

# 中華民國第 63 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高中組 化學科

050206

**LH 對快篩試劑顏色深淺定量**

學校名稱：國立嘉義高級中學

作者：  高二 翁健洲  高二 郭冠偉  高二 楊庭瑞	指導老師：  葉秀娟
---	------------------

關鍵詞：側流分析(LFA)、快篩試劑、灰階值定量

# 摘要

隨著快篩的實用度提高，我們希望能夠更了解快篩的原理、適合快篩的濃度與體積，以及最合適的作用時間，我們以色彩灰階值作為顏色深淺定量。由於 COVID-19 的檢測試劑需要高規格的實驗室，因此我們選擇較易取得的排卵試劑，我們跟龍騰生技公司取得排卵試劑以及黃體素 80MIU 濃度的尿液，我們將原濃度尿液體積分成 30、50、75、100 $\mu$ l，發現每種濃度的深度大致相同。我們將原濃度分別稀釋成 1、2/3、1/3、1/9、1/27、1/40、1/50 倍，發現顏色深度隨著濃度下降變淺。而快篩可測得的最低體積介於 25 $\mu$ l~30 $\mu$ l，最低濃度則介於 1/50~1/55 原濃度之間，每組數據皆在 8~9 分鐘時達到穩定。

## 壹、前言

### 一、研究動機

近年來，隨著全球疫情的爆發，快速篩檢已成為防疫工作中不可或缺的重要環節。快篩技術具有檢測迅速、簡單、便捷等優點，可以快速獲得檢測結果，讓人可以即時採取隔離措施，以避免人與人的接觸造成病毒的傳播，但是快篩也有一些讓我們感到困惑的現象，例如：有些快篩在 15 分鐘之內沒有明顯呈色，但是放置長久時間後就會有明顯的陽性線條，通常我們症狀很嚴重時，量出來的線條顏色會非常深；而快康復時，線條顏色會較淺。因此，我們想藉由這樣的機制來定量分析抗體或抗原濃度、或滴入液體體積對線條顏色深淺影響，並且藉由探討時間對線條顏色深淺的影響，驗證一般快篩需要等待 15 分鐘的反應時間是否為最佳觀察時期。由於 covid-19 的抗體及抗原我們無法取得，因此我們採用較容易取得的排卵試紙以及黃體成長激素(LH)來進行實驗以達到相同的效果，同時也期許日後此類相關技術能夠運用在正式上市的产品。

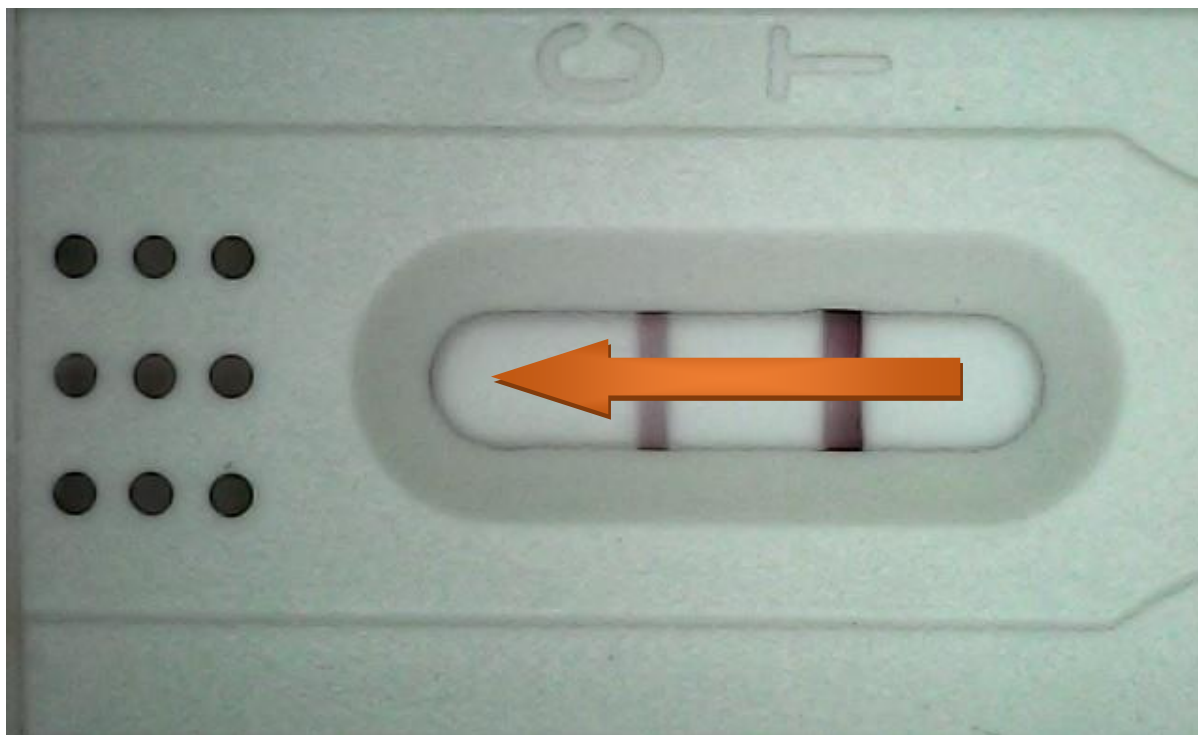
## 二、研究目的

- (一)、研究滴入不同體積的 LH 對於快篩試劑顏色深淺的影響
- (二)、研究滴入不同濃度的 LH 對於快篩試劑的顏色深淺的影響
- (三)、探討滴入不同體積或濃度的 LH 對其顏色達穩定的時間長短比較
- (四)、研究 T 線與 C 線的顏色深淺比值隨滴入體積與濃度之變化
- (五)、探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度

## 三、文獻回顧

### (一)、側流分析(LFA)

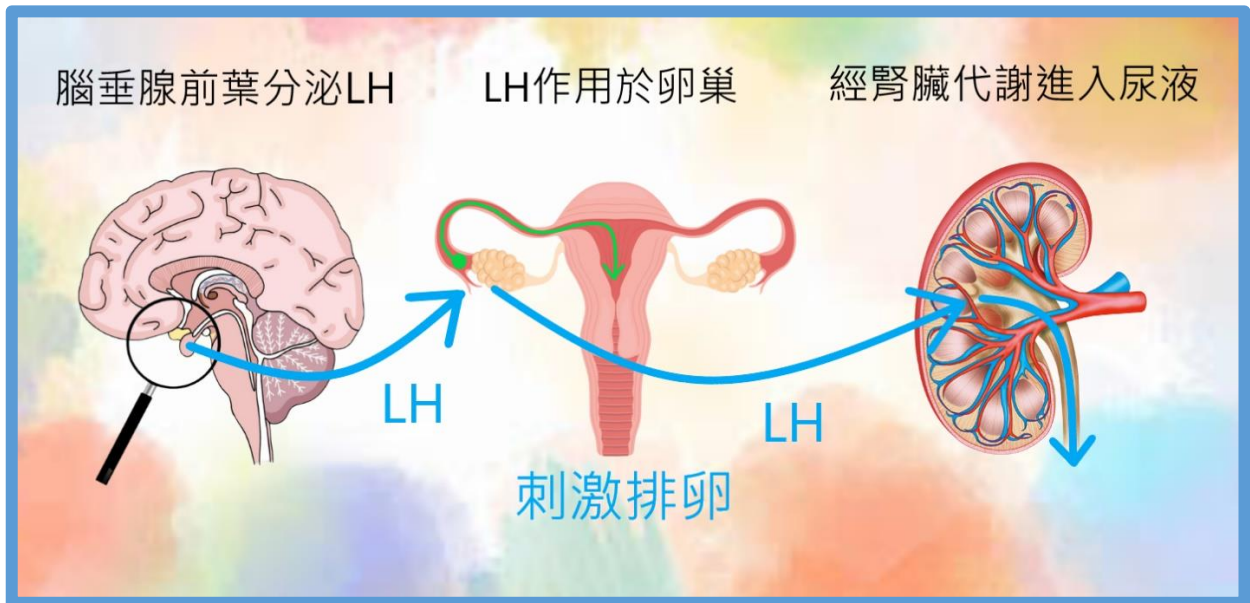
側向流體免疫分析法 (Lateral flow assay) 又稱為側向流體免疫層析法 (lateral flow immunochromatographic assays)，快篩試劑主要使用此種方式，可以快速偵測待測物質是否存在於樣本中。舉凡病毒抗原、血清中抗體、樣本中蛋白質或小分子化合物均可以開發為快篩檢測試劑。其原理使用相似於抗體連結免疫法 (ELISA) 的原理；首先樣本會流經反應區，此反應區中有能辨識待測目標之抗原/抗體，當樣本流經反應區，待測目標則被捕捉，最後利用奈米膠金 (colloidal gold nanoparticles) 呈色(如圖一)。



圖一. 側流分析示意圖

## (二)、尿液中為何有 LH?

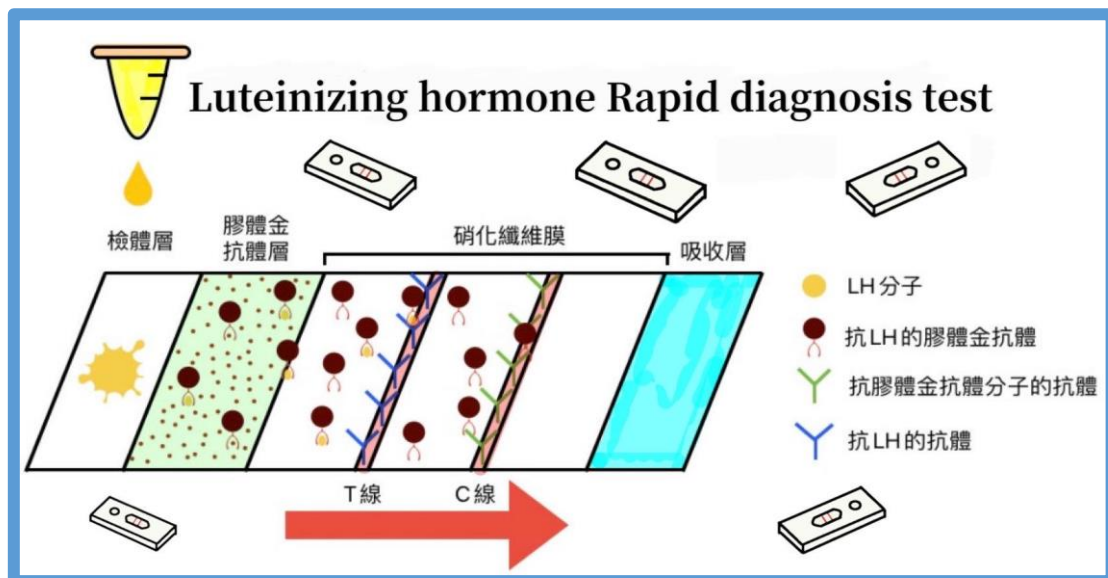
腦垂腺前葉大量分泌 LH 後，LH 經由血液循環刺激卵巢排卵。LH 作用在卵巢之後，就會經由腎臟代謝，經由尿液排出 (如圖二)。我們就是用排卵試紙，檢測尿液中 LH 的濃度，來觀察女性的排卵時間。



圖二. 排卵試紙原理

## (三)、快篩試劑原理

快篩試劑內含的試紙可依序分成 4 個部件：檢體層、膠體金抗體層、硝化纖維膜與吸收層（如圖三）。當受檢者尿液加到檢體層時，因各層纖維中的毛細作用將檢體內 LH 分子帶向最後方吸收層。檢體中含有 LH 流經膠體金抗體層時，可以識別 LH 的單株抗體會認出而與其結合在一起，而此處的單株抗體是已經結合了奈米等級膠體金的特製化抗體，也是快篩試劑能夠形成暗紅線條的原因。接著，LH-膠體金抗體結合物流經有二道線的硝化纖維膜，第一道是測試線，含有能抓住 LH 的抗體，而第二道線則是控制線，有能抓住膠體金抗體分子的抗體。當受檢者尿液中有 LH 時，經硝化纖維膜則會呈現雙線，代表陽性結果。反之，受檢者尿液中沒有 LH 時，只呈現單線結果，代表陰性，而若第二道線無呈現顏色，則此測驗屬於無效測試。



圖三. 快篩試劑原理

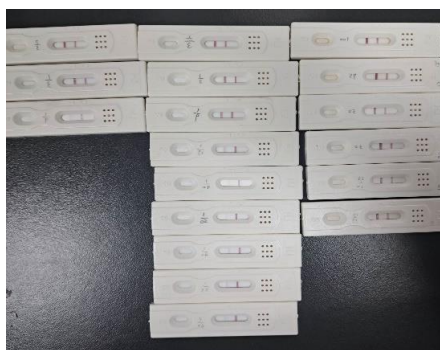
## 貳、研究設備及器材

### 一、黃體成長激素 Luteinizing hormone 80miu



圖四. 黃體成長激素

### 二、LH 快篩試劑數盒

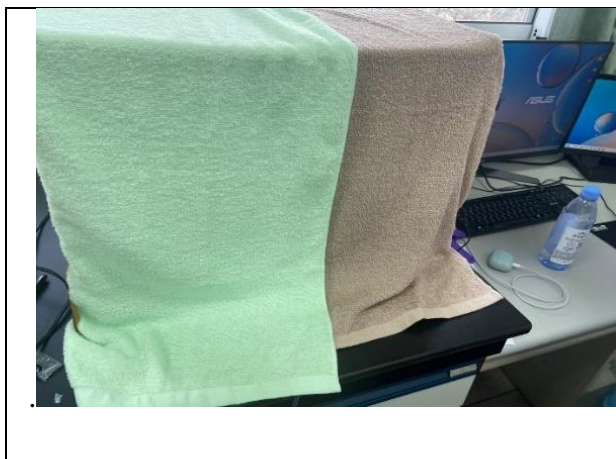


圖五. LH 快篩試劑

### 三、實驗器材

微量吸管(pipette)(10~100 $\mu$ l)	小試管(稀釋用)
不受外界光線影響的自製暗房	蒸餾水
網美燈	攝影工具

#### 四、實驗設備



圖六. 暗室外觀及裝置



圖七. 暗室內部實驗裝置



圖八. 實驗相關設備(LH、pipette.....)



圖九. 小試管(稀釋用)

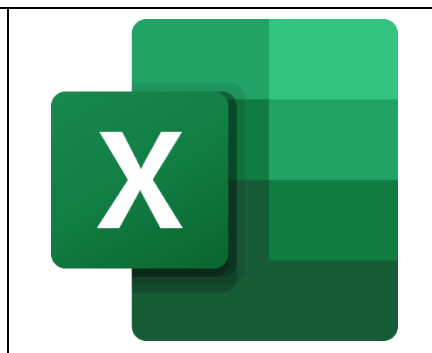
#### 五、分析軟體



影像擷取工具 Amcap



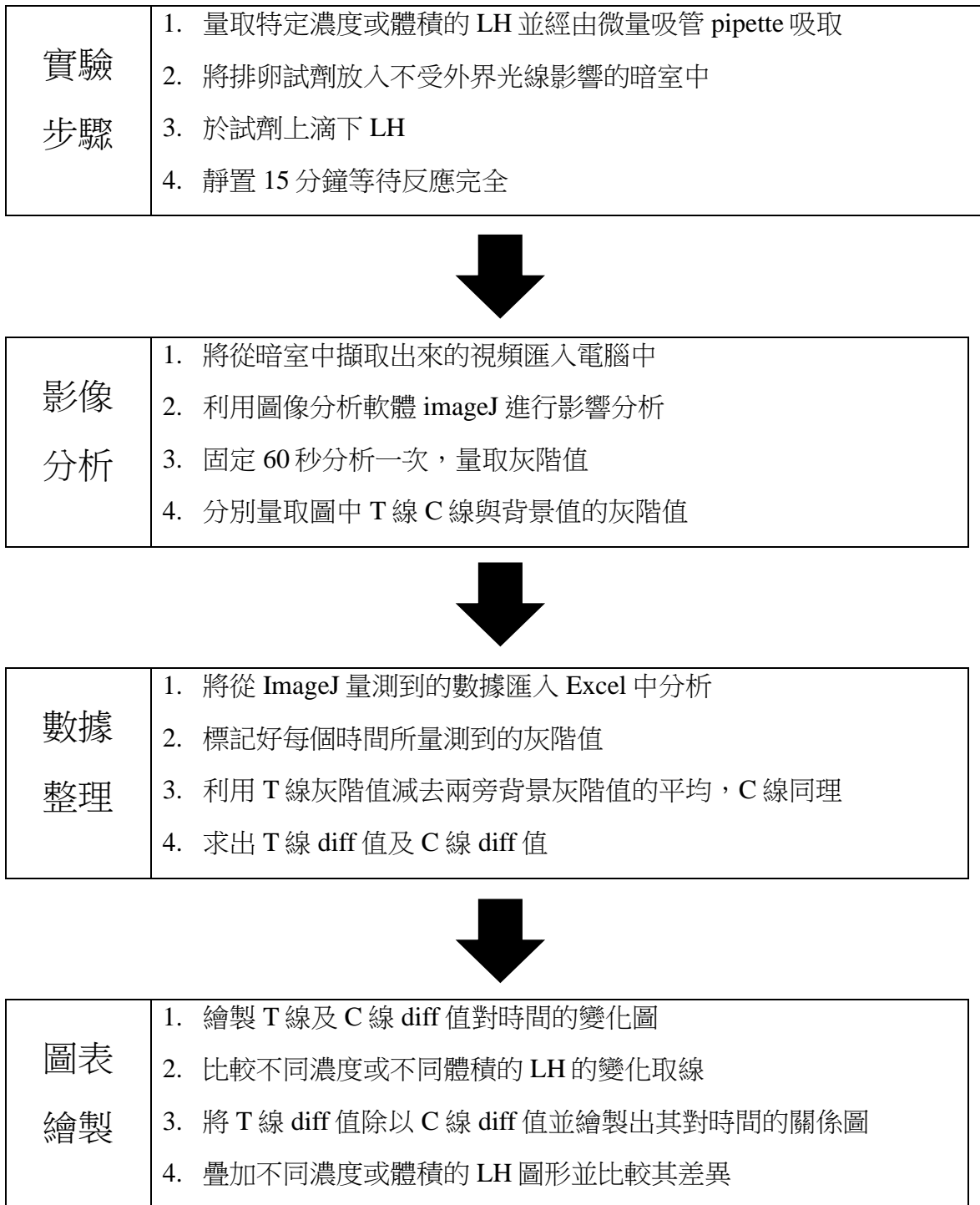
圖像分析軟體 ImageJ



數據分析軟體 Excel

## 參、研究過程或方法

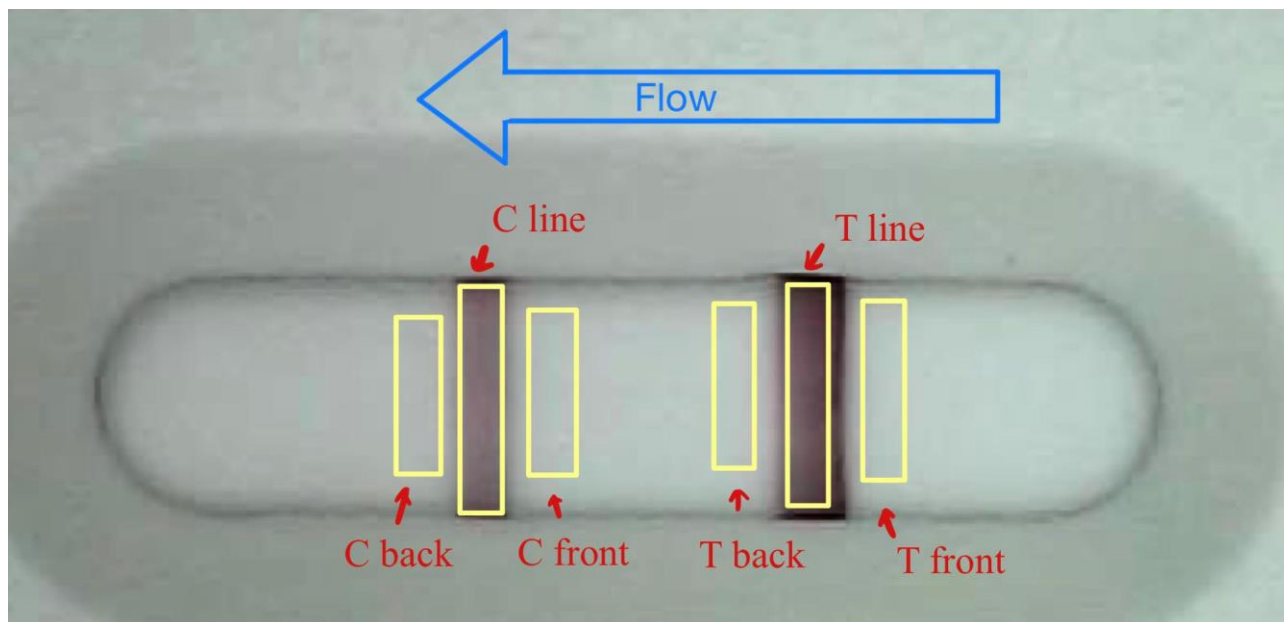
### 一、執行流程圖



### 二、相關分析技術

#### (一)、灰階數值初步量取

分別量取 T 線上的灰階值，T 線前的白色背景灰階值及 T 線後的白色背景灰階值，並利用選取工具在該區域隨機量取五次，以避免顏色分布不平均導致測量上的誤差，最後再將五次量取資料平均，由 T 線旁的背景灰階去扣除 T 線上的灰階(灰階越大表示越白)，此時得到的 *diff* 值越大表示顏色差越大，T 線越深。C 線測量方法與 T 線同理。



圖十.ImageJ 測驗範圍

## (二)灰階數值隨時間量取

選定一固定區域，隨時間變化逐個分析其灰階值，每部實驗影片量取六塊區域，分別為 T 線前、T 線、T 線後、C 線前、C 線、C 線後，最後 *diff* 值計算同上述分析方法，由背景值減去 T (C) 線值。變化率為將前一刻的 T 線灰階值減去現在 T 線的灰階值再除以前一刻的 T 線灰階值的百分率。(註: 當變化率小於 2% 定義為穩定)

其中公式如下:

$$T_{diff} = \frac{T_{front} + T_{back}}{2} - T_{line} \quad [1]$$

$$C_{diff} = \frac{C_{front} + C_{back}}{2} - C_{line} \quad [2]$$

$$Change\ Rate(\%) = \frac{T_{(time-1)} - T_{(time)}}{T_{(time-1)}} \times 100 \quad [3]$$



表一：LH 原濃度 0.075ml 在 ImageJ 測到的值

time(min)	T front	T line	T back	C front	C line	C back
0	190.9	181.1	187.7	183.6	183.3	180.0
1	192.8	139.1	181.8	184.7	158.1	182.6
2	189.3	117.3	184.3	180.0	137.2	183.7
3	191.6	106.4	186.7	179.9	127.3	184.2
4	189.0	99.0	187.7	178.7	121.1	184.0
5	192.0	93.1	184.8	183.3	124.8	182.7
6	187.7	84.6	187.0	184.1	122.0	179.9
7	193.0	80.8	187.6	179.6	118.5	178.5
8	195.3	75.6	182.3	175.9	117.9	179.6
9	193.2	75.9	184.7	179.8	120.6	180.7
10	190.6	73.5	184.0	181.1	118.0	178.3
11	191.7	73.3	185.9	182.8	115.8	178.2
12	188.0	73.3	187.6	181.0	115.1	181.0
13	186.9	73.6	187.4	182.0	114.8	181.9
14	188.0	73.2	186.3	176.8	113.6	182.3
15	192.6	76.1	187.2	184.5	115.2	180.0

根據公式[1]、[2]、[3]，可以得到下列表二的各項數值

經由 EXCEL 計算後可得到如表二:

表二：LH 原濃度 0.075ml 在不同時間下的 diff 值

時間(分鐘)	T diff	C diff	T diff / C diff	變化率(%)
0	8.2	-1.5	-5.7	-----
1	48.2	25.5	1.9	30.7
2	69.5	44.6	1.6	16.0
3	82.7	54.7	1.5	7.4
4	89.3	60.3	1.5	6.3
5	95.3	58.2	1.6	7.2
6	102.7	60.0	1.7	6.2
7	109.5	60.6	1.8	3.3

8	113.2	59.8	1.9	-0.2
9	113.0	59.7	1.9	0.7
10	113.8	61.7	1.8	1.4
11	115.5	64.7	1.8	-0.9
12	114.5	65.9	1.7	-0.9
13	113.5	67.1	1.7	0.4
14	113.9	65.9	1.7	-0.1
15	113.8	67.0	1.7	-0.1

(螢光部分為穩定，變化率小於 2%，顏色大致不變)

當成功算出 T diff、C diff、T diff / C diff 及變化率時

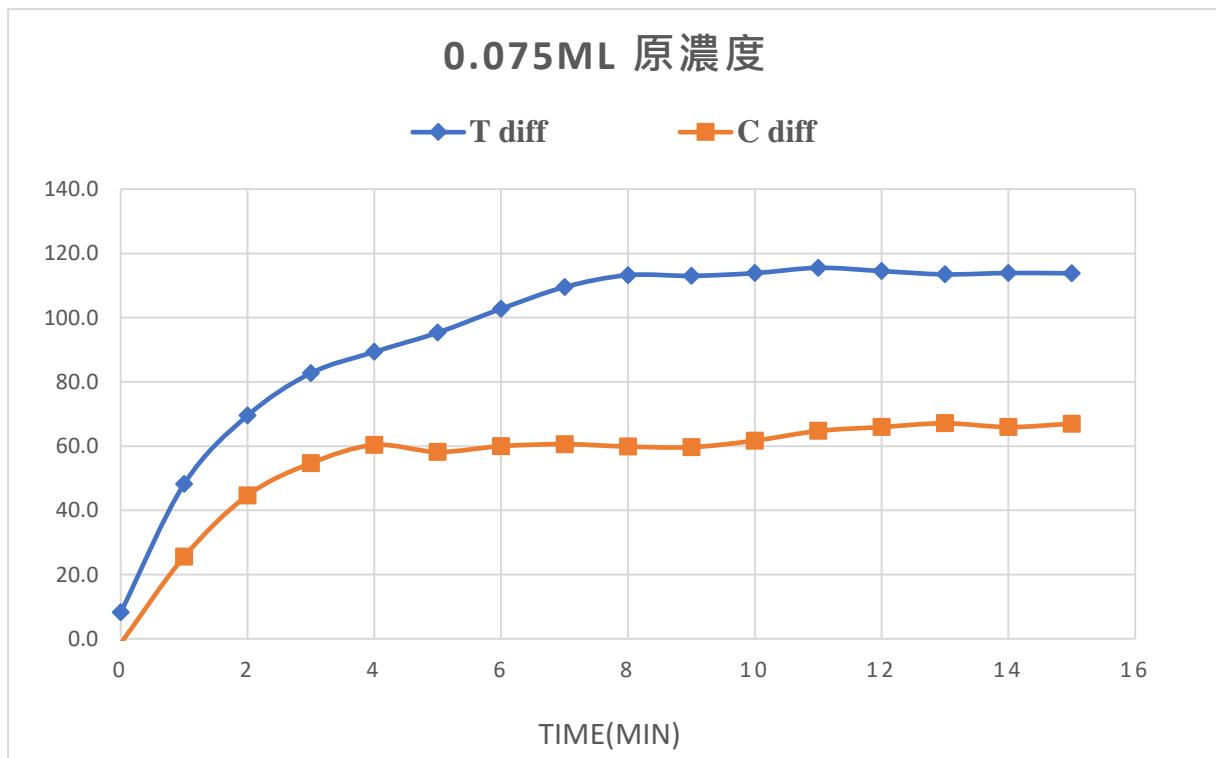
將數值利用 EXCEL 進行圖表繪製，繪製出分別隨時間的變化及趨勢圖曲線

圖表部分見下方研究結果

## 肆、研究結果

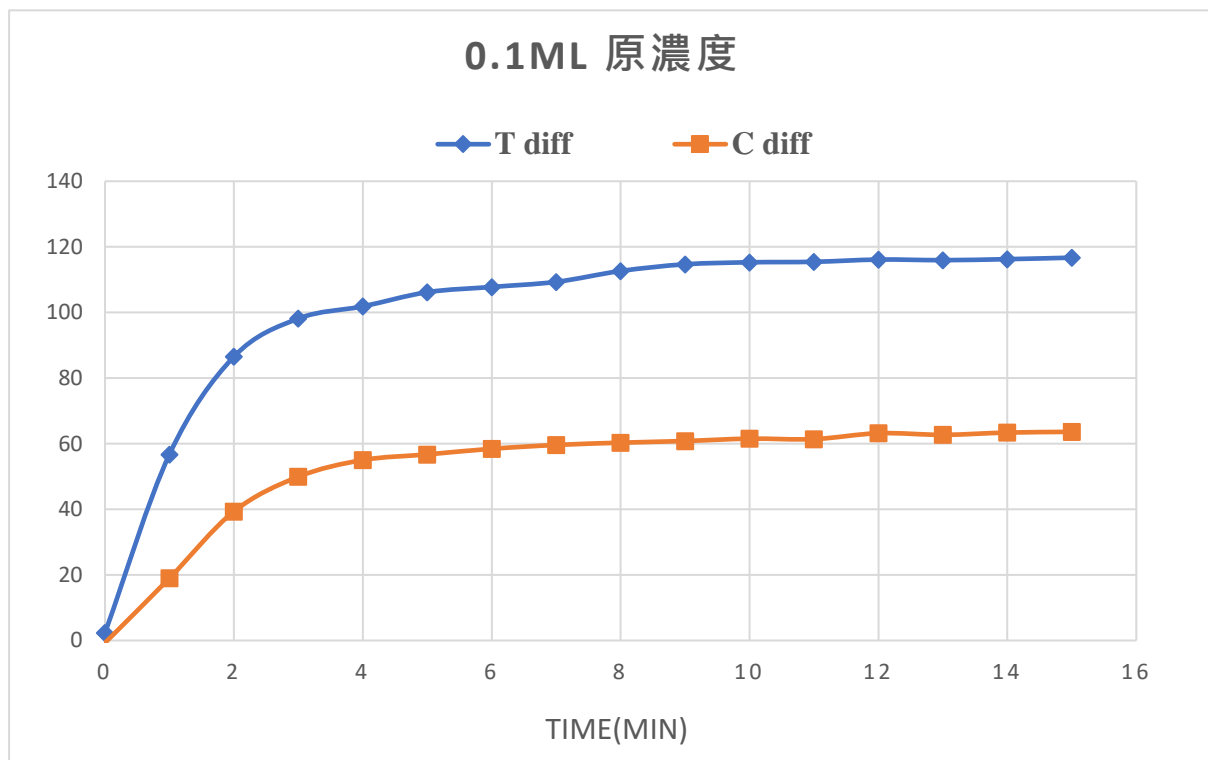
一、滴入不同體積之 LH 對 diff 值的影響

(一)、LH 原濃度 75 $\mu$ l



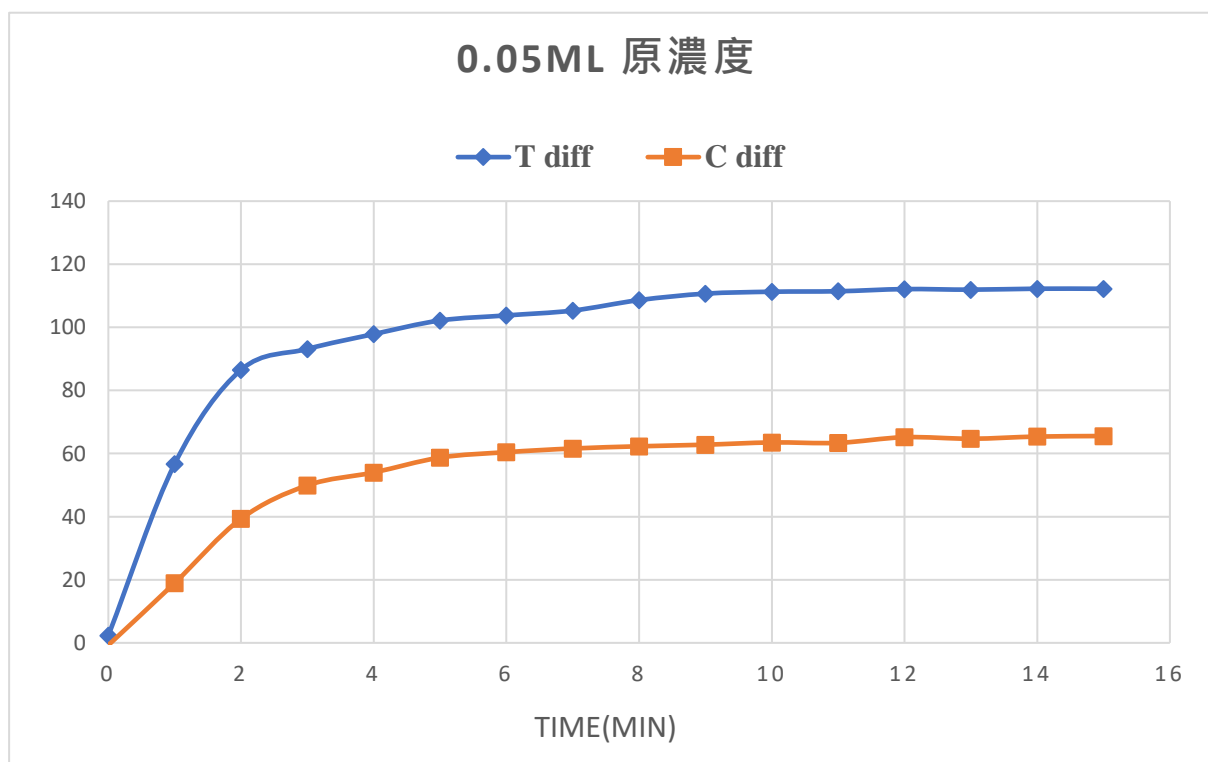
圖十一. LH 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

(二)、LH 原濃度 100 $\mu$ l



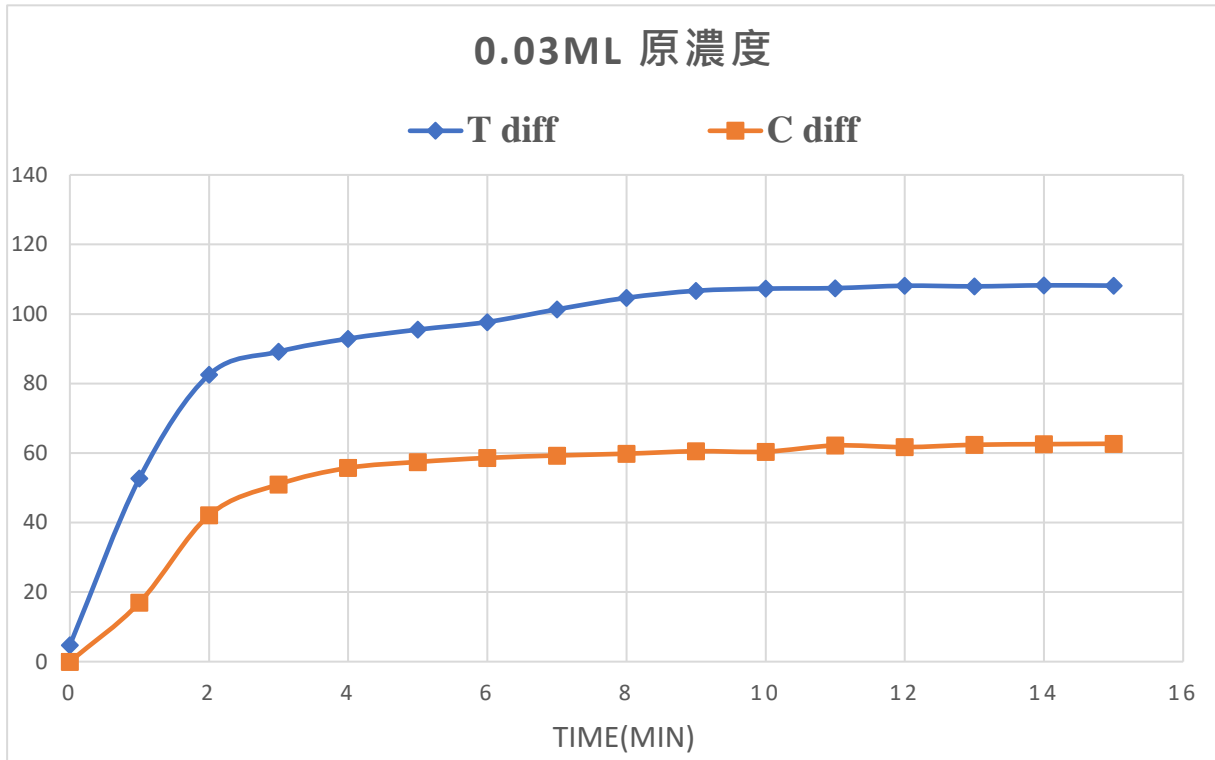
圖十二. LH 原濃度 100 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

(三)、LH 原濃度 50 $\mu$ l



圖十三. LH 原濃度 50 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

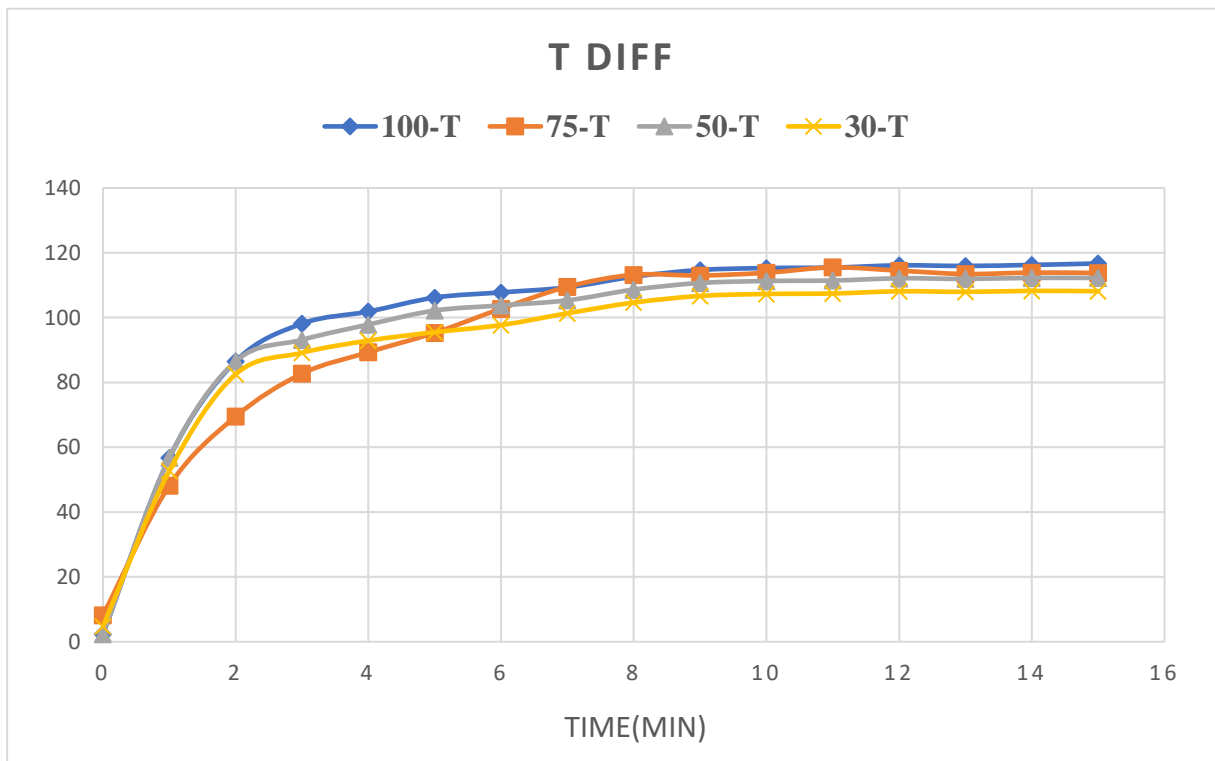
(四)、LH 原濃度 30 $\mu$ l



圖十四. LH 原濃度 30 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

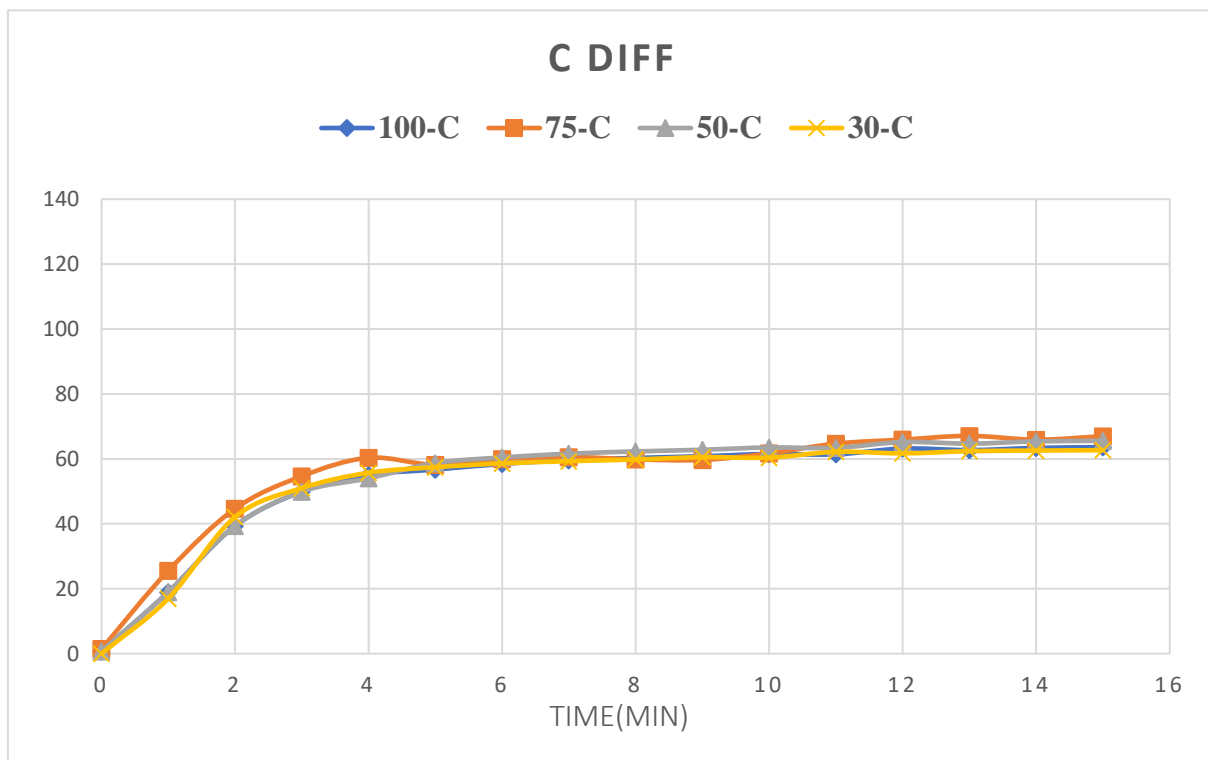
(五)、相同濃度，不同體積的分析:

1.T DIFF 疊圖分析:



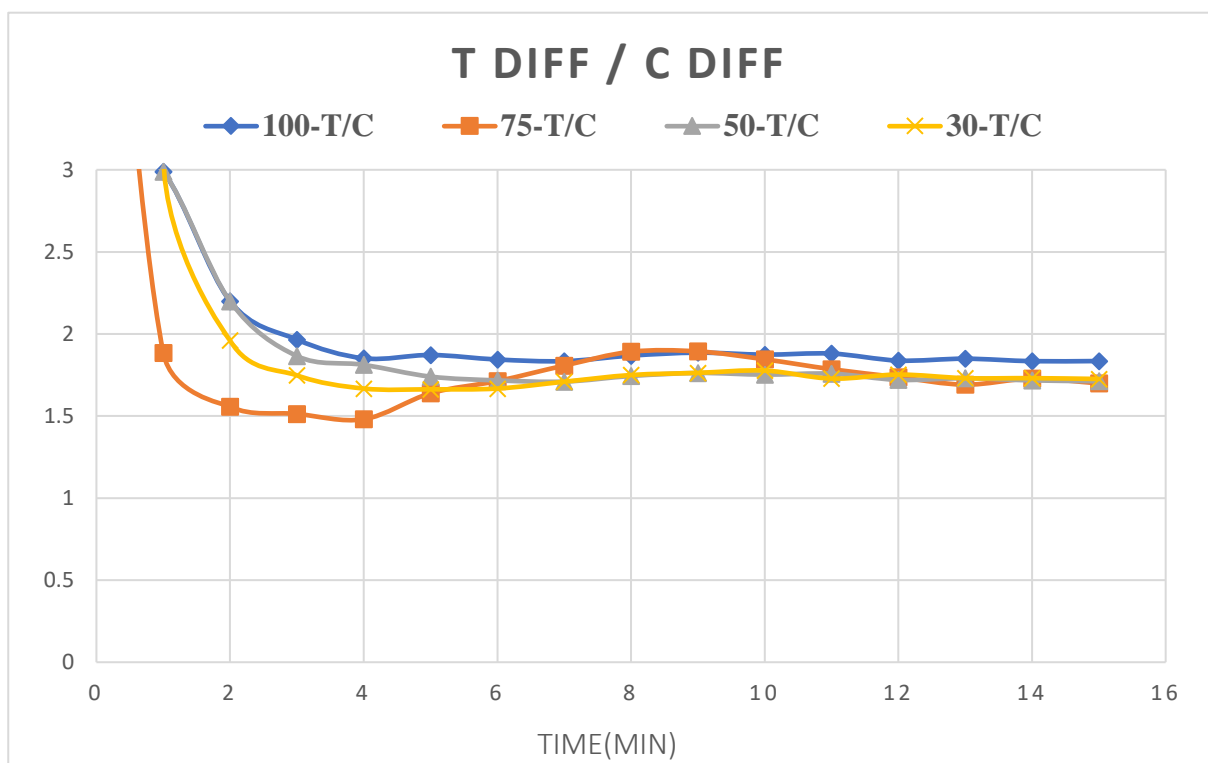
圖十五. LH 原濃度各體積之 diff 疊圖

## 2. C diff 疊圖分析



圖十六. LH 原濃度各體積之 C diff 疊圖

## 3. T diff / C diff 疊圖分析



圖十七. LH 原濃度各體積之 T diff / C diff 疊圖

(六)、最終數據

表三：滴入不同體積的 LH 其 T diff、C diff 及 T diff / C diff

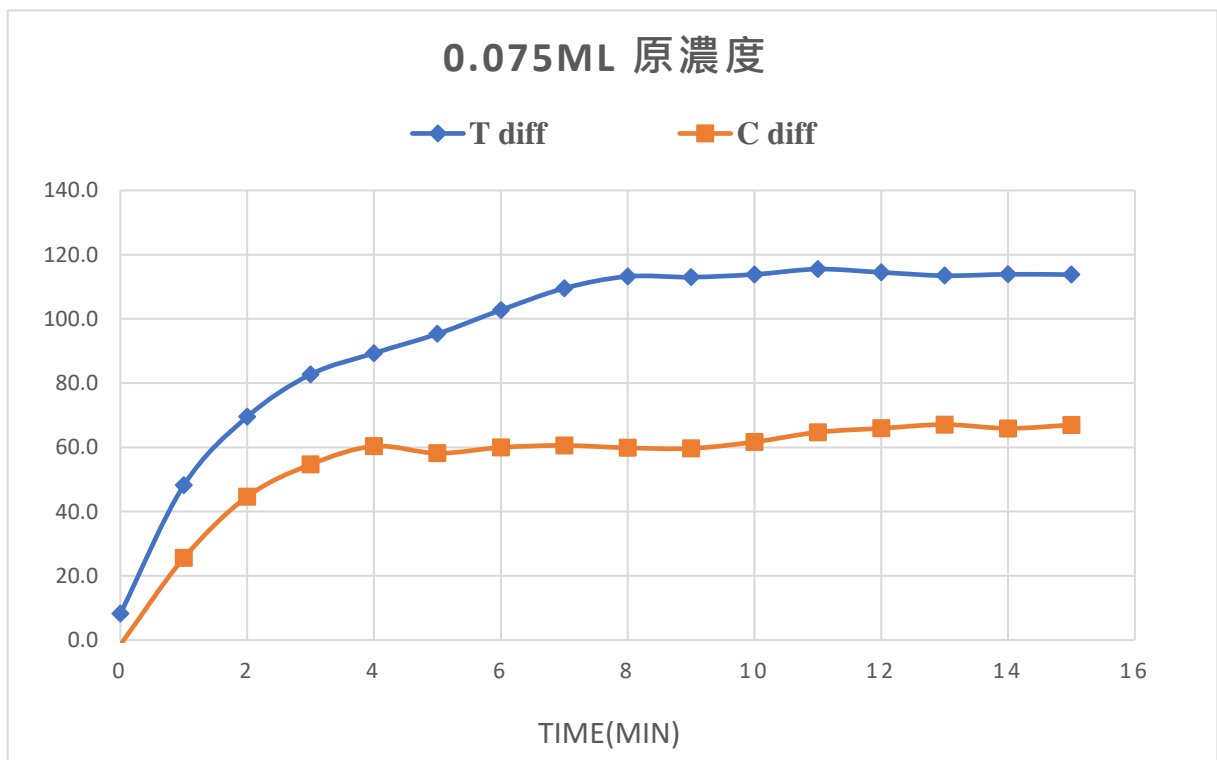
滴入體積(μl)	100	75	50	30
T DIFF	116.7	113.4	112.2	108.2
C DIFF	63.6	66.9	65.6	62.7
T diff / C diff	1.83	1.69	1.71	1.73



圖十八. 滴入不同體積的 LH 15 分鐘後照片

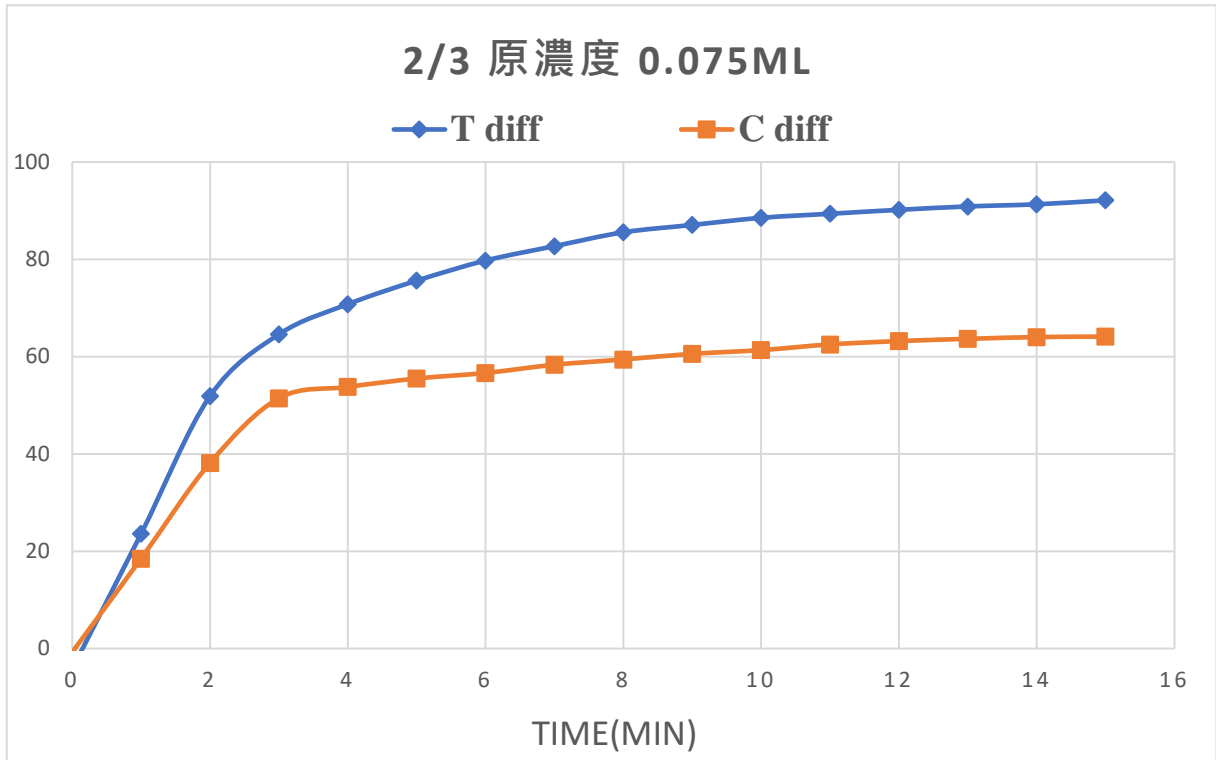
二、滴入不同濃度的 LH 對 diff 值的影響

(一)、原濃度 75μl



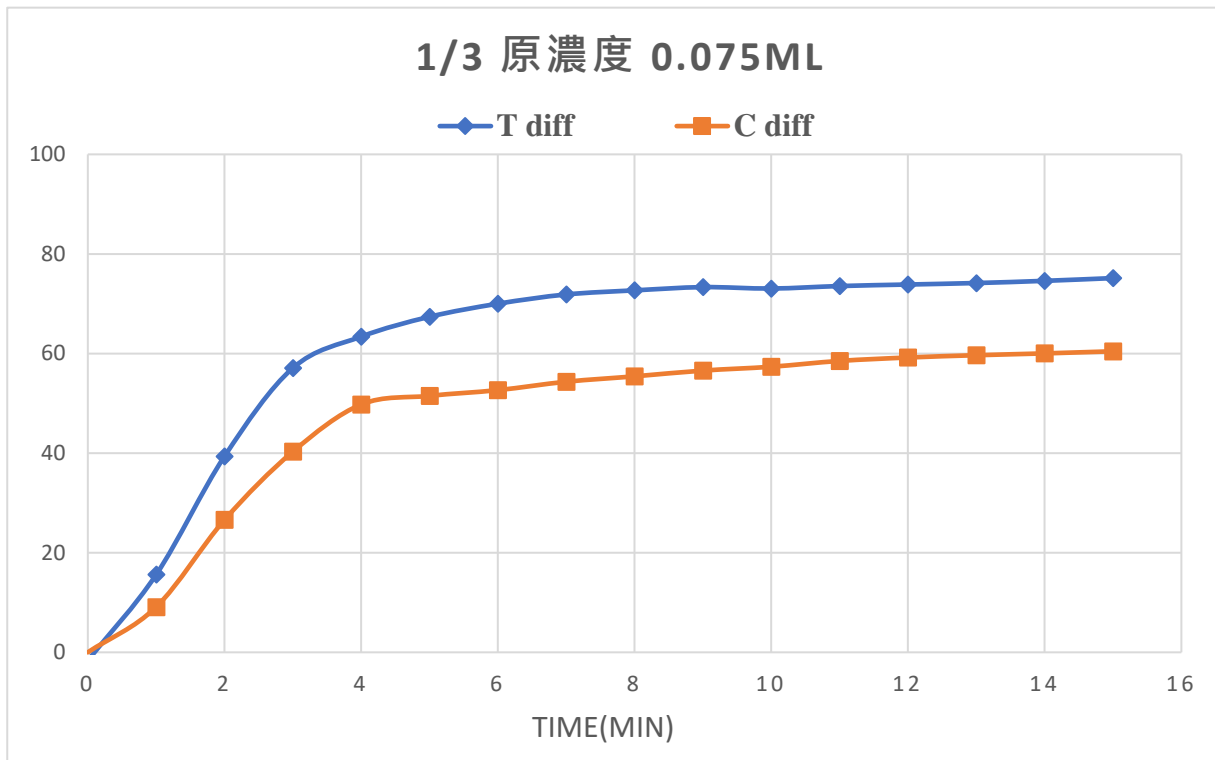
圖十九. LH 原濃度 75μl diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

(二)、2/3 原濃度 75 $\mu$ l



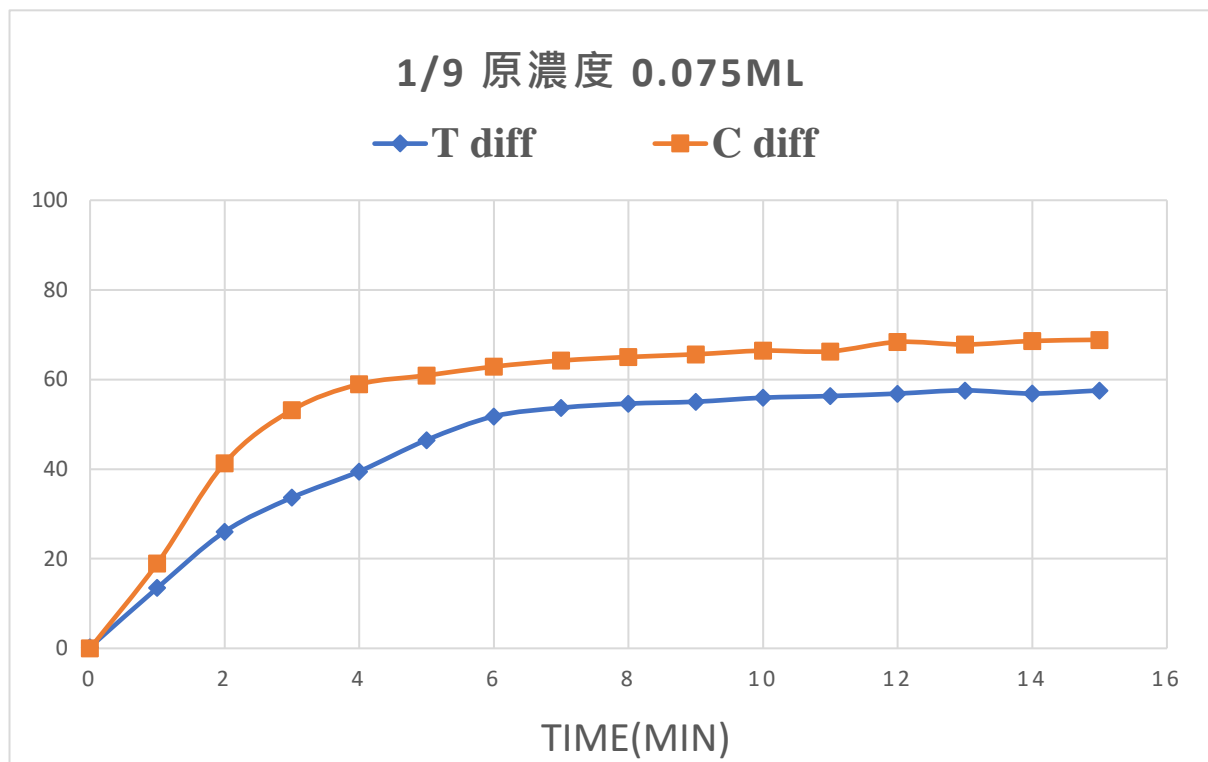
圖二十. LH 2/3 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

(三)、1/3 原濃度 75 $\mu$ l



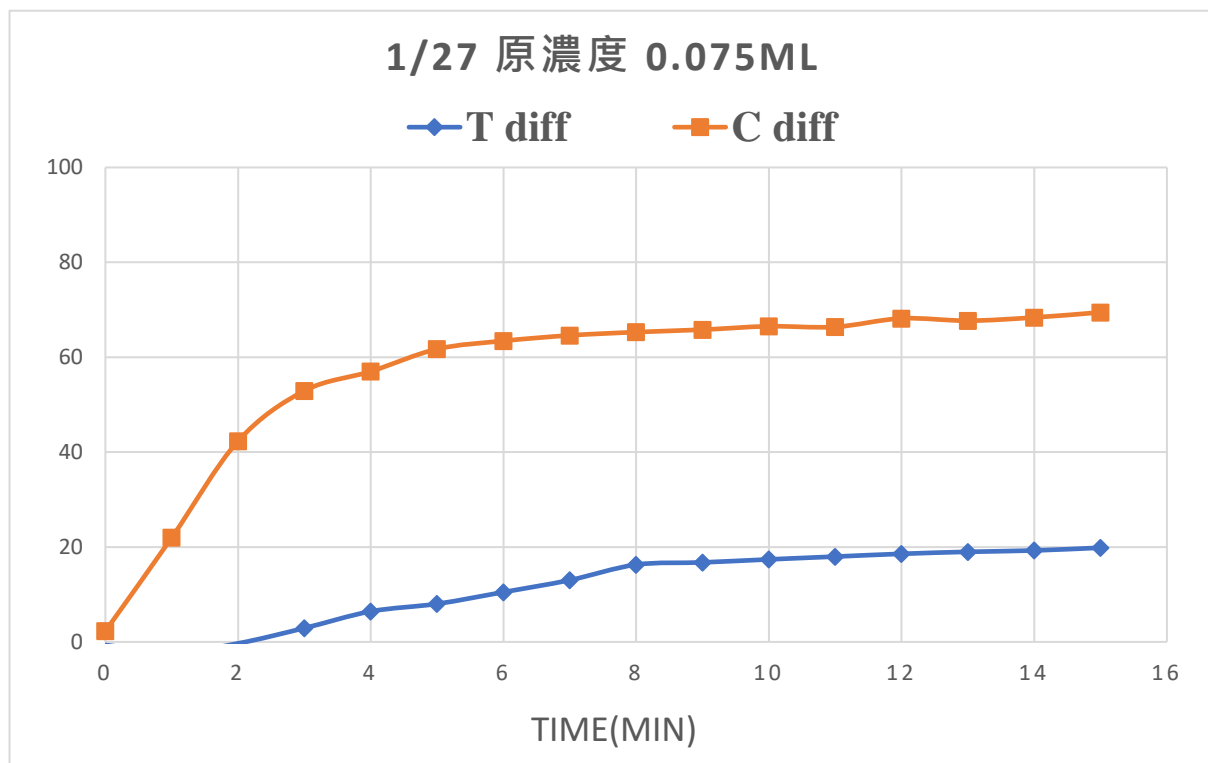
圖二十一. LH 1/3 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

(四)、1/9 原濃度 75 $\mu$ l



圖二十二. LH 1/9 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

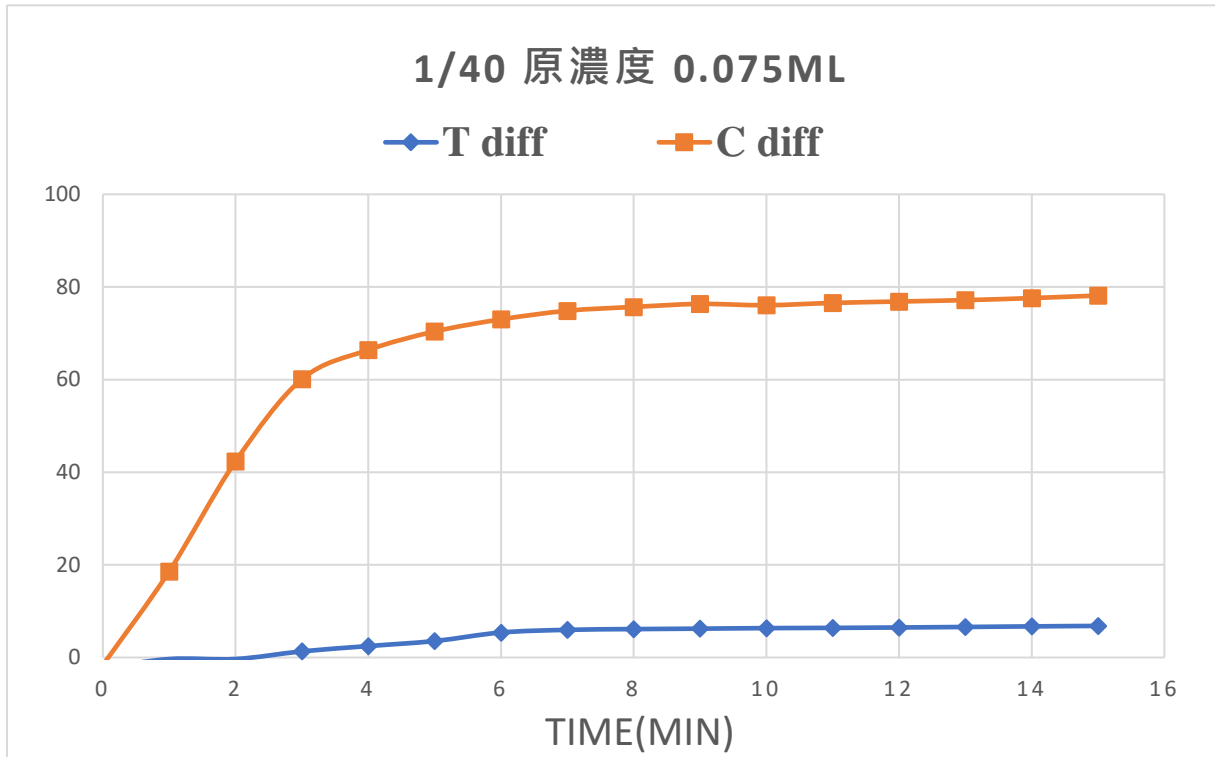
(五)、1/27 原濃度 75 $\mu$ l



圖二十三. LH 1/27 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

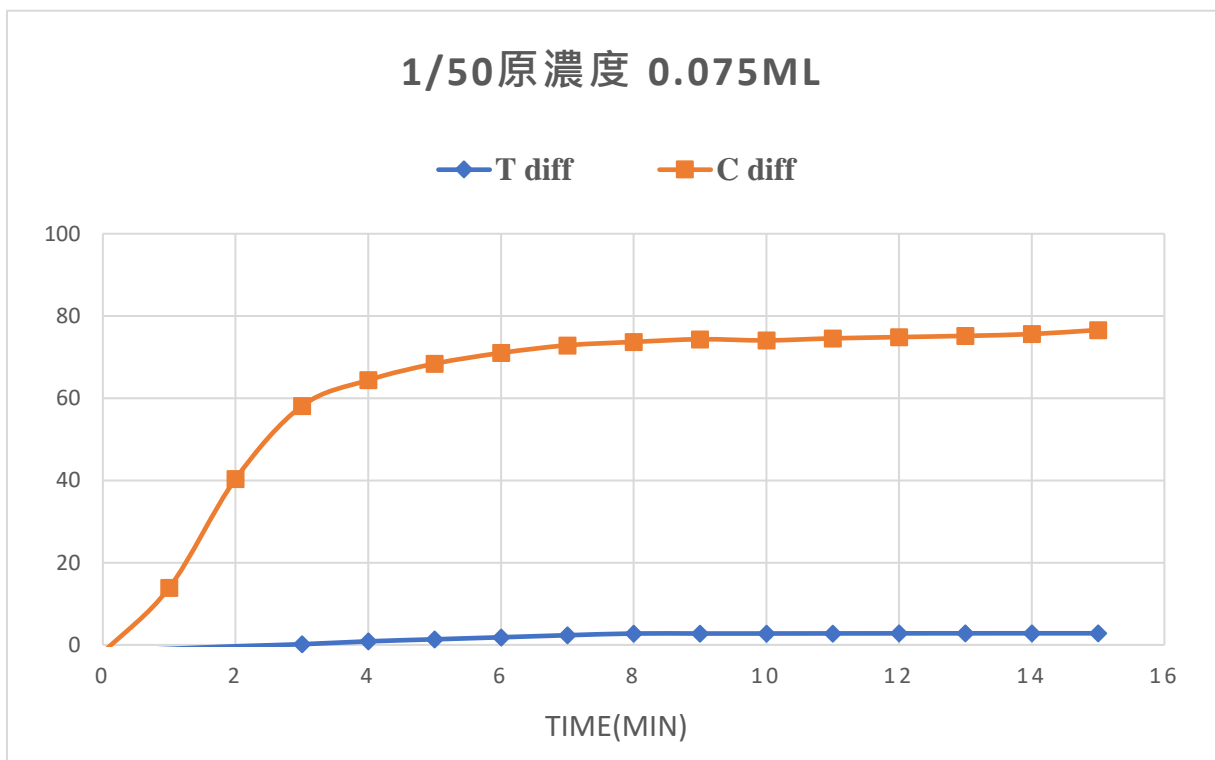


(六)、1/40 原濃度 75 $\mu$ l



圖二十四. LH 1/40 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

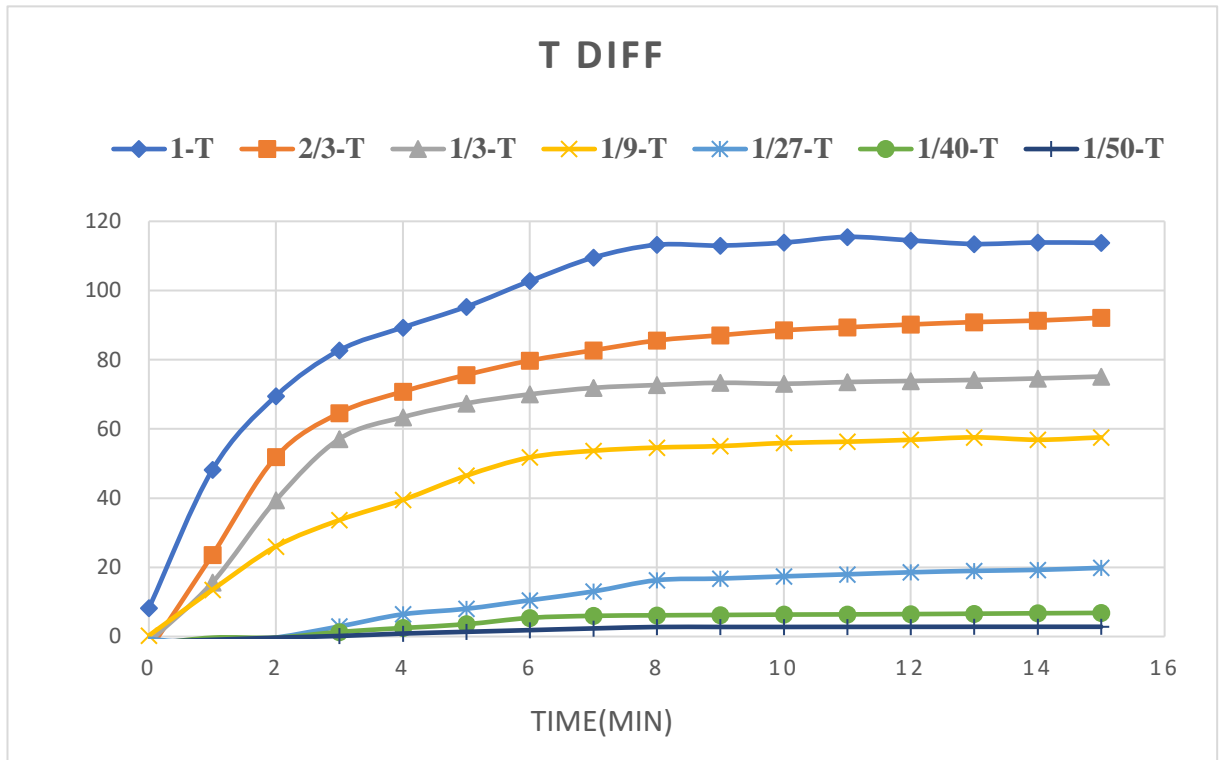
(七)、1/50 原濃度 75 $\mu$ l



圖二十五. LH 1/50 原濃度 75 $\mu$ l diff 值圖表 (其中橫軸是時間(min)，縱軸是 diff 值)

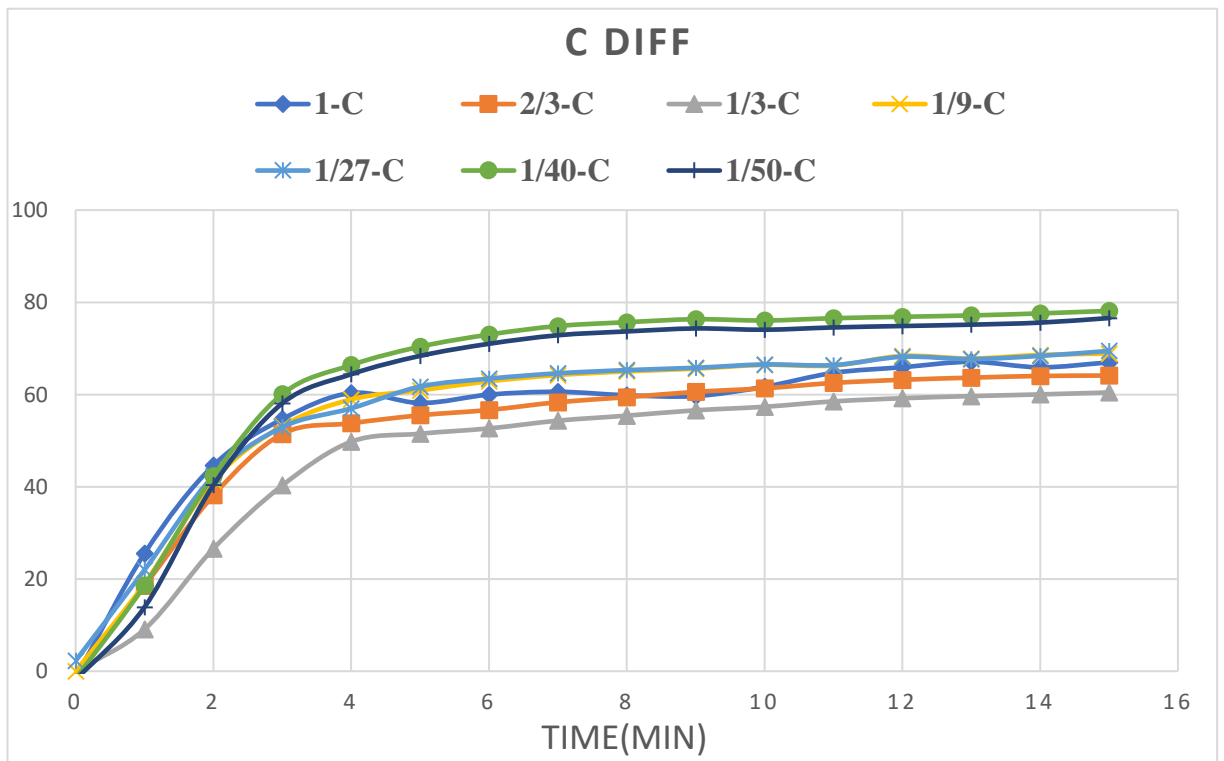
(八)、相同體積，不同濃度的分析:

1.T diff 疊圖分析:



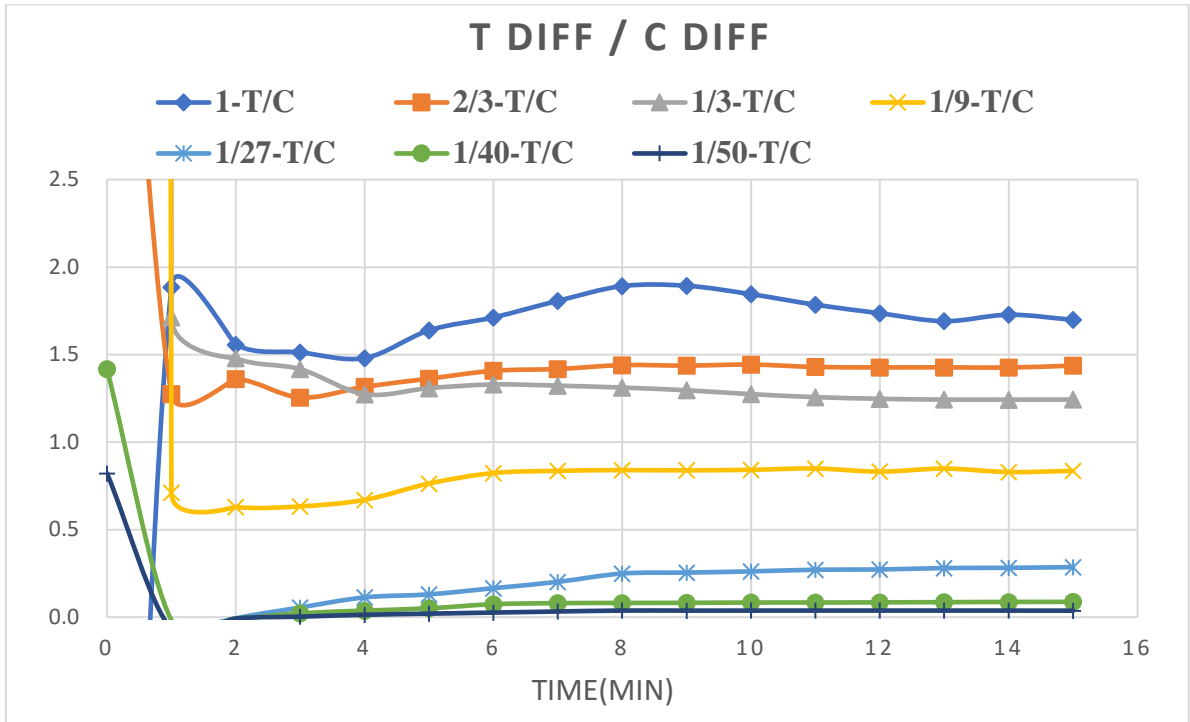
圖二十六. LH 各濃度之 T diff 疊圖

2. C diff 疊圖分析:



圖二十七. LH 各濃度之 C diff 疊圖

### 3. T diff / C diff

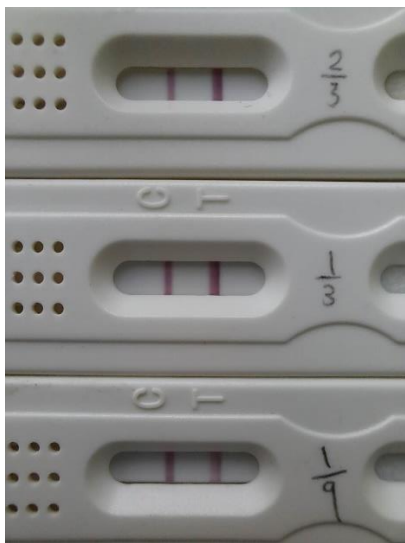


圖二十八. LH 各濃度之 T diff / C diff 疊圖

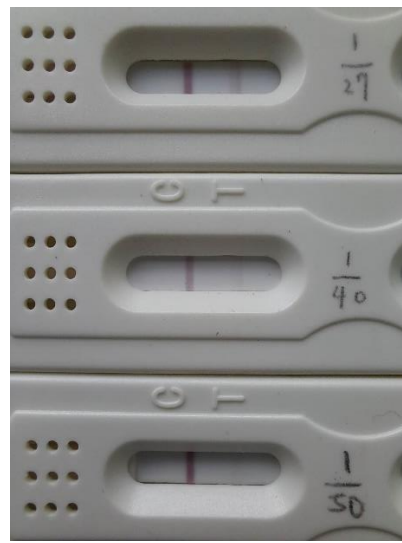
### (九)、最終數據

表四：滴入不同體積的 LH 其 T diff、C diff 及 T diff / C diff

滴入濃度(相對原濃度)	1	2/3	1/3	1/9	1/27	1/40	1/50
T DIFF	113.4	90.8	75.2	57.5	19.9	6.8	2.8
C DIFF	66.9	62.5	60.5	68.8	69.5	78.2	76.6
T diff / C diff	1.69	1.45	1.24	0.84	0.29	0.09	0.04



圖二十九.



圖三十.

滴入不同濃度的 LH 15 分鐘後之實驗照片

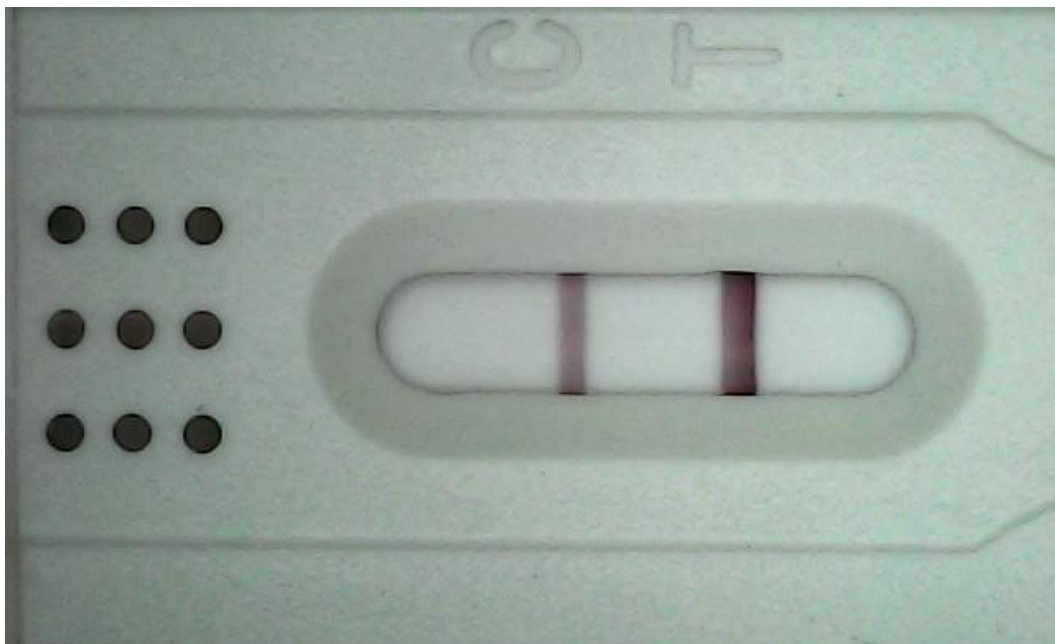
## 伍、討論

### 一、滴入不同體積的 LH 對於快篩試劑顏色深淺的影響

觀察圖十五、圖十六及表三，發現每一種體積的 T diff 值及 C diff 皆十分相近，T diff 值雖隨滴入體積變少而微幅下降，但下降幅度小，以肉眼觀察幾乎無法察覺其差異，故推測線條顏色的變化受體積的影響極小。



圖三十一. 100 $\mu$ l 之 T 線 C 線實驗照片



圖三十二. 50 $\mu$ l 之 T 線 C 線實驗照片

## 二、滴入不同濃度的 LH 對於快篩試劑的顏色深淺的影響

觀察圖二十六、二十七及表四，可以發現濃度越小，T diff 也越小，且 T 線的顏色深淺肉眼可見差異，而 C 線在濃度偏高的情況下大致差不多，唯在濃度極小時如 1/40 原濃度、1/50 原濃度，這兩者之 C 線比之其他組數據卻略高，推測是因為低濃度含有的 LH 很少，因此，在 T 線結合的膠體金甚少，而剩下的膠體金都與 C 線結合，造成 C 線較深，而 1/50 之 T 線極淡，幾乎可視為陰性的狀態。



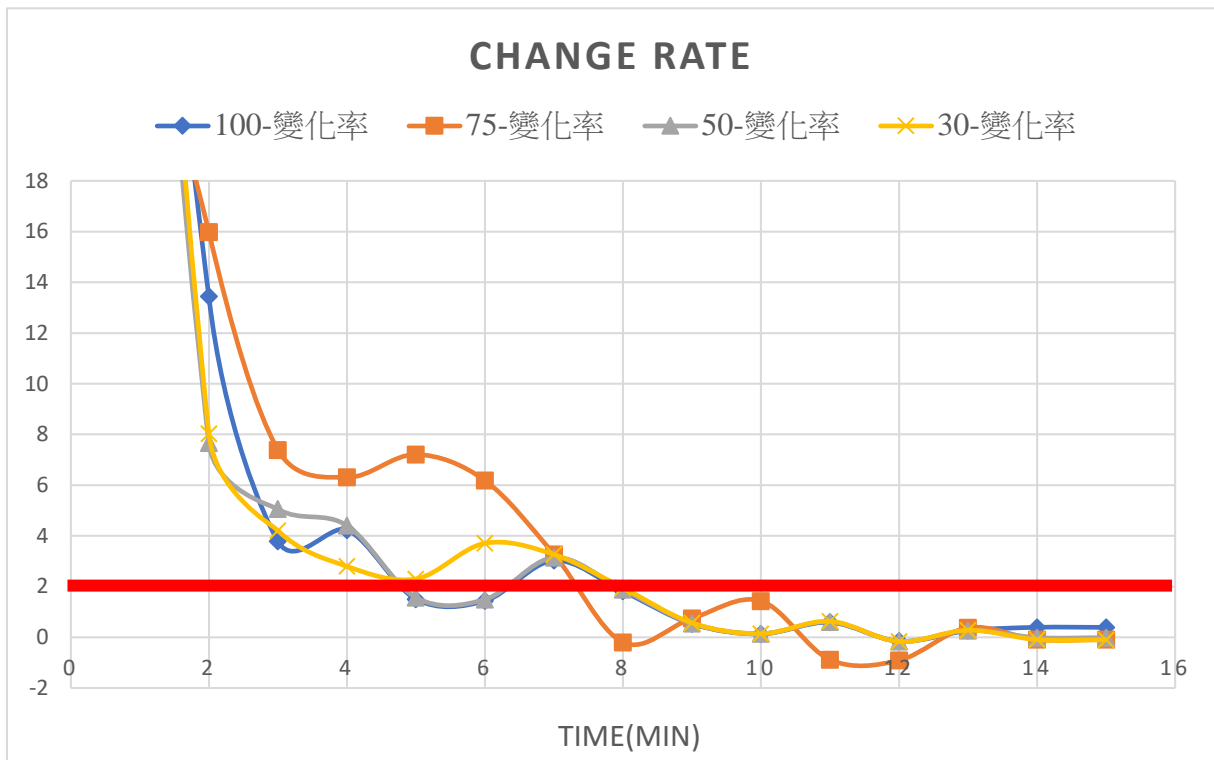
圖三十三.1/40 原濃度的 T 線以及 C 線



圖三十四.1/50 原濃度的 T 線以及 C 線

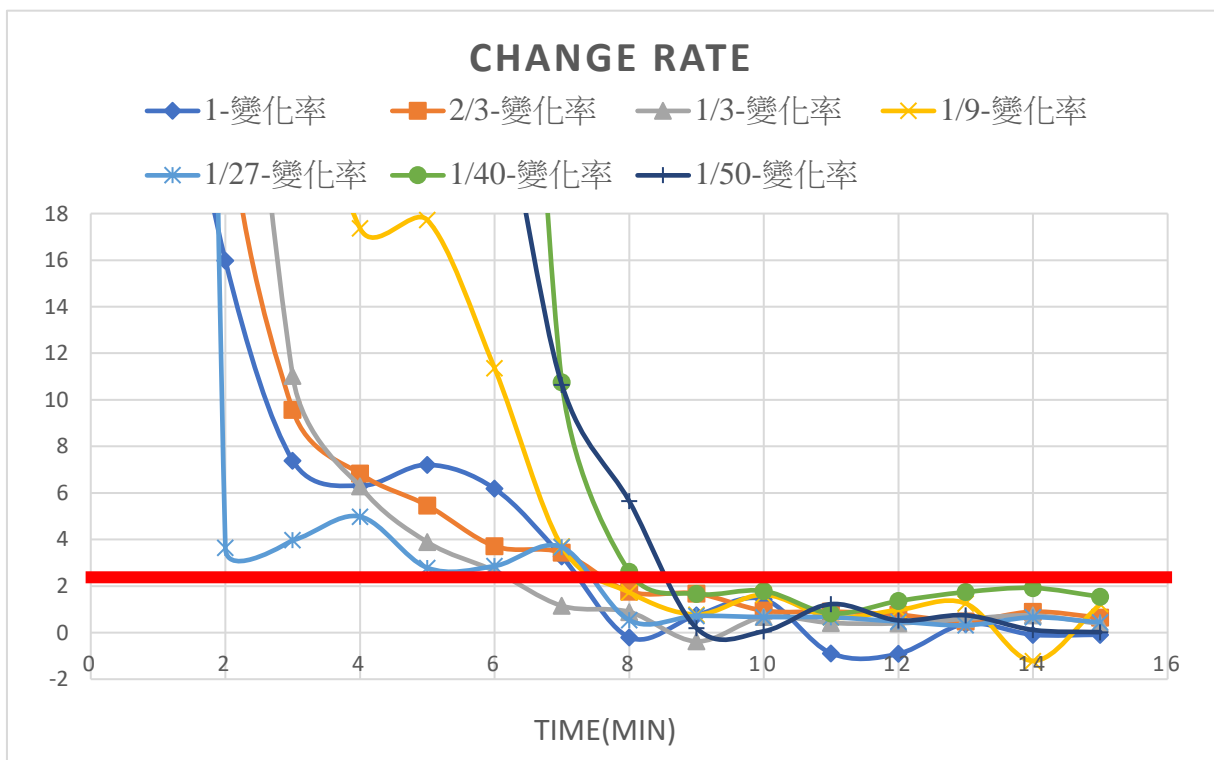
三、探討滴入不同體積或濃度的 LH 對其顏色達穩定的時間長短比較

(一)、不同體積的 LH 其變化率之曲線



圖三十五.不同體積的 LH 其變化率之曲線

(二)、不同濃度的 LH 其變化率之曲線



圖三十六.不同濃度的 LH 其變化率之曲線

觀察圖三十五及三十六，我們可以發現，不論 LH 的濃度與體積為何，其變化率皆在約 8 分鐘時達到 2% 以下，之所以定義為 2% 以下代表達穩定狀態，是因為發現多筆數據的曲線在 8 分鐘後皆有在 2% 以下徘徊的趨勢，由此可以代表快篩試劑只需要放置 8 分鐘後，即可完成檢測，在 8~15 分鐘期間雖仍有深度變化，但變化較小，檢測結果已然明瞭。



圖三十七.1/27 原濃度的 8 分鐘及 15 分鐘時之實驗照片

#### 四、探討 T 線與 C 線的顏色深淺比值隨滴入體積與濃度之變化

根據圖十七、圖二十八、表三及表四，我們可以發現不同體積、濃度相同時，100 $\mu$ l、75 $\mu$ l、50 $\mu$ l 及 30 $\mu$ l，其 T 線 DIFF/C 線 DIFF 基本一致，而相同體積、不同濃度時，T 和 C 的比值則是隨著濃度下降而下降。

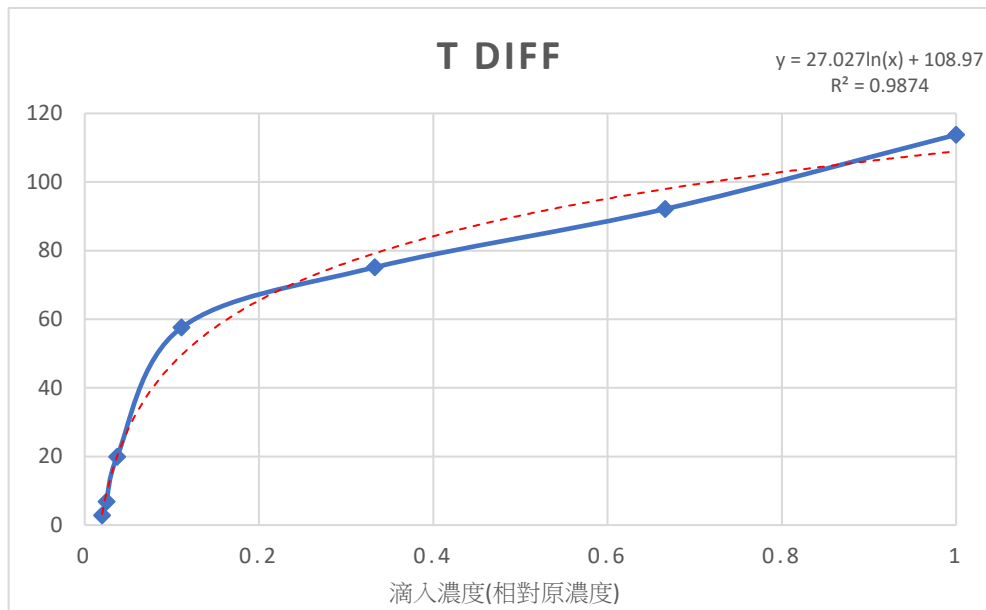
在樣品跑的過程中線持續會變深，因為一開始是水的結合，然後抗原或抗體取代水，讓顏色變深。由於試紙上面塗了一些反應物，也會與水親近（極性-極性鍵），所以假設 T 與 C 兩個線對水的結成正比，這樣假設的話，T、C 除起來應該為定值，而我們觀察所有的實驗情形皆在 2 分鐘左右，T 線 DIFF/C 線 DIFF 的曲線便達到穩定，前一分鐘不穩定推測是因 LH 一開始還沒跑到 C 線，因此 C diff 可能是正的很小或負的很小，故第一分鐘 T 線 DIFF/C 線 DIFF 可能極大或極小。

#### 五、探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度

我們在滴入原濃度 25 $\mu$ l 時，發現水沒辦法流到試紙 T 線和 C 線的區域，因此我們將體積加到 30 $\mu$ l，才有液體流過，因此我們得知此試紙可測得的最低體積介於 25 及 30 $\mu$ l，推測是因為檢測區前方的試紙會先吸收一部份液體，才会有剩下的液體抵達檢測區。

因為相同濃度不同體積條件下的 T diff 皆相仿，故我們討論相同體積不同濃度的曲線。

根據表四，我們可畫出滴入濃度對 T diff 的關係圖：



圖三十八. 滴入濃度對 T diff 關係圖

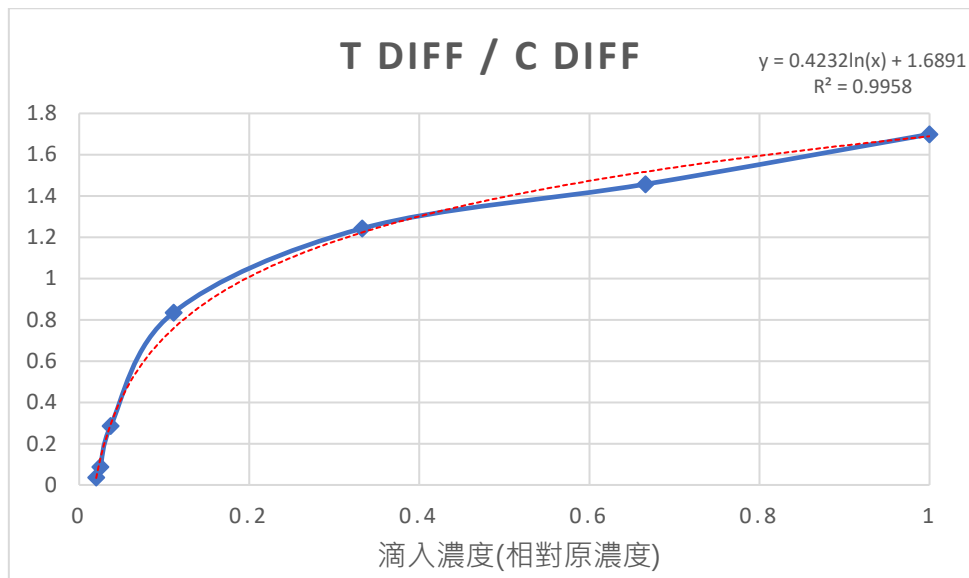
由 EXCEL 內建趨勢線公式，我們得到

$$T_{diff} = 27.027 \ln(\text{Concentration}) + 108.97 \quad [4]$$

$$R^2 = 0.9874 \quad [5]$$

如果根據公式 [4] 推導，當 T diff = 0 時，濃度應為 1/56 原濃度，此時的  $R^2$  達到 0.9874 相當高的數值，但如果僅僅只看 T diff，似乎忽略了 C diff，因 C diff 雖大致相仿，但仍有些微不同，可能是因為每次實驗微小誤差所致，因此我們便想嘗試由 T diff / C diff 與濃度去繪製出曲線。





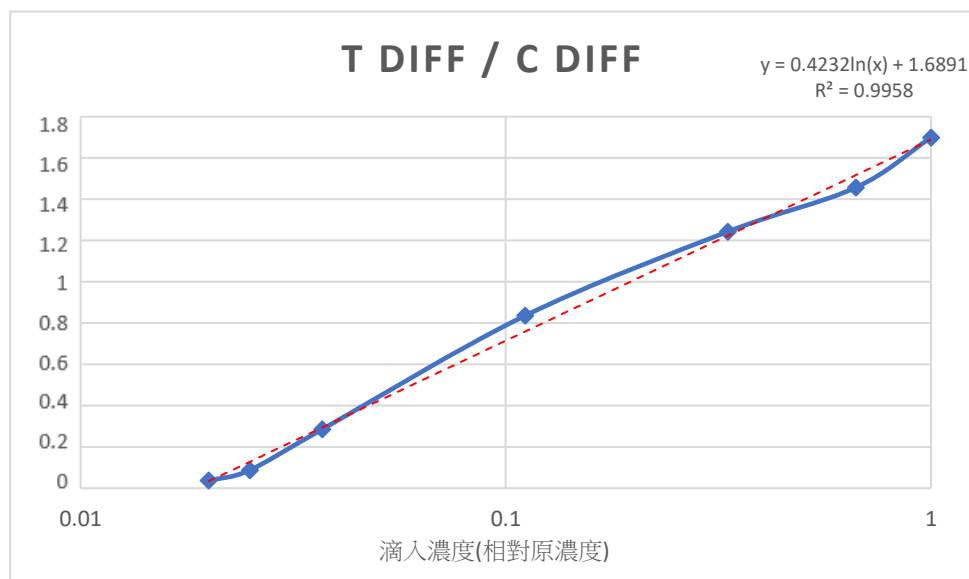
圖三十九. 滴入濃度對 T diff / C diff 關係圖

由 EXCEL 內建趨勢線公式，我們得到

$$T \text{ diff} / C \text{ diff} = 0.4232 \ln(\text{Concentration}) + 1.6891 \quad [6]$$

$$R^2 = 0.9958 \quad [7]$$

如果根據 [6] 公式推導，當 T diff / C diff = 0 時，濃度應為 1/55 原濃度， $R^2$ 更是達到了0.9958，基本上貼合自然對數曲線，我們也實際進行 1/55 原濃度的實驗，如同猜想，我們發現 1/55 原濃度無 T 線的存在，由於此公式僅由實驗所得數據趨勢得到，雖  $R^2$  極高，但仍無法證明正確性，只能由 1/50 原濃度極弱的 T 線以及 1/55 原濃度完全無 T 線，判斷最小濃度應該介於 1/50 原濃度及 1/55 原濃度。



圖四十. 滴入濃度對 T diff / C diff 關係圖(濃度轉為對數刻度)

## 六、誤差討論

### (一)、T 線的深度不平均

如圖三十二所示，T 線區域中，因為先接觸到流動液體的 T 線區域有較高的膠體金，造成靠近流動起始點處的區域較深，而在越靠近試紙中央 T 線灰階值也會較淺，推測是因為液體吸附力較強，兩側顏色較深，若在取 T 線灰階值時，在某一側取的區域偏多，會造成數值有誤差，利用選取工具在該區域隨機量取更多次，以避免顏色分布不平均導致測量上的誤差，最後再將所有量取資料做平均。

### (二)、相機解析度不夠

由於實驗經費有限，因此使用的攝影機解析度有限，ImageJ 無法準確分析每個色塊，我們希望日後能夠使用更精準更精密的儀器來進行實驗，並比較不同相機擷取能力對 ImageJ 造成誤差的大小與影響。

### (三)、光線不平均

為了保持在照光條件皆相同，而且能夠正常攝影，我們使用網美燈進行照光，我們將攝像頭放置在網美燈的圓心，盡可能讓快篩試劑的受光較均勻，但燈光仍無法避免有微小的誤差，具體實驗架設參考圖七。

## 陸、結論

### 一、結論

(一)、分析後不同體積的 LH 滴入後可以發現:

- 各種體積的 T diff 差距不大
- 每一種體積都在大概 8~9 分鐘時趨於穩定。
- 滴入不同體積的 LH 其 C 線灰階值大致相同

(二)、分析後不同濃度的 LH 滴入後可以發現:

- 濃度越大顏色越深
- 每種濃度都在大概 8~9 分鐘趨於穩定
- 滴入不同濃度的 LH 其 C 線灰階值大致相同
- 但低濃度的 C 線在低濃度如 1/40、1/50 原濃度會特別高

(三) 探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度:

- 最低可測體積:25~30 $\mu$ l
- 最低可測濃度:1.45~1.6MIU

## 二、應用與未來展望

我們這次對於 LH 濃度及體積進行初步定量分析，不僅僅觀察到了影響成色的變因，以及顏色隨著時間的改變，隨著濃度的不同，T DIFF/C DIFF 的值也有對應的值，並且，我們利用 excel 的趨勢線分析，找出了最符合我們實驗結果的趨勢線，使我們能夠由 T DIFF/C DIFF 的值回推出滴入的檢體濃度，但由於我們的實驗組不夠多，無法確定我們所做的趨勢線足夠精準，使我們回推檢體濃度，希望日後可以有龐大的數據庫可以強化此技術的運用。

目前快篩試劑已經廣泛應用在很多方面，但大部分得快篩試劑都只檢測定性結果(陽或陰)，我們能以定量的方式開發出一種快篩試劑，結合各種資訊設備的科技分析技術，將試劑上線條深度與滴入檢體的濃度做連結，例如:當尿液中的黃體成長激素濃度達到高濃度時，排卵快篩試劑的顏色深度會增加，加上手機的拍照功能，並安裝對應的 app 分析，即可達到精準檢測的效果，對於某些想懷孕婦女或不想懷孕的少女，可以大大的增加正確率。也希望這些技術可以運用在 covid-19 等疾病的抗體檢測上。

## 柒、參考文獻

1. Frew, E. (2021). A SARS-CoV-2 Antigen Rapid Diagnostic Test for Resource Limited Settings. *Nature*.
2. 李日生(2018年12月25日)。月經不規則，排卵異常，哪裡出問題？ - 照護線上。2023年5月19日。取自: <https://www.careonline.com.tw/2018/12/MC.html>
3. 李日生(2018年10月2日)。排卵試紙怎麼用？醫師圖文解說- 照護線上。2023年5月19日。取自: <https://www.careonline.com.tw/2018/10/ovulation.html>
4. 防疫小尖兵：新冠病毒快篩試劑開發(2020年4月30日) - 國家衛生研究院電子報，839期。2023年5月19日。取自: <https://enews.nhri.org.tw/research/3531/>
5. 側向流體免疫分析(快篩)平台開發(無日期) - 偉喬生醫 LEADGENE。2023年5月19日。取自: <https://www.leadgenebio.com/index.php?option=module&lang=cht&task=pageinfo&id=417>

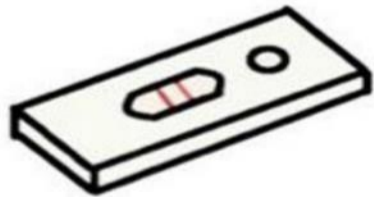
## 【評語】 050206

本研究對於 LH 濃度及體積進行初步定量分析，觀察到了影響成色的變因，以及顏色隨著時間的改變，隨著濃度的不同也有對應的值，利用 excel 的趨勢線分析，由 T DIFF/C DIFF 的值回推出滴入的檢體濃度。但為何動機講的是要探討等待時間對新冠快篩試劑線條顏色深淺的影響，但卻採用較容易取得的排卵試紙以及黃體成長激素(LH)來進行實驗，每種快篩試劑性質都不一樣，似乎不能互相比較。另所得結論每種濃度的深度大致相同，若將原濃度分別稀釋發現顏色深度隨著濃度下降變淺，似乎可以預期。

# 作品海報

LH 對快篩試劑

顏色深淺定量



# 摘要

隨著快篩的實用度提高，我們希望能夠更了解快篩的原理、適合快篩的濃度與體積，以及最合適的作用時間，我們以色彩灰階值作為顏色深淺定量。由於COVID-19的檢測試劑需要高規格的實驗室，因此我們選擇較易取得的排卵試劑，我們跟龍騰生技公司取得排卵試劑以及黃體素80MIU濃度的尿液，我們將原濃度尿液體積分成30、50、75、100 $\mu$ l，發現每種濃度的深度大致相同。我們將原濃度分別稀釋成1、2/3、1/3、1/9、1/27、1/40、1/50倍，發現顏色深度隨著濃度下降變淺。而快篩可測得的最低體積介於25 $\mu$ l~30 $\mu$ l，最低濃度則介於1/50~1/55原濃度之間，每組數據皆在8~9分鐘時達到穩定。

# 研究動機

近年來，隨著全球疫情的爆發，快速篩檢已成為防疫工作中不可或缺的重要環節。快篩技術具有檢測迅速、簡單、便捷等優點，可以快速獲得檢測結果，讓人可以即時採取隔離措施，以避免人與人的接觸造成病毒的傳播，但是快篩也有一些讓我們感到困惑的現象，例如:有些快篩在15分鐘之內沒有明顯呈色，但是放置長久時間後就會有明顯的陽性線條，通常我們症狀很嚴重時，量出來的線條顏色會非常深；而快康復時，線條顏色會較淺。因此，我們想藉由這樣的機制來定量分析抗體或抗原濃度、或滴入液體體積對線條顏色深淺影響，並且藉由探討時間對線條顏色深淺的影響，驗證一般快篩需要等待15分鐘的反應時間是否為最佳觀察時期。由於covid-19的抗體及抗原我們無法取得，因此我們採用較容易取得的排卵試紙以及黃體成長激素(LH)來進行實驗以達到相同的效果，同時也期許日後此類相關技術能夠運用在正式上市的产品。

# 研究目的

- (一)、研究滴入不同體積的LH對於快篩試劑顏色深淺的影響
- (二)、研究滴入不同濃度的LH對於快篩試劑顏色深淺的影響
- (三)、探討滴入不同體積或濃度的LH對其顏色達穩定的時間長短比較
- (四)、研究T線與C線的顏色深淺比值隨滴入體積與濃度之變化
- (五)、探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度

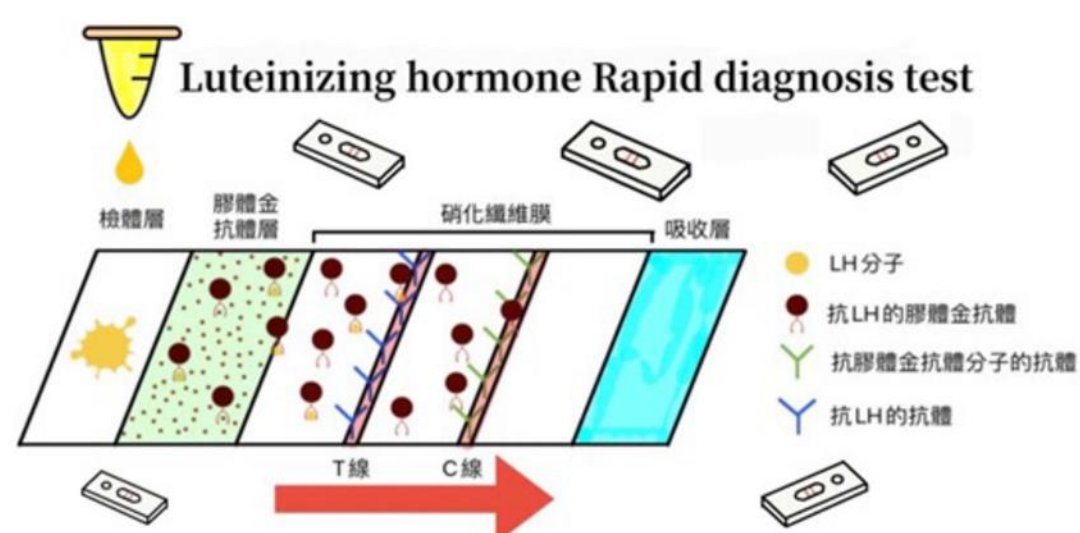
# 研究原理

## (一)、側流分析(LFA)

側向流體免疫分析法 (Lateral flow assay) 又稱為側向流體免疫層析法 (lateral flow immunochromatographic assay)，快篩試劑主要使用此種方式，可以快速偵測待測物質是否存在於樣本中。凡舉病毒抗原、血清中抗體、樣本中蛋白質或小分子化合物均可以開發為快篩檢測試劑。其原理使用相似於抗體連結免疫法 (ELISA) 的原理；首先樣本會流經反應區，此反應區中有能辨識待測目標之抗原/抗體，當樣本流經反應區，待測目標則被捕捉，最後利用奈米膠金 (colloidal gold nanoparticles) 呈色。

## (二)、快篩試劑原理

快篩試劑內含的試紙可依序分成4個部件：檢體層、膠體金抗體層、硝化纖維膜與吸收層（如圖）。當受檢者尿液加到檢體層時，因各層纖維中的毛細作用將檢體內LH分子帶向最後方吸收層。檢體中含有LH流經膠體金抗體層時，可以識別LH的單株抗體會認出而與其結合在一起，而此處的單株抗體是已經結合了奈米等級膠體金的特製化抗體，也是快篩試劑能夠形成暗紅線條的原因。接著，LH-膠體金抗體結合物流經有二道線的硝化纖維膜，第一道是測試線，含有能抓住LH的抗體，而第二道線則是控制線，有能抓住膠體金抗體分子的抗體。當受檢者尿液中有LH時，經硝化纖維膜則會呈現雙線，代表陽性結果。反之，受檢者尿液中沒有LH時，只呈現單線結果，代表陰性，而若第二道線無呈現顏色，則此測驗屬於無效測試。



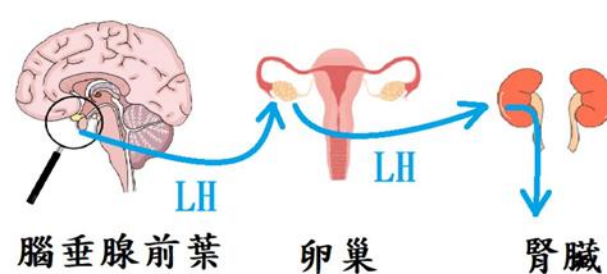
# 研究設備與器材

黃體成長激素	排卵試紙數張
微量吸管(pipette)	網美燈
自製暗房	蒸餾水
小試管	攝影工具



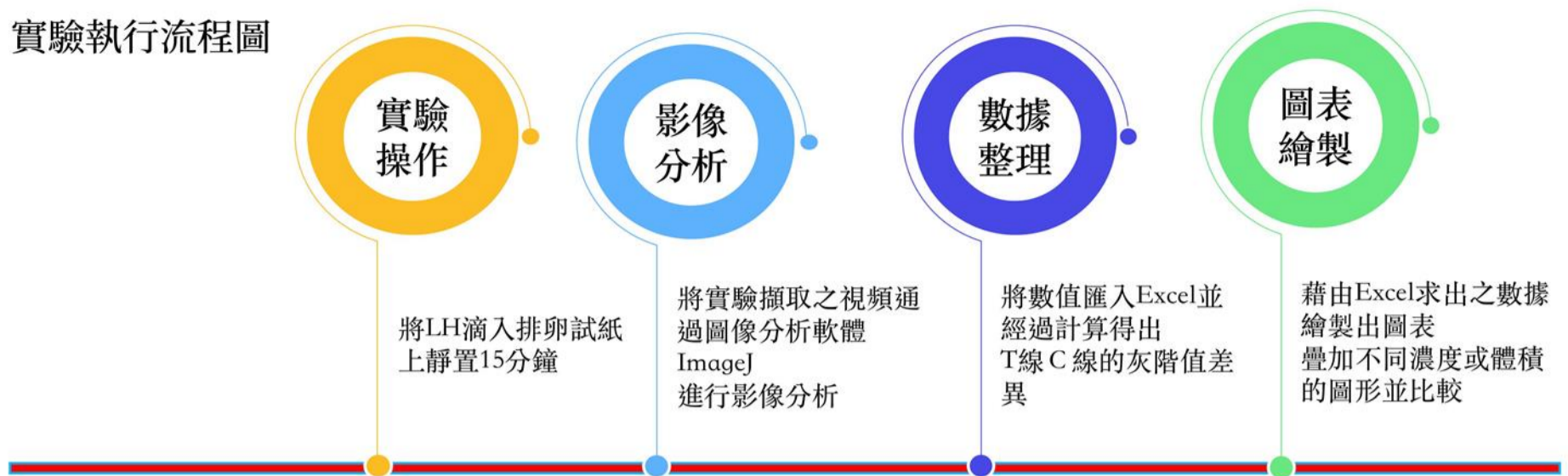
## (三)、尿液中為何有LH?

腦垂腺前葉大量分泌LH後，LH經由血液循環刺激卵巢排卵。LH作用在卵巢之後，就會經由腎臟代謝，經由尿液排出。我們就是用排卵試紙，檢測尿液中LH的濃度，來觀察女性的排卵時間。



# 研究過程與方法

## 實驗執行流程圖



## 相關技術分析

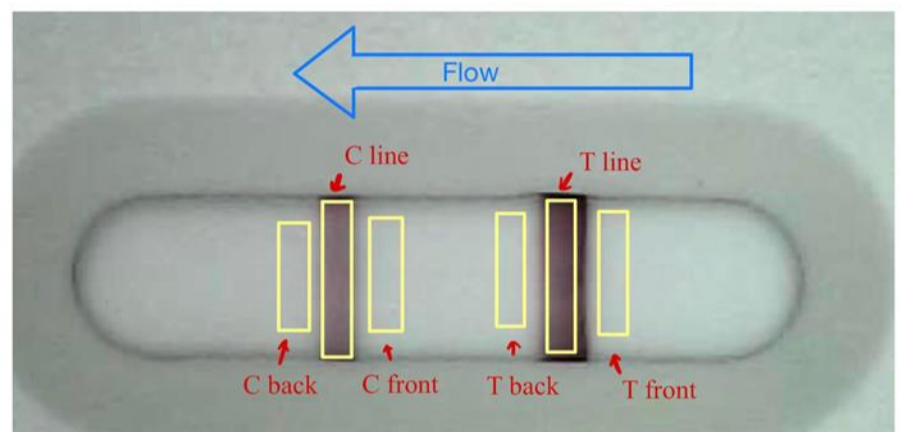
選定一固定區域，隨時間變化逐個分析其灰階值，每部實驗影片量取六塊區域(如圖)，分別為T線前、T線、T線後、C線前、C線、C線後，最後diff值計算同上述分析方法，由背景值減去T (C)線值。變化率為將前一刻的T線灰階值減去現在T線的灰階值再除以前一刻的T線灰階值的百分率。

其中公式如下：

$$T_{diff} = \frac{T_{front} + T_{back}}{2} - T_{line}$$

$$C_{diff} = \frac{C_{front} + C_{back}}{2} - C_{line}$$

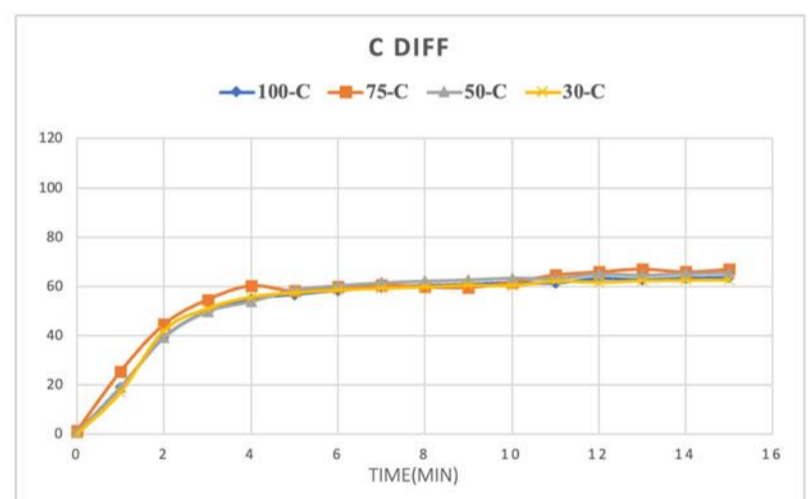
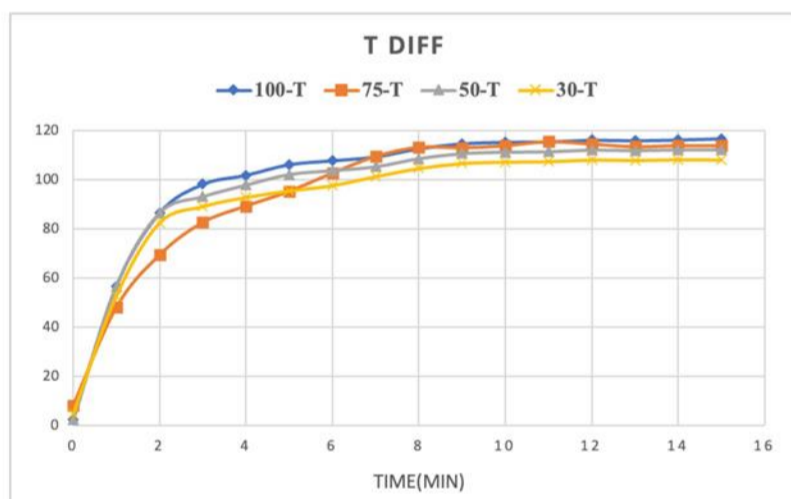
$$Change\ Rate(\%) = \frac{T_{(time-1)} - T_{(time)}}{T_{(time-1)}} \times 100\%$$



## 結果與圖表討論

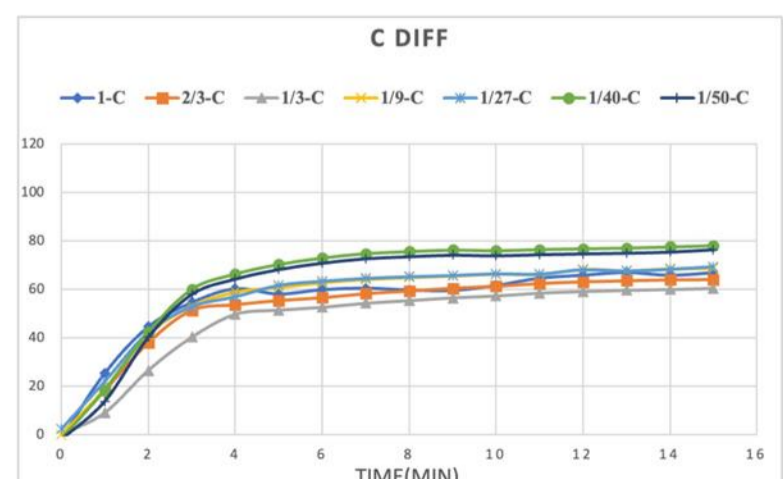
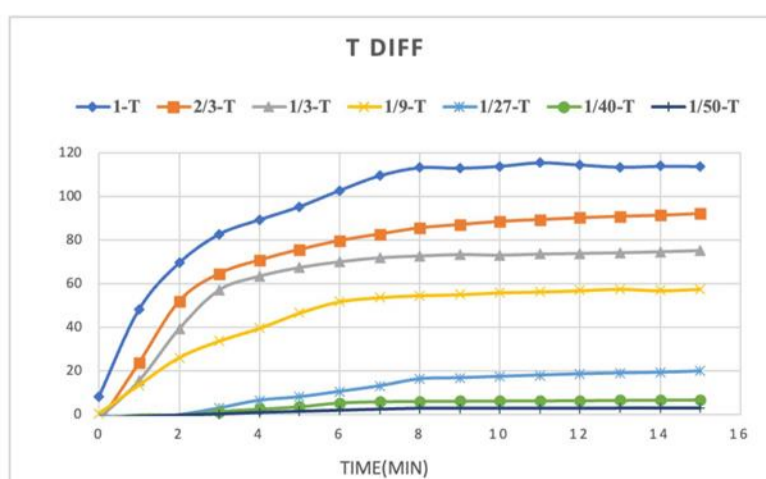
### 一、滴入不同體積的LH對於快篩試劑顏色深淺的影響

滴入體積(μl)	100	75	50	30	
15分鐘時T DIFF		116.7	113.4	112.2	108.2
15分鐘時C DIFF		63.6	66.9	65.6	62.7



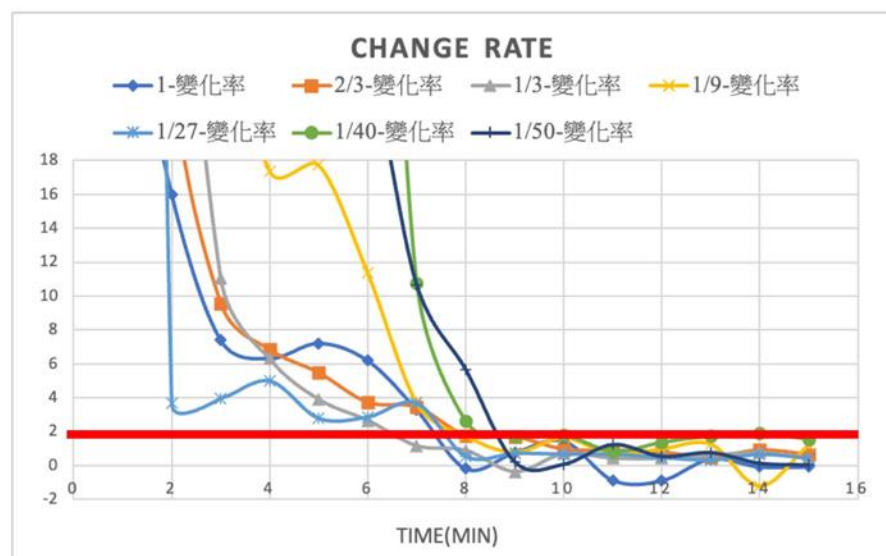
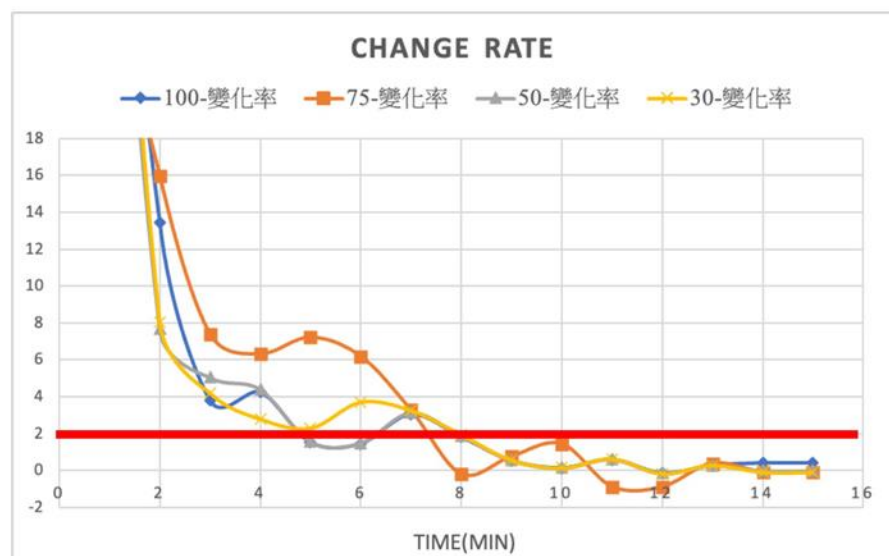
### 二、滴入不同濃度的LH對於快篩試劑顏色深淺的影響

滴入濃度(80MIU)	1	2/3	1/3	1/9	1/27	1/40	1/50
15分鐘時T DIFF	113.4	90.8	75.2	57.5	19.9	6.8	2.8
15分鐘時C DIFF	66.9	62.5	60.5	68.8	69.5	78.2	76.6

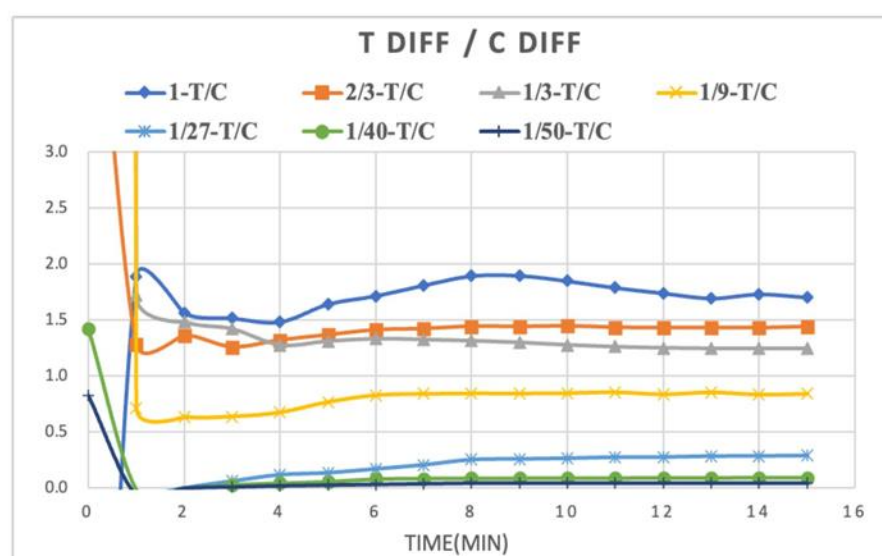
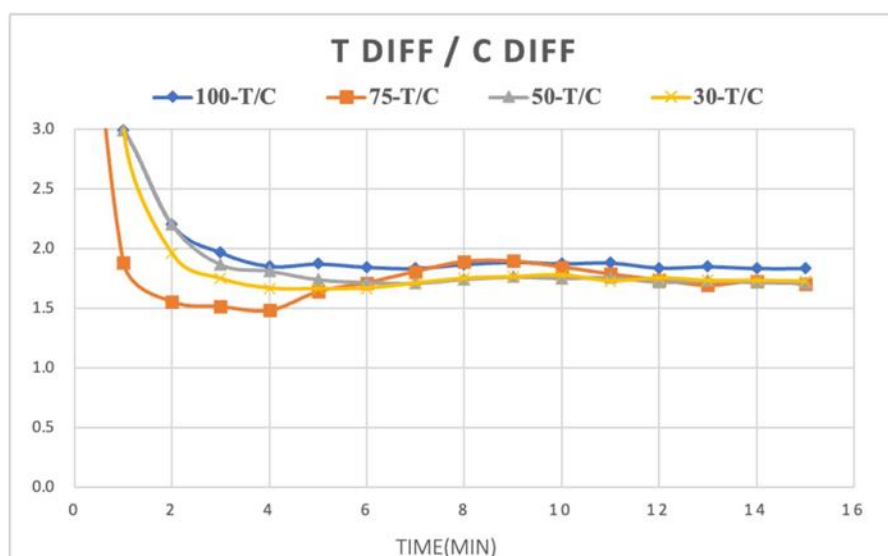




### 三、探討滴入不同體積或濃度的LH對其顏色達穩定的時間長短比較



### 四、研究T線與C線的顏色深淺比值隨滴入體積與濃度之變化

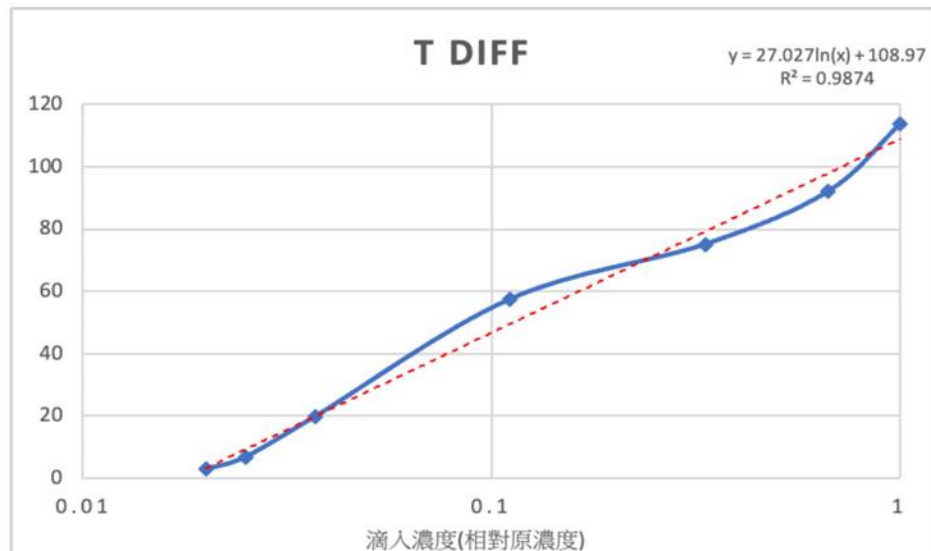


### 五、探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度

**最低可偵測的體積** 滴入25  $\mu\text{l}$ 時，試劑無法出現顏色，而滴入30  $\mu\text{l}$ 時，快篩才出現顏色，我們推測最低可偵測的體積在25  $\mu\text{l}$ 和30  $\mu\text{l}$ 之間。

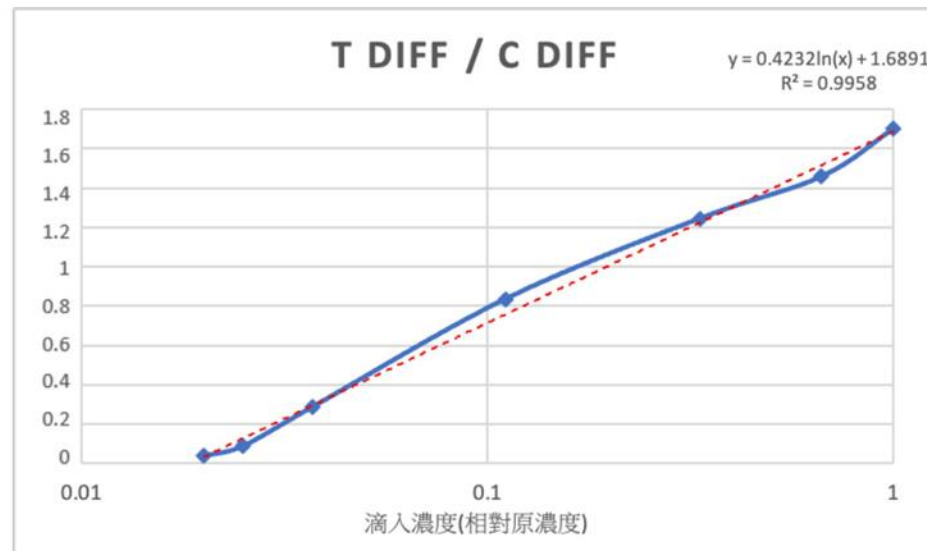
**最低可偵測的濃度**

滴入濃度(相對80MIU)	1	2/3	1/3	1/9	1/27	1/40	1/50
15分鐘後的T DIFF	113.4	90.8	75.2	57.5	19.9	6.8	2.8
15分鐘後的T DIFF/C DIFF	1.69	1.45	1.24	0.84	0.29	0.09	0.04



$$T_{diff} = 27.027 \ln(\text{Concentration}) + 108.97$$

$$R^2 = 0.9874$$



$$T_{diff}/C_{diff} = 0.4232 \ln(\text{Concentration}) + 1.6891$$

$$R^2 = 0.9958$$

利用趨勢線  $T_{diff}/C_{diff} = 0.4232 \ln(\text{Concentration}) + 1.6891$

算出最低可偵測的濃度為1/55原濃度，並以實驗求證

### 結論及未來展望

分析不同濃度的LH滴入後可以發現:

- 濃度越大顏色越深
- 每種濃度都在大概8~9分鐘趨於穩定
- 滴入不同濃度的LH其C線灰階值大致相同
- 低濃度的C線(1/40、1/50原濃度)會特別深

分析不同體積的LH滴入後可以發現:

- 各種體積的T diff差距不大
- 每一種體積都在大概8~9分鐘時趨於穩定
- 滴入不同體積的LH其C線灰階值大致相同

探討快篩試劑可偵測的最低體積及最低濃度:

- 最低可測體積:25~30 $\mu\text{l}$
- 最低可測濃度:1.45~1.6MIU (1/50~1/55原濃度)

未來展望與應用

- 減少誤差來源可能：如相機解析度不夠，光線不平均等
- 增加實驗組數，使趨勢線更精準
- 安裝手機app使可以直接拍照反推黃體成長激素的濃度
- 增加女性受孕成功率及避孕成功率