

免疫层析技术的发展及在 POCT 中的应用

黄德智 综述, 蒲晓允[△] 审校

(陆军军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘 要:免疫层析技术因其简单、方便、易操作、快速, 价格相对低廉, 已广泛应用于即时检测(POCT)。随着 POCT 检测项目的增多和对已有项目检测定量、灵敏度、特异度等要求的提高, 本文就免疫层析技术的最新发展及其应用, 作以下综述。

关键词:免疫层析技术; 即时检测; 量子点

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.022

中图法分类号:R446

文章编号:1673-4130(2019)05-0594-04

文献标识码:A

Development of immunochromatography and its application in POCT

HUANG Dezhi, PU Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Immunochromatography has been widely used in POCT because of its simplicity, convenience, easy operation, rapidity and relatively low price. With the increase of POCT testing items and the increase of the requirements for quantification, sensitivity, and specificity of existing projects, this paper reviews the latest developments and applications of immunochromatography.

Key words: immunochromatography; POCT; quantum dots

1 免疫层析技术简介

免疫层析技术是在 20 世纪 60 年代在发达国家兴起并被用于检测血清蛋白的一种结合了免疫技术和色谱层析技术的快速检测分析方法, 利用胶体金、胶体碳、磁性纳米材料、稀土纳米材料、量子点等着色标记物, 在层析时, 标记物与待测物的络合物被相应的配体捕获而浓集显色于硝酸纤维素膜上的检测线, 以纤维膜上显色条带的有无、颜色深浅和反射光线来定性或定量, 在即时检测(POCT)中应用极为广泛。免疫层析试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素(NC)膜、检测线(T 线)、质控线(C 线)、吸水垫、聚氯乙烯(PVC)底板等部分组成, 根据待检测物的大小和抗原抗体结合的方式, 分为双抗体夹心法和竞争法^[1-2]。

2 免疫层析技术发展及应用

免疫层析技术关键在于依靠标记抗体的免疫标记材料, 而纳米材料由于优越的信号放大作用, 能达到良好的灵敏度和特异度而备受青睐。下面主要从胶体碳、量子点、稀土纳米材料、上转换发光技术和超顺磁性纳米材料以及适配体等方面进行介绍。

2.1 胶体碳 与胶体金相比, 胶体碳的优点包括更高的颜色强度, 即更高的灵敏度和标记效率, 动力学检测范围更广, 成本低廉, 制作工艺简单, 可大规模生产且更环保, 但由于其标记和封闭时间长, 并未体现

出对胶体金的绝对优势, 故其商业化程度较低^[3-4]。何卓等^[3]利用碳纳米颗粒制作的胶体碳试纸条用于检测疟原虫, 并可通过扫描检测带灰度值以定量。最近, YU 等^[4]利用一种新的胶体碳材料氧化石墨烯作为标记物, 成功制作出用于检测黄曲霉素 B1 的试纸条, 肉眼最低检测限可达 0.3 ng/mL。材料学的进步能促进检测的进步, 诸如碳量子点和石墨烯量子点等材料也是免疫层析研究中可以利用的标记材料。

2.2 量子点 量子点被认为是免疫层析中最有前途的荧光半导体纳米材料, 与一般荧光染料相比, 量子点具有尺寸可调的荧光, 发射光谱窄而对称, 高量子产率, 宽吸收光谱, 荧光强度高, 耐光漂白和稳定性好等优点^[5-6]。水溶性量子点表面富含羧基或氨基以用于连接蛋白质。表面是羧基的量子点被 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活, 并且这些激活的羧基和抗体的氨基相连接。这些特性使得量子点是一个可以达到高灵敏度和同时对多种检测物定量的免疫层析标记物^[7]。为了检测样本中不同的物质, 有两种不同模式的检测方法。第一种模式是不同的 T 线去检测与之对应的分析物; 第二种模式是一条 T 线去检测不同的分析物。例如, 第一种模式, TARANOVA 等^[8]设计了一种“交通信号灯”式的竞争性免疫层析方法, 他们

[△] 通信作者, E-mail: 15809320@qq.com。

本文引用格式: 黄德智, 蒲晓允. 免疫层析技术的发展及在 POCT 中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5): 594-597.

使用的多色彩的量子点作为标记物以同时检测牛奶中的氧氟沙星、氯霉素和链霉素,有 625、585、525 nm 的 3 种不同发射峰的水溶性量子点被用于制作成 3 条不同颜色的检测线,分别是红色、黄色和绿色。在这种“交通信号灯”式的检测方法中,氧氟沙星、氯霉素和链霉素的检测限分别达到了 0.30、0.12、0.20 ng/mL,比酶联免疫吸附试验(ELISA)方法的检测限低了 80~200 倍。第二种模式,WANG 等^[7]设计的一种以多色量子点为标记物的双抗体夹心免疫层析试纸条,这种试纸条只有一条 T 线,可同时检测甲胎蛋白和癌胚抗原,检测限分别为 3、2 ng/mL。虽然量子点有诸多优点,但量子点也有缺点。例如,量子点在生物环境下化学性质和胶体性质的不稳定性可能会导致定量不准确。所以,最近已经有几个研究小组都已经开发了一种新的方法,把量子点包被到纳米颗粒表面或里面形成量子点微球,以提升其化学和胶体稳定性,并借此通过量子点的数量来扩大检测信号^[8-9]。丁乔棋等^[10]以羧基化 CdTe/ZnSe 量子点荧光微球为标记物制作的免疫层析试纸条检测牛奶中的氯霉素,检出限为 0.1 μg/L。量子点提高稳定性后,在多联检测上是很有前途的纳米材料。

2.3 镧系元素 镧系元素是第 57 号元素镧到 71 号元素镱共 15 种元素的统称,用符号 Ln 表示,镧系元素和免疫层析技术相结合形成时间分辨荧光免疫分析层析技术(TRFICA)^[11]。与传统荧光标记物相比,镧系元素有独特的荧光特性:荧光寿命长,激发光和发射光的波长差(stokes 位移)大,激发光谱和发射光谱无交叉,特征峰非常尖锐,标记物体积小(原子标记),标记物不会影响被标记物(尤其对蛋白质的影响小)的空间立体结构,保证了被检物质的稳定性,且可以实现多位点标记等特点。通过有效利用波长分辨和时间分辨技术排除非特异荧光,实现了高信噪比和灵敏度,以时间分辨技术测量特异荧光,对待检物质进行定量分析,解决了普通荧光分析中材料和样品中非特异荧光产生的高背景问题,其中 Eu 最为常用^[12-13]。LIANG 等^[14]用 Eu³⁺ 螯合的聚苯乙烯微球作为标记物制作的时间分辨荧光免疫层析试纸条以检测甲胎蛋白,该研究小组是以 T 线荧光值/C 线荧光值(H_T/H_C 比率)来定量检测甲胎蛋白,以 H_T/H_C 比率来定量可以消除试纸条之间的固有异质性和检测标本的基质效应,使得结果准确性和重复性更好。最后该小组检测甲胎蛋白的线性范围达到 1.0~1 000.0 IU/mL,最低检测限达到了 0.1 IU/mL,与商用的化学发光试剂盒结果符合性优异。同样地,TRFICA 一样可以实现一个试纸条检测多种物质。WANG 等^[15]用竞争法,在 NC 膜上划了 1 条 C 线和 3 条 T 线,3 条 T 线分别用于检测 3 种不同的 β-受体激动剂:盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇。理论上讲,TRFICA 的灵敏度可以达到 10~18 mol/L,但

在现有的研究中还不能达到,所以以后的研究仍须进一步发挥其高灵敏度的优势。

2.4 上转换发光技术 上转换发光技术即以稀土金属元素(主要是镧系)构成的纳米或亚微米颗粒作为标记物的免疫层析技术^[16]。上转换发光材料在红外激发光下可发射出不同波长的可见光,使其具有抗光漂白能力强、反斯托克斯位移宽、毒性低、背景荧光干扰小、发光特性稳定等有点,在免疫检测中可提高灵敏度和信噪比,尤其适用于复杂样本的检测^[17-20]。雷萌等^[21]研制基于上转换纳米荧光快速定量检测降钙素原的免疫层析检测技术,最低检测限为 0.02 ng/mL,线性范围为 0.05~44.00 ng/mL。基于上转换发光尤其适用于复杂样本的检测的特点,可以开发基于上转换发光的多联检测试纸条。

2.5 磁性纳米微球 在传统的免疫层析方法中,定量主要依赖于测试仪去读取可见光或荧光,但这种方法的劣势就是只能检测到膜表面及以下 10 μm 这部分的可见光或荧光。然而,通常 NC 膜的厚度一般是数百微米,分析物在层析时,从膜表面到底部均有指示物质的分布,这样就造成了多达 90% 或以上的指示物质未被肉眼或光学仪器所测量到,这对于检测的灵敏度是个极大的损失。而基于超顺磁纳米颗粒(MNPs)作为标记物的免疫层析方法,利用磁信号分析仪(MAR)可以实现对膜上信号的完整读取,不用去考虑膜的厚度问题,这样可以把灵敏度提高 10~1 000 倍,而且试纸条在长时间放置后磁信号并不会有明显损失,生物材料中有鲜有磁信号,因此,对试纸条的干扰很小,所以这样的方法可以达到很高的灵敏度、准确性和稳定性^[9,22-23]。基于超顺磁纳米颗粒的免疫层析法,定量的检测模式有两种:第一种模式是在振荡的磁场中,用巨磁阻传感器去检测 T 线上所有磁性纳米颗粒的磁化饱和强度;第二种模式是在磁场中,利用磁信号检测仪去扫描 NC 膜上各个部分以得到磁通量^[9]。然而两种模式使用的检测仪器不适宜普及,WU 等^[24]利用智能手机的相机和成像技术把质控线和检测线上的磁珠抗体颜色强度转化成数字信号来给尿液中的可卡因定量。GONG 等^[25]也利用磁性微球建立了同时检测心肌肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶(CK-MB)的方法,最低检测限达到了 0.049 ng/mL 和 0.085 ng/mL。这也为以后用磁性微球建立免疫层析的方法做出了一定的指引,可以利用身边的智能设备如手机等作为检测设备,做到更加高效快速的检测。

2.6 适配体 传统的免疫层析法用抗体作为标记物和捕获物,现在随着指数富集的配基系统进化技术(SELEX)的应用,配对的适配体也逐渐筛选出来。适配体相对于传统的抗体来讲,具有诸多的优势:筛选周期短,亲和力和稳定性高,特异度强,重复性好,易于合成和修饰,成本低,易于保存,无免疫原性和毒

性,可与细胞、重金属、蛋白质、细菌和病毒等靶标适配^[26-27]。AHMAD RASTON 等^[28]利用 SELEX 筛选丝氨酸蛋白酶抑制剂的同源适配体结合胶体金技术检测丝氨酸蛋白酶抑制剂,在溶液和血清中的检测限分别达到了 0.137 nmol 和 0.105 nmol。WU 等^[26]也首次用适配体检测玉米赤霉烯酮,检测限达到了 20 ng/mL。由于适配体的诸多优点以及 SELEX 技术的逐渐成熟应用,在免疫层析上用适配体来代替抗体检测是一个好的方向。

3 结论和展望

本综述介绍了免疫层析法的设计组装、反应原理及主要标记物种类和在 POCT 的应用,包括床旁检测、食物检测和环境监测等。经过几十年的发展,从最初的胶体金,到后来的胶体碳、量子点、稀土发光材料、上转换发光材料、超顺磁纳米微球和适配体等,以及本文中还未提及的脂质体等材料,各种材料都被人们发现并运用,使得免疫层析得到长足的发展和广泛应用。定量、提高灵敏度、多联检测和环保是未来依然要努力的方向。总之,多种多样的标记材料已经在免疫层析法上有所使用,也各自展现了自己的优势和劣势,应进一步对此深入研究,以使得其更好地应用于临床检测、食品检测和环境监测等。

参考文献

- [1] WANG C E, GUAN D I, CHEN C, et al. Rapid detection of unconjugated estriol in the serum via superparamagnetic lateral flow immunochromatographic assay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(1):123-130.
- [2] YAN L Z, DOU L N, BU T, et al. Highly sensitive furazolidone monitoring in milk by a signal amplified lateral flow assay based on magnetite nanoparticles labeled dual-probe [J]. *Food Chem*, 2018, 261:131-138.
- [3] 何卓, 李正祥, 庄世锋, 等. 疟原虫胶体碳试纸条的研制 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(3):323-327.
- [4] YU L, LI P W, DING X X, et al. Graphene oxide and carboxylated graphene oxide: viable two-dimensional nanolabels for lateral flow immunoassays [J]. *Talanta*, 2017, 165:167-175.
- [5] LE T, ZHANG Z H, WU J, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using a quantum dot-antibody probe for rapid and quantitative detection of 1-aminohydantoin in edible animal tissues [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(2):565-572.
- [6] WANG S J, LIU Y, JIAO S S, et al. Quantum-dot-based lateral flow immunoassay for detection of neonicotinoid residues in tea leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(46):10107-10114.
- [7] WANG C Y, HOU F, MA Y C. Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68:156-162.
- [8] TARANOVA N A, BERLINA A N, ZHERDEV A V, et al. 'Traffic light' immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63(2):255-261.
- [9] HUANG X L, AGUILAR Z P, XU H Y, et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: a review [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75:166-180.
- [10] 丁乔棋, 李丽, 范文韬, 等. 基于新型量子点荧光微球的氯霉素免疫层析试纸条的制备和应用 [J]. *分析化学*, 2017, 45(11):1686-1693.
- [11] 梁荣良, 吴英松. 镧系元素在免疫学检测技术中的应用 [J]. *现代免疫学*, 2015, 35(4):348-352.
- [12] 史咏梅, 何晖, 冯子力, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术在医学领域的应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(19):2866-2869.
- [13] 邓传欢, 吴英松, 徐劲. 时间分辨荧光免疫分析技术在寄生虫病诊断中的应用 [J]. *热带医学杂志*, 2010, 10(1):111-114.
- [14] LIANG R L, XU X P, LIU T C, et al. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 891:277-283.
- [15] WANG P L, WANG Z, SU X O. A sensitive and quantitative fluorescent multi-component immuno-chromatographic sensor for beta-agonist residues [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64:511-516.
- [16] CORSTJENS P M, TJON K M, DE DOOD C-J, et al. Multi-center evaluation of a user-friendly lateral flow assay to determine IP-10 and CCL4 levels in blood of TB and non-TB cases in Africa [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(1/2):22-31.
- [17] 李阳, 王云龙. 免疫层析技术的研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(22):3978-3980.
- [18] 於然, 谢飞, 马雪梅. 上转换荧光材料的化学修饰及在免疫检测的应用 [J]. *北京生物医学工程*, 2015, 35(3):304-309.
- [19] LIU X, ZHAO Y, SUN C Y, et al. Rapid detection of abrin in foods with an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1):34926.
- [20] HUA F, ZHANG P P, ZHANG F L, et al. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for rapid detection of *Francisella tularensis* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):17178.
- [21] 雷萌, 许新强, 冀天星, 等. 基于上转换纳米荧光快速定量检测 PCT 技术研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(1):67-69.
- [22] RYU Y, JIN Z, KANG M S, et al. Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody [J]. *BioChip Jour-*

- nal, 2011, 5(3):193-198.
- [23] CHEN Y R, WANG K, LIU Z R, et al. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(9):2319-2327.
- [24] WU J, DONG M L, ZHANG C, et al. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera[J]. Sensors (Basel), 2017, 17(6):1286.
- [25] GONG X Q, ZHANG B, PIAO J F, et al. High sensitive and multiple detection of acute myocardial infarction biomarkers based on a dual-readout immunochromatography test strip[J]. Nanomed: Nanotechnol Biol Med, 2018, 14(4):1257-1266.
- [26] WU S J, LIU L H, DUAN N, et al. Aptamer-Based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(8):1949-1954.
- [27] LIU J, ZENG J Y, TIAN Y P, et al. An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples [J]. Analyst, 2018, 143(1):182-189.
- [28] AHMAD RASTON N H, NGUYEN V, GU M B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of vaspin[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 93:21-25.
- (收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-12-16)

• 综 述 •

脱落滋养层细胞在产前诊断中的应用研究进展^{*}

李 丹 综述, 兰风华 审校

(厦门大学附属东方医院全军检验医学研究所临床遗传与实验医学科, 福建福州 350025)

摘 要: 产前诊断为在出生前预测胎儿是否患有某些遗传性疾病或先天畸形的方法, 又称宫内诊断。诊断时间越早, 操作创伤性越小, 对孕妇及胎儿越有利。通过微创方法收集宫颈脱落滋养层细胞, 对其进行形态学、免疫学、遗传学等分析, 可确定其胎源性来源并实现孕早期胎儿遗传病的诊断, 从而达到产前诊断早期、微创的目的。本文就近年来基于宫颈脱落滋养层细胞的微创性产前诊断进展做一综述。

关键词: 产前诊断; 滋养层细胞; 遗传分析; 先天畸形; 宫颈

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2019. 05. 023 **中图法分类号:**R715. 5

文章编号:1673-4130(2019)05-0597-04 **文献标识码:**A

Advances in the application of transcervical trophoblast cells in prenatal diagnosis^{*}

LI Dan, LAN Fenghua

(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, PLA Institute of Clinical Laboratory Medicine, Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Prenatal diagnosis is an approach of predicting whether the fetus has certain genetic diseases or congenital malformations before birth, also known as intrauterine diagnosis. The earlier the diagnosis is, the less traumatic the operation is, and the more beneficial to pregnant women and fetuses. By collecting cervical exfoliated trophoblast cells by minimally invasive method and analyzing their morphology, immunology and genetics, we can determine their fetal origin and realize the diagnosis of fetal genetic diseases in early pregnancy, so as to achieve the goal of early and minimally invasive prenatal diagnosis. In this paper, we review the progress of minimally invasive prenatal diagnosis based on cervical exfoliative trophoblast cells in recent years.

Key words: prenatal diagnosis; trophoblast cells; genetic analysis; congenital malformations; cervical

产前诊断是降低遗传缺陷新生儿出生率最重要的方法, 其金标准为羊膜腔穿刺获取羊水中胎儿细胞行产前遗传分析, 但因其操作的有创性、致流产风险和诊断时间位于孕中晚期等原因仍难以为广大孕妇

所接受。通过微创的方式获得胎儿遗传物质及早期的产前诊断技术是该领域研究者追求的目标。宫颈脱落滋养层细胞取材安全、便利, 是产前诊断技术微创化的重要备选来源之一, 且其可将诊断时间提早至

^{*} 基金项目: 福建省科技引导性项目(2016Y0071)。

本文引用格式: 李丹, 兰风华. 脱落滋养层细胞在产前诊断中的应用研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5):597-600.