

神奇“魔法条”之新冠病毒的快速检测

杨迪, 魏嘉怡, 翟红, 王昕, 孙太明, 宋浩乐, 王海雁*

山西大同大学化学与化工学院, 山西 大同 037009

摘要: 胶体金作为商业化的即时检验POCT (point-of-care test)免疫层析技术中最广泛的标记物之一, 具有显著的颜色特征, 后期无需可视化改造, 且形态稳定、环境友好。本文试纸条制作过程简单, 不需要大型贵重仪器。采用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金, 将胶体金标记在新冠病毒的核衣壳N蛋白抗体上, 通过在免疫层析试纸条可视区形成类似三明治结构的抗体-抗原-抗体夹心复合物, 并以此复合物的红色检测线作为新冠病毒的定性分析依据。该检测方法裸眼可测、操作简单、且快速(10 min)、灵敏(检测限为 $0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低成本(每条不超过5元)。实验过程可以引导学生体验生命体系中抗原抗体相互作用引发的特异性生命化学反应, 激发学生对化学、生物、生命科学和纳米材料等学科相互融合的可视化快检技术的浓厚研究兴趣。

关键词: 胶体金; POCT; 免疫层析; 新冠病毒

中图分类号: G64; O6

Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using an Innovative “Magic Strip”

Di Yang, Jiayi Wei, Hong Zhai, Xin Wang, Taiming Sun, Haole Song, Haiyan Wang *

Department of Chemistry and Chemical engineering, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China.

Abstract: Colloidal gold, a marker widely embraced in commercial point-of-care testing (POCT) for immunochromatographic assays, is distinguished by its vivid color characteristics. It is environmentally benign, morphologically stable, and required no further visual modifications. This study details a straightforward process for fabricating test strips that obviate the need for sophisticated, costly equipment. Colloidal gold, synthesized by reducing the chloroauric acid with trisodium citrate, was conjugated to the nucleocapsid N protein antibody of SARS-CoV-2. With the test strip's visible area, a competitive antibody-antigen-antibody sandwich complex forms, with the red test line serving as the basis for qualitative analysis of the virus. This detection approach is visually discernible, user-friendly, rapid (within 10 min), sensitive (detection limit of $0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and cost-effective (each strip costing no more than 5 yuan). The experimental process offers students an opportunity to engage with the specific biochemical reactions triggered by antigen-antibody interactions, fostering a deep interest in exploring rapid diagnostic technologies that integrate chemistry, biology, life sciences and nanomaterials.

Key Words: Colloidal gold; Point-of-care testing (POCT); Immune chromatography; SARS-CoV-2 virus

1 引言

胶体金免疫层析技术是20世纪80年代发展起来的一种体外诊断技术^[1], 由于其操作简单、检测速度快、裸眼可测和灵敏度高等优点, 在疫情期间被广泛用于社区新冠病毒感染的早期筛查^[2]。同时, 胶体金免疫层析技术作为最经典的标记检测技术在即时检测(point-of-care testing, POCT)方面发

收稿: 2023-12-04; 录用: 2024-01-04; 网络发表: 2024-02-19

*通讯作者, Email: why7135280@126.com

基金资助: 山西省留学人员科研资助项目(2021-144)

挥着重要作用, 已成为流行病预防预诊和避免大面积爆发的普适性诊断技术^[3]。

根据待测物分子质量大小, 胶体金免疫层析技术主要有双抗夹心法、竞争法和间接法三种反应模式^[1]。其中, 双抗夹心法主要是用来检测生物大分子及颗粒抗原, 竞争法通常用于检测小分子抗原, 间接法则主要用于检测抗体。在本文中我们将重点向大家科普双抗夹心法。虽其定量检测与核酸检测相比存有差距, 但大量的临床性能评估测试结果显示, 其灵敏度和特异性均处于良好的水平^[4], 故应用于社区感染者的快速筛查。

该科普实验, 我们意在让大家理解POCT“傻瓜”式操作背后的反应原理, 从而激发学生的学习热情。本实验将呈现低成本的制备与简便的检测, 涵盖了抗原与抗体的免疫反应、纳米粒子与生物大分子例如蛋白质的静电吸引等知识点, 巧妙地将科普教育与实际应用相结合, 展现了POCT用于新冠病毒快速检测的神奇魅力。激励学生热爱学习, 做“了然于胸”的生活者。

2 实验部分

2.1 实验原理

2.1.1 新冠病毒结构

新冠病毒(SARS-CoV-2)是一种正链RNA病毒, 在人类中具有传染性, 是近20年来, 继传染性非典型肺炎冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸系统综合征冠状病毒(MERS-CoV)后, 第三种能够引起人类严重疾病的冠状病毒。图1左图所示SARS-CoV-2外层有包膜, 病毒体呈球形或椭圆形, 直径60–140 nm。该病毒内部基因组全长约30 kb (在两端有帽状聚腺苷酸化、感染性的未翻译的序列), 主要编码4种结构蛋白和16种非结构蛋白。图1右图所示, 4种主要的结构蛋白分别为刺突蛋白S、包膜蛋白E、脂质膜蛋白M以及核蛋白壳N。其中刺突蛋白S是介导病毒吸附和侵入宿主细胞的关键结构, 是治疗药物的一个作用靶点。包膜蛋白E和囊膜蛋白M参与病毒的组装, 是新冠病毒组装的关键蛋白^[5]。核衣壳N蛋白作为病毒侵染细胞后表达量最高的结构蛋白, 是良好的新冠病毒检测标志物^[6]。

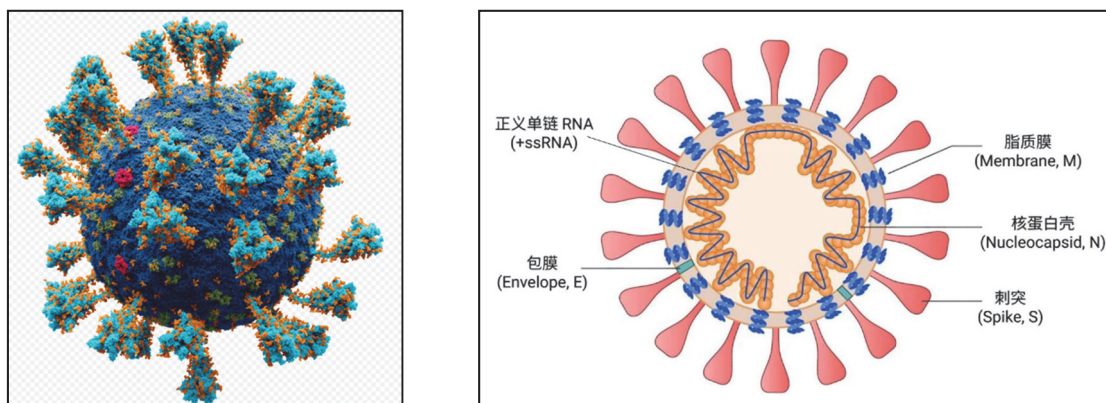


图1 SARS-CoV-2外观模型及内部结构示意图

左图为SARS-CoV-2外观模型^[7]。其中蓝色代表包膜; 绿松石代表刺突糖蛋白(S); 粉色代表包膜蛋白(E); 绿色代表脂质膜蛋白(M); 橙色代表聚糖。右图为SARS-CoV-2内部结构示意图。电子版为彩图, 后同

2.1.2 POCT中胶体金作为显色剂的免疫层析试纸条快检原理

新冠抗原检测主要依赖免疫分析法, 利用筛选得到的新冠特异性抗体对新冠的抗原进行有效的捕获和识别^[5]。测流层析法是免疫分析法中速度最快、最简便的抗原检测方法^[8]。其检测原理如图2所示, 待测样本在吸水纸纤维所形成的毛细力作用下, 从试纸条的一端流向另一端。在这一过程中, 样本中的新冠病毒的核衣壳N蛋白首先与胶体金标记的新冠核衣壳N蛋白抗体相结合, 随后到达反应膜上的检测线(Test line, T线), 与T线上的捕获抗体相结合, 试纸条上出现可检测红线。

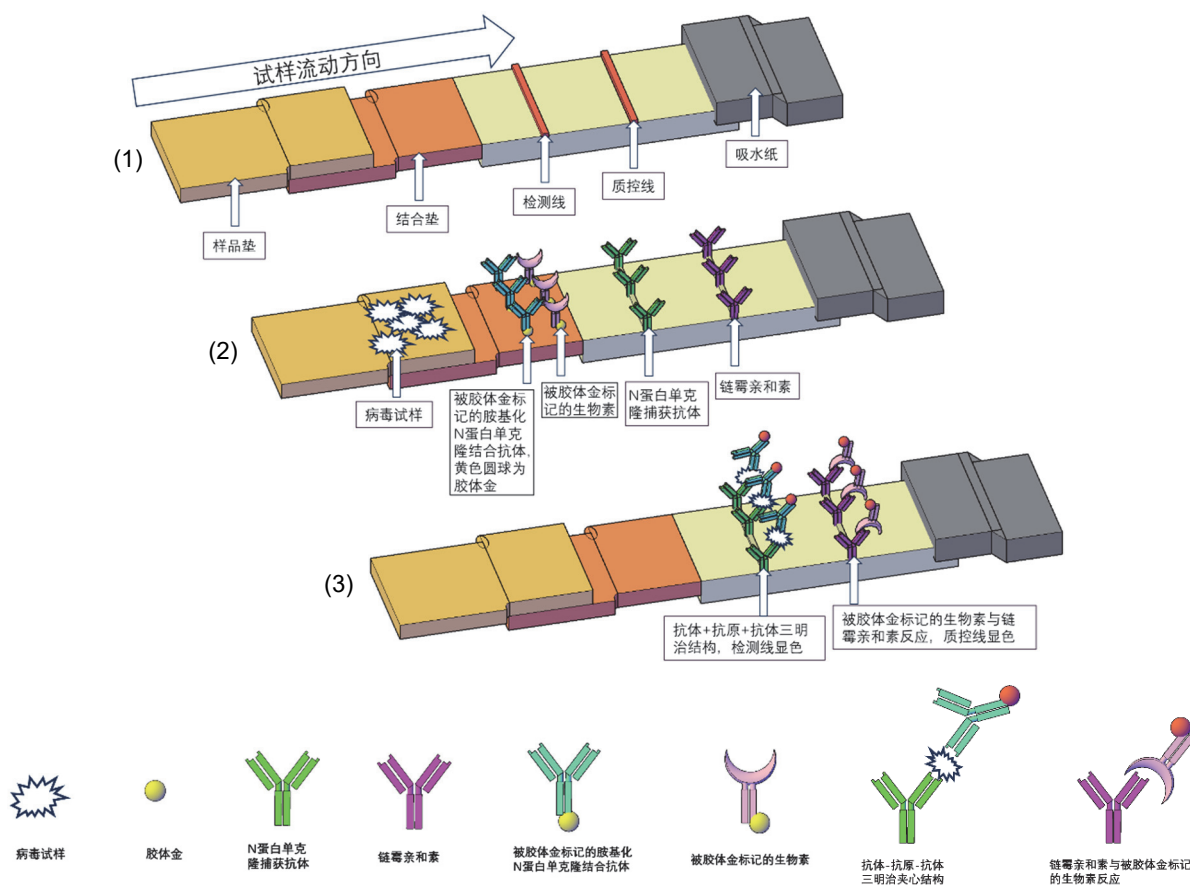


图2 胶体金免疫层析法检测新冠病毒原理示意

如图2 (2)所示, 样品垫上加有病毒试样, 结合垫上负载胶体金标记的新冠核壳N蛋白单克隆抗体, 检测线上负载核壳N蛋白单克隆捕获抗体, 质控线上负载链霉亲和素。

如图2 (3)所示, 抗原抗体结合物沿着结合垫向反应膜(醋酸纤维素膜)移动, 当抗原抗体结合物移至固定有新冠病毒N蛋白单克隆抗体的反应区域时, 抗原-抗体结合物与固定于反应膜检测线的N蛋白单克隆抗体发生特异性结合形成抗体-抗原-抗体夹心复合物而被截留, 聚集在检测带上, 从而在T线上观察到红色的显色结果。

样品溶液继续在毛细作用下前行, 当胶体金标记的生物素被质控线(Contral line, C线)上的链霉亲和素捕获后, C线显色

2.2 试剂和材料

实验所需试剂、材料及生产厂家见表1、表2。

2.3 仪器和表征方法

2.3.1 仪器

实验所需仪器及厂家见表3。

2.3.2 表征方法

将烧制好的胶体金用紫外分光光度计进行400–700 nm波段分光光度扫描, 如图3所示, 记录数据。由表4可知, 作为显色剂的胶体金波长在523–527 nm, 吸收峰窄而高。

以上结果表明当1%柠檬酸三钠添加量为1 mL/100 mL时得到的胶体金颗粒分布均匀。且该添加量下的胶体金显示为紫红色, 透明度高, 无悬浮颗粒, 便于标记。

表1 试剂及生产厂家

试剂	生产商
氯金酸	西亚化学科技HG/T 3446-2003
柠檬酸三钠	深圳一诺GB1886.25-2016
牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)	龙洲生物科技T/WLFBSA 001-2018
生物素	菲鹏生物科技有限公司
酪蛋白酸钠	西亚化学科技GB/T 3800-1999
乙酸-EDTA缓冲液(pH 5.5)	上海尚宝生物科技T16360-500
Tris-盐酸缓冲液(pH 7.6灭菌)	上海如吉生物科技 SJH1103
磷酸盐缓冲液(Phosphate Balanced Solution, PBS)	西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)
吐温-20 (Tween-20)	西陇科学化工化学纯CP级90005-65-6
液体生物防腐剂(Proclin-300)	西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)
硼酸	上海榕诺材料科技GB 5009.275-2016
海藻糖	西安浩天生物工程GB/T 23529-2009
mAbs117 SARS-Cov-2胺基化N蛋白结合抗体	菲鹏生物科技有限公司
mAbs30 SARS-CoV-2 N蛋白捕获抗体	菲鹏生物科技有限公司
链霉亲和素	菲鹏生物科技有限公司
新冠病毒核衣壳N蛋白	菲鹏生物科技有限公司

表2 材料及生产厂家

材料	生产商
聚氯乙烯(Polyvinyl Chloride, PVC)底板	佛山市全一净环保科技有限公司
玻璃纤维素(Glass Fiber Membrane, GF)膜	佛山市全一净环保科技有限公司
硝酸纤维素(Nitrocellulose membrane, NC)膜	德国赛多利斯(Sartorius)

表3 仪器及厂家

仪器	生产商
XYZ三维划膜喷金仪	上海金标生物科技有限公司HM3035
台式离心机	德国Eppendorf PE-08303
烘箱	上海尚仪仪器设备有限公司101-4B
数控高速斩纸机	上海金标生物科技有限公司ZQ3500
pH计	上海雷磁
紫外-可见扫描分光光度计	上海天普仪器有限公司UV-2450型

表4 胶体金紫外可见扫描结果

V(超纯水)/mL	V(1%氯金酸)/mL	V(1%柠檬酸三钠)/mL	λ (胶体金)/nm	Abs
100	1	0.5	529.00	0.944
100	1	1	524.50	1.255
100	1	2	527.50	1.051
100	1	4	518.00	0.988

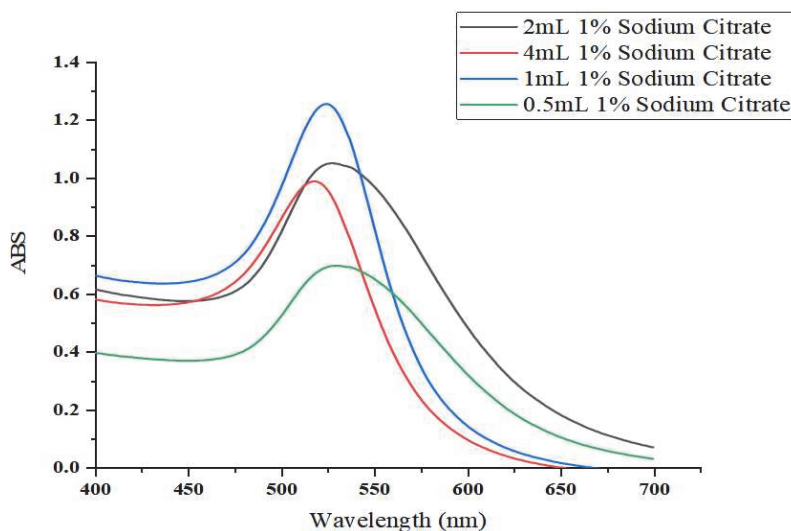


图3 胶体金紫外可见光谱扫描图

电子版为彩图, 后同

2.4 实验步骤

所有实验步骤在本课题组流感快检研究的实验基础上加以优化^[8]。

2.4.1 胶体金的制备

- ① 取100 mL超纯水于250 mL锥形瓶中, 加入搅拌子。
- ② 将锥形瓶置于磁力加热搅拌器上, 并打开开关。
- ③ 待水沸腾后, 用移液枪准确移取1%氯金酸1 mL置入锥形瓶。
- ④ 继续加热2–3 min后, 取1%的柠檬酸三钠1 mL加入锥形瓶中并保持微沸。
- ⑤ 溶液在2 min内由灰色变为黑色, 继而变为褐色, 最终变为酒红色, 继续加热2–5 min, 直至稳定不变色即可停止。

⑥ 将锥形瓶转移至磁力搅拌器上搅拌冷却, 待冷却至室温后移入100 mL容量瓶并用超纯水定容至100 mL。

2.4.2 胶体金pH优化

- ① 取20 mL上述制备好的胶体金于50 mL离心管, 测定初始pH值。
- ② 梯度(10 μL)加入0.2 mol·L⁻¹碳酸钾进行pH调节, 记录数据如表5所示。

表5 胶体金pH优化

$V(\text{胶体金})/\text{mL}$	$V(0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3)/\mu\text{L}$	pH
20	0	3.86
20	10	4.81
20	20	5.58
20	30	6.24
20	40	7.02
20	50	8.42
20	60	9.11
20	70	9.29
20	90	9.57

取8份200 μL 配制好的最优胶体金于酶标板, 分别加入0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55 μL 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸钾溶液调节pH, 然后加入2 μL 新冠核壳N蛋白单克隆抗体摇匀, 反应10 min, 再加入20 μL 20%氯化钠溶液, 反应1 h。反应结束后, 未标记抗体的胶体金溶液会由紫红色褪为浅蓝色, 标记抗体的胶体金溶液则为淡粉色。等电点是两性电解质的一种重要特性, 溶液的电荷数会受到pH值的影响。当溶液中两性电解质正电荷数与负电荷数达到平衡时, 该溶液的pH值则为等电点。当pH值接近或者稍微高于等电点时, 蛋白质抗体能够与胶体金达到最稳定的物理吸附。根据图4所示, 随着0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钾溶液加入量的改变, 容器内胶体金的颜色发生变化, N蛋白抗体在0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钾溶液添加量为0.4 μL 时, 颜色发生显著变化, 且加入20 μL 20%氯化钠溶液后胶体金未发生聚集沉淀, 蛋白质也未析出, 且溶液颜色仍保持不变, 由此可得出N蛋白抗体标记的最佳pH为9.11。

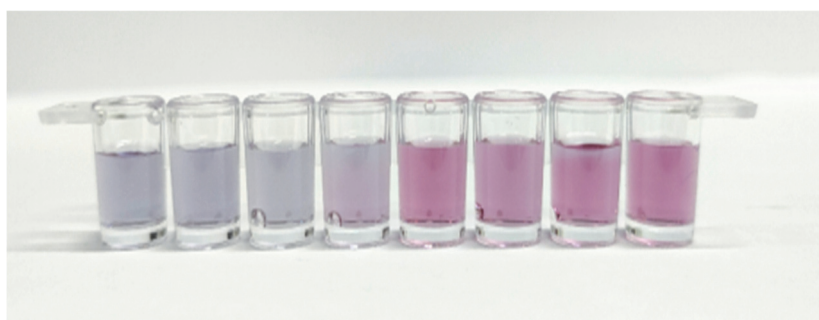


图4 新冠单克隆N核壳蛋白胶体金标记的pH优化实验

2.4.3 结合垫处理

- ① 取3 mL步骤2.4.1中制备好的胶体金于5 mL离心管。
- ② 依据上述pH调节步骤, 加入一定量0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸钾调节胶体金的pH至9.11。
- ③ 在离心管中加入9 μg (预先配制1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) mAbs117 SARS-Cov-2胺基化N蛋白结合抗体, 混匀仪混匀20 min。
- ④ 取2.5 μL 被胶体金标记的生物素与1 mL结合垫处理液(0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris + 0.2% BSA + 0.2% Tween-20 + 5%海藻糖(pH 8.0)、0.1% proclin300、超纯水定容)混合均匀后加入离心管中。
- ⑤ 取30 μL 10%的BSA溶液加入离心管, 对胶体金表面的残余的结合位点进行封闭, 混匀20 min, 离心(10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min)去上清, 以除去标记过程中未被标记的抗体和胶体金以及可能形成的各类聚合物, 并保留沉淀。
- ⑥ 余液用结合垫处理液(0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris + 0.2% BSA + 0.2% Tween-20 + 5%海藻糖(pH 8.0)、0.1% proclin300、超纯水定容)复溶至2 mL, 混匀20 min。
- ⑦ 取80 μL 5%的酪蛋白酸钠加入离心管, 混匀10 min。
- ⑧ 在洁净环境中用移液枪均匀涂布于玻璃纤维素膜上, 移至烘箱37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干2 h。

2.4.4 包被抗体及可视区处理

- ① 将包被液(3%海藻糖pH 7.4, proclin300 0.02%, 1 \times pbs定容)与mAbs30 SARS-Cov-2 N蛋白捕获抗体和链霉亲和素混合, 均配制为1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的包被抗体溶液。
- ② 打开划膜机, 预热后, 调整为合适的划膜仪喷液管距离, 以确保划线具体均匀。仪器用超纯水清洗20次。用吸水纸吸去喷头多余水分。
- ③ 先将喷液管倒吸5 μL , 以空出空气隔绝, 避免包被抗体与之前清洗所用超纯水混合, 然后分别倒吸25 μL 上述的包被抗体。将NC膜贴于PVC底板上, 固定于划膜机, 启动划线, 形成T线和C线。
- ④ 划线结束后, 移至烘箱37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干2 h。

2.4.5 样品垫处理

用移液枪定量移取6 mL样品垫处理液(0.05 mmol·L⁻¹ Tris + 0.2% BSA + 0.2% Tween20 pH 8.0, proclin 300 0.1%)在洁净空间内, 均匀涂布于样品垫(玻璃纤维素膜)上, 移至烘箱37 °C烘干2 h。

2.4.6 组合试纸条并裁剪

将PVC底板从烘箱内取出, 将样品垫、结合垫粘于PVC底板, 然后用数控高速斩纸机裁剪为4.05 mm的试纸条, 装入卡壳。

2.4.7 试纸条检测

将新冠病毒核衣壳N蛋白抗体用样品稀释液稀释至1 μg·μL⁻¹, 用移液枪定量移取100 μL, 加至进样口, 等待10 min后观察现象。

2.4.8 检测限测定试验

将灭活抗原用样品稀释液配制成0.5、1、1.5、2、2.5、3 ng·mL⁻¹六个浓度的标准品溶液, 用移液枪准确移取不同浓度的标准品溶液各100 μL于进样口。每个浓度重复五次, 记录数据。分别取质量分数为0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 ng·mL⁻¹的灭活抗原加入试纸条样孔内, 15 min后观察七组试纸条的显色情况, 并进行比较。

检测限LOD (limit of detection)是指能断定样品中存在浓度高于空白的待测物质的量。当LOD值较小时, 我们仅需较少的样本, 就可得到准确结果。由表6可知, 当添加的灭活抗原质量分数为0.5 ng·mL⁻¹时, 试纸条能够全部检测出阳性, 当添加的灭活抗原质量分数为0.25 ng·mL⁻¹时, 批次1中有一条未检测出阳性, 批次3中有两条。说明当添加的灭活抗原质量分数在0.25 ng·mL⁻¹时, 制作的试纸条已不能完全准确测定结果。由图5可看出, 作为对比, 第一个试纸条灭活抗原质量分数添加量为0 ng·mL⁻¹, 我们可以看到只有C线亮, 之后随着灭活抗原质量分数添加量的减少, T线的亮度降低, 在添加量为0.5 ng·mL⁻¹时, 达到极限, 因此可确定试纸条的检测限为0.5 ng·mL⁻¹。

表6 新冠N蛋白的快检试纸条的LOD测试实验

样本	抗原(ng·mL ⁻¹)	Lot No. 1		Lot No. 2		Lot No. 3	
新冠N蛋白	2.5	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)
灭活抗原	2.0	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)
	1.5	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)
	1.0	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)
	0.5	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=0)	+(n=5)
	0.25	-(n=1)	+(n=4)	-(n=0)	+(n=5)	-(n=2)	+(n=3)

-代表阴性, +代表阳性



图5 检测限测试

2.4.9 稳定性测定实验

稳定性是试纸条在生产后能否投入使用的先决条件, 若其稳定性不佳, 即便其测量属性优越, 也无法批量生产使用。由表7可知, 不同批次相同时间, 测试的试纸条均符合真实样本条件, 结果显示为阳性。由表8可知, 相同批次不同时间, 测试的试纸条也同样全部符合真实样本条件, 未出现检测失灵或失效情况。因此, 试纸条的稳定性得到了充分验证, 且良好。

表7 试纸条的稳定性测试实验 (1)

样本	抗原(ng·mL ⁻¹)	Lot No. 1		Lot No. 2		Lot No. 3	
病毒N蛋白抗原	0.5	-(n=0)	+(n=3)	-(n=0)	+(n=3)	-(n=0)	+(n=3)

表8 试纸条的稳定性测试实验 (2)

样本	抗原(ng·mL ⁻¹)	Lot No. 1		Lot No. 2		Lot No. 3	
病毒N蛋白抗原	0.5	-(n=0)	+(n=14)	-(n=0)	+(n=14)	-(n=0)	+(n=14)

-代表阴性, +代表阳性

3 科普展示和互动方案

本实验的科普场所要求相对较低, 适合在学校、街道、广场等地点进行展示。以下是针对不同年龄段的人群及其受益情况的描述:

① 小学生。

这些孩子处于教育启蒙阶段, 对身边的一切充满好奇。通过实验展示, 可以激发他们的探究欲望, 并在潜移默化中影响他们。

② 初高中生。

面临中考或高考压力的高中生, 通过贴近生活的科普实验, 既能缓解学业压力, 又能激发他们对学习的兴趣。

③ 化学及化学相关专业大学生。

这些学生具备一定的化学知识基础。通过现场实验展示, 可以将课本上的理论知识转化为生动的实践, 增强他们对专业的信心并激发科研热情。

④ 社会人士。

新冠病毒令人们闻风丧胆。通过我们的科普宣传, 让大众对病毒有更清晰的认识, 增强了他们战胜病毒的信心, 建立起了坚强的心理防线。

总之, 这个实验为广大群众提供了了解新冠病毒的有效途径, 使人们在科学知识的指导下, 更好地应对疫情挑战。

4 结语

新冠疫情使得各种便捷快速的检验检测器件大量涌入生活, 这类操作简便、原理却不简单的常用POCT器件的制备, 已成为分析仪器制造的新趋势。新冠疫情之后, 胶体金免疫层析试剂条已逐渐成为常见的快检测试仪器, POCT即时检验的理念也逐渐深入人心。这种省去标本在实验室检验时的复杂前处理程序, 能快速裸眼得到检验结果的新方法, 理应走进大学化学实验室。

如今, 科技的进步要求促进学科交叉融合, 化学学科的发展已不再孤立, 已经与生物学、生命科学和纳米材料学紧密相连。相较于其他本科生实验, 本实验综合了生物学抗原抗体反应、纳米材料与生物大分子相互作用的知识, 充分体现了生活中生物与化学相融合的需求。本实验广泛适用于化学、应用化学、制药工程等专业的学生实验教学。总的来说, 本科普实验既有科学性、趣味性, 又实用便捷, 易于参与, 适用范围广泛, 无疑是化学科普的理想之选。

5 特点/特色/创新性声明

① 本实验通过胶体金标记法,将难以捉摸的新冠病毒实现可视化定性检测,彰显了化学学科的趣味性。

② 实验过程中,采用灭活病毒抗原及抗体,确保了实验的安全性,避免了感染的风险,完全符合实验室的安全规范。这样的实验设计,旨在让同学们在实践中提升操作技能,同时认识到化学与生物、生命科学、纳米材料等学科之间的密切联系,感受到多元学科交叉融合的魅力。

参 考 文 献

- [1] 张改平. 免疫层析试纸快速检测技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2015: 1-11.
- [2] Qin, J.; Wang, W.; Gao, L.; Yao, S. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (10), 2857.
- [3] Li, X.; Yin, Y.; Pang, L.; Xu, S.; Lu, F.; Xu, D.; Shen, T. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *108*, 483.
- [4] 姚翔, 陈智伟, 张彩云, 谢迺鸿. 中国病毒病杂志, **2023**, *13* (2), 115.
- [5] Hu, R.; Liao, T.; Ren, Y.; Liu, W.; Ma, R.; Wang, X.; Lin, Q.; Wang, G.; Liang, Y. *Nano Res.* **2022**, *15* (8), 7313.
- [6] 陈晨, 胡劲超, 曹姗姗, 门冬. 中国生物工程杂志, **2021**, *41* (6), 119
- [7] Het is niet leuk om gastheer te zijn. [2024-02-18]. https://bionieuws.nl/article/1045994/het_is_niet_leuk_om_gastheer_te_zijn
- [8] Zhang, R.; Liao, T.; Wang, X.; Zhai, H.; Yang, D.; Wang, X.; Wang, H.; Feng, F. *Anal. Biochem.* **2022**, *655*, 114847.