

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052008

陰差陽錯-COVID-19 快篩偽陰偽陽之探討與準確率改善

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高二 柯卉芯	指導老師： 馬瑪宣
---------------	--------------

關鍵詞：新冠病毒（COVID-19）、
偽陰偽陽（False Negatives and
Positives）、
快篩（Lateral Flow Test）

摘要

本研究成功以 SARS-CoV-2 病毒表面棘狀蛋白做出快篩試劑，達到 15 分鐘內高準確率之檢測效率，可判別是否感染 COVID-19，更進一步使用自旋增強側流免疫分析儀（Spin-enhanced lateral flow immunoassay, SELFIA）偵測奈米金吸收波長，提高 100 倍之偵測靈敏度。實驗中依 NCBI 資料庫發布的病毒核酸序列，合成棘蛋白抗原基因進行蛋白質生產後，挑選有潛力的棘蛋白抗體，F4 與 AuNP-conjugated D3 進行配對，利用雙抗體夾心法，開發橫向流動的 COVID-19 快篩系統，並進一步利用 SELFIA 判讀檢測結果，提高偵測靈敏度達 0.1 ng/mL，同時測試對突變株的專一性，減少偽陰性情況發生。另一方面，我們測試不同緩衝液系統，選擇能不破壞抗原又具低疏水親和效應的緩衝液，以減少偽陽性。開發此簡易、經濟、高準確率的快篩試劑，將之普及化有助於新冠肺炎的防治。

壹、研究動機

2019 年 COVID-19 大爆發，由 SARS-CoV-2 冠狀病毒引起的呼吸道感染疾病導致數百萬人死亡。與 SARS 和 MERS 相比，COVID-19 的傳播速度更快，死亡率高，根據約翰·霍普金斯大學 [1]，全球有超過 1.7 億個病例，有近 3 百萬人死亡，儘管各國都在努力遏制病毒的蔓延，許多人還是擔心自己是否感染了 COVID-19。

如今，2021 年中衛福部宣布全國停課，而主要原因是這次英國突變株 B.1.1.7 襲來，雖然毒性不高，但傳染力（infection efficiency）比原始 COVID-19 病毒株強，加上大多數人防疫意識逐漸鬆散，而且台灣疫苗接種比例低，導致台灣疫情擴散。

控制這種 COVID-19 大流行的方法是增加快篩普及性，並落實隔離政策。今天最廣泛使用的是 RT-PCR 技術的鼻咽拭子測試。儘管具有很高的準確性，這些標準診斷測試，可能需要數小時至幾天的時間才能得知結果，而且價格高昂，並非所有人都能負擔得起，無法普及化。再加上 PCR 需由醫護人員執行，最近確診人數持續增加，醫護人員短缺，無法廣設篩檢站，民眾爭先恐後來篩檢反而又造成群聚。另一方面，價格低、快速且易於使用的快篩測試，可以有效的對大量的人群進行更頻繁的測試。然而，此類產品與 RT-PCR 核酸診斷測試相比準確率較低，容易導致偽陰性和偽陽性的結果。因此，若可以降低

偽陰偽陽性，甚至提高偵測靈敏度，高品質的快篩試劑將有助於阻止 COVID-19 的快速傳播。

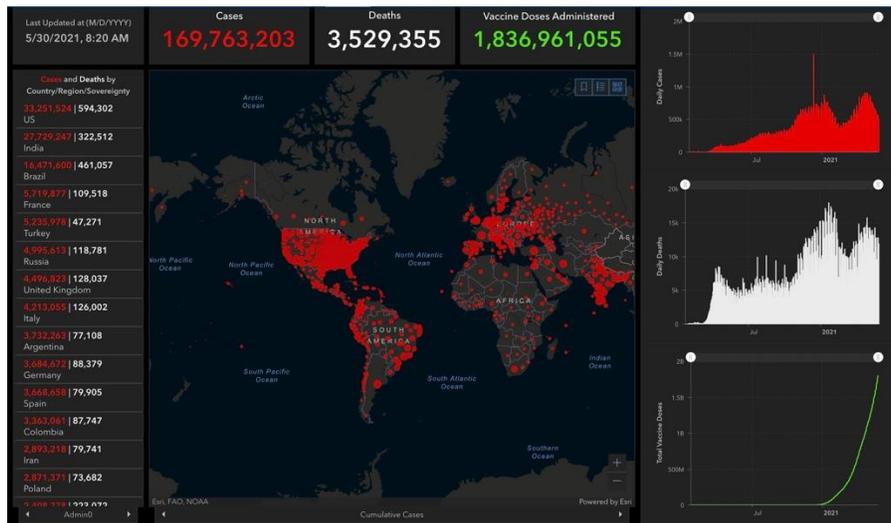


圖 1. 由約翰·霍普金斯大學 Systems Science and Engineering (CSSE) 提供的 COVID-19 Dashboard. 實時更新 [2].

貳、研究目的

為何會產生偽陰性及偽陽性？為了增進市面上 COVID-19 快篩試劑的診斷準確性，我們將以驗孕棒快篩準確度為目標，探討如何減少錯誤的結果：

一、解決偽陽性結果

- (一) 篩選高專一性抗體
- (二) 緩衝液系統篩選

二、提高靈敏度減少偽陰性

- (一) 篩選高親和性抗體
- (二) 利用 SELFIA 提高靈敏度

參、研究設備及器材

實驗材料 與藥品	凍結的 FreeStyle™ 293-F 細胞、0.5% 錐蟲藍染色劑、FreeStyle™ 細胞培養基、OptiPRO™ SFM™ 培養基、FreeStyle™ MAX 細胞轉染試劑、NaCl、imidazole、glycerol、TCEP、Ni-NTA 柱、抗體 (F4, A2, A4, D3)、ProSep-vA Sepharose 純化樹脂、ddH ₂ O、glycine、glycine-HCl 緩衝液、Tris-HCl 緩衝液、Tris-HCl、SDS-PAGE 凝膠片、SDS、β-Mercaptoethanol、Bromophenol Blue、Tris-base、Coomassie blue、甲醇、冰醋酸、TEMED、牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate-buffered saline, PBS)、Tween 20、TMB 呈色劑、NaOH、30 nm 膠體金 (AuNP)、K ₂ CO ₃ 、sodium borate、病毒運送培養基、RIPA 細胞裂解液
實驗器皿 與耗材	離心管、燒杯、三角燒瓶、培養皿、酒精、封口膜、pipette、震盪錐形瓶、Eppendorf、細胞計數器、試管架、托盤、透明微量 96 孔盤、快篩試紙
實驗儀器	筆記電腦、37°C 恆溫培養箱、迴轉式振盪機、細胞計數器、離心機、ELISA plate reader、自旋增強側流免疫分析儀 SELFIA、超音波破碎機

肆、研究過程與方法

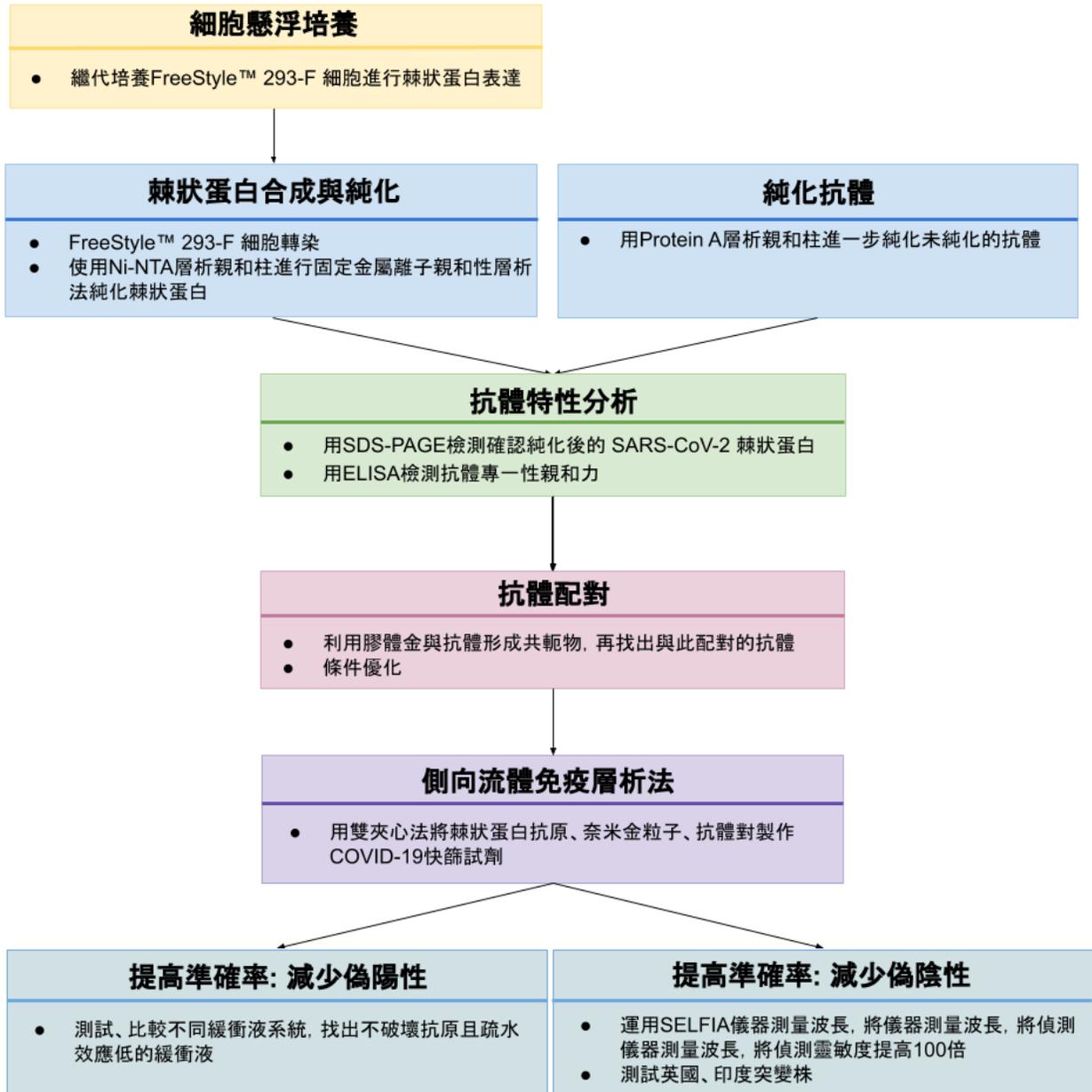


圖 2. 研究過程概念圖

壹、細胞懸浮培養

一、質體 DNA

SARS-CoV-2 棘狀蛋白 DNA 序列於 2020 年 3 月從 NCBI 數據庫獲得。由 Biotools Company 合成棘狀蛋白 DNA 序列後，將其構築到 pcDNA3.4 表達質體中。

二、細胞懸浮培養

1. 將冷凍的 FreeStyle™293-F 細胞儲存在液態氮中的冷凍管中。
2. 將液態氮中的細胞放置在 37°C 水浴中快速融化。
3. 將管中的物質轉移到裝有 30 mL 預熱至 37°C 的 FreeStyle™293 表達培養基的無菌 125 mL 震盪錐形瓶中。於 135 rpm 的迴轉式振盪機上培養。
4. 每 2 至 3 天更換新鮮培養液，於 7 天後收穫細胞。

三、細胞轉染

1. 轉染前 24 小時，將 0.6×10^6 細胞/mL 的 FreeStyle™293-F 細胞瓶放置在以 135 rpm 的速度在 37°C 的迴轉式振盪機上。
2. 將 1.3×10^6 細胞/mL 稀釋至 1×10^6 細胞/mL。
3. 將 30 mL 細胞加至每個 125 mL 三角燒瓶中。將 FreeStyle™ MAX Transfection Reagent 的試管倒置幾次進行混合。
4. 稀釋 37.5 µg 的質體 DNA，加入 OptiPRO™SFM™ 培養基至 0.6 mL。
5. 將 OptiPRO™SFM™ 中的 37.5 µL FreeStyle™ MAX 試劑稀釋體積至 0.6 mL 的，並顛倒試管均勻混合。
6. 將稀釋的 FreeStyle™ MAX 試劑加至稀釋的 DNA 溶液中，使總體積為 1.2 mL。
7. 將混合物在室溫下放置 10 分鐘，再緩慢加入裝有 FreeStyle™ 293-F 細胞的燒瓶中。
8. 將轉染的細胞在迴轉式振盪機上以 135 rpm 於 37°C 孵育。8 天後收集含蛋白質培養液。
9. 離心後，收集培養基的上清液以使用 Ni-NTA 管柱純化蛋白。

貳、棘狀蛋白合成與純化

一、準備 IMAC 緩衝液

1. 親和 (binding) 緩衝液：0.05 M Tris-base，pH 8.0、0.5 M NaCl、30 mM imidazole。
2. 親和洗滌 (wash) 緩衝液：0.05 M Tris-base，pH 8.0、0.5 M NaCl、30 mM imidazole。
3. 親和洗脫 (elute) 緩衝液：0.05 M Tris-base，pH 8.0、0.5 M NaCl、0.25 M imidazole。

(二) 固定金屬離子親和性層析法 (IMAC)

1. 將含有目標蛋白之上清液注入含有 Ni-NTA 的 IMAC 管柱，進行結合。
2. 再用洗滌緩衝液洗滌，移除雜蛋白，直到沒有蛋白質流過為止。
3. 用親和洗脫緩衝液洗脫結合的蛋白質，收集流通物，並以 A_{280} 偵測洗脫溶液，進行後續蛋白質分析。

參、檢測廠商 A 的快篩

一、偽陽性

原理：在進行側向流體免疫層析法時，檢體所在的緩衝液會影響抗體與抗體間、抗體與奈米金顆粒間和檢體中的閒雜物質與抗體間的互動，產生疏水性結合效應，造成偽陽性的錯誤結果，所以我們將比較四種不同緩衝液，篩選出偽陽性最低的系統。在檢體內不含有棘狀蛋白抗原的條件下，測試線上理應不會出現紅色線，若有顯現，則測試結果為偽陽性。

- 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)：
 - 1) 配方： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、NaCl、KCl
 - 2) 用於普遍生物研究中，緩衝容量廣 (pH 5.8–8.0)，滲透壓與生理條件接近，並且對細胞無毒，有些病毒或生物製劑需要這種緩衝液稀釋
- PBST：
 - 1) 配方： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、NaCl、KCl、Tween 20
 - 2) 是含低濃度 Tween 20 的 PBS，通常用作西式墨點法和 ELISA 分析的洗滌液 (Tween 20 是一種非離子表面活性劑，能大幅度降低物質表面的張力)
- RIPA 裂解液 (Radioimmunoprecipitation Lysis Buffer)：

- 1) 成分：Tris、NaCl、乙基苯基聚乙二醇（Nonidet P-40, NP-40）、脫氧膽酸鈉（Sodium Deoxycholate）、SDS
 - 2) 是最普遍使用的細胞裂解緩衝液，通常用於將細胞核膜破壞並抽取裡面的蛋白質
- 病毒運送培養基（Virus Transport Medium, VTM）：
 - 1) 成分：Hank's 平衡鹽溶液（Hank's Balanced Salt Solution, HBSS）、胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）、硫酸慶大黴素、Amphotericin B 抗黴菌劑、70% ethanol
 - 2) 是目前通過美國食品藥品監督管理局認證，可用於 PCR 核酸檢測的運送培養基
1. 準備廠商 A 快篩試劑 4 個。
 2. 分別將 100 μ l PBS、PBST、RIPA、VTM 分別滴入四個試劑的檢體區，放在平面上等待緩衝液流向最後面的吸收區。
 3. 用肉眼觀測比較四種不同緩衝液系統，若測試線呈現紅色，則快篩試劑有偽陽性問題。
 4. 用 SELFIA 將結果放大 100 倍。眼睛勿直視雷射光，小心將製作完成的 COVID-19 快篩試劑放置 SELFIA 儀器內，將儀器關上。
 5. 在與儀器連結的電腦上點擊「掃描」。
 6. 等待約 3 分鐘，看電腦顯示掃描完畢後，點擊「儲存」，保存數據。
 7. 勿直視儀器內部將快篩試劑取出。

二、偽陰性

原理：為了確保不會產生偽陽性結果，我們接著篩選出不會產生偽陽性的緩衝液，用不同濃度的棘狀蛋白抗原測試廠商 A 的偵測靈敏度，檢測偽陰性。若抗原濃度高但是快篩的測試線上沒有顯示或是顏色不明顯，則代表快篩極有可能判出偽陰性結果。

1. 準備廠商 A 快篩試劑 3 個。
2. 用偽陽性實驗篩選出的緩衝液調配 0、10、20、100 ng/mL 的棘狀蛋白抗原濃度。

3. 分別將 100 μl 的抗原溶液滴分別滴入三個試劑的檢體區，放在平面上等待緩衝液流向最後面的吸收區。
4. 先用肉眼觀測比較不同抗原濃度的結果，若在檢體含有抗原的條件下測試線沒有呈現紅色，則快篩試有偽陰性問題。
5. 用 SELFIA 將結果放大 100 倍。眼睛勿直視雷射光，小心將製作完成的 COVID-19 快篩試劑放置 SELFIA 儀器內，將儀器關上。
6. 在與儀器連結的電腦上點擊「掃描」。
7. 等待約 3 分鐘，看電腦顯示掃描完畢後，點擊「儲存」，保存數據。
8. 勿直視儀器內部將快篩試劑取出。

肆、抗體純化

1. 抗體 F4、D3、A2 和 A4 由 NanoKemy 及 Pharmtekx 所提供，並進一步使用蛋白 A 管柱 (Protein-A Column) 純化。
2. 將 Protein-A Column 以緩衝液 PBS 平衡。
3. 將抗體蛋白溶液混合 PBS 緩衝液加入柱中讓抗體結合於管柱上。
4. 將抗體用 10 mL 的 0.2 M glycine-HCl (pH 2.0) 緩衝液洗脫至含有 1.3 mL, 1 M Tris-HCl (pH 9.0) 的中和緩衝液中。
5. 收集抗體，進行後續實驗。

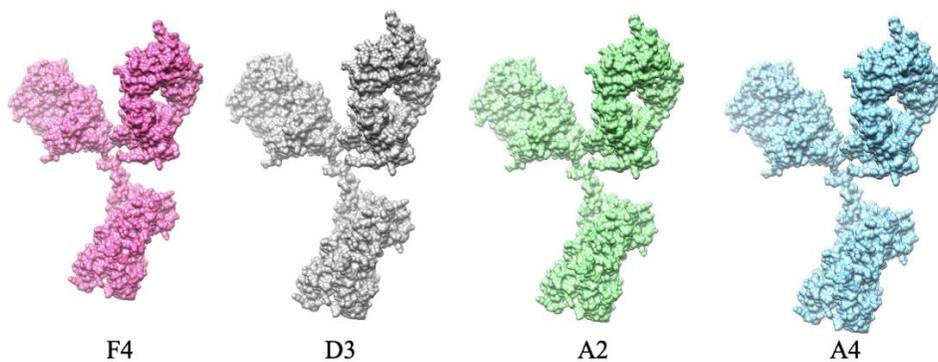


圖 3. 抗體 F4、D3、A2、A4 的 3D 結構示意圖。

伍、用 SDS-PAGE 抗體特性分析

一、配製緩衝液

1. 30% ammonium persulfate : 1.5 g ammonium persulfate 用 ddH₂O 稀釋
2. 上樣緩衝液 : 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8 、 1.0 M Tris-HCl , pH 6.8 、 125 mM of Tris-HCl , pH 6.8 、 20% Glycerol 、 4% SDS 、 10% β-Mercaptoethanol 、 0.5 mg/ml Bromophenol Blue 、 ddH₂O 混合。總體積 40 mL 。 (非還原性 SDS-PAGE 不加 β-Mercaptoethanol)
3. 電極緩衝液 : Tris-base 、 glycine 、 SDS 加 ddH₂O 到 1000 mL 。
4. Coomassie 染色液 : 1 g Coomassie Brilliant Blue-R-250 加入甲醇、冰醋酸和 ddH₂O
5. 脫色液 : 1.2 L 甲醇、0.4 L 冰醋酸、ddH₂O

二、電泳實驗操作

1. 組裝漿凹玻璃板與平玻璃板放入電泳槽內。
2. 放置分離凝膠上方的區域後乾後，倒入堆濃縮膠。
3. 加入 300 mL 1x 電極緩衝液。
8. 然後將 GFP ， BSA ， 棘狀蛋白和四隻抗體 A2 ， D3 ， F4 和 A4 加到凝膠上。
9. 在前 15 分鐘內以 100V 運行，並在 45 分鐘內升至 200V 。
10. 接下來，將凝膠從設備中移出，放置在托盤中。
11. 加入 20 mL 的 Coomassie 染色液，並且在輕輕搖動下讓膠染色 30 分鐘。
12. 將染色液倒出並保存。加入 5 mL 脫色液，並在輕輕搖動下將凝膠脫色 1 分鐘。丟棄去脫色液後，添加新的 30 mL 的脫色液。
13. 輕輕搖動讓凝膠脫色 2 小時。丟棄脫色液。輕輕搖動，用 30 mL ddH₂O 沖洗凝膠 5 分鐘。
14. 在凝膠下方用濾紙在 60°C 下等乾 1 小時，並用保鮮膜包覆。

陸、用 ELISA 分析進行抗體配對

1. 每個抗體 A2 ， D3 ， F4 和 A4 分別使用四個透明微量 96 孔盤。
2. 在透明微量 96 孔盤的孔中塗上 100 μL 不同濃度的棘狀蛋白抗原 (in PBS) ，並在 4°C 下反應 12 小時。

3. 用 200 μL 含 0.05% Tween 20 的磷酸鹽緩衝鹽水 (PBST) 洗滌 3 次。
4. 將 200 μL 的 5% 牛奶添加到每個孔中，阻隔非專一性結合。
5. 在 37°C 下反應 60 分鐘，並用 PBST 洗滌 3 次。
6. 將 100 μL 的抗體 A2, D3, F4 或 A4 加到孔中。
7. 在 37°C 下反應 12 小時後，並用 PBST 洗滌 4 次，每孔加入 100 μl TMB 呈色劑。
8. 在室溫反應 30 分鐘以顯色。
9. 加入 50 μL 的 1 M NaOH 並混合。用 ELISA plate reader 測量吸光度。

柒、側向流體免疫層析法 Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

原理：側向流體免疫層析法用法簡單且價格合理，可以檢測檢體中目標分析物的存在與否。由於它們的便利性，LFIA 具有廣泛的應用，例如驗孕、傳染病檢測和食品安全測試。LFIA 是單方向的，從檢體區開始，流向另一端，目標分析物與結合奈米金粒子的抗體一起移動至結合區。接下來，目標分析物和與結合奈米金粒子的抗體會流動至含有固定化抗體的硝酸纖維素膜上 [6]。奈米金與抗體之結合物與控制線上的抗體結合，顯示一條線，代表此測試有效；分析物不是被測試線上的抗體捕獲，就是被末端的吸水區吸收。

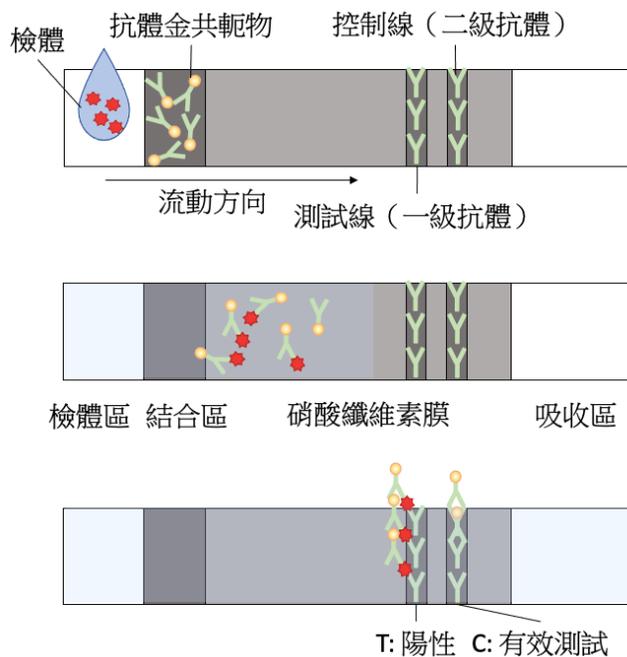


圖 4. 雙抗體夾心法的側向流體測試條設置。在橫向流動期間，檢體從體區移至吸收區。若檢體含有目標分析物，則流過硝酸纖維素膜時，會被能抓住抗原的一級抗體捕獲，呈現出兩條線，顯示結果為陽性；若檢體內無目標分析物，則流過硝酸纖維素膜時，只會被能抓住抗體金共軛物的二級抗體捕獲，呈現出一條線，顯示結果為陰性。

一、優化抗體濃度

1. 四種抗體溶液用 25 μ l ddH₂O 連續 2 倍稀釋。
2. 將 125 μ L 膠體金加到每個試管中。
3. 將試管在室溫下孵育 5 分鐘，然後將 125 μ L 1 M NaCl 溶液加到每個試管中。最佳的蛋白質濃度是在沒有變色的情況下，濃度最低的試管。



圖 5. 找到最適合的抗體濃度。抗體 D3 從高到低濃度，顏色由紅變藍。稀釋度最高但仍保持紅色的試管是最佳蛋白質濃度。因此右側的第二個試管有最佳蛋白質濃度，為 0.05 mg/mL。

二、結合抗體與奈米金

1. 用 0.2 M K₂CO₃ 將 30 nm 膠體金的 pH 調節至 9.0。
2. 將 1:20 的抗人類抗體和 20 mM sodium borate 以 14,000 xg 離心 30 分鐘，再以 1,000 xg 濃縮 2 分鐘。
3. 將 2 mL 的抗體溶液加到 10 mL 的膠體金溶液中，在室溫放置 30 分鐘。
4. 加入在 20 mM sodium borate 中的 1/10 體積的 10% BSA，混合後在室溫放置 10 分鐘。
5. 在 4°C 下，以 15,000 xg 將溶液離心 30 分鐘。
6. 小心丟棄上清液，並將沉澱物重懸於含有 1% BSA 的 20 mM sodium borate 中。
7. 將該溶液洗滌 3 次。
8. 最後，將結合物重懸於 1 mL 含有 1% BSA 的 20 mM sodium borate 中。

三、測試側向流體免疫層析法

1. 組裝測試條。
2. 為了測試四種抗體與奈米金結合後是否可以結合棘狀蛋白，對硝酸纖維素膜上的棘狀蛋白抗原進行了初步得測試。使四種結合金的抗體流過快篩試紙。

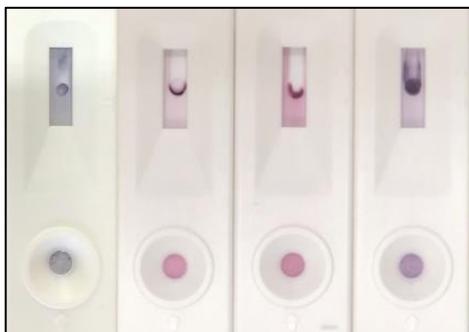


圖 6. 初步測試

結合有 30 nm 奈米金的抗體 A4，A2，F4 和 D3（左到右）流過試紙條。儘管硝酸纖維素膜上可見一個污點，但仍不能確保結合成功，例如，有可能是奈米金與棘狀蛋白的結合。

捌、優化減少偽陽性與偽陰性

一、減少偽陽性：緩衝系統

1. 準備快篩試劑 4 個。
2. 分別將 100 μ L PBS、PBST、RIPA、VTM 分別滴入四個試劑的檢體區，放在平面上等待緩衝液流向最後面的吸收區。
3. 用肉眼觀測比較四種不同緩衝液系統，若測試線呈現紅色，則快篩試劑有偽陽性問題。
4. 用 SELFIA 將結果放大 100 倍。眼睛勿直視雷射光，小心將製作完成的 COVID-19 快篩試劑放置 SELFIA 儀器內，將儀器關上。
5. 在與儀器連結的電腦上點擊「掃描」。
6. 等待約 3 分鐘，看電腦顯示掃描完畢後，點擊「儲存」，保存數據。
7. 勿直視儀器內部將快篩試劑取出。

二、減少偽陰性

（一）提高靈敏度：自旋增強側流免疫分析儀 SELFIA

原理：SELFIA 儀器可用來搭配側向流體免疫層析法，以雷射光激發在硝化纖維素膜條上的奈米金顆粒，捕獲檢測奈米金在 OD₅₂₀ 下的吸光度，快速進行抗體篩選和抗原檢測，可以輕鬆提高 100 倍之靈敏度，從而減少假陰性結果。

1. 眼睛勿直視雷射光，小心將製作完成的 COVID-19 快篩試劑放置 SELFIA 儀器內，將儀器關上。
2. 在與儀器連結的電腦上點擊「掃描」。
3. 等待約 3 分鐘，看電腦顯示掃描完畢後，點擊「儲存」，保存數據。
4. 勿直視儀器內部將快篩試劑取出。

(二) 測試專一性：測試突變株

1. 準備兩個快篩，分別測試英國突變株、印度突變株的棘狀蛋白的受體結合區 Receptor Binding Domain (RBD)。
2. 分別取 100 ng/mL 濃度的棘狀蛋白抗原分別滴入兩個快篩的檢體區。
3. 等待 10-15 分鐘，觀察快篩的測試線上是否呈現紅色線條。

伍、研究結果

壹、廠商 A 快篩的準確度結果

一、偽陽性

結果顯示，廠商 A 沒有非常嚴重的偽陽問題，但是使用廠商 A 快篩檢測套件內附上的緩衝液進行測向流體檢測時，用肉眼看，在測試線上的紅色線條比其他緩衝液更明顯，極有可能讓使用者誤判呈陽性，用 SELFIA 儀器放大 100 倍觀看在 OD₅₂₀ 下的吸光度時，I/Σ 的值也相對高。至於 PBST、RIPA，雖然下圖用手機紀錄的照片無法真實還測試線上的顏色亮度，但實際用肉眼看時，測試線上呈現淡淡紅色，快篩結果不清楚。相較之下，使用 PBS、VTM 的快篩測試線的紅色沒有其他緩衝液明顯，放大 100 倍後的 I/Σ 值仍是最低的兩個。

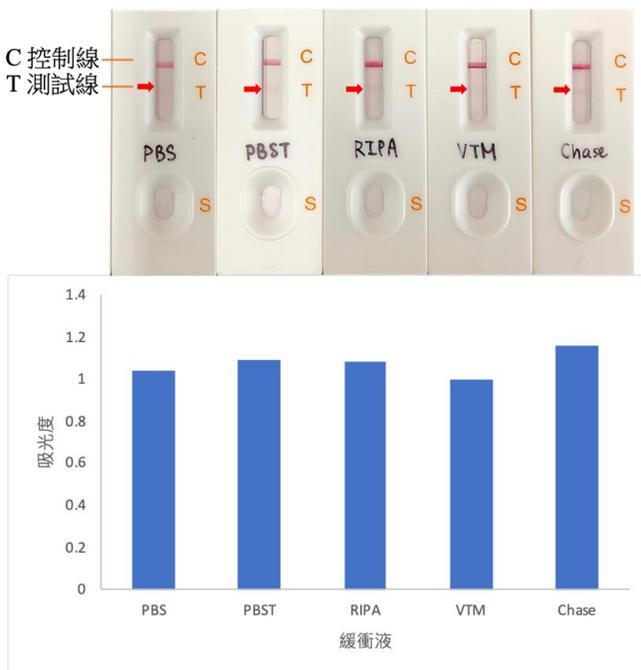


圖 7. 廠商 A 緩衝液系統比較。

上半為此廠商快篩試劑以肉眼可見的實際偵測結果，在檢體內不含有抗原的情況下，測試線不應該出現任何顏色顯示。

用 SELFIA 儀器將結果放大 100 倍時，由於就算是同個廠商生產出的快篩上的奈米金和抗體含量都不同，不能直接比較測試線上的奈米金吸光度，要將測試線值除此快篩的背景值，也等於是測試現的吸光度是背景值的多少倍，計算公式如下：

$$\text{測試線值 (Test Line Value)} / \Sigma = \text{背景值 (Background Value)}$$

二、偽陰性

為了確認在硝化纖維膜上的抗體不會因緩衝液導致錯誤的陽性結果，由偽陽性實驗得知，VTM 是偽陽性最低的緩衝液，適合進行快篩檢測，所以偽陰性實驗使用 VTM 作為病毒抗原的溶液。由於廠商 A 的快篩在 0、10、20、100 ng/mL 的棘狀抗原濃度下都沒有清楚的顯示結果為陽性，我們將抗原濃度加到了 200 ng/mL，但是此快篩的測試線上仍沒有明顯的紅色線，沒有良好的偵測靈敏度。

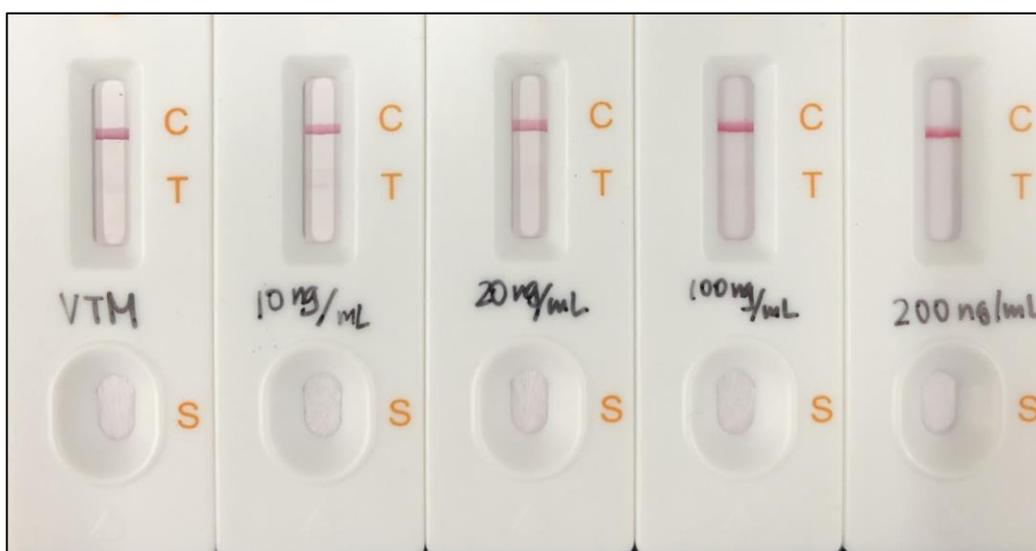


圖 8. 廠商 A 快篩在肉眼下的結果。（左到右分別為 0、10、20、100、200 ng/mL 的棘狀抗原濃度。）

用 SELFIA 儀器放大 100 倍後的訊號也證實了此快篩偵測不到病毒抗原，200 ng/mL 的抗原濃度與完全沒有病毒抗原的吸光度幾乎相同，若使用者的鼻咽拭子檢體內含有抗原，則此快篩將有高機率顯示錯誤的陰性結果。

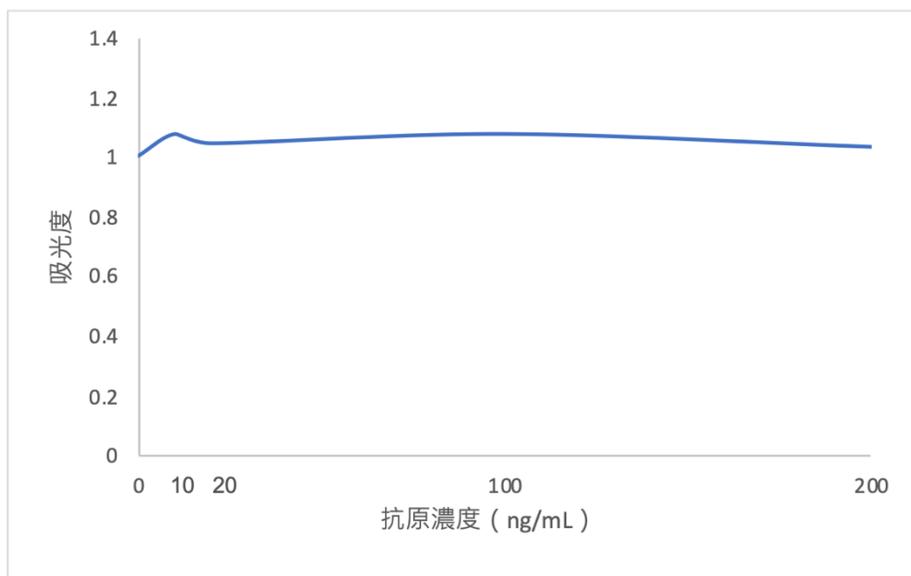


圖 9. 廠商 A 快篩在 0、10、20、100、200 ng/mL 之棘狀抗原濃度的 I/Σ 吸光度幾乎相同。

貳、純化結果

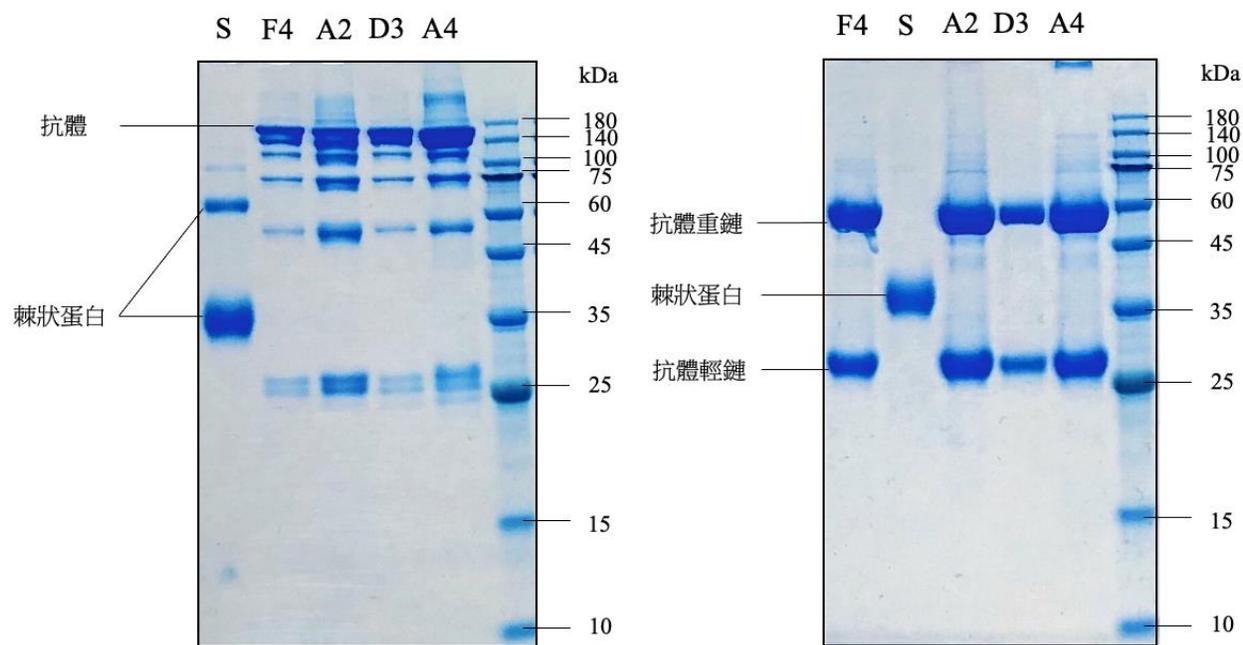


圖 10. 還原性（左）與非還原性（右）SDS-PAGE 結果。分析並確認了純化的在棘狀蛋白上的受器結合區（receptor-binding domain, RBD）和四隻抗體。棘狀蛋白（S）和抗體均顯示乾淨且清晰的條帶。

參、用 ELISA 配對抗體與棘狀蛋白

為了確定與棘狀蛋白配對的抗體的專一性與親和性，在 OD₄₅₀ 的吸光度下，我們觀察四種抗體 F4，A4，A2 和 D3 與棘狀蛋白抗原的結合程度（圖 11）。如圖 11 所示，所有抗體均顯示出對棘狀蛋白抗原的專一性，並且對其他蛋白質，如綠色螢光蛋白（GFP）和牛血清白蛋白（BSA）的結合親和力弱，為背景值。其中，抗體 F4 和 A4 對棘狀蛋白抗原的親和力最強，如在 3.5 和 4.0 附近的高吸光率所見。此外，在圖 12 中，抗體 A4 在較高濃度下與棘狀蛋白抗原的結合親和力強，而抗體 F4 即使在濃度較低的棘狀蛋白抗原下也表現出比抗體 A4，A2 或 D3 更強的親和力。因此，A4 和 F4 抗體是側向流體免疫層析中將與納米金結合的首位候選抗體，用於配對抗體。

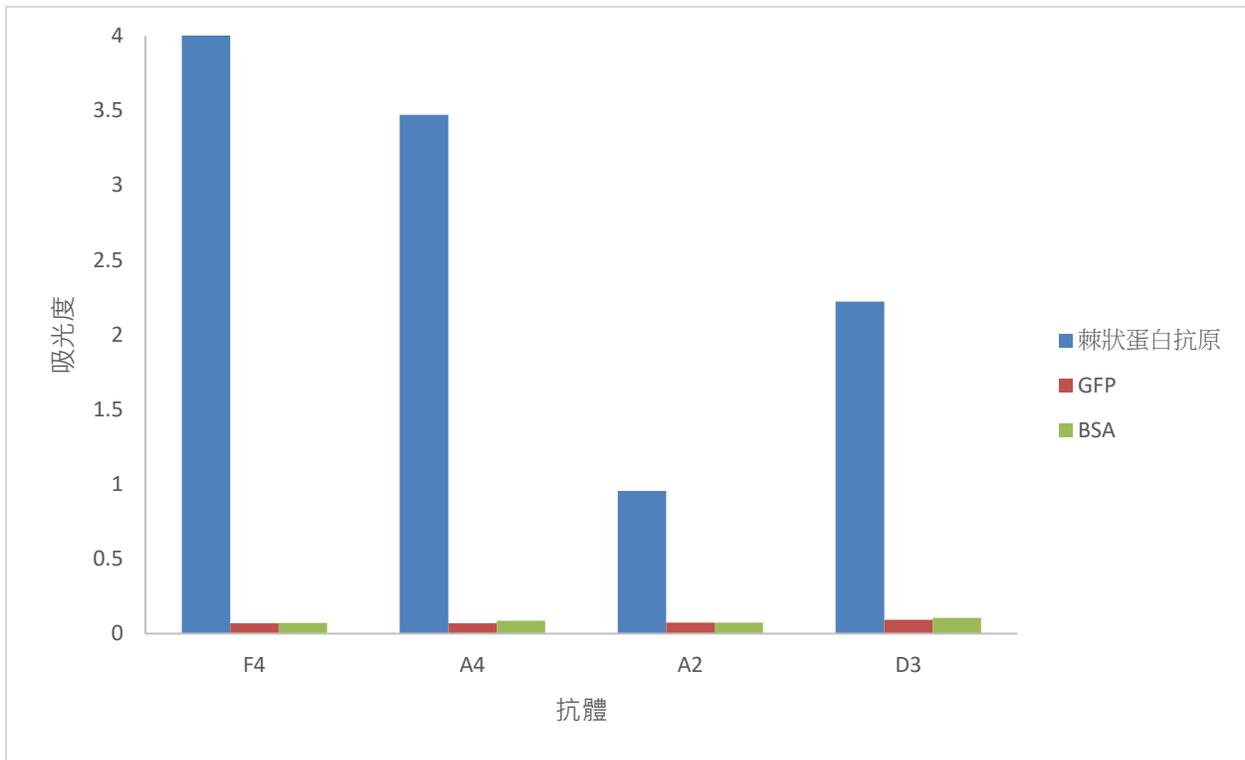


圖 11. 抗體與棘狀蛋白抗原結合親和力和結合專一性。將 GFP，BSA 和棘狀蛋白抗原包固定於曹孔中，並將相同濃度的抗體 F4，A4，A2 和 D3 加到每個孔中。然後使用 ELISA plate reader 在 OD₄₅₀ 觀察吸光度。四種抗體對 GFP 和 BSA 的吸光度值均可以忽略不計，表示兩種蛋白質與四種抗體之間幾乎沒有或不曾結合。對於棘狀蛋白抗原，抗體 F4 在 OD₄₅₀ 下顯示的最高吸光度為 4.032，而抗體 A2 在 OD₄₅₀ 下顯示最低吸光度為 0.954。

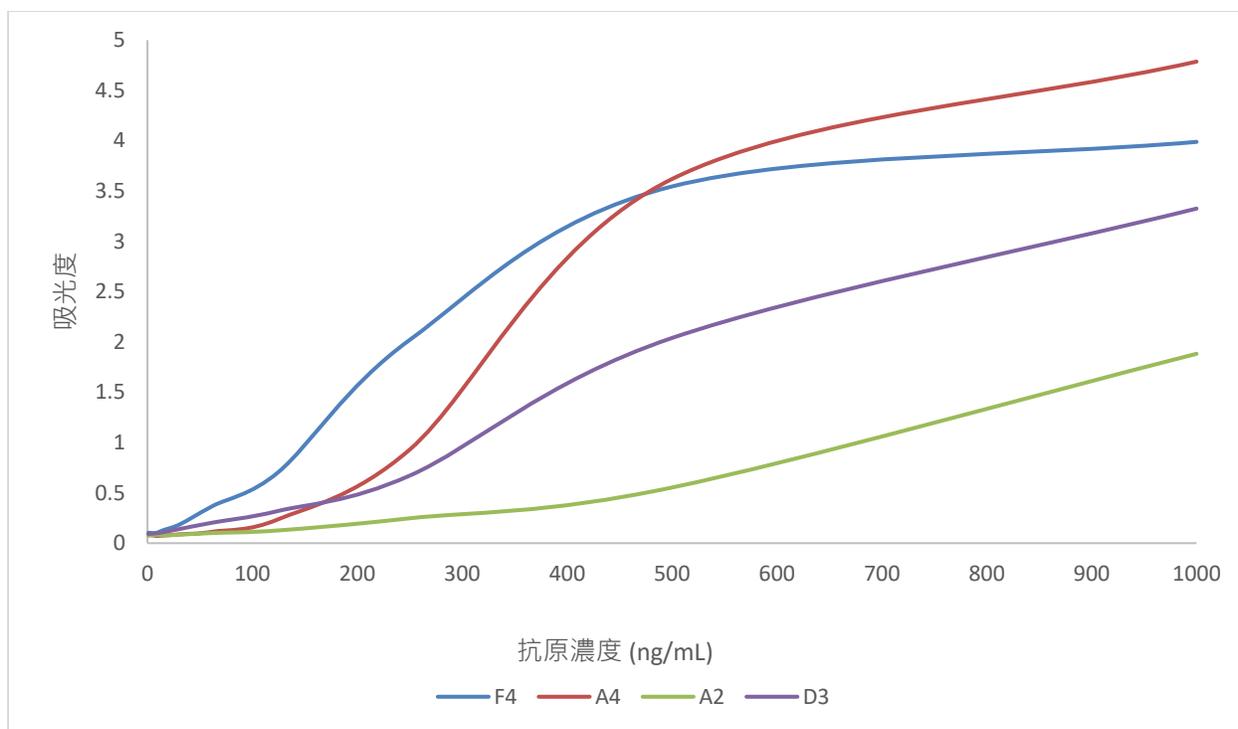
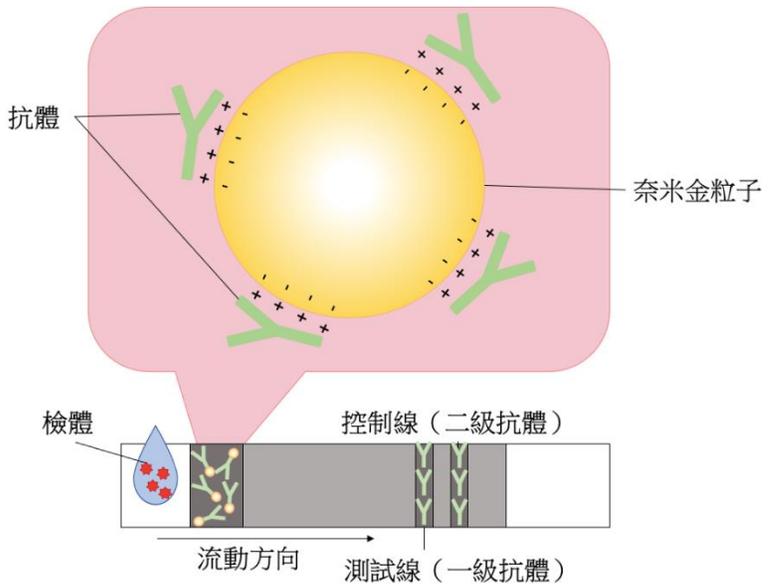


圖 12. F4，A4，A2，D3 的結合親和力比較。 抗原濃度從 1000 ng/mL 到 0 ng/mL 的兩倍序列稀釋，並將相同濃度的抗體 F4，A4，A2 和 D3 加到每個孔中。記錄每種抗體在 OD₄₅₀ 的吸光度。在 500 ng/mL 至 1000 ng/mL 的高抗原濃度下，A4 吸光度值超過 F4，A2 和 D3。在 0 ng/mL 到 500 ng/mL 的較低抗原濃度下，F4 吸光度值超過 A4，A2 和 D3。A4 和 F4 抗體對棘狀蛋白抗原的親和力均高於 A2 和 D3 抗體。A4 和 F4 是奈米金結合的優先候選對象。

肆、奈米金粒子與抗體的結合

由於奈米金具有強大的吸光能力和獨特的表面化學性能，在側向流體免疫層析中被廣泛用作指示劑。AuNP 可以促進包括肽和蛋白質在內的各種分子的非共價和共價結合。在非共價結合中，AuNP 的表面帶負電荷，因此，離子相互作用使包含帶正電荷的抗體自然結合於 AuNP 的表面。對於 AuNP，增加尺寸會增加吸光範圍，呈現不同的顏色。當在側向流體免疫層析中發生結合時，30 nm AuNP 在測試條上呈現紅色，因為它的最大吸光度為 526 nm，並反射紅光。

圖 13. 抗體和 AuNP 之間的疏水效應。實際上，奈米金粒子與抗體結合的方式如上，帶有正電荷的抗體會被帶有負電荷的 AuNP 表面吸引。[4]



伍、奈米金與抗體結合後與棘狀蛋白的結合親和力

為了設置 COVID-19 的快篩條，需要確認抗體與 AuNP 結合後對棘狀蛋白抗原的結合親和力。為了確保結合親和力，將四種抗體分別與金結合，並將抗原固定在測試線上，流過橫向流動試紙，觀察測試線是否有任何可見的結合跡象。如圖 14 所示，抗體 D3 在測試線上顯示出最強的信號。因此，在雙抗體側向流體免疫層析過程中，應使用它與棘狀蛋白抗原結合。

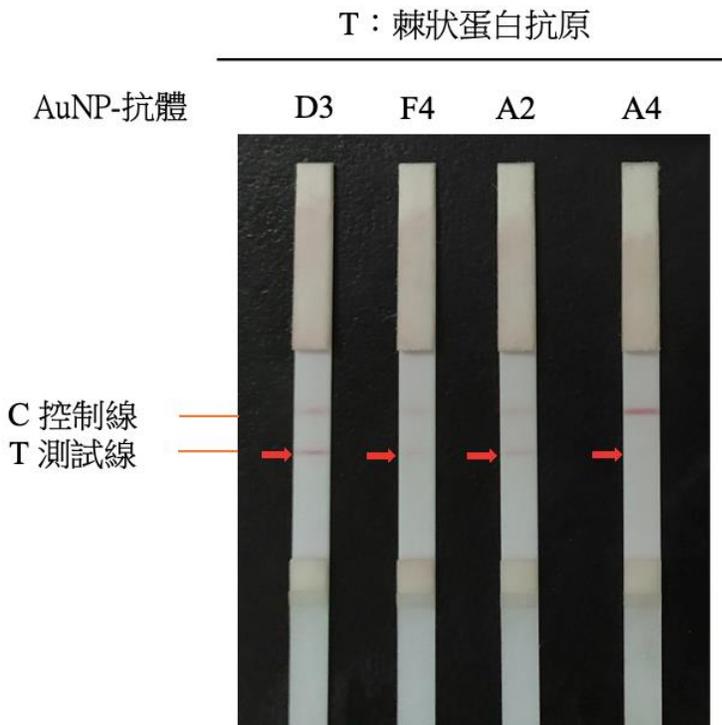


圖 14. 棘狀抗原與抗體配對。測試線上可觀察抗原與抗體配對。成功與奈米金結合的 D3 抗體與棘狀抗原結合。F4，A2 和 A4 抗體未與奈米金結合成功，或對棘狀抗原的親和力較低。

陸、抗體配對

為了尋找合適的抗體對做側向流體免疫層析，讓四種不同的 AuNP-抗體結合分別結合 F4，D3，A2 和 A4 抗體，將每隻抗體固定在四個試紙條的測試線上（使用 F4 作為目標的示例如圖 15 所示）。由於結果表是 F4 和 D3 彼此牢固結合，因此抗體 F4 和 D3 成為用於側向流體免疫層析相互作用的抗體對。

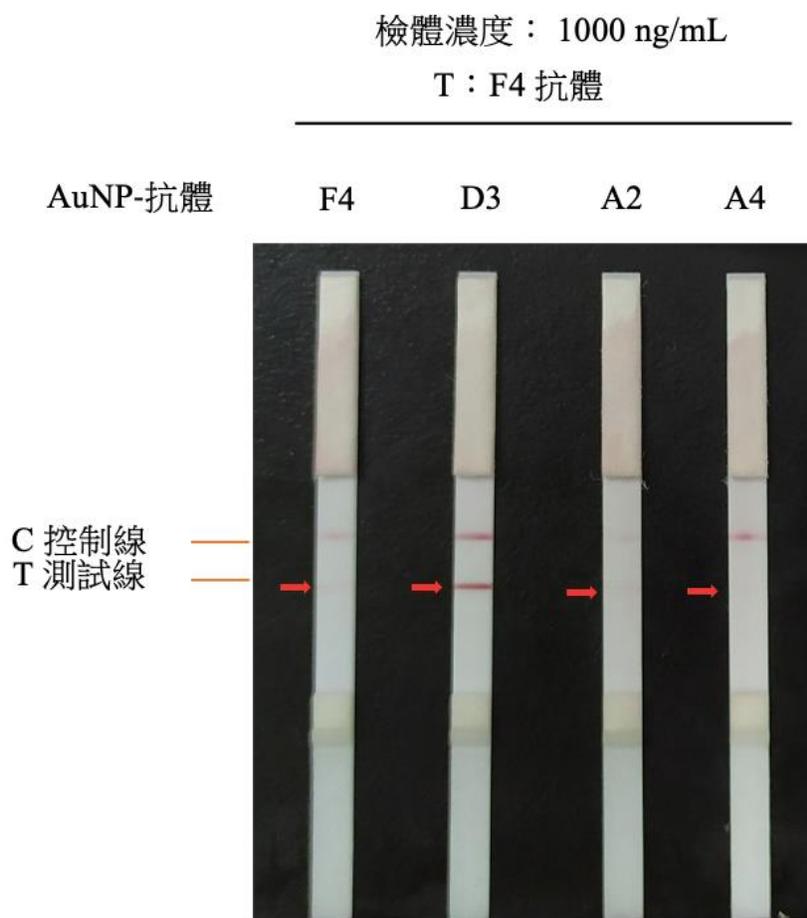


圖 15. 使用 F4 作為目標的抗體配對。 F4 固定在測試線上，並允許其他三種 3 種奈米金-抗體（AuNP-D3，AuNP-A2，AuNP-A4）以 1000 ng/mL 的棘狀蛋白抗原結合。由於蛋白質因為有相同的結合區，通常不與自身結合，因此將 F4 用作陰性對照。從試紙結果可以看出，D3 對 F4 的親和力最高。與 A2 和 A4 相比，它產生了最明顯的暗紅色線條，代表成功發現抗體對 F4 與 D3。

奈米金 測試線	F4	D3	A2	A4
F4	-	+++	+	-
D3	++	-	+	-
A2	-	++	-	-
A4	-	+	-	-

表 1. 抗體 F4，D3，A2 和 A4 之間的配對。 F4 和 D3 顯示具有最強的親和力。測試四隻抗體分別與結合奈米後的抗體之間的結合親和力，找出側向流體免疫層析法的抗體對。

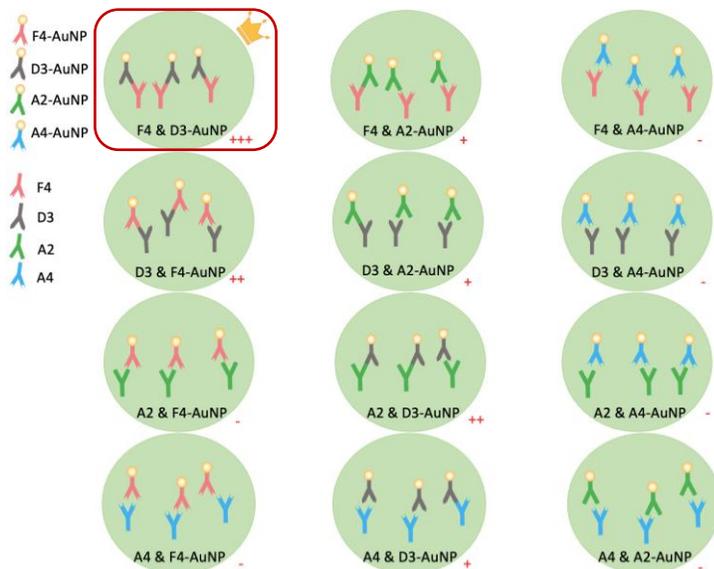


圖 16. 結合親和力示意圖。與 AuNP- D3 抗體配對的 F4 抗體有出最佳的結合親和力。

柒、雙抗體側向流體免疫層析設計

側向流體免疫層析的快篩設置如下。抗體 D3 與金結合後將固定在結合區，抗體 F4 則固定在測試線上。當含有棘狀蛋白抗原的檢體流過條帶時，它將首先結合到 AuNP-D3。然後，被 AuNP-D3 捕獲的棘狀蛋白抗原將與固定在測試線上的 F4 抗體結合，顯示一條紅色線。建立該側向流體快篩裝置後，測試了不同濃度（0、10、20、40、100 和 200 ng / mL）的棘狀蛋白抗原，以提高檢測靈敏度極限。

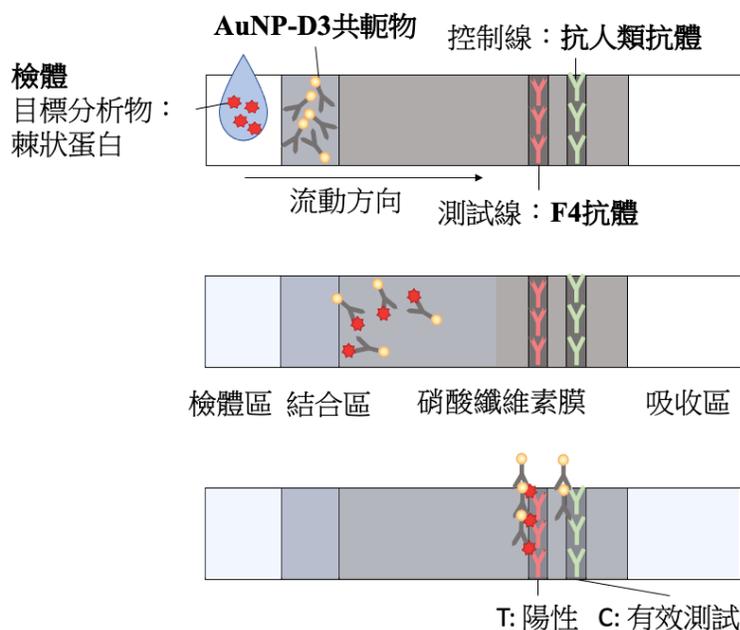


圖 17. 使用雙抗體夾心分析格式的側向流體免疫層析試條的最終設計。AuNP-D3 在結合區上。在硝酸纖維素膜上，將 F4 抗體固定在測試線，將抗人類抗體固定在控制線上。

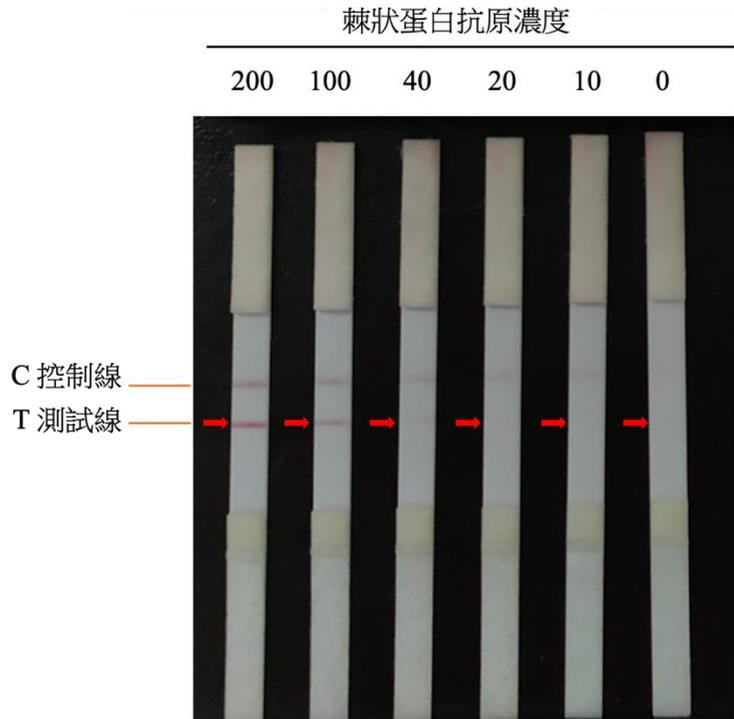


圖 18. 使用 0、10、20、40、100 和 200 ng/mL 棘狀蛋白抗原濃度測試檢測最低濃度。當濃度為 100 ng/mL 時，能看到清晰的測試線，而濃度為 40 ng/mL 棘突蛋白的測試線則不太明顯。但是，這表明濃度在 40 到 100 ng/mL 之間仍能夠成功結合 F4 抗體。

捌、緩衝液系統篩選減少偽陽性

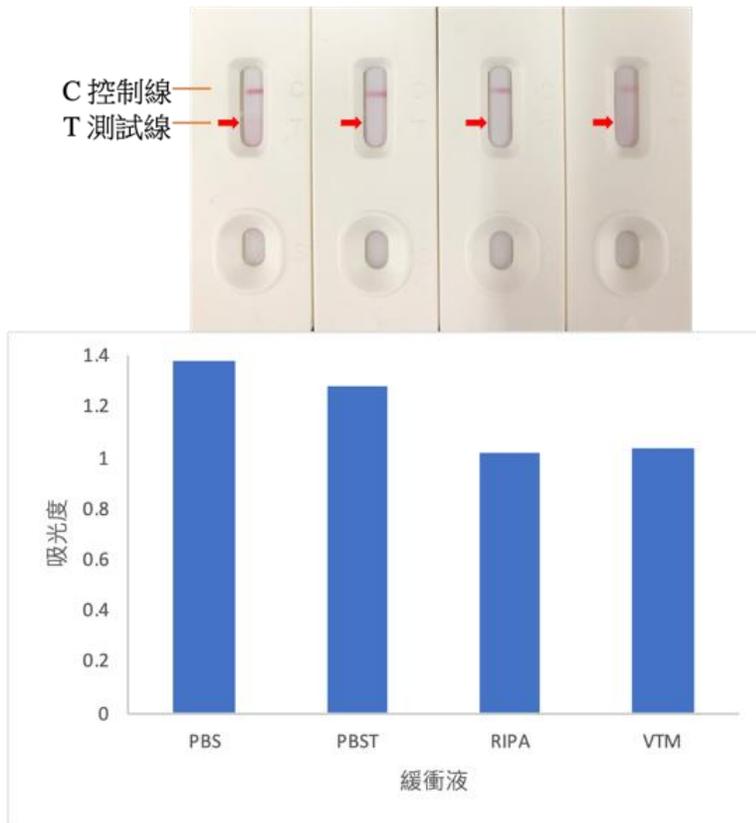


圖 19. 篩選不同緩衝液檢測偽陽性。

用肉眼觀看時，除了使用 PBS、PBST 快篩試條整體比較紅、試紙不乾淨，使用 RIPA、VTM 的測試線上很乾淨，沒有紅色的線條，而放大 100 倍後的 I/Σ 吸光度值也證實如此，結果清楚表示陰性。

RIPA 細胞裂解液用於抽取細胞內的蛋白質，含有 SDS 和 NP-40 等界面活性劑，所以能破壞細胞膜，瓦解病毒顆粒，特定抗原（如：核衣殼蛋白、棘狀蛋白）會釋放於緩衝系統中，但是不至於讓蛋白質完全變性。另一方面，VTM 培養基常用於核酸檢測，須保存病毒活性，含有胎牛血清幫助維持病毒細胞存活，有些人也會加入緩衝液，例如：HEPES，能確保細胞在穩定的 pH 下，不會破壞抗原。由圖 10 的結果所見，由於使用 RIPA 裂解液和 VTM 的快篩試劑均在測試線將線正確的陰性結果，抗體與抗原間應有的專一性互動不會被影響，它們是適合選做快篩的兩個緩衝系統。PBS 內含有 KCl、NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄，具備一般緩衝能力，能防止蛋白質變性，但是不足以改善抗體-抗體、奈米金-抗體或是檢體中的其他物質之間的疏水效應會導致偽陽性。即使使用 PBST 當緩衝系統，此非離子表面活性劑會大幅度降低物質表面的疏水性作用力，顯著降低疏水效應，去除抗體間的非專一性結合，然而 TWEEN 20 是屬於較弱的界面活性劑，不足以改善及降低此檢測系統的偽陽性現象。

玖、提高靈敏度減少偽陰性

最後，將檢測靈敏度提高到 10 ng/mL 的棘狀蛋白抗原濃度。在初始條件下，測試線上的暗紅色顯示線不清楚。現在僅需 10 ng/mL 肉眼就可見一條清晰的暗紅色線條，表是棘狀蛋白抗原、奈米金-D3 抗體、抗體 F4 結合成功。

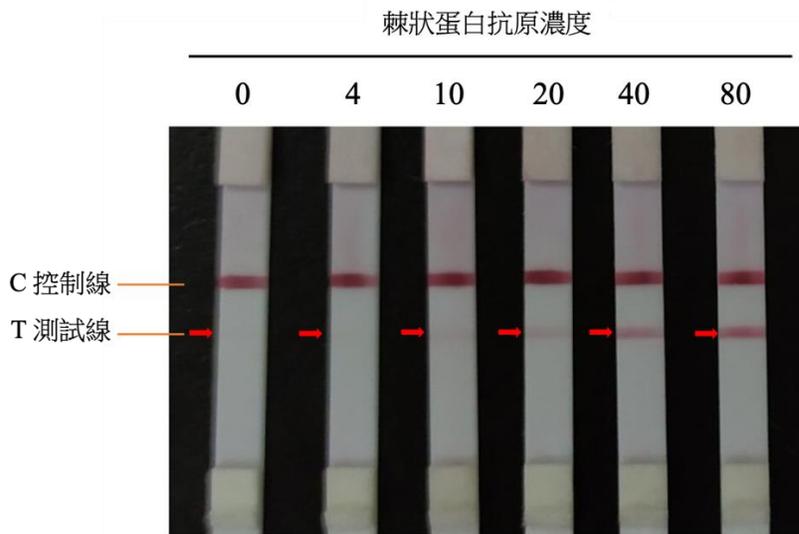


圖 20. 0 ng/mL 到 80 ng/mL 的棘狀蛋白抗原濃度。以 0 ng/mL 的濃度作為對照，可以在 10 ng/mL 看到清晰的測試線，因此靈敏度極限已達到 10 ng/mL。

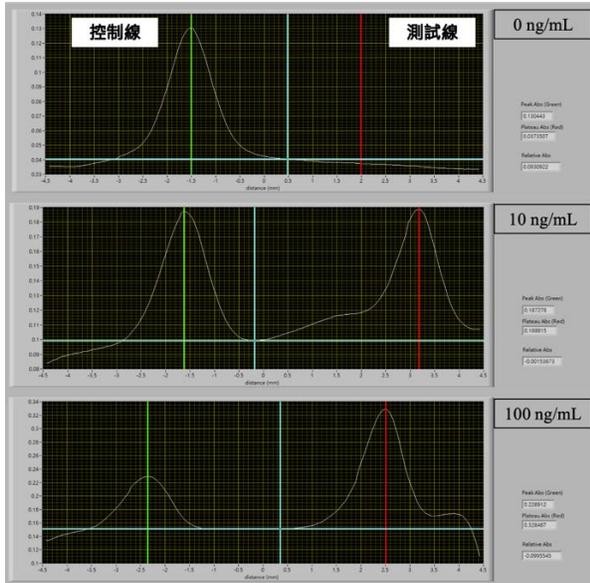


圖 21. 0、10、100 ng/mL 抗原濃度在 SELFIA 儀器下的吸光度結果。圖上的綠色線對應的是控制線而紅色線對應的是測試線，對比兩個波的高度，偵測靈敏度達到 10 ng/mL。

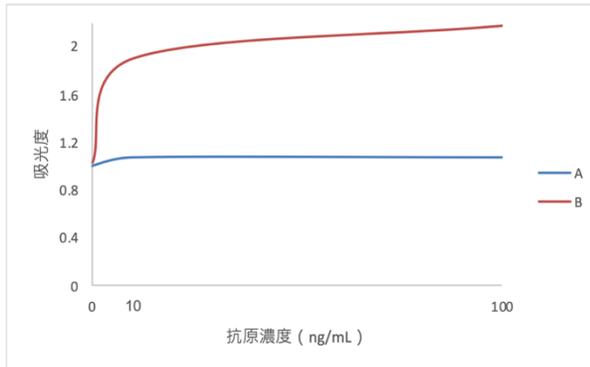


圖 22. 比較我們的快篩與廠商 A 快篩的偵測零靈敏度。用 SELFIA 得到圖 20. 的結果，算出 I/Σ 值，確認快篩已達到只需 10 ng/mL 的病毒抗原濃度就可判斷為陽性結果，但廠商 A 的快篩連 100 ng/mL 的高抗原濃度都無法偵測到。

另外，為了進一步測試對突變株的偵測能力，我們測試了英國突變株 B.1.1.7 和印度突變株 B.1.617 的 RBD 蛋白，發現此快篩的抗體都能辨認兩株突變病毒的 RBD，但由於印度突變株在測試線上紅色線條較淡，靈敏度較低，代表在偵測印度突變株時有可能導致偽陰性。反之針對英國突變株，此快篩測試片可以有極強訊號偵測 B.1.1.7 英國突變株。

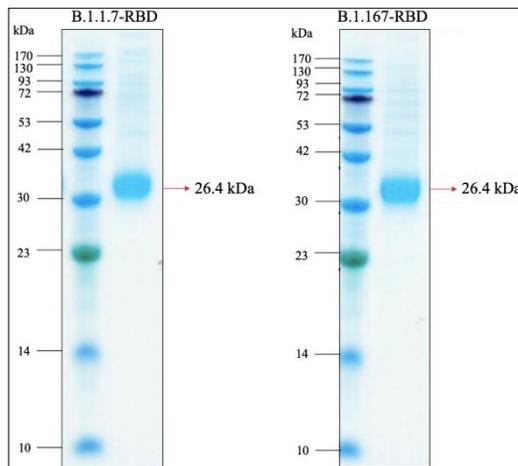


圖 23. 突變株 SDS-PAGE 純化結果。

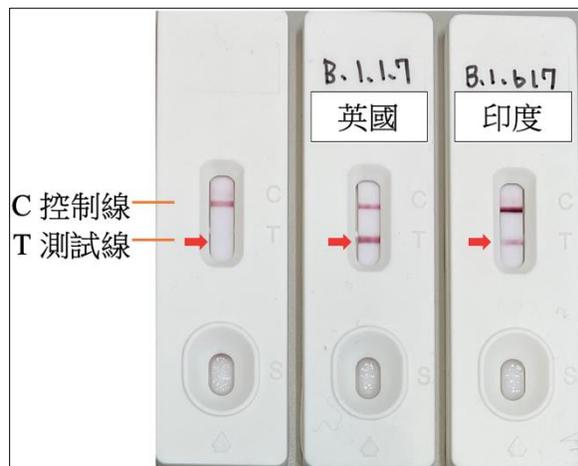


圖 24. 突變株對偽陰性之影響。

陸、討論

壹、用 SARS-CoV-2 的棘狀蛋白開發橫向流動免疫分析

COVID-19 的病毒是 SARS-CoV-2，這是感染人類冠狀病毒家族的第七個已知菌株。這些病毒長約 30 千鹼基對，並包含正單鏈 RNA，既可作為基因組又可作為 mRNA 起作用，使宿主細胞能夠將其 mRNA 直接翻譯為蛋白質。SARS-CoV-2 在結構上由棘狀蛋白、包膜蛋白、跨膜蛋白和核衣殼蛋白組成，每種蛋白具有不同的功能。大多數廠商使用核衣殼蛋白作為側向流動的靶標，因為此蛋白在受感染的人體細胞中含量最高 [8]，只需要低濃度的檢體即可檢測 COVID-19 感染，具有高靈敏度和低檢測限。核衣殼蛋白和棘狀蛋白都可以用作側向流動檢測目標。棘狀蛋白從包膜中突出，並負責與人類細胞受體血管緊張素轉化酶 2 (ACE2) 結合進入人細胞內部。由於棘狀蛋白在病毒表面的位置以及與人肺細胞的進入和感染直接相關，因此被用作靶標蛋白。這兩個目標都可檢測 COVID-19 感染，幫助減少偽陰性、偽陽性。

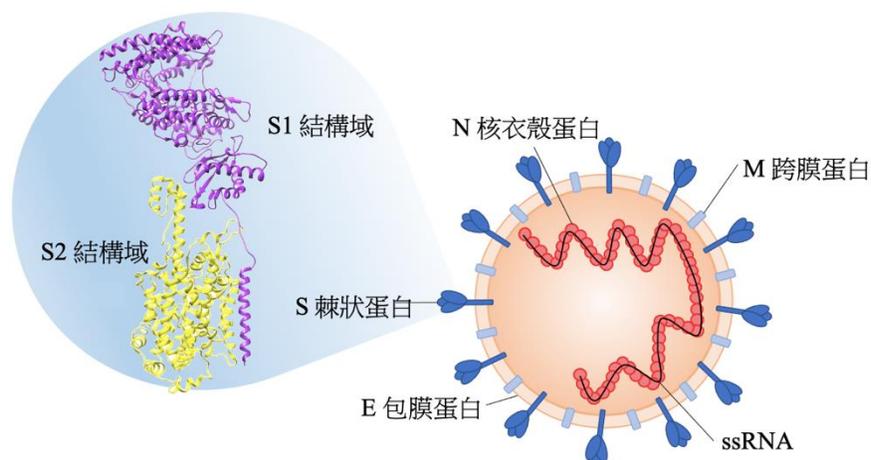
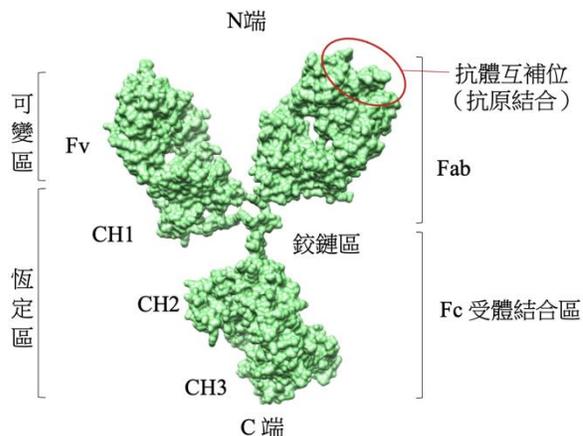


圖 25. SARS-CoV-2 的結構。左側是棘狀蛋白的 3D 結構。S 棘狀蛋白具有兩個結構域：S1 和 S2。S1 負責細胞識別，而 S2 則有助於人類得宿主細胞膜和病毒包膜的融合。[7]

圖 26. 抗體的 3D 結構。抗體上的 Fab 區含有抗體互補位 (paratope)，對應棘狀蛋白抗原的決定位，具有專一性，因此對於尋找合適的抗原配對至關重要。



貳、

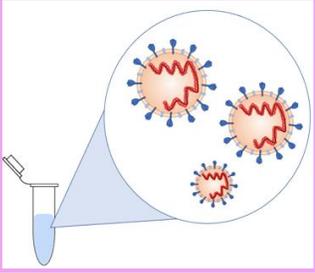
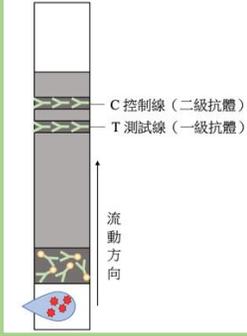
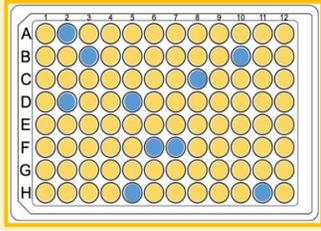
	RT-PCR 核酸檢測	快篩抗原檢測	抗體檢測
			
檢體類型	鼻咽拭子	鼻咽拭子	血清
檢測方式	用 cDNA 偵測 SARS-CoV-2 病毒的 RNA	偵測 SARS-CoV-2 抗原，以試紙上顏色變化顯現	感染或疫苗免疫後幾天偵測 IgM/IgG 抗體
時間	4 小時 – 1 星期	1 小時內	1 – 3 天
準確度	高準確度，被視為標準	需要 RT-PCR 測試進一步確認	可能需要進行第二次抗體檢測
優點	- 直接檢測病毒的存在 - 高準確度	- 價格低，大多數人可負擔 - 可在家檢測，不用麻煩醫護人員 - 快速知道結果	- 感染或疫苗免疫後幾天能準確檢測 IgM/IgG 抗體
侷限及缺點	- 價格高 - 需要實驗室專用設備進行診斷 - 耗人力 - 實驗室污染可導致錯誤結果	- 需要花時間測試與抗體的結合親和力 - 不同製造商之間的質量差異會影響靈敏度和特異性	- 需要花時間測試與抗體的結合親和力 - 需要實驗室專用設備進行診斷

表 2. COVID-19 核酸、抗體和抗原診斷測試之間的比較 [4]. 雖然快篩在實驗時需要花時間測試與抗體的結合親和力，但是它的價格讓大多數人可負擔，使用方便，比 PCR 檢測或 ELISA 抗體檢測可更有效地控制疫情擴散 [6]。考慮到當前市場快篩檢測的缺點，我們在本研究中將解決敏感度和特異性問題。

參、偽陽性

一、同科病毒株 (Coronaviridae) 棘蛋白序列之比較

COVID-19 的病毒是 SARS-CoV-2，是會感染人類的冠狀病毒的第七個已知病毒株，而其他病毒株包括：嚴重急性呼吸道冠狀病毒 (SARS-CoV)、中東呼吸冠狀病毒 (MERS-CoV)、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1。HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1 會引起輕度上呼吸道的疾病，是造成成年人普通感冒的 15% - 30% 的病毒。[5] 我們從 NCBI 資料庫取得人類冠狀病毒的氨基酸序列，用 Pairwise Sequence Alignment 進行蛋白質序列一致度 (Identity) 的比較，發現 SARS-CoV-2 的棘狀蛋白序列與 SARS-CoV 病毒的序列相似度較高，一致度可達到 70.5%，而其他的人類冠狀病毒則均低於 25%。雖然人類冠狀病毒都是以表面上的棘狀蛋白與人類細胞受體結合，但是每個促進進入宿主細胞的病毒棘狀蛋白差異度大，導致結構上的差異，一致度低，表示若快篩檢體內若有蛋白質序列較近之抗原，如：SARS-CoV 的棘狀蛋白抗原，則 SARS-CoV-2 的快篩抗體有可能會因專一性低而結合 SARS-CoV 的抗原，顯示錯誤的陽性結果。另一方面，針對 SARS-CoV-2 棘狀蛋白抗原所設計的快篩系統對其他冠狀病毒 (MERS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1) 將不具專一性。

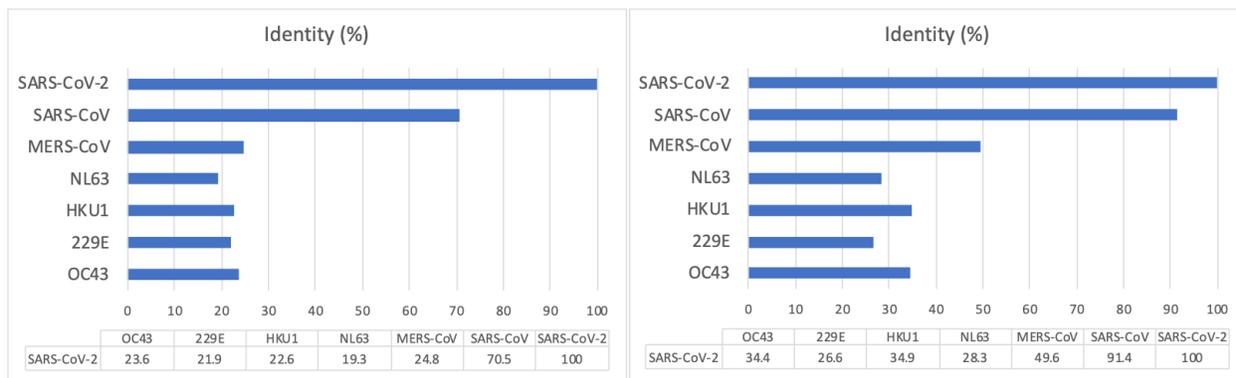


圖 27. 人類冠狀病毒比較。(左) SARS-CoV-2 的棘狀蛋白序列與 SARS-CoV 病毒的序列相似度高，達到 70.5%。(右) SARS-CoV-2 的核衣殼蛋白序列與其餘的六株人類冠狀病毒一制度都高於 SARS-CoV-2 的棘狀蛋白序列，代表若用核衣殼蛋白當作標靶製作 SARS-CoV-2 快篩，偽陽性問題極有可能會比以棘狀蛋白作標靶的快篩高，也是我們一開始選擇棘狀蛋白製作快篩的重要原因。

二、篩選優質抗體，具有更高專一性

產生偽陽性跟抗體對抗原的專一性有關，本研究中用的抗體 F4、D3、A4、A2 由廠商提供，若能篩選優質的抗體，抗體品質好且具有高專一性，則可以降低偽陽性結果。

肆、偽陰性

一、突變株對抗體辨認的影響

隨著疫情逐漸擴散，越來越多人被感染，尤其是 RNA 病毒，新的突變會發生更快。現在最普遍的 SARS-CoV-2 病毒的棘狀蛋白上就帶有 D614G 的突變，英國的 B.1.1.7 lineage 有 N501Y、P681H、69/70 deletion 的突變，而印度的 B.1.617 lineage 帶有 E484Q 和 L452R 的突變，南非的 B.1.351 lineage 帶有 K417N、E484K、N501Y 的突變。我們的抗體可辨識棘狀蛋白的區域為 R319-F541，若突變處不在範圍內，抗體仍可辨識。若突變處位於抗體辨識區，COVID-19 快篩上的抗體有可能無法辨認抗原。抗原的柔性區域 (flexible region) 很容易會是人類抗體辨認與結合的區域，也較容易發生突變，常導致抗原結構改變。雖然如此，但是抗原仍需與 ACE2 結合維持病毒感染宿主細胞之活性。未來，在病毒持續突變的情況下，可將人類細胞受體 ACE2 與抗體的 Fc 區域融合成重組蛋白，作為快篩上的一級抗體，有效捕獲檢體內 SARS-CoV-2 的棘狀蛋白抗原。另外，就算是同樣與人類細胞受體 ACE2 結合的病毒株，例如：HCoV-SARS、HCoV-NL63，不用擔心會造成陽性結果：因粘膜受體不同而對應之結構差異，再加上結合區與 AuNP 結合的抗體只會認出 SARS-CoV-2 的棘狀蛋白抗原並與其結合，不會導致錯誤的快篩判斷。

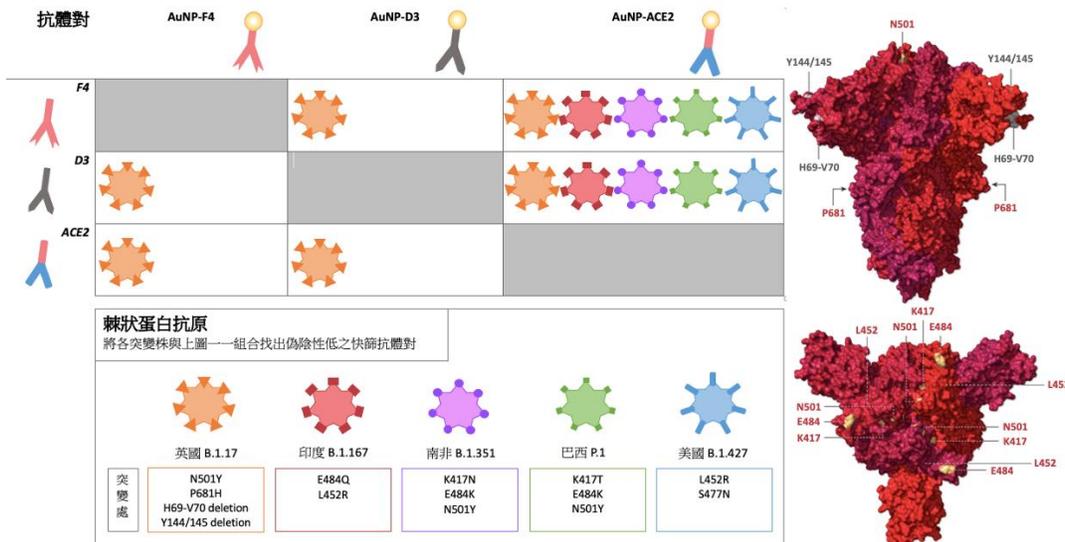


圖 28. 突變棘狀蛋白抗原配對與棘狀蛋白突變處 [3]。

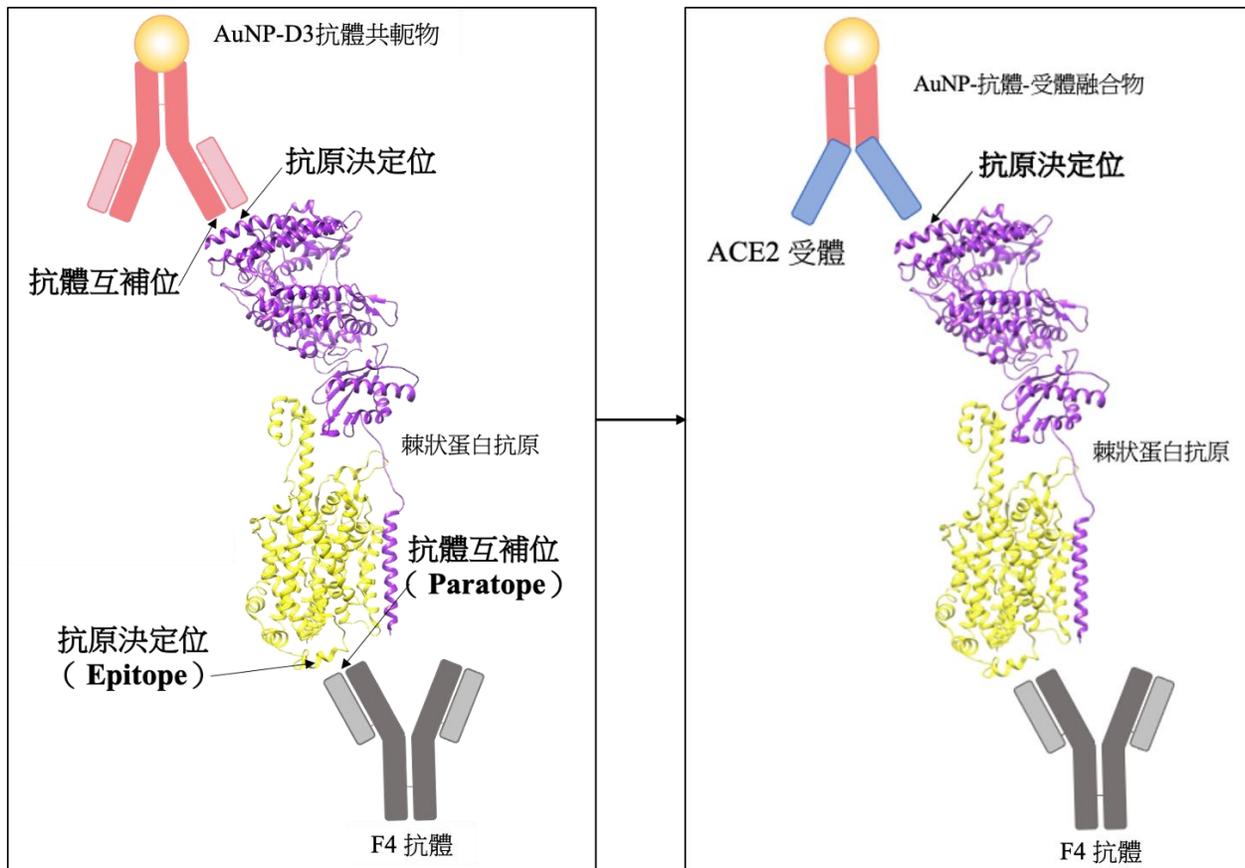


圖 28. 測試線上抗體與抗原結合方式。抗體上的 Fab 區含有抗體互補位 (paratope)，對應棘狀蛋白抗原的決定為，具有專一性，因此對於尋找合適的抗原配對至關重要。一個抗原有許多不同的決定位 (epitope)，我們快篩的設計是將抗體 D3 結合棘狀蛋白抗原的一個決定位，而抗體 F4 則結合到另一個決定位。

柒、結論

- 壹. 如廠商 A 的快篩，現在市面上販賣的 COVID-19 快篩試劑，準確度有待加強，存有偽陽性和偽陰性問題。
- 貳. 通過 ELISA 分析測試純化的刺突蛋白和抗體 F4，A4，A2 和 D3 的結合親和力。結果顯示，所有抗體均顯示出對刺突蛋白的特異性，而 F4 和 D3 顯示出對刺突的最高敏感性。
- 參. 將抗體 F4，A4，A2 和 D3 與金結合，並測試與刺突蛋白的結合親和力。金綴合的 F4 對刺突蛋白表現出最強的結合親和力。
- 肆. 將抗體 F4、A4、A2 和 D3 配對並測試彼此的結合。將每種抗體與金偶聯，並測試與其他三種未偶聯的抗體的配對。抗體 D3 對與金結合的 F4 具有最大的結合親和力。
- 伍. 根據雙抗體夾心法的形式，將成對的刺突抗原和抗體 F4 和 D3 進行比對，以進行側向流體免疫層析法。
- 陸. VTM 是最合適 COVID-19 快篩試劑的緩衝液系統。美國 FDA 規定使用呼吸道分泌物的標準檢測方法檢測 SARS-CoV-2 需要使 VTM 將鼻咽或口咽拭子運送到臨床實驗室 [1]，而現在疫情嚴重，VTM 培養基的數量有限，加上並非所有人的經濟能力都能負擔核酸檢測的高昂價格，所以若能用 RIPA 代替 VTM 當作快篩試劑的緩衝系統，則能幫助擴大篩檢範圍，並提準確率高、快速且便宜的檢測方式。
- 柒. 側向流體免疫快篩檢測的靈敏度極限從 100 ng/mL 提高到僅需 10 ng/mL，並對英國突變株有專一性。
- 捌. 如果 COVID-19 疾病繼續保持今天的嚴重程度，則可以進一步開發側向流體免疫層析法，以進行公共快篩檢測。
- 玖. 減少時間和人工成本，在短時間內將快篩應用於其他傳染病。
- 壹拾. 將人類細胞受體 ACE2 與抗體的 Fc 區域融合成重組蛋白(ACE2-Fc)，應用於快篩配對之產品開發，可解決突變株躲避舊版快篩檢測的問題，降低偽陰性。

捌、參考文獻資料

- [1] Center for Devices and Radiological Health. (2021, January 28).
- [2] *COVID-19 Map*. (2020). Johns Hopkins Coronavirus Resource Center.
- [3] Corum, J., & Zimmer, C. (2021, March 22). Key mutations in the B.1.1.7 spike [Illustration].
Coronavirus Variants and Mutations.
- [4] Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17–22.
- [5] Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2021). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology*, 428–440.
- [6] Shmerling, R. H. (2021, January 5). Which test is best for COVID-19? Harvard Health Blog.
- [7] *Spike Protein / S Protein*. (n.d.). SinoBiological.
- [8] Zhou, B., Liu, J., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Li, P., Ma, Q., & Cao, C. (2008). The Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Inhibits Cell Cytokinesis and Proliferation by Interacting with Translation Elongation Factor 1 α . *Journal of Virology*, 82(14), 6962–6971.

【評語】 052008

1. 此作品的研究目的明確且聚焦，研究內容結合近年時事，有初步結果顯示可行性，其結果對相關研究領域可能具有貢獻。
2. 國內外已開發類似的試劑套組，雖有實用價值及社會影響性，但其新穎性略嫌不足。應有文獻回顧的段落，以說明此作品探討的方向與過去研究有哪些不同。
3. 此研究所使用的方法大致合理可行，但有些材料及方法的敘述不是很清楚詳實，例如英國突變株、印度突變株的棘狀蛋白來源未說明，有些方法的描述也似是而非。建議對可數值化的資料，其分析應使用統計方法及顯著性檢定，以確定不同組別之間是否具顯著性差異。此外，建議盡可能將實驗結果量化，再進行比較分析，也需注意要有重複性實驗，為何僅使用這四種抗體的原因也未說明。
4. 簡報資料編排大致合理，但部分內容稍嫌擁擠，尤其是字數略多；此外，有些圖的字太小、不清晰。

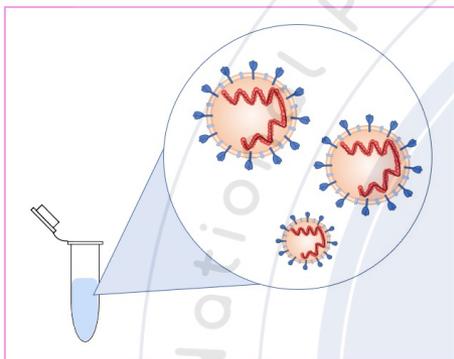
作品簡報

陰差陽錯—COVID-19快篩 偽陰偽陽性之探討與準確率改善

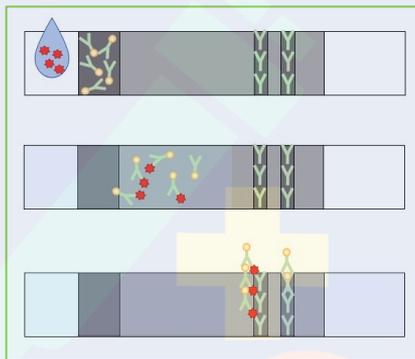
組別： 高級中等學校組
科別： 動物與醫學學科

前言

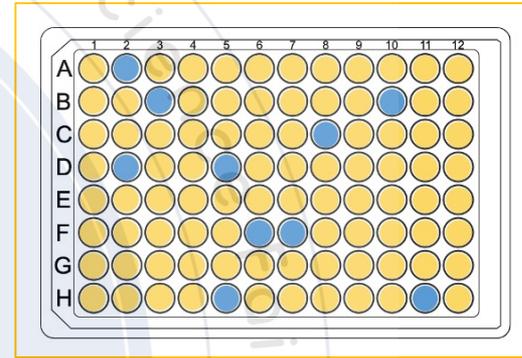
目前檢測病毒感染的方式可分為以下三種，其中，價格低、快速且易於使用的快篩測試，可以有效的對大量人群進行更頻繁的測試，卻容易產生偽陰偽陽的錯誤結果。



RT-PCR核酸檢測



快篩抗原檢測



抗體檢測

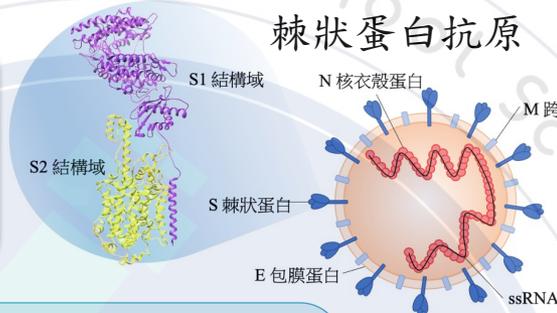
- 為了增進市面上COVID-19快篩試劑的診斷準確性，我們以驗孕棒快篩準確度為目標，減少錯誤的結果。
- 本研究成功以SARS-CoV-2病毒表面棘狀蛋白做出快篩試劑，達到15分鐘內高準確率之檢測效率，透過鼻咽拭子取樣判別是否感染COVID-19，
- 測試適當抗體對，偵測靈敏度可達10 ng/mL，進一步利用SELFIA判讀檢測結果，提高偵測靈敏度達0.1 ng/mL，同時測試對突變株的專一性，減少偽陰性。
- 測試不同緩衝液系統，選擇能不破壞抗原又具低疏水親和效應的緩衝液，以減少偽陽性。

研究問題：為何會產生偽陰性及偽陽性？又如何減少錯誤的結果？

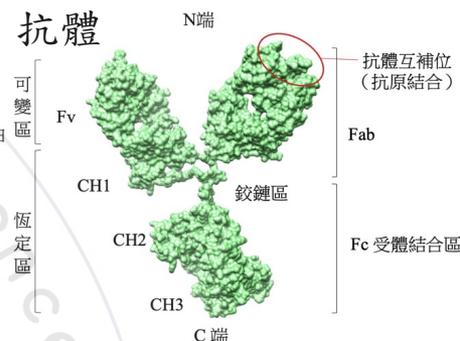
研究過程與方法

準備抗體與抗原

- 細胞懸浮培養→棘狀蛋白合成與純化
- 純化抗體



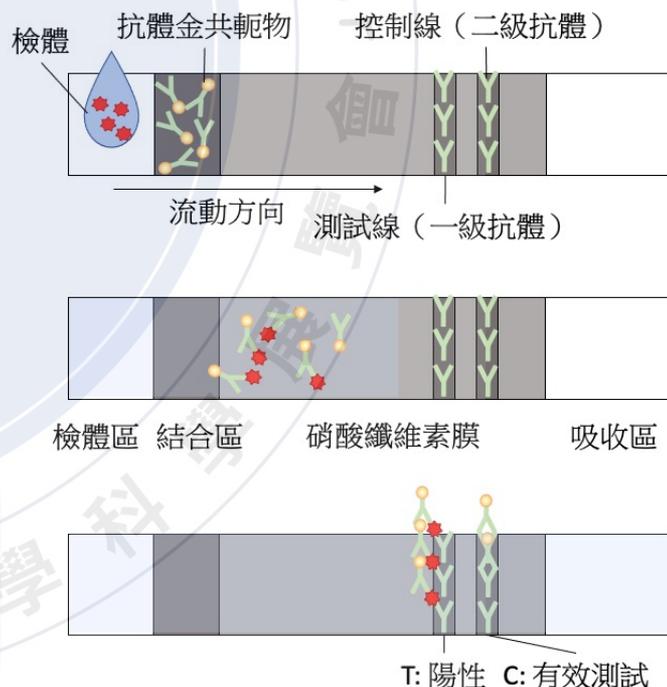
抗體



製作快篩

- 抗體特性分析
- 抗體配對
- 側向流體免疫層析法

雙抗體側向流體免疫層析



提高準確率

- 減少偽陰：SELFIA儀器偵測訊號
- 減少偽陽：
 - 比較四種緩衝液
 - 英國和印度突變株測試

未來發展

- 抗體Fc融合ACE2 人類細胞受體 偵測所有COVID-19病毒株
- 多條測試線的快篩辨認突變株

研究方法：快篩製作

抗體配對

- ✓ ELISA 檢測抗體-抗原專一性、親和力
- ✓ 結合金奈米粒子 (AuNP) -抗體
- ✓ 擬快篩試條找雙抗體對

偽陽性

- ✓ 篩選緩衝液：PBS、PBST、RIPA、VTM

偽陰性

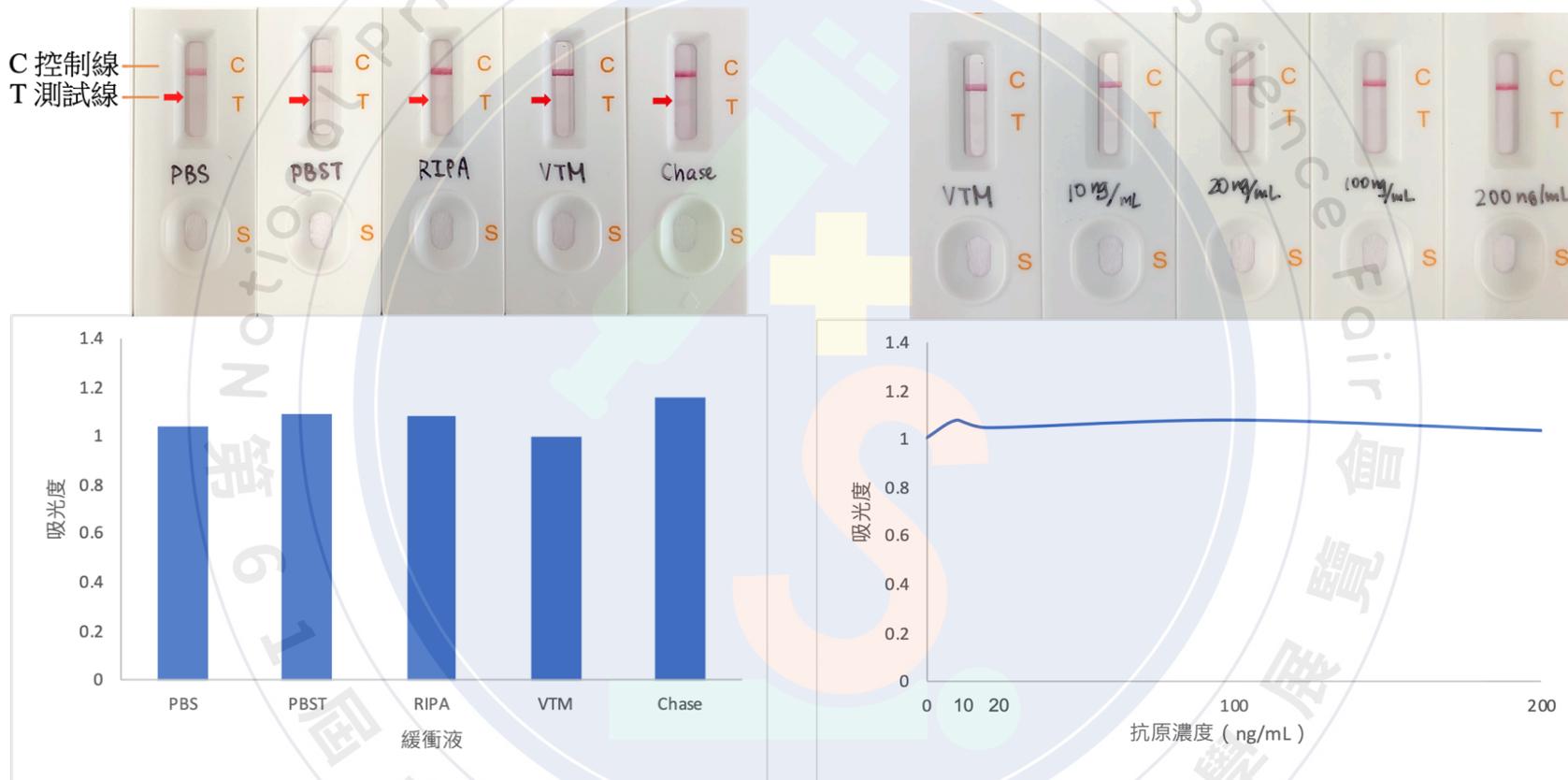
- ✓ SELFIA儀器提高靈敏度
- ✓ 測試突變株：英國B.1.1.7 (Alpha)、印度B.1.617 (Delta)

篩選抗體

從四隻抗體F4、D3、A2、A4找出能與AuNP結合且抗原-抗體、抗體間親和力強的兩隻抗體

研究結果 1

廠商A快篩



偽陽性

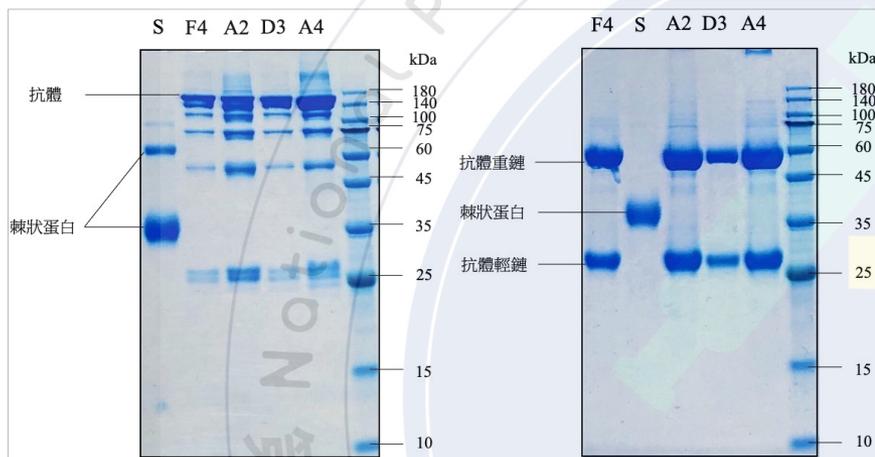
- 不同緩衝液在T線呈現淡紅色
- SELFIA放大訊號100倍(OD₅₂₀)的 I/Σ吸光值對應肉眼結果

偽陰性

- 0、10、20、100、200 ng/mL抗原濃度
- SELFIA放大訊號100倍(OD₅₂₀)的 I/Σ吸光值，明顯偵測不到病毒抗原

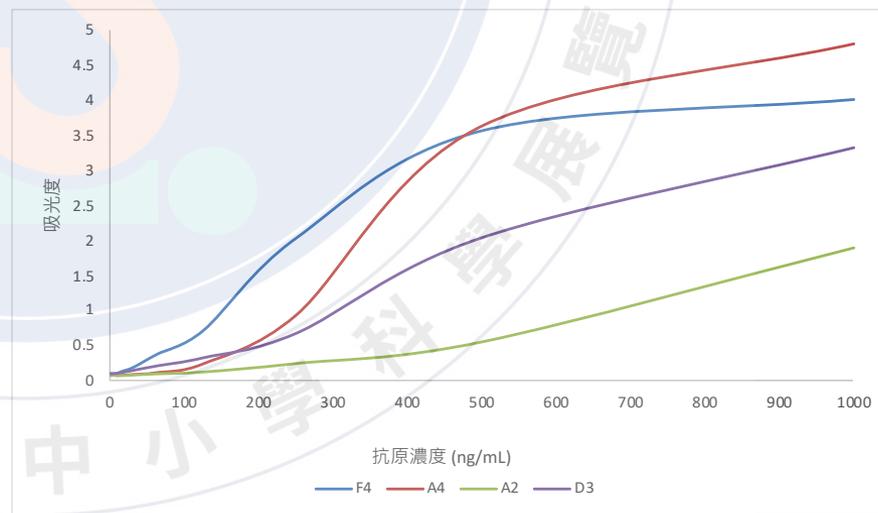
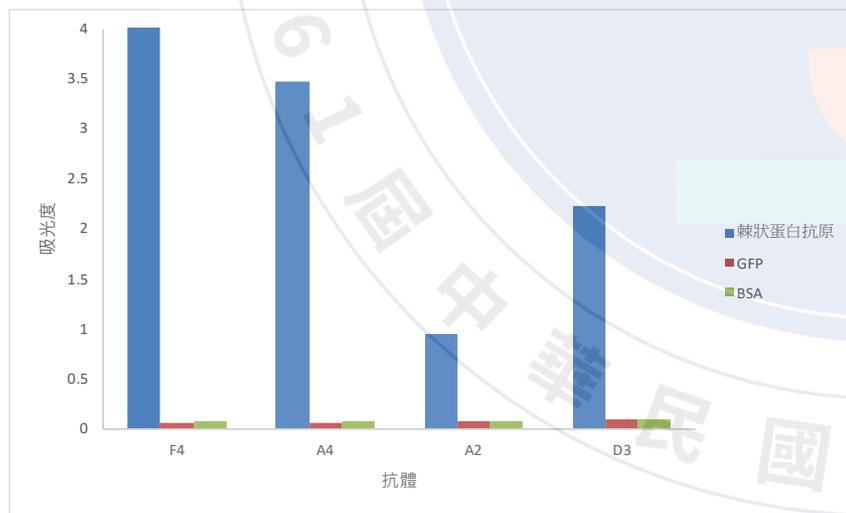
研究結果 2

純化、ELISA配對抗原與抗體



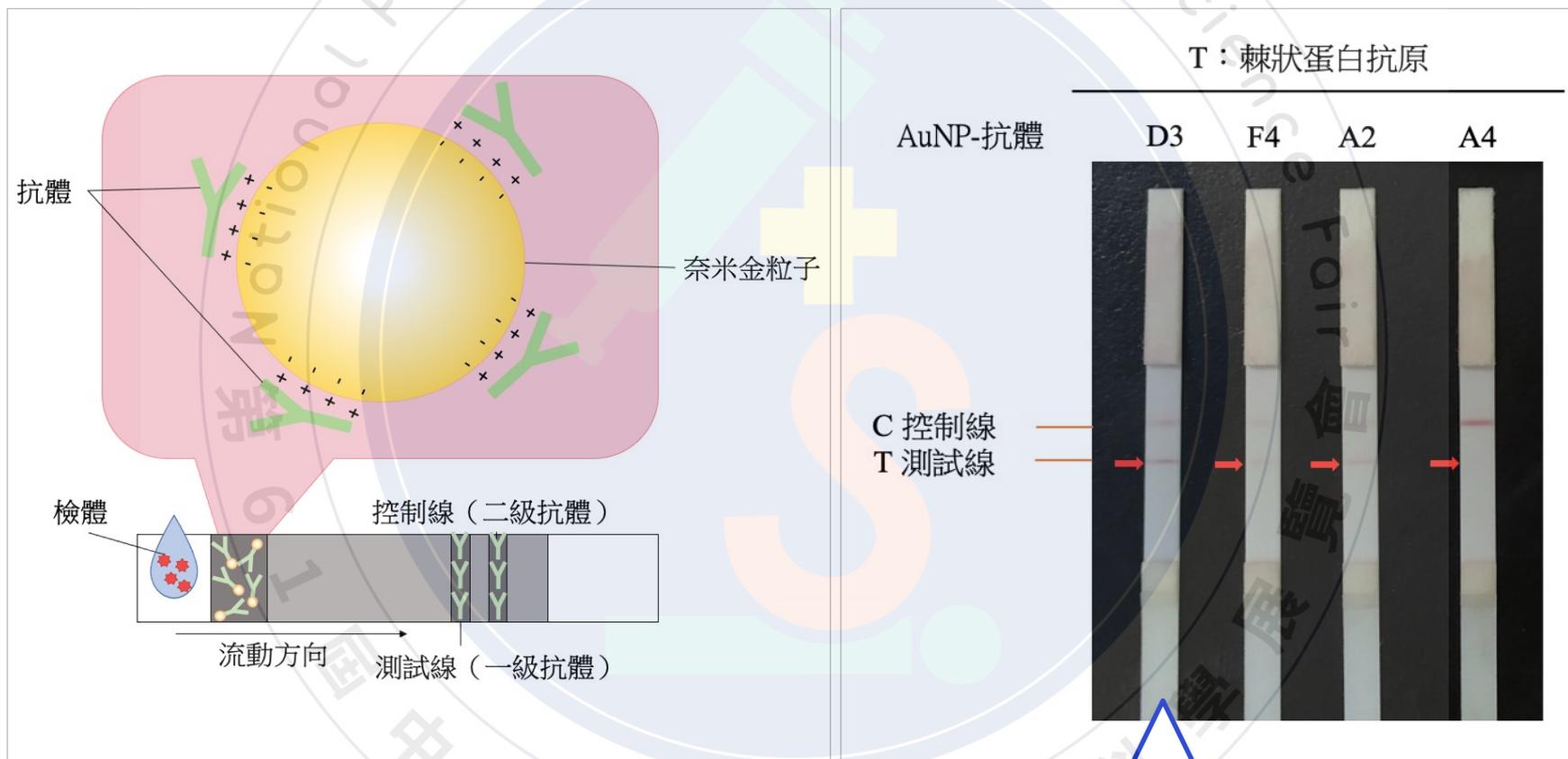
非還原性(左)與還原性(右) SDS-PAGE結果

- ELISA確認抗體抗原結合
 - 專一性：F4、A4、A2、D3
 - 親和力：
 - 500 ng/mL – 1000 ng/mL：A4吸光度值超過F4，A2和D3
 - 0 ng/mL – 500 ng/mL：F4吸光度值超過A4，A2和D3



研究結果 3

AuNP-抗體結合棘狀蛋白

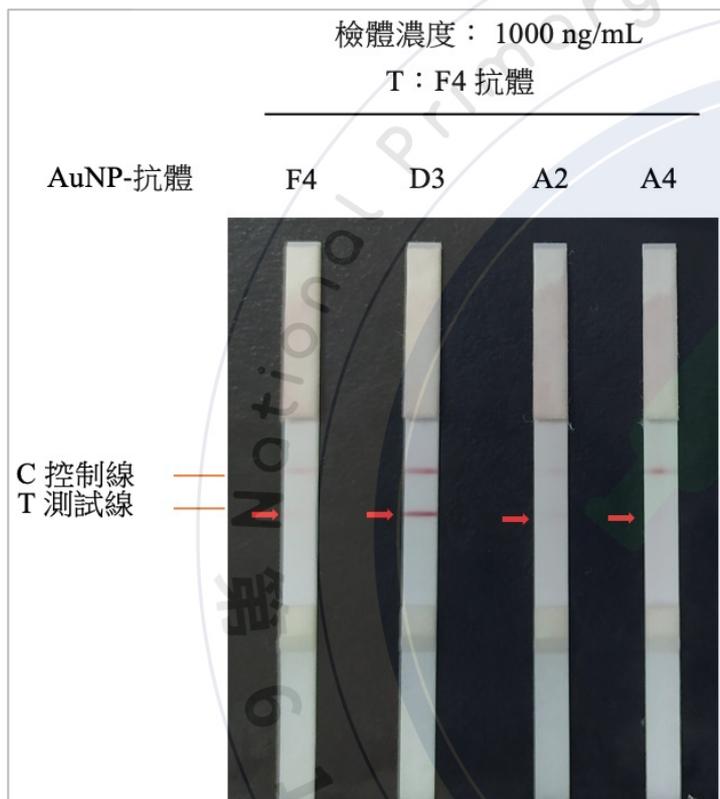


- 抗體結合金奈米粒子(AuNP)：
疏水效應

棘狀抗原與抗體配對：
D3抗體與AuNP結合成功

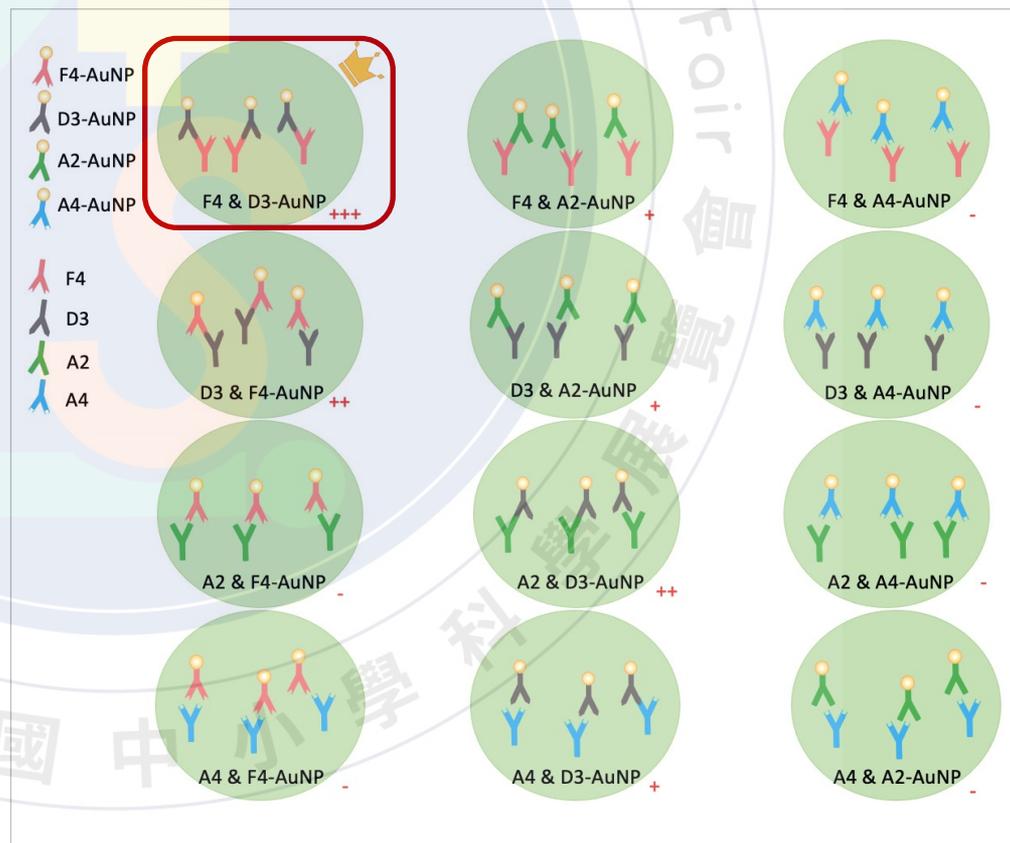
研究結果 4

抗體配對



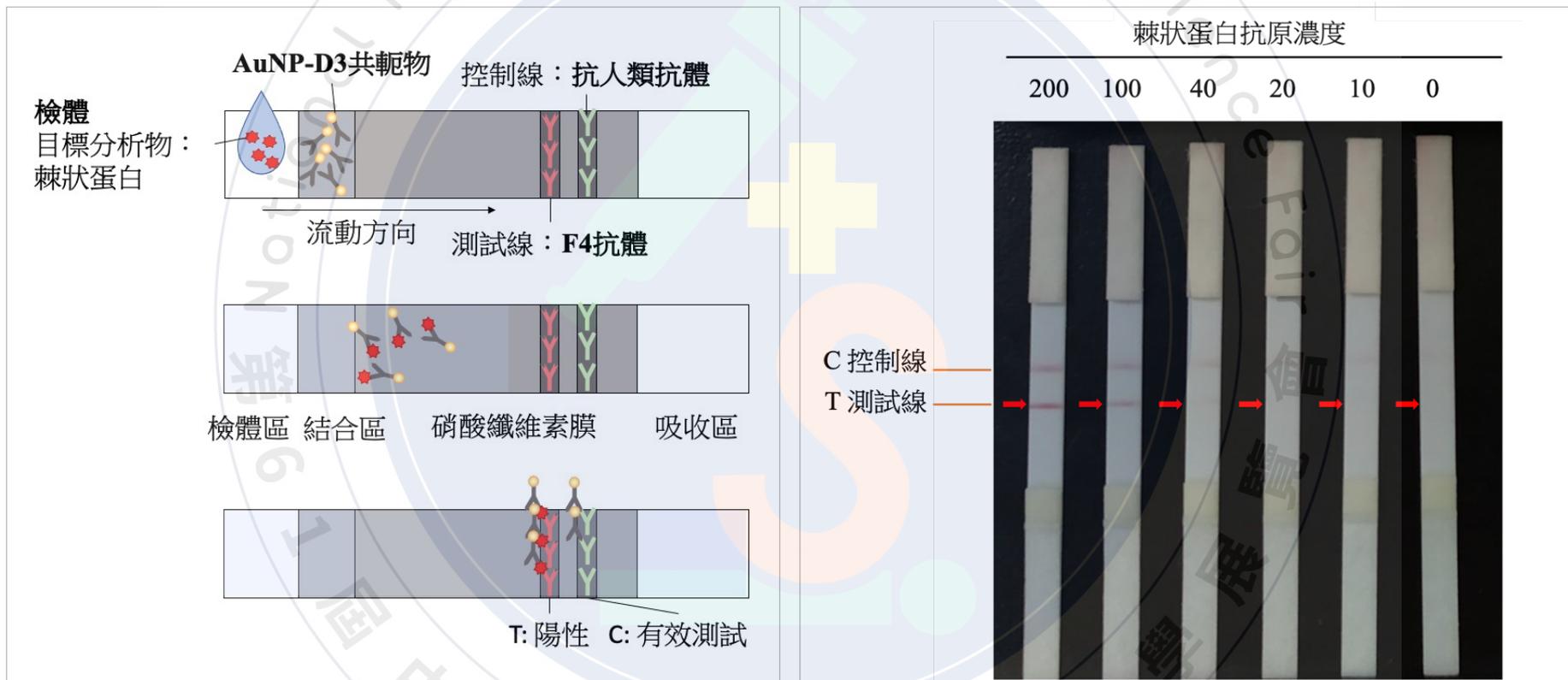
- 抗體F4，D3，A2和A4之間配對
 - 使用F4作為目標的抗體配對：發現抗體對F4、D3（左圖為實際結果，下圖為示意圖）

奈米金 測試線	F4	D3	A2	A4
F4	-	+++	+	-
D3	++	-	+	-
A2	-	++	-	-
A4	-	+	-	-



研究結果 5

雙抗體側向流體免疫層析

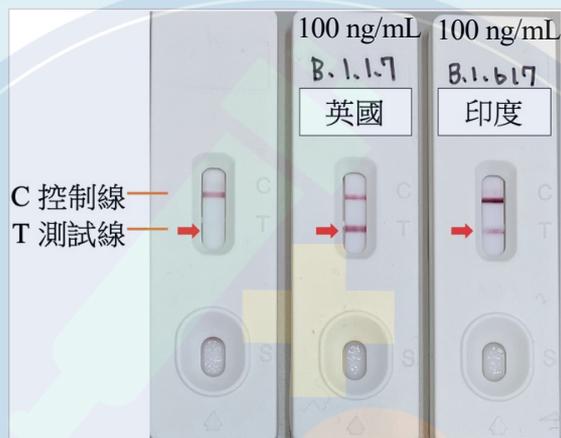
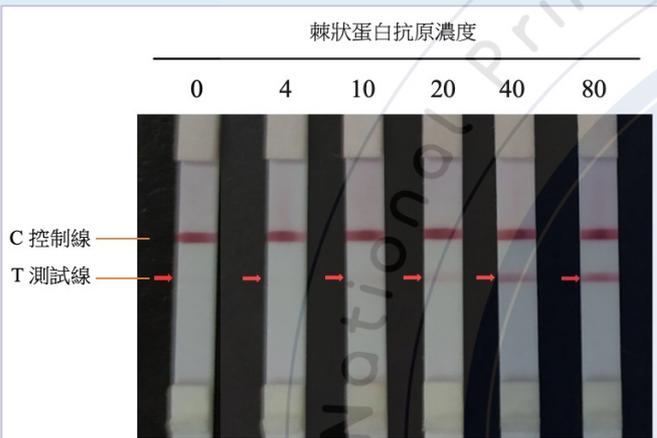


找到抗體對，使用雙抗體夾心分析格式
的側向流體免疫層析試條的最終設計

使用0、10、20、40、100、200 ng/mL
棘狀蛋白抗原濃度檢測最低濃度，靈
敏度為 40 ng/mL

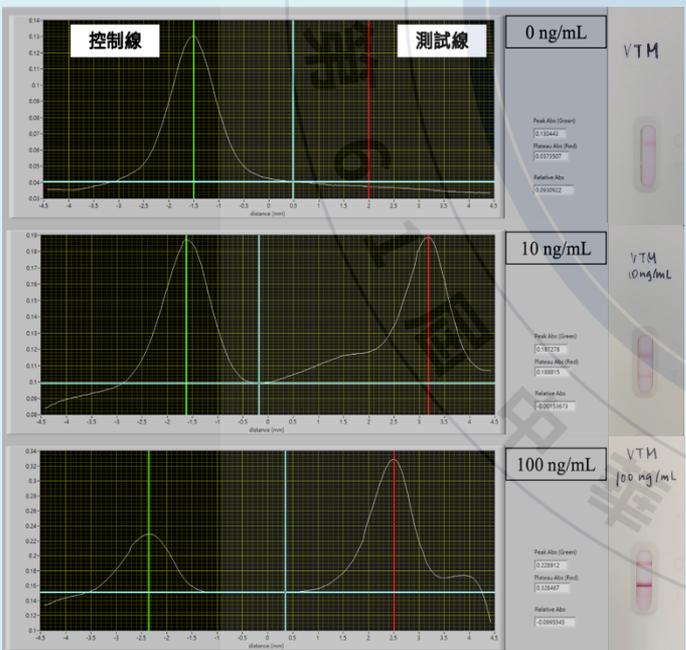
研究結果 6

改善偽陰偽陽



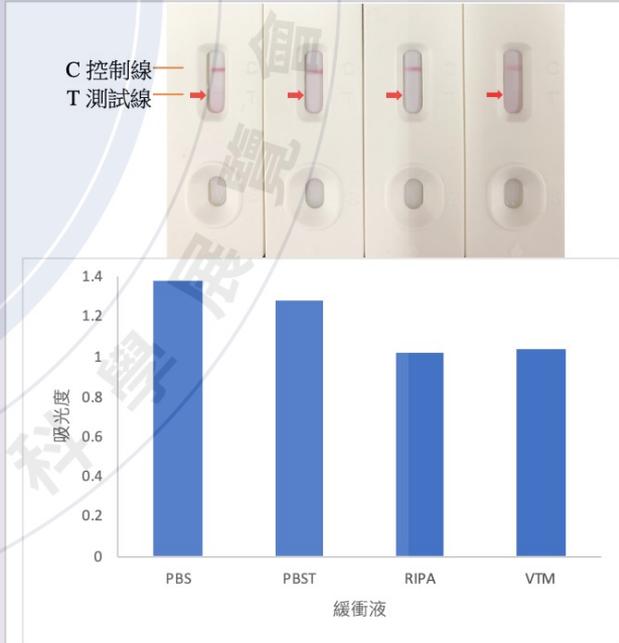
偽陽性

- 篩選不同緩衝液檢測偽陽性
- SELFIA放大訊號100倍，篩選出RIPA和VTM當緩衝液



偽陰性

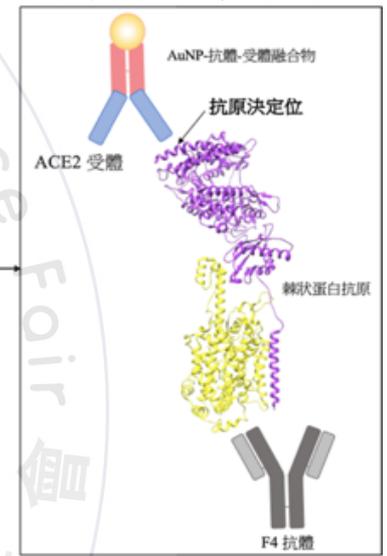
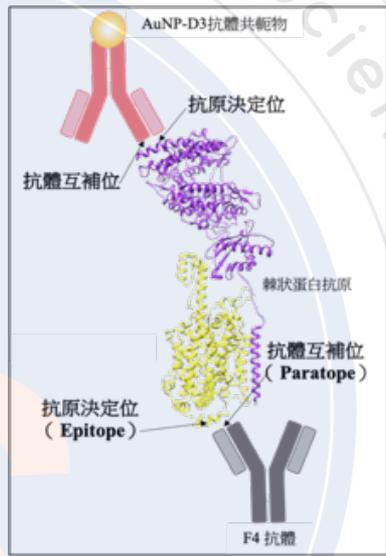
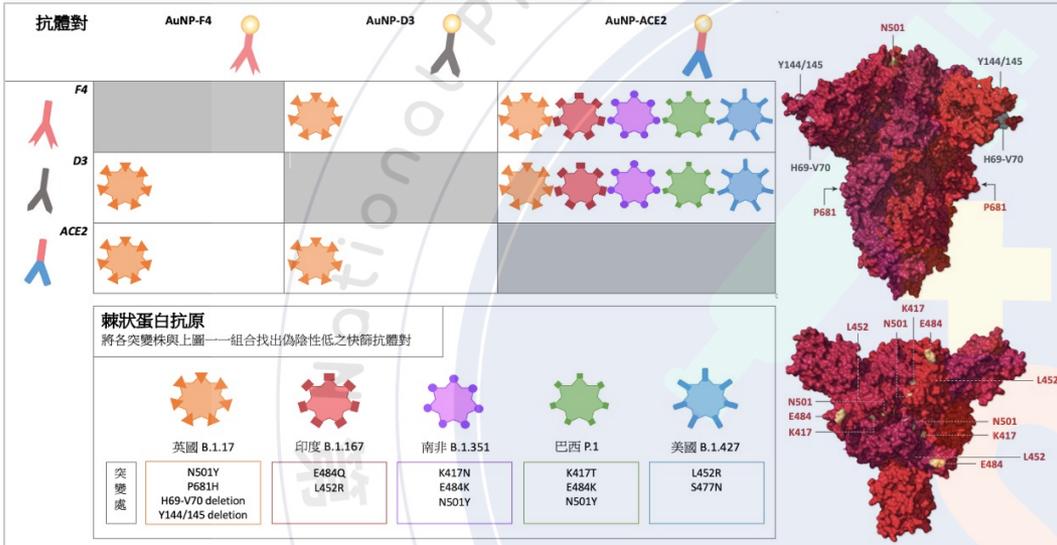
- 靈敏度達10 ng/mL
- SELFIA放大訊號100倍，證實靈敏度達10 ng/mL
- 快篩皆可辨認英國、印度突變株，但印度突變株訊號較弱，偽陰性較高



討論：未來發展，提高準確率

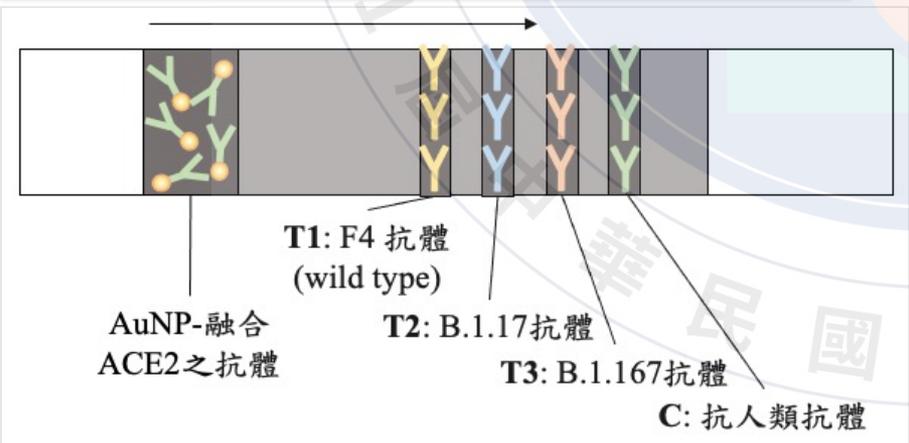
偽陰性—突變株抗體辨認

- SARS-CoV-2病毒視人類為感染對象，棘狀蛋白抗原必辨認ACE2人類細胞受體。
- 抗體Fc區域融合ACE2，凡只要是新冠狀病毒株，即可辨認。



多測試線快篩，一次性辨認突變株

- 設計多測試線COVID-19快篩，辨認感染為何種新冠狀病毒突變株。
- 連結APP，確認診斷結果，減少人為錯誤判斷。



結論

- 根據雙抗體夾心法的形式，將成對的棘狀蛋白抗原和抗體F4和D3進行比對，以進行側向流體免疫層析法。
- VTM 和 RIPA是最合適 COVID-19 快篩試劑的緩衝液系統。
- 側向流體免疫快篩檢測的靈敏度極限從 100 ng/mL 提高到僅需 10 ng/mL，有SELFIA的幫助則僅需0.1ng/mL。
- 對英國突變株有專一性。
- 將人類細胞受體 ACE2 與抗體的Fc區域融合成重組蛋白 (ACE2-Fc)，應用於快篩配對之產品開發，可解決突變株躲避舊版快篩檢測的問題，降低偽陰性。

參考文獻

- Corum, J., & Zimmer, C. (2021, March 22). Key mutations in the B.1.1.7 spike [Illustration]. Coronavirus Variants and Mutations.
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research, 9, 17–22.
- Shmerling, R. H. (2021, January 5). Which test is best for COVID-19? Harvard Health Blog.