

侧向层析技术标记物研究进展



靖静 综述 王志增 审校

河南大学 基础医学院, 抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室, 细胞与分子免疫重点实验室 (河南开封 475004)

【摘要】 侧向层析技术以其简单、快速、灵敏、经济等优势广泛应用于即时检验、现场检验以及家庭自检中。合适的标记物的选择对整个实验的灵敏度起着重要作用。传统的标记物有胶体金、纳米硒以及纳米碳等, 尤以胶体金最为常用。近年来新型标记物的出现, 如量子点、纳米酶等, 使得侧向层析有了进一步的发展, 实现了从定性检测逐步向定量检测的转变。本文旨在介绍目前已有的侧向层析标记物, 为侧向层析工作者筛选合适的标记物提供一定的研究依据。

【关键词】 侧向层析; 标记物; 胶体金; 纳米酶

Research advance of lateral flow assay labels

JING Jing, WANG Zhizeng

Joint National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Key Lab of Cellular and Molecular Immunology, School of Basic Medical Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, P.R.China

Corresponding author: WANG Zhizeng, Email: wzhzeng@126.com

【Abstract】 Lateral flow assay is widely used in the point-of-care testing on-site and in-home testing with the advantage of being simple, rapid, sensitive and cost-effective. Proper labels are the key factors in lateral flow assay. Traditional labels include colloidal gold, selenium nanoparticle, and carbon nanoparticle, among which the colloidal gold is most commonly used. Lateral flow assay has been improved as a result of the discovery of new labels, such as quantum dots and nanozyme recently. Meanwhile, transformation of qualitative detection to quantitative detection is gradually realized. This article aims at introducing the most often used and the latest lateral flow assay labels, providing a basis theoretical investigation on screening proper labels for lateral flow assay researchers.

【Key words】 lateral flow assay; labels; colloidal gold; nanozyme

引言

侧向层析技术 (lateral flow assay, LFA) 近年来发展迅速, 在食品安全^[1]、疾病诊断^[2]、毒品检测^[3]、环境监测^[4]等方面都有广泛的应用。侧向层析试纸条与酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time-polymerase chain reaction, RT-PCR) 等检测技术相比, 具有简单、快速、不依赖大型仪器设备、价格低廉等优势, 被广泛应用于即时检验、现场检验以及家庭自检^[5-6]。随着现实需求的不断增加, 侧向层析的标记物也在不断的探索研究中。理想的标记物应该具备性能稳定、制备

简单、灵敏度高、重复生产性高、假阳性低等特性, 除此之外还应具备制备成本经济的特点^[7]。本文旨在通过总结 LFA 的原理与其标记物的研究进展, 分析各类标记物的特点, 希望能为以后侧向层析实验的研究提供一定的理论研究依据。

1 侧向层析试纸条的原理

侧向层析试纸条的核心部分如图 1 所示, 主要由支撑垫、样品垫、结合垫、反应垫和吸水垫五部分组成。标记物通过静电吸引、疏水作用、配位结合等非共价键作用与蛋白/核酸结合, 形成蛋白/核酸-标记物复合物, 将其固化在玻璃纤维膜上, 形成结合垫^[8]。将样品加到试纸条的样品垫, 液体基

DOI: 10.7507/1001-5515.201703005

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1504823); 河南省科技发展计划项目 (182102310154)

通信作者: 王志增, Email: wzhzeng@126.com

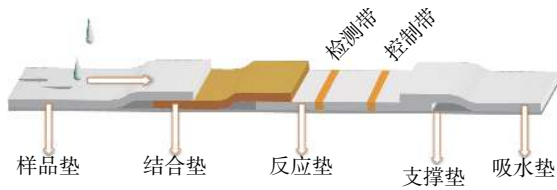


图1 侧向层析试纸条反应模板

Fig.1 Reaction template of lateral flow test strip

质会层析到结合垫上,使固定于结合垫的蛋白/核酸-标记物复合体复溶,随着毛细管作用,蛋白/核酸-标记物复合体会跟液体基质一起经反应垫朝吸水垫方向层析,当复合体层析到反应垫时,蛋白/核酸会与检测带和控制带包被的蛋白/核酸发生反应,最终根据检测线和质控线的反应情况对样本中是否有目标物质做出初步判断^[9]。

2 侧向层析标记物的种类

根据纳米粒子的特性,可以大致将侧向层析标记物分为三类。一类为有色型的标记物,例如胶体金、纳米硒、纳米碳等,可通过肉眼观察到显色情况,直接辨别结果,通常用于定性或半定量检测;另一类为荧光性标记物,通过一些简单的机器捕捉荧光信号,实现对目标物质的定量分析;还有一些其他类型的标记物,例如免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB)、纳米酶等,通过捕捉试验过程中的磁信号或酶学活性,实现对目标物质的检测。

2.1 有色型侧向层析标记物

2.1.1 胶体金 胶体金是由氯金酸在还原剂的作用下,形成的一种具有表面双电层结构的纳米粒子。胶体金制备简单、性能稳定,具有良好的生物相容性,可以与蛋白质、核酸等通过非共价键结合;并且标记过程简单、方便、快速,使其在快速检测领域得到了广泛的关注与应用^[10-11]。虽然胶体金作为LFA的标记物具有很多优点,但是对于低浓度样品的检测,其灵敏度仍较低。尽管通过银增强和核酸适配体等新方法提高了胶体金侧向层析实验的灵敏度,但这些方法使整个LFA变得复杂,背离了LFA操作简便的初衷。另外,胶体金制备原料成本相对较高,所以还需寻找新的价格低廉、灵敏度高的标记物。

2.1.2 纳米硒 纳米硒是在一些大分子物质做稳定剂的前提下,通过使用抗坏血酸等还原剂还原亚硒酸,得到的橘黄色的纳米硒粒子。与胶体金相比,纳米硒制备过程简单,制备原料经济易得,纳米粒子性能更加稳定^[12]。1990年, Oskiwicz 等最先将

纳米硒应用到侧向层析试纸条的制备中,用来检测人尿液中人绒毛膜促性腺激素的含量。多年来,纳米硒在侧向层析中的应用并不广泛,直到2014年,本团队^[1]利用纳米硒研制出了三聚氰胺快速检测试纸条,才将纳米硒重新带入了侧向层析领域的研究。目前,仅有雅培公司研制的人类免疫缺陷病毒纳米硒快速检测试纸条投入市场使用。纳米硒还有巨大的发展空间可待人们挖掘,随着纳米技术以及免疫诊断技术的发展,相信纳米硒在该领域将会具有更广阔的应用前景。

2.1.3 纳米碳 1993年 Degussa AG 公司从烟尘中提取的SB4型碳纳米粒子首次作为标记物用于分析物的检测^[13]。纳米碳制备简单、成本低廉,制成的胶体性能稳定,可以与蛋白、核酸、多肽等多种探针结合,用于不同类型的样品检测。与胶体金和纳米硒相比,黑色的纳米粒子与白色的硝酸纤维素膜会形成更大的颜色反差,使得检测结果更易辨别,提高了检测灵敏度^[14]。但是,由于纳米碳在生产过程中易产生污染以及标记时间较长等缺点,导致纳米碳的应用并不广泛。

2.1.4 金磁纳米颗粒 金磁纳米颗粒通常由两部分构成:具有磁学特性的核心以及由聚合物或贵金属附着其表面构成^[15]。其中金磁纳米颗粒是2001年由崔亚丽团队首次报道合成。通过 Fe_3O_4 与 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 混匀,在羟胺作用下将吸附在 Fe_3O_4 表面的 Au^{3+} 还原为 Au ,然后用盐酸清洗至pH6-7。金磁颗粒因其良好的光学、磁学以及生物学特性,在侧向层析中具有一定的应用。目前已有针对C反应蛋白以及心血管等疾病检测的金磁颗粒的报道^[16-17]。但是金磁纳米粒子制备过程复杂、成本造价高,导致其在侧向层析中的应用并不广泛。随着制备工艺的改善,金磁纳米颗粒以其独特的优势,将会受到更多侧向层析研究者的青睐。

2.2 荧光性侧向层析标记物

有色型的胶体金、纳米硒、纳米碳等因其自身特点限制,大多用于定性检测。即使通过改变标记的探针,借助一些仪器设备逐渐有定量检测的报道出现,但是其灵敏度仍旧较低,并且使整个试验变得复杂,也增加了试验的成本,与侧向层析试纸条使用简单、检测快速、价格低廉的优势相背离。因此,荧光微球、量子点(quantum dots, QDs)、上转换发光(up-converting phosphor, UCP)等荧光性标记物应运而生。

2.2.1 荧光微球 荧光微球是一类负载荧光物质的球形纳米粒子,受外界能量刺激能激发出特定的荧

光。荧光微球的载体多为有机或聚合物材料,具有稳定的形态结构以及高效的发光效率,作为一种新的示踪标记物已经被广泛应用于侧向层析实验、流式细胞术、高通量药物筛选等生物医学领域^[18-19]。Liu等^[20]以荧光微球为标记物研制出来的用于检测黄曲霉素 B1 的试纸条,灵敏度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与高效液相色谱法的检测结果具有高度一致性。Xie等^[21]分别以荧光微球和胶体金为标记物制备检测大肠杆菌 O157:H7 的侧向层析试纸条,并对二者进行比较。发现荧光微球用作标记物比胶体金具有更高的灵敏度和抗体结合率,其稳定性也优于胶体金。荧光微球作为一种新兴的标记物,因其独特的优点,受到人们的广泛关注。目前已经有以荧光微球为标记物的荧光定量快速检测试纸条在市场上使用,随着检测方法的进步,荧光微球作为 LFA 标记物将会占据更多的市场份额。

2.2.2 量子点 QDs 是一种由 II—VI 族或 III—V 族元素如 CdSe、ZnSe、InP、InAs 等组成的具有特殊电子性质与光学性质的半导体纳米粒子,在最近 10 年中得到广泛的研究与应用^[22-23]。QDs 可以和不同的生物分子结合,例如蛋白、抗体、适配体、寡核苷酸适配子等,然后形成一个兼具电化学特性和生物学特性的结合物在 LFA 模板中进行检测^[24-25]。Bruno^[26]把大肠杆菌寡核苷酸适配子与 QDs 结合,研究出的侧向层析试纸条灵敏度比同等条件下胶体金试纸条高出 10 倍之多。QDs 的这些独特优势,使其成为 LFA 的新宠,目前市场上已经出现了很多以 QDs 为标记物的产品,相信在不久的将来,QDs 在 LFA 上会有更多更广泛的应用。

2.2.3 上转换发光 20 世纪 70 年代,科学家们合成了一类反斯托克斯规则的发光材料——UCP,由稀土元素掺杂某些晶体晶格构成。UCP 在红外光区(波长 $> 780 \text{ nm}$)被激发,发射出不同波长的光,且发射光的波长短于激发波长^[27-28]。UCP 作为荧光标记物,与传统的荧光标记物相比具有以下优势:① 独有的上转换发光现象,降低了实验中的背景干扰,灵敏度较高^[29];② UCP 由惰性材料合成,不易褪色,使 LFA 试纸条可以长期储存;③ 因其强大的反斯托克斯位移效应,不同颜色的 UCP 粒子可以被同一红外光激发,可用于同一样品的多元化分析^[30-31]。但是 UCP 颗粒需要经过一系列的处理才能作为稳定的标记物,制备复杂,市场上的成品颗粒又价格高昂,成为制约 UCP 发展的主要因素。

2.3 其他侧向层析标记物

除了有色型和荧光性 LFA 标记物外,还有

IMB^[32]、脂质体^[33]以及新兴的纳米酶^[34]等作为标记物应用于 LFA 中。

IMB 是一种表面包裹某种化学基团的球形磁性纳米微粒,稳定性好、灵敏度高,可以作为多元检测的标记物^[35]。Wang 等^[36]用 300 nm 的 IMB 作为标记物,研究出的检测炭疽杆菌的侧向层析试纸条最低检出限为 $5 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。脂质体是由磷脂分子组成的双亲性膜性微球,内含水相空间,可以封装和固定标记探针,例如酶、染料、荧光物质等。Shukla 等^[33]研制的检测沙门氏菌的侧向层析试纸条,最低检出限为 $10^2 \text{ CFU}/\text{L}$,其灵敏度提高了 2~3 倍。然而,由于 IMB 和脂质体制备工艺复杂、成本较高,目前并没有广泛应用于侧向层析实验中。

纳米酶由阎锡蕴课题组发明合成,具有纳米尺寸效应的同时具有酶学活性,在纳米科学以及生物学领域都有广泛的应用^[37]。纳米酶埃博拉检测试纸条的灵敏度可达 1 ng/mL,比胶体金埃博拉检测试纸条高 100 倍,可达到 ELISA 的灵敏度,同时准确性比 ELISA 高^[34]。所以纳米酶在侧向层析中同样具有良好的科研价值以及开发应用价值。

3 结论与展望

不论是应用在临床诊断、食品安全控制还是法医学鉴定中的技术,都应该满足现场生物检测的高通量性、高准确性、客观定量和操作简便的特性。而 LFA 满足这些特性,是最适用于即时检验与现场检验的一种检测手段。目前,市场应用最广泛的就是以胶体金作为标记物的试纸条,但是它只能实现简单的定性检测,不能实现定量检测,也不适用于多元化检测。随着标记技术的发展,利用 QDs、IMB、脂质体等新型标记物,可以发展多元化的定性、定量检测,提高了侧向层析试纸条的灵敏度,使侧向层析试纸条在快速检测领域得到极大发展。相信在不久的将来,不论是疾病的诊断还是食品安全的监测都可以像现在的早孕试纸条与血糖检测那样,进入家庭,实现疾病的自我监控与预防和食品安全的检测与监督,真正把预防与治疗结合起来,提高人们的生活健康质量。

参考文献

- 1 Wang Zhizeng, Zhi Dejuan, Zhao Yang, *et al.* Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 1699-1707.
- 2 Song Liuwei, Wang Yingbin, Fang Linlin, *et al.* Rapid fluorescent

- lateral-flow immunoassay for hepatitis B virus genotyping. *Anal Chem*, 2015, 87(10): 5173-5180.
- 3 Teerinen T, Lappalainen T, Erho T. A paper-based lateral flow assay for morphine. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(24): 5955-5965.
 - 4 Liu Liqiang, Xing Changrui, Yan Huijuan, *et al.* Development of an ELISA and immunochromatographic strip for highly sensitive detection of microcystin-LR. *Sensors*, 2014, 14(8): 14672-14685.
 - 5 Hu Jie, Wang Shuqi, Wang Lin, *et al.* Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54(2): 585-597.
 - 6 Hagström A E V, Garvey G, Paterson A S, *et al.* Sensitive detection of norovirus using phage nanoparticle reporters in lateral-flow assay. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126571.
 - 7 Shan Shan, Lai Weihua, Xiong Yonghua, *et al.* Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(3): 745-753.
 - 8 Chandler J, Gurmin T, Robinson N. The place of gold in rapid tests. *IVD Technol*, 2000, 6(3): 37-49.
 - 9 Meng Kai, Sun Wenjing, Zhao Peng, *et al.* Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma. *Biosens Bioelectron*, 2014, 55: 396-399.
 - 10 Li Shuqun, Song Juan, Yang Hong, *et al.* An immunochromatographic assay for rapid and direct detection of 3-amino-5-morpholino-2-oxazolidone (AMOZ) in meat and feed samples. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(4): 760-767.
 - 11 Hou Wanwan, Wang Shaohui, Wang Xiaolan, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatographic strips for detection of *riemerella anatipestifer*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122952.
 - 12 王志增. 三聚氰胺胶体硒快速检测试纸条的研制. 兰州: 兰州大学, 2014.
 - 13 Posthuma-Trumpie G A, Wichers J H, Koets M, *et al.* Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(2): 593-600.
 - 14 Huang Xiaolin, Aguilar Z P, Xu Hengyi, *et al.* Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 166-180.
 - 15 Cui Y L, Hu D D, Fang Y, *et al.* Preparation and mechanism of Fe₃O₄/Au core/shell super-paramagnetic microspheres. *Science in China Series B-chemistry*, 2001, 44(4): 404-410.
 - 16 郭博阳, 马乐, 张梦丹, 等. 利用金磁微粒免疫化学发光技术检测高敏 C 反应蛋白. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(11): 1468-1472.
 - 17 Hui Wenli, Zhang Sinong, Zhang Chao, *et al.* A novel lateral flow assay based on GoldMag nanoparticles and its clinical applications for genotyping of MTHFR C677T polymorphisms. *Nanoscale*, 2016, 8(6): 3579-3587.
 - 18 韩文敏. 免疫检测荧光微球的制备和性能研究. 武汉: 华中科技大学, 2008.
 - 19 Cheng Song, Yang Yajie, Ni Xiaoqin, *et al.* Fluorescent microspheres lateral flow assay for sensitive detection of the milk allergen casein. *Food Agric Immunol*, 2017, 28(6): 1017-1028.
 - 20 Liu Daofeng, Huang Yanmei, Chen Minghui, *et al.* Rapid detection method for aflatoxin B-1 in soybean sauce based on fluorescent microspheres probe. *Food Control*, 2015, 50: 659-662.
 - 21 Xie Quanyuan, Wu Yanhua, Xiong Qirong, *et al.* Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54(12): 262-265.
 - 22 杨久敏. 基于纳米量子点标记肿瘤标志物检测系统研究. 天津: 天津大学, 2012.
 - 23 Chen Zhenhua, Liang Rongliang, Guo Xinxin, *et al.* Simultaneous quantitation of cytokeratin-19 fragment and carcinoembryonic antigen in human serum via quantum dot-doped nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 60-65.
 - 24 Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2015, 73(2): 47-63.
 - 25 Foubert A, Beloglazova N V, De Saeger S. Comparative study of colloidal gold and quantum dots as labels for multiplex screening tests for multi-mycotoxin detection. *Anal Chim Acta*, 2017, 955: 48-57.
 - 26 Bruno J G. Application of DNA aptamers and quantum dots to lateral flow test strips for detection of foodborne pathogens with improved sensitivity *versus* colloidal gold. *Pathogens*, 2014, 3(2): 341-355.
 - 27 赵瑾. 布鲁氏抗原快速检测 UTP 免疫层析试纸条的研制. 北京: 军事医学科学院疾病预防控制中心, 2009.
 - 28 Bobosha K, Tjon Kon Fat E M, van den Eeden S J, *et al.* Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(5): e2845.
 - 29 Das G K, Stark D T, Kennedy I M. Potential toxicity of up-converting nanoparticles encapsulated with a bilayer formed by ligand attraction. *Langmuir*, 2014, 30(27): 8167-8176.
 - 30 Zhang Pingping, Liu Xiao, Wang Chengbin, *et al.* Evaluation of up-converting phosphor technology-based lateral flow strips for rapid detection of *Bacillus anthracis* spore, *Brucella* spp., and *Yersinia pestis*. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105305.
 - 31 Corstjens P L, de Dood C J, Priest J W, *et al.* Feasibility of a lateral flow test for neurocysticercosis using novel up-converting nanomaterials and a lightweight strip analyzer. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(7): e2944.
 - 32 Chen Yiping, Xianyu Y, Sun Jiashu, *et al.* One-step detection of pathogens and cancer biomarkers by the naked eye based on aggregation of immunomagnetic beads. *Nanoscale*, 2016, 8(2): 1100-1107.
 - 33 Shukla S, Leem H, Kim M. Development of a liposome-based immunochromatographic strip assay for the detection of *Salmonella*. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(8): 2581-2590.
 - 34 Duan Demin, Fan Kelong, Zhang Dexi, *et al.* Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 134-141.
 - 35 Barnett J M, Wraith P, Kiely J, *et al.* An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen. *Biosensors*, 2014, 4(3): 204-220.
 - 36 Wang Dianbing, Tian Bo, Zhang Zhiping, *et al.* Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on "Road Closure". *Biosens Bioelectron*, 2015, 67: 608-614.
 - 37 Gao Lizeng, Yan Xiyun. Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology. *Science China. Life sciences*, 2016, 59(4): 400-402.