浓度要高一点。当然具体选用何种表面活性剂和该表面活性剂使用多少的浓度，与表面活性剂在样品垫的使用一样，都是在生产过程中慢慢摸索和调整出来的。

2.5.3 表面活性剂对蛋白质吸收的影响

表面活性剂会影响膜对蛋白的吸收，这点在点膜的时候尤其突出。在前面的样品垫中添加表面活性剂内容中也有描述这一作用。有点需要注意，如果表面活性剂在膜里面的浓度太高就会阻止蛋白质和膜结合。当然一般膜内表面活性剂的浓度是由膜生产商控制的。

有时，设计产品中所选择的材料会对蛋白结合到 NC 膜上产生影响。所有干扰蛋白与膜结合的物质大体上可以分为三种类型：非特异性蛋白，静电干扰物质、疏水作用干扰物质。通常减少蛋白的结合的物质包括竞争结合位点的物质，如经典的蛋白类物质（BSA,动物血清），还有干扰氢键结合的物质（如尿素，甲酰胺），影响疏水作用的物质（如 Tween，Triton 或 Brij 这一类表面活性剂）。如聚乙烯醇(PVA)，聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，聚乙二醇(PEG)这类人工多聚物也会以联合干扰的形式抑止一个或者多个蛋白和膜之间的结合。

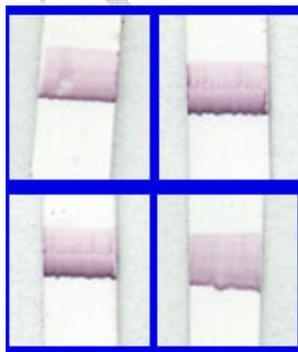


图 16 从检测结果的检测线（T 线）明显可以看出蛋白与膜结合的问题

倘若与膜结合蛋白量不够多，或是蛋白与膜之间的结合力不够，就会出现相当多的问题。最显著的就是 T 线检测结果出现问题。（见 图 16）。如果与膜结合的蛋白量很少，导致 T 线强度变弱，检测结果的灵敏度就会降低（见图 17）。如果蛋白与膜的结合效率很低，结合不牢固，蛋白会有扩散，T 线会变宽变弱，而不如正常情况下清晰色艳，有时候甚至会有蛋白与膜的物理结合实在太弱的情况出现，检测蛋白和表面活性剂一起跑板，经过 T 线位置时，实际上会把原来点在膜上的蛋白冲走，此时检测结果就大受影响，检测线就会呈现宽线，

或是几乎没有检测线，导致很难给出正确的检测结果(见图 18)。

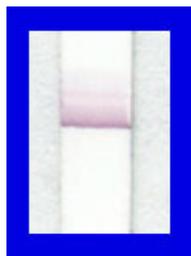


图 17 检测线变弱表明与膜结合的蛋白量太少

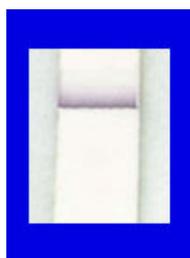


图 18 含检测待检蛋白和表面活性剂的溶液冲洗膜上 T 线蛋白，导致检测线（T 线）扩散

实际生产过程中会发现表面活性剂和人工聚合物会给整个快诊产品带来很多的问题，有时很棘手。Tween 20, Triton X-100, 聚乙烯醇(PVA), 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 聚乙二醇(PEG)这类化合物，能够在蛋白质与膜结合之前，就和相应的蛋白质结合成其他的化合物，从而阻止了蛋白质与膜的结合，直接影响产品的检测性能。所以应付的措施就是尽量避免在 T/C 线溶液固定在 NC 膜上（点膜）之前，NC 膜污染到上述物质。

但是，在传染病产品中，IHI-402C 产品的 T 线溶液配制中，会添加一定浓度的 PVA 和 Tween20。添加 PVA 和 Tween20 的目的是提高灵敏度，一般 Tween20 的浓度为 5-10mg/ml。虽然理论上感觉人工聚合物 PVA 和表面活性剂 Tween20 都会干扰膜对蛋白的吸收，当初在开发此产品时，发现在一定浓度范围内，添加此两种物质溶液还是有提高产品灵敏度的效果。当然有时候在调试该产品过程中，会有发现 T 线会略有扩散现象。此时略微降低表面活性剂的浓度，或者略微降低喷量并适当提高 T 线浓度，可以提高产品灵敏度，T 线显色档次可以提高。

所以在使用表面活性剂的时候还是要根据快诊产品的特性，摸索使用方式和浓度。

2.5.4 表面活性剂对 C/T 线条的影响

处理膜的表面活性剂浓度的增加，增大了膜的亲水性能，从而增强目标蛋白与膜结合的均一性，增加毛细层析的均一性。当然这个膜上的表面活性剂浓度是根据 C/T 线在膜上的宽度来调整和优化的，不同的膜公司使用的表面活性剂种类可能会不同，浓度也可能不同，即使是同一膜公司，不同型号的膜上使用的表面活性剂的种类和浓度也可能会有差异，而且某些膜公司还可以根据 IVD 公司客户的具体要求，定制特定类型的膜。

2.5.5 表面活性剂对线条结合宽度的影响

当表面活性剂在膜中的浓度增加的时候，在增大标记物与膜的结合，增强信号强度和产

品灵敏度的同时,也会有标记物在膜上就会扩扩散的现象出现。而线条的扩散会造成信号强度的减弱和总体实验灵敏度的下降。所以不难发现表面活性剂浓度的增大,开始会出现检测信号增强,产品灵敏度增强的效果,但是达到一定浓度时,就会不会按照预期出现线条扩散信号强度减弱,灵敏度降低的状况出现(见图19)。这点在前面的表面活性剂在样品垫的作用中也有提到。

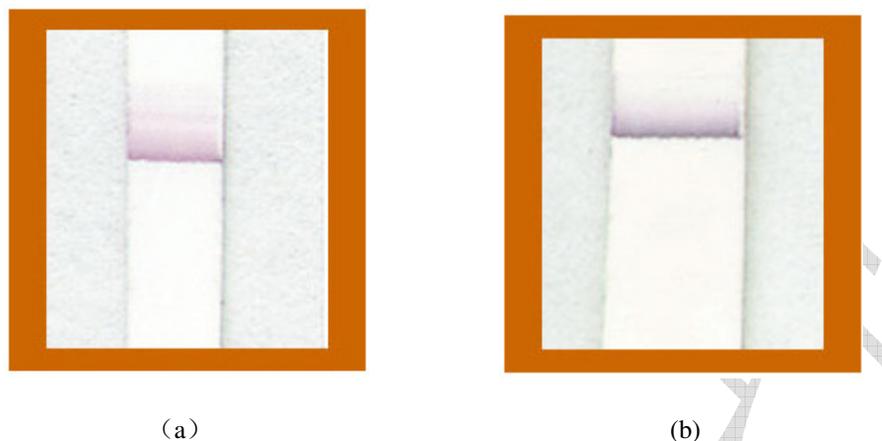


图19 检测线条扩散的快诊试纸(a)和检测线不扩散的正常快诊试纸条(b)

2.5.6 表面活性剂对非特异性蛋白与膜结合的影响

一般快诊产品原料稳定优质,设计得当时,不太会出现大频率的非特异性信号的。但是某些时候原料出现问题,或是临床上会有交叉物质反应,这就需要采取在膜上进行封闭处理的步骤。

对于某些需要封闭的快诊产品,在抗原(或抗体)与膜结合后,随后还要进行两步处理。第一步是干燥或烘干,使抗原(或抗体)能够维持免疫反应活性并与膜牢固结合。抗原(抗体)与硝酸纤维素膜牢固的结合需要足够的干燥温度和时间,如果不足会影响整个的试验稳定性。第二步是使用封闭剂将膜上未结合位点封闭以防非特异性吸附,在做封闭时,用惰性蛋白质或非离子去污剂封闭膜上的未结合位点可以降低抗体的非特异性结合。封闭剂应该封闭所有未结合位点而不替换膜上的靶蛋白、不结合靶蛋白的标委、也不与抗体或检测试剂有交叉反应。常用的封闭剂有各种蛋白质(凝胶、脱脂奶粉、干酪素、BSA)、人工多聚物(PVP、PVA、PEG)、表面活性剂(Tween 20、Triton X-100)。表6为其常用的工作浓度范围。

像某些用到奶粉和鱼皮凝胶。每种产品都有各自特性,所以具体选用何种物质和选用何种浓度,还是要作大量的试验才能确定。

如果要在封闭过程中使用表面活性剂,要尽可能的减低浓度。所以相同的物质在封闭液中的浓度往往小于在产品样品垫中的浓度。一般相应的推荐使用浓度 tween-20 和 triton-X100 小于 0.05% (v/v), 丙三醇小于 1mg/ml, PVA, PVP 和 PEG 小于 0.5% (v/v)。不过对于离子型表面活性剂,例如十二烷基钠(SDS),和前面说的一样,因为会影响膜与蛋白质的结合,还会破坏蛋白结构和构象,所以不推荐使用。

表6 用于封闭的材料和所需浓度材料典型的工作浓度范围

编号	试剂	浓度(%)
----	----	-------

1	凝胶或明胶	0.1—0.5
2	脱脂奶粉	0.5—2
3	干酪素（酪蛋白）	0.5—2
4	BSA	1—2
5	Tween 20	0.01—2
6	Triton X—100	0.01—2
7	PVA(15kD)	0.1—5
8	PVP(33kD)	0.1—7
9	PEG(20kD)	0.05—3
10	Brij	0.05—3

2.5.7 表面活性剂在膜上使用的注意事项

多微孔硝酸纤维素膜对蛋白的高结合力不仅取决于硝酸纤维素对特定分子的高化学亲和力和力作用，高床体积的多微孔膜对其也有决定性，因为这样的膜为可能吸收的蛋白分子提供了良好的接触机会和巨大的内表面积。蛋白与硝酸纤维素的结合是瞬间发生的，但是其实际作用机理目前尚不清楚。可能是由硝酸偶极子引起的疏水和静电力相互作用所产生的。[19-21]硝酸纤维素膜是完全中性的，本身没有质子，但它们吸收蛋白质的能力却依赖于固定液的 pH，pH 可以影响特定蛋白在特定膜上的结合能力。所以当在膜上点蛋白的时候，表面活性剂应当尽量避免使用。

表面活性剂会对蛋白质与硝酸纤维素膜之间的结合产生影响。虽然 C、T 线原料蛋白溶液会因为蒸发而停留在 C、T 线位置上，但并不是因为在分子水平上与硝酸纤维素膜结合了。如果生产时，稀释过程中在配制 C、T 线原料溶液中添加了表面活性剂，那么相应的快诊产品在检测一开始，信号会出现（即会出现线条），而后因为 C、T 线原料蛋白与硝酸纤维素膜脱离而流向上层滤纸，出现检测信号的消失[22-24]。如果为了避免非特异性反应或者减少背景颜色而不得不使用表面活性剂的时候，一般推荐将表面活性剂添加在玻纤和聚脂膜中。

在理论上，研发人员应选择有助于确保产品的稳定性和可重复性的封闭剂。选择的封闭剂应同时降低非特异性背景，在长期保存条件下仍能结合在膜上，而且在样品检测时能保持 NC 膜均一致的重湿润特性。同时，封闭剂也不应干扰捕获线处的抗原抗体反应而降低检测的信号强度。鉴于理想封闭系统的关键特征，封闭剂的选择常常需要研发人员在以下四个方面寻找最佳的平衡点[25-28]：

- (1) 爬行速率
- (2) 捕获线的强度
- (3) 捕获线的宽度
- (4) 非特异性背景的程度

可是上述几个关键指标常常互相矛盾。比如，封闭剂减少非特异相互作用同时也会降低特异性信号，而增加膜爬速的同时也会降低检测的灵敏度、增加检测线的宽度。笼统地说，

这几种封闭剂主要分为三类：

- (1) 表面活性剂；
- (2) 人造聚合物；
- (3) 蛋白质；

通常情况下，表面活性剂与人造聚合物至少两类封闭剂混合使用可起到较好的封闭效果（见表6）。而蛋白质通常不是最有效的封闭材料，虽然蛋白质类封闭剂有助于减少非特异性信号，但是它们也会降低整个检测系统的爬行速度。

当液体试剂与膜接触后，特别是在封闭过程中，直接往膜上添加封闭液，会造成膜中表面活性剂浓度的减少，从而影响整个膜的亲水性。通常我们为了消除这个影响或将这个影响降低到最低程度，最简单的办法就是在封闭液等液体溶液中直接加入一定量的表面活性剂，封闭液中的表面活性剂的使用浓度一般较样品垫中的使用浓度要低，一般为 0.01%~0.05% v/v，在膜上使用封闭液处理。另外发现，测试时的 pH 的改变或者离子浓度的增加会减弱这种处理手段的效果。其实封闭是最后的无奈之举。若是在前期研发过程中，优化玻纤或 BUFFER 没有效果才选择这样的封闭技术。若是原料抗体抗原不好，使用过程中可能临床上有些物质有些交叉，会突然出现假阳性、假阴性，那么也会考虑使用膜封闭方法。当然封闭方法产见的有三种（见表 7），需要视具体情况确定使用何种封闭方法。若是其他方法能够优化产品，则不推荐使用膜上封闭步骤。

表 7 现有的封闭技术和效果对比

封闭方法	效果	特点	结论
膜上全部封闭	高	均匀润湿，跑板均一性好 批次之间均一性好 利于储存	封闭设备投入或人工投入昂贵 在点完 C/T 线之后，未粘样品垫的时候就必须进行全部膜的封闭。 可能会使得 C/T 线原料被洗脱再次溶解。 封闭剂内的试剂可能会对 C/T 线原料的抗原性或对产品保质期有影响
在玻纤或聚脂膜中添加封闭剂	一般，属于中等	操作简单，成本便宜。 不会造成 C/T 线原料再溶解。 将 C/T 线原料和封闭剂分离会减少不利的相互作用。	不如全部封闭膜有效
在点膜液中直接加入表面活性剂	对 C/T 线而言效果高对膜而言效果差	操作简单，成本便宜	不如全部封闭膜有效。 封闭剂内的试剂可能会对降低 C/T 线原料的抗原性或影响产品保质期。 封闭剂内的试剂会导致 C/T 的明显扩散。

就目前传染病方面的产品而言，用到封闭液的产品相对较少，除 STREP A 外还有早孕

系列产品有些也是要喷封闭液的，具体在封闭液中添加的表面活性剂有差异，视具体情况而定，不同产品不一样。像 IST-501b 产品的封闭液中添加的是 S7(Standapol ES-1)。有点需要指出，不是所有需要封闭液中都会添加表面活性剂的，像 Binax 的 Malaria 产品是要对点好 C、T 线的膜进行封闭的，但是在封闭液中就没有表面活性剂成分。

2.6 在 Buffer 的应用

在某些产品的 Buffer 中，也会发现表面活性剂的踪影。比如丙肝产品的加样方式是样品 5 微升一滴，Buffer 一滴。在这个产品的 Buffer 液中就添加了 Tween20(S19)，RSV 产品 IRS-501/502a 产品的加样方式是样品和 Buffer2: 1 形式混合溶液 100 微升添加在样品垫上。此 Buffer 中添加了 0.5% Chemal LA-9 (S22)表面活性剂，处理样品标本，有助跑板。

在 Malaria 产品的 Reagent A 液 中，就添加了 Triton X-100 (S14)、Tween 20(S19)和 ZWITTERGENT 这三种表面活性剂，其中前面两种是常见的表面活性剂，后一种较为特殊，在此产品中起着去污、封闭的作用，还起着消除假阳性的作用。

在此产品的金标 Drying Buffer 中也添加了低浓度的 Triton X-100 (S14) 溶液，有助于金标溶液快速被金标垫吸收，且吸收均匀，在 60℃烘道内烘 20 分钟，有助于水分蒸发，快速完成金标的干燥过程，有利于金标的稳定性。

2.7 其他方面的应用

StrepA 产品的裂解液中，也有添加了表面活性剂 Tween20 (S19)。其作用在于与细胞膜的磷脂双分子层膜作用，从而影响分子通透性，起到裂解细胞作用。在某些公司的 Flu 产品的裂解液中就含有 Triton X-100 (S14)、Tween 20(S19)两种表面活性剂。

在爱滋产品的 C、T 线溶液中就添加了一定浓度的表面活性剂 Tween20 (S19) 和人工聚合物 PVP。主要是因为临床应用中，爱滋产品经常会出现假阳性的问题，将表面活性剂添加在检测线中可以适当的消除假阳性现象。

3. 表面活性剂在快诊产品中应用前景和展望

测流检测的材料质量一直以来都在不断改进。随着更佳的测试设计的出现，在定量检测领域中的应用日益扩大。由于全球 IVD (体外诊断器械) 市场价值数十亿，并且还在持续增长，技术进步为快速测定和实验室测定提供学多选择。

随着全球 IVD 产品 (特别是快速诊断试纸条) 的开发和快速增长，相信表面活性剂在快诊领域的应用将会越来越广泛，可以遇见在不久的将来必定会有更多种类的表面活性剂应用于快诊试纸条中。对现有表面活性剂的性能和功效的研究和开发将进一步加深。