

引用格式: 曾小苘, 郭九川, 郭劲宏. 有机长余辉纳米探针介导的 LFIA 胃蛋白酶原检测 [J]. 电子科技大学学报, 2026, 55(2): 301-311.
ZENG X T, GUO J C, GUO J H. Ultra-long organo-phosphorescent nanoprobe for detection of pepsinogen by lateral flow immunoassay[J]. Journal of University of Electronic Science and Technology of China, 2026, 55(2): 301-311.

有机长余辉纳米探针介导的 LFIA 胃蛋白酶原检测



曾小苘¹, 郭九川², 郭劲宏^{3*}

(1. 成都中医药大学智能医学学院, 成都 611137; 2. 电子科技大学信息与通信工程学院, 成都 611731;
3. 上海交通大学自动化与感知学院, 上海 200240)

摘要: 有机长余辉材料具有激发态性能丰富、成本低、柔韧性好、易于合成、发光寿命超长等优点, 在背景荧光衰减后, 其余辉的收集能有效排除背景光干扰。在此基础上, 该文构建了一个基于有机长余辉纳米探针的侧流免疫层析 (UOP-LFIAs) 检测平台。首先, 制备并合成长余辉晶体, 然后通过表面涂覆聚乙烯吡咯烷酮和羧甲基纤维素的步骤获得长余辉溶液。通过抗体偶联获得有机长余辉纳米探针, 再设计制作出一种便携式 UOP-LFIAs 检测装置。最后, 采用便携式 UOP-LFIAs 检测装置检测胃蛋白酶原 (PG) I 和 II。结果表明, PG I 和 PG II 的检测限分别为 0.36 ng/mL 和 0.57 ng/mL, 检测范围分别为 0.36~1 200 ng/mL 和 0.57~500 ng/mL。平均回收率分别为 101.30% 和 99.30%。该研究所构造的 UOP-LFIAs 检测平台不仅制备过程简便、快速、高效且经济, 而且能有效地降低背景光信号的干扰, 提升磷光化效率。此外, 该平台实现了 PG I 和 PG II 的联合检测, 仅需 5 min 即可快速获得结果, 为即时检测提供了一个高效的疾病检测平台。

关键词: 有机长余辉纳米探针; 即时检测; 侧流免疫层析法; 胃蛋白酶原检测

中图分类号: TB383; R446.1

文献标志码: A

DOI: 10.12178/1001-0548.2024326

Ultra-long organo-phosphorescent nanoprobe for detection of pepsinogen by lateral flow immunoassay

ZENG Xiaotong¹, GUO Jiuchuan², and GUO Jinghong^{3*}

(1. School of Intelligent Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. School of Information and Communication Engineering, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China;

3. School of Automation and Intelligent Sensing, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Ultra-long organic phosphorescent materials have the advantages of rich excited state properties, low price and easy to synthesize, good flexibility, ultra-long luminescence lifetime. After the fluorescence decay of the background, the collection of the remaining light can effectively eliminate the background light interference. Based on this, a Lateral Flow Immunochromatographic Detection Platform Based on Ultra-Long Organo-Phosphorescent Nanoprobes (UOP-LFIAs) constructed by authors is presented in this paper. Firstly, long afterglow crystals were prepared and synthesized, and then the long afterglow solution was obtained by one-step coating polyvinylpyrrolidone and carboxymethyl cellulose on the surface. Next, it was coupled with antibodies to obtain ultra-long organic afterglow phosphorescent nanoprobes. A portable UOP-LFIAs test strip detection analyzer was then designed and manufactured. Finally, Pepsinogen (PG) I and II were detected by using a portable UOP-LFIAs detection device. The results show that the detection limits were 0.36 ng/mL and 0.57 ng/mL for PG I and PG II, with respective detection ranges of 0.36-1 200 ng/mL and 0.57-500 ng/mL. The average recoveries were 101.30% and 99.30%, respectively. It is concluded that the UOP-LFIAs assay platform established in this study is not only simple, rapid, cost-effective and suitable for macro-preparation, but also can effectively reduce the interference of background light signal and enhance the phosphorescence efficiency, thereby improving the detection sensitivity. Additionally, the platform enables the combined detection of PG I and PG II, providing results in just 5 minutes. This development offers a powerful tool for bedside disease detection.

收稿日期: 2024-12-01

作者简介: 曾小苘, 主要从事中医药信息学方面的研究。

*通信作者 E-mail: guojinhong@sjtu.edu.cn

Key words: ultra-long organo-phosphorescent nanoprobe; point-of-care testing; lateral flow immunoassay; pepsinogen detection

即时检测是一种快速、简便的临床检测技术,最初用于检测尿液中的葡萄糖淀粉酶^[1]。随着医疗需求变化和即时检测技术的发展,其逐渐应用于疾病预防和疗效监测,包括免疫层析、分子生物学检测和微流控芯片^[2]等。侧流免疫层析法(lateral flow immunochromatographic, LFIA)是即时检测技术的关键分支,具有快速、低成本、易操作、现场适用性好、保质期长、所需体积小、便携性好、灵敏度和特异度高、可与电子和电化学系统集成^[3-5]等优点。LFIA 试条由样品垫、结合垫、色谱膜、吸收垫、背衬垫和应用在试条上的各种试剂构成,通过生物标记物的标签化实现检测,探针材料的选择对检测灵敏度至关重要。

目前常用的探针材料有胶体金、量子点、荧光微球、上转换纳米颗粒和磁性纳米颗粒。胶体金是侧流免疫层析法中最常用的探针^[6-7],但其分析多为定性或半定量,敏感性不足^[8-9]。荧光量子点^[10]和荧光微球^[11]也可利用荧光强度用于定性和定量分析,但易受样品细胞组织和自身荧光干扰的影响,导致荧光信号减弱或猝灭^[12-13]。上转换纳米粒子的激发光源为近红外光,可以有效避免生物样品自身荧光和散射光的干扰,具有高灵敏度和光稳定性^[14-15],但制备和标记步骤复杂^[16]。时间分辨荧光微球相比于普通荧光微球,可以有效地减少外部光源的干扰,提供更准确的测量结果^[17],但衰减快,对设备要求高。

为应对内源荧光干扰、制备复杂和高成本的问题,有机长余辉纳米材料(ultra-long afterglow organo phosphorescent nanomaterials, UOPs)是有效的解决方案。UOPs 是一种储存光能的材料,基于光致发光原理,能在光源移除后缓慢释放能量,持续时间长达 1 s。它们也适用于即时检测^[18],并具有制备简便、来源广泛、生物相容性好、激发态性能多样、成本低、柔韧性佳和易于合成等优点^[18-20]。得益于大的 Stokes 位移,UOPs 具有更高的磷光化效率和更长的发光寿命。在 360 nm 紫外光激发下,它们能发射 580 nm 的宽波长间隔光。由于长余辉纳米材料的发光寿命远超背景荧光的纳秒级别,因此在背景荧光衰减后,余辉的收集能有效排除背景光干扰^[21]。近年来,有机长余辉纳米材料因其在信息储存、防伪、生物成像、化学传感等领域

的应用而成为研究焦点^[22-23]。文献 [24] 通过制备单分散长余辉纳米颗粒,优化了长余辉材料的合成,提升了色谱试条的检测性能。然而,目前多数液相长余辉纳米颗粒易受水和氧影响,打破了余辉效应,限制了实际应用。文献 [25] 通过一种简单的纳米沉淀方法开发了一种有机长余辉纳米探针,具有 284.59 ms 的发光寿命和 7.6% 的荧光量子效率。长余辉纳米材料在免疫层析法中也显示出高灵敏度检测的潜力。文献 [26] 首次将小型长余辉纳米材料引入色谱测试条的设计中,最终实现了溶菌酶的高灵敏度检测。另外,基于长余辉纳米材料的时间解析分析技术^[27]虽提高了检测精度,却需要昂贵设备,在资源有限的环境下使用不便。

本文开发了一种基于有机长余辉纳米探针的侧流免疫层析(UOP-LFIAs)检测平台,即通过简便方法制备长余辉晶体,并涂覆聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)和羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)得到有机长余辉纳米探针。PVP 保护探针免受干扰,具有良好的水溶性和分散性。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

实验中使用的所有化学品和溶剂都是分析级的。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、N-羟基琥珀酰亚胺亚胺磺酸钠盐(NHS)、2-吗啉乙磺酸(MES, 99.0%)、T-酪蛋白、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、PVP、乙醇胺、甘氨酸和磷酸盐缓冲盐水(PBS, 20×)、牛血清白蛋白(BSA)均来自西格玛奥德里奇公司(上海)贸易有限公司(美国生命科学与高科技集团公司)。玻璃纤维、吸水性弯曲纸、聚氯乙烯背卡均来自上海金标生物技术有限公司。硝化纤维素(NC)膜购自德国赛多利斯公司,型号为 CN140。抗人 PGI 单克隆抗体(anti-human PGI monoclonal antibodies, PG I-MAb1、PG I-MAb2)、抗人 PG II 单克隆抗体(anti-human PG II monoclonal antibodies, PG II-MAb1、PG II-MAb2)、PGI 抗原(PG I antigen, PG I-Ag)、PG II 抗原(PG II antigen, PG II-Ag)均购自南京欧凯生物科技有限公司。山羊抗小鼠 IgG 来自山东奥创

生物科技有限公司。实验水为去离子水。

1.2 多功能有机长余辉纳米探针的合成与制备

制备长余辉纳米探针的过程需要两步, 如图 1 所示。第 1 步, 在文献 [9] 的基础上制备长余辉晶体。第 2 步, 采用一步法制备长余辉纳米探针, 并在前人研究方案的基础上进行优化, 使整个

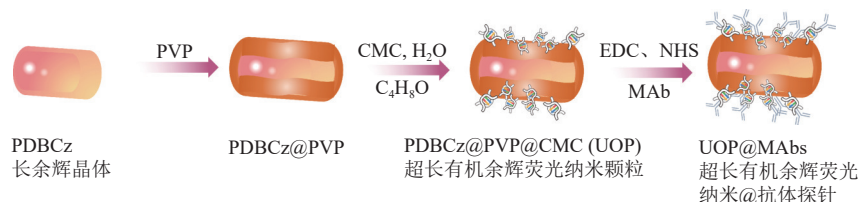


图 1 长余辉晶体标记的 PG I 和 II 抗体的流程图

所得到的有机长余辉纳米溶液中的纳米晶颗粒有一羧基基团附着在其表面, 以便与单克隆抗体上的一氨基进行下一次反应。取 1 mg 上述有机长余辉纳米溶液, 加入 1 mL 初始洗涤缓冲液 MES (0.05 M, pH=6.5), 离心机离心 (12 000 rpm, 8 min), 倒出上清液; 加入 1.5 mg EDC (-20 °C), 1.6 mg NHS (4 °C), 在转子上搅拌 15 min (20 rpm)。再加入 1.5 mg EDC (-20 °C), 1.6 mg NHS (4 °C), 并在转盘上彻底混合 15 min (20 rpm)。然后在冷冻离心机 (12 000 rpm, 8 min) 中离心洗涤样品。倒出上清液后, 加入 1 mL PBS, 超声破碎 3 min (工作时间 1 s, 暂停时间 4 s, 超声功率 40 W), 重复 3 次。加入 0.2 mg PG I 单克隆抗体, 在垂直转盘上混合搅拌 4 h (40 rpm/min), 用冷冻离心机离心清洗 (12 000 rpm, 5 min), 然后加入 1 mL PBS 进行超声分散。再加入阻断液乙醇胺、甘氨酸和牛血清白蛋白各 60 μ L, 在垂直旋转的圆盘上混合搅拌 2 h (20 rpm/min), 倒出上清液。接着加入 1 mL PBS, 冷冻离心机 (12 000 rpm, 8 min) 离心 3 次, 然后加入 400 μ L 最终洗涤液 (PBS + 10% 蔗糖) 进行超声处理, 然后在恒温烘箱中进行冷冻干燥 12 h。最终获得 UOP@mAbs 纳米探针。

UOP@PG II 单抗的制备方法与上述基本相同, 但在第 1 个垂直旋转转盘上将混合搅拌时间改为 30 min, 最后加入 200 μ L 最终洗涤液。

1.3 有机长余辉纳米侧流免疫层析试验条的原理及制备

本文研究并构建了一种基于有机长余辉纳米探针的用于胃蛋白酶原联合检测的侧流免疫层析试验条。由于 PG I 和 PG II 抗原有两个以上的抗原位点, 所以本文选择 LFIA 双抗体三明治法进行定量

制备过程更简单、更快。首先, 称量 100 mg 长余辉晶体, 与 20 mg PVP、5 mg CMC、8 ml 四氢呋喃 (THF) 和 5 mL 纯化水反应, 在 65 °C 的水浴中超声处理 2 h。最后, 将完成的有机长余辉纳米溶液在离心机中离心 3 min (2 500 rpm, 8 °C), 去除大的微球和杂质, 得到有机长余辉纳米溶液。

检测, 如图 2a 所示。通常的检测原理是利用 PG I 和 II 的抗体-抗原 (Ab-Ag) 特异性结合反应进行检测。首先, 在结合垫上分配荧光标记 UOP@mab 的溶液。将封装后的抗体胃蛋白酶原抗体 I、胃蛋白酶原抗体 II 和山羊抗小鼠 IgG 分别喷洒在 NC 膜上, 作为试验线 (test line, T₁ 线、T₂ 线) 和控制线 (control line, C 线)。在试验过程中, 被试样品中的物质 (含有胃蛋白酶原 I 和 II 抗原) 与试验条上相应的荧光标记物结合, 利用膜的毛细管作用通过结合垫和 NC 膜到达吸收垫。在检测过程中, 这些标记物将与抗原结合, 然后在通过细胞膜上的试验线时, 它们被 T₁ 线和 T₂ 线捕获, 形成一个三明治复合物在检测区诱导出一个信号。此外, 如果样品不含待测物质, 样品将继续移动到控制线产生光信号, 用作确定色谱过程是否正常的标准。

按照以下步骤准备一次性 UOP-LFIAs 试验条。首先, 将 PG I -mAb1、PG II -mAb1 和山羊抗小鼠 IgG 分别涂在 1.5 μ L/cm 和 40 mm/s 的 NC 膜上, 形成 PG I 检测线 T₁ 线、PG II 检测线 T₂ 线和质量控制线 C 线。将试纸在 37 °C 的恒温干燥箱中干燥 4 h。再将玻璃纤维膜浸入玻璃纤维膜处理溶液中 (用 1.21% Tris、1% PVP、1% S9、5% T-酪蛋白和去离子水预处理), 在旋转振荡器中浸泡 2 h。接着将玻璃纤维膜和 NC 膜都在室温下干燥后放入电热鼓风炉中, 在 45 °C 下烘烤 24 h。然后将上述 UOP@mAbs 溶液分别以 5 mg/mL (PG I) 和 10 mg/mL (PG II) 的浓度喷洒在处理过的玻璃纤维膜上 (喷雾体积 3 μ L/cm), 再放在恒温烘箱中以 37 °C 干燥 10 h。最后, 将干燥的玻璃纤维膜、NC 膜和吸墨试纸安全地组装在聚氯乙烯基板上。用切割机将其切割成 4 mm 宽的条带, 形成最终的有机长余辉纳米侧流免疫层析 (UOP-LFIAs) 试验条。

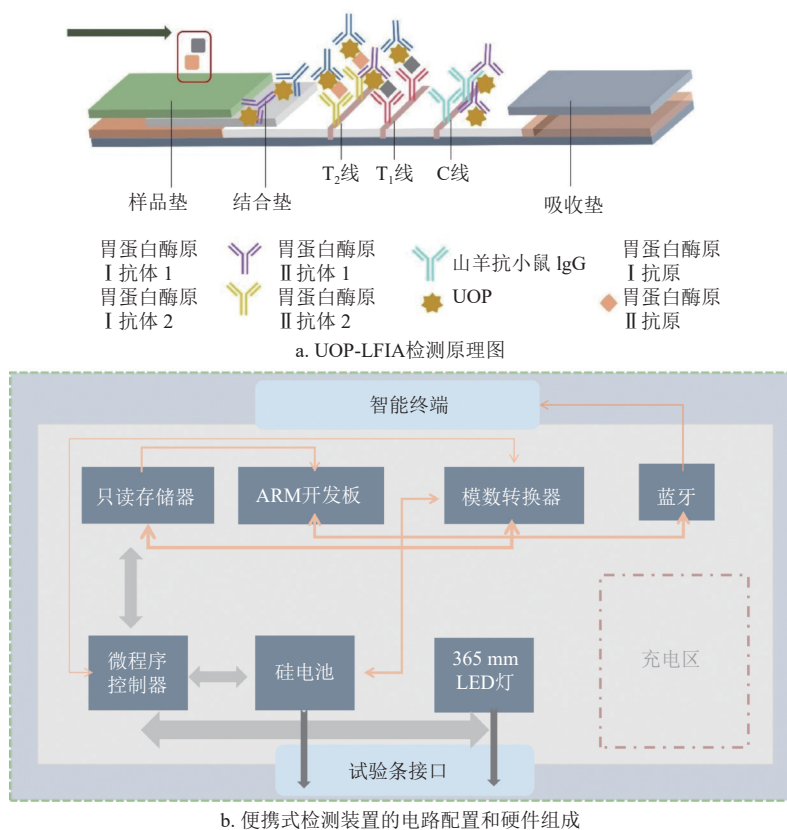


图 2 UOP-LFIAs 试验条的检测原理图和便携式 UOP-LFIAs 检测装置设计图

1.4 便携式 UOP-LFIAs 检测装置的原理和设计

如图 2b 所示, 便携式 UOP-LFIAs 检测装置的长度、宽度、高度分别为 9、5、2 cm, 重量约为 220 g。该检测装置的检测系统主要包括锂电池供电模块、信号处理模块、激光模块、数控模块 4 个部分。免疫胶样测试纸作为原始信号的来源, 用光电传感器实现原始信号的采集和转换工作。在检测过程中, 激光模块发出 365 nm 的红外光, 激发 2 s 后, 数控模块自动断光源, T 线和 C 线区域的有机长余辉纳米粒子发出荧光信号。所发射的荧光信号被信号处理模块接收, 并通过数字和模拟的方式转换为容易观察到的电信号。便携式 UOP-LFIAs 检测装置通过识别 T 线和 C 线中信号的所有峰值, 并整合信号下方的有效区域得到 C/T 比值数据, 获得 T 线和 C 线的荧光强度, 再基于荧光信号强度与胃蛋白酶原抗原浓度呈正相关关系实现定量检测。

2 结果和讨论

2.1 UOP@mAbs 的表征

有机长余辉纳米颗粒作为信号标记的颗粒大小可以直接影响免疫层析方法的敏感性。用透射电镜

对有机长余辉纳米颗粒的形态进行了表征, 如图 3 所示。比例尺为 100 nm, 从图 3a 中可以看出有机长余辉纳米颗粒的粒径在 200 nm 左右。图 3b 为有机长余辉纳米颗粒的粒径分布。可以看出, 有机长余辉纳米颗粒的直径为 206.71 ± 4.46 nm (平均尺寸 \pm 标准差, $N=100$), 这与电子显微镜图像的表征结果一致。与抗体偶联后, 颗粒大小逐渐增大。配合物 UOP@MAb 225.65 ± 3.27 nm 和 224.19 ± 1.93 nm 各自的平均直径 (平均尺寸 \pm 标准差, $N=100$) 如图 3c, 3f 所示。

本文采用了紫外线激发的长余辉测试条。利用荧光光谱索引仪收集了长余辉纳米材料的余辉梯度图像。图 3d 为有机长余辉纳米颗粒的发射光谱。在 365 nm 处被激发光激发后, 在 564 nm 和 600 nm 处有两个强光波。图 3e 显示了有机长余辉纳米颗粒的余辉持续时间图, 长余辉荧光可维持 300 ms 以上。较长的波长间隔有效地避免了背景噪声的干扰。图 3i 显示了 4 种纳米颗粒, 长余辉晶体、有机长余辉纳米颗粒和 UOP@PG I 单抗、UOP@PG II 单抗的潜在转化。结果表明, 在有机长余辉纳米颗粒的表面改性过程中可进行 zeta 电位测量追踪。

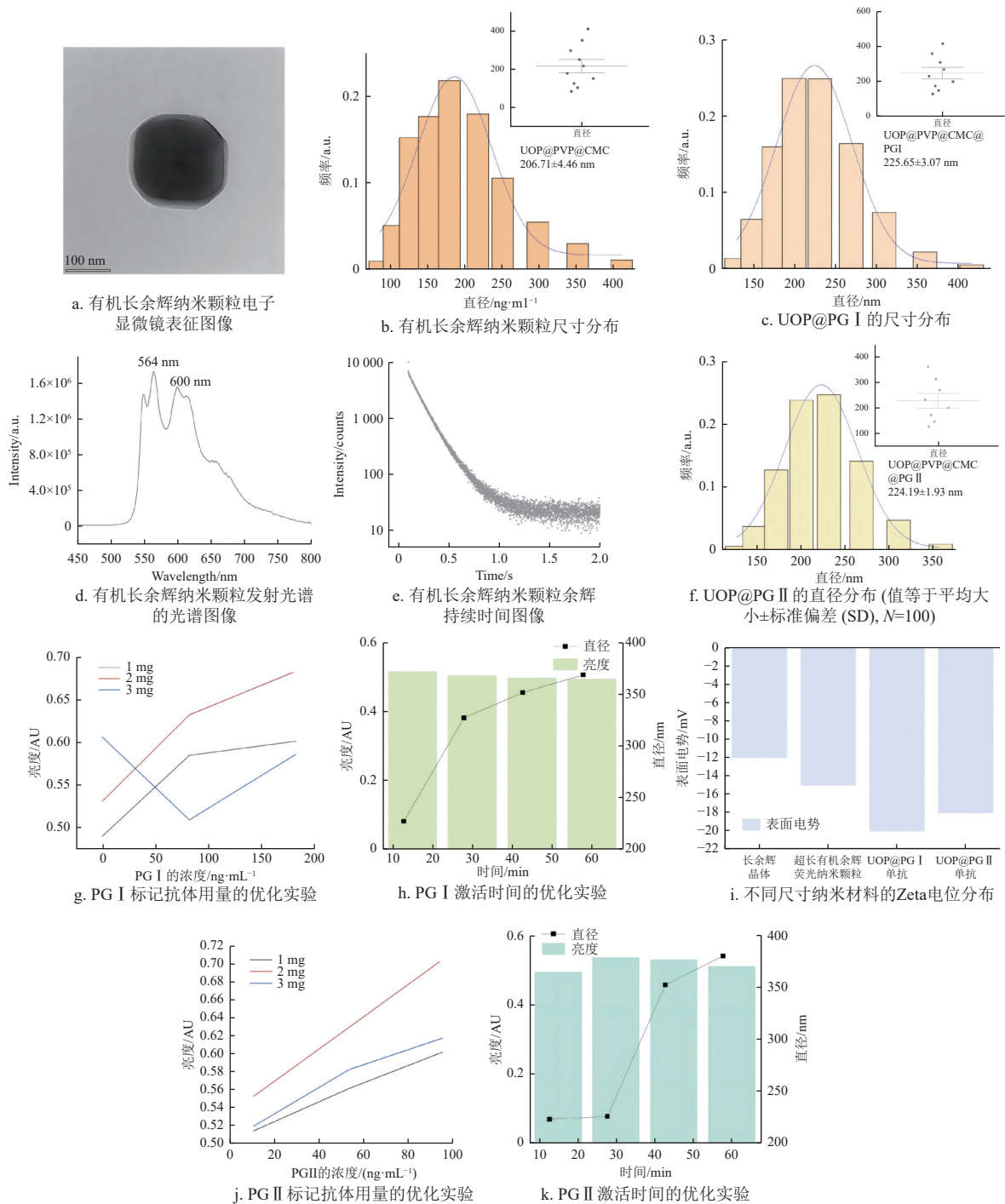


图 3 基于纳米颗粒尺寸和 zeta 电位分析仪的尺寸分布与 PG I、PG II 标记抗体用量优化实验和激活时间优化实验

2.2 有机长余辉纳米侧流免疫层析试验条的优化

2.2.1 标记抗体量的优化

标记抗体的数量直接影响检测灵敏度。为了研究最佳的抗体标记量, 分别选择 1、2、3 mg 的抗体进行偶联实验, 并在探针制备过程中组装成试条。将低、中、高浓度的 PG I 和 PG II 样品滴加到试条中, 等待 5 min 后检测其荧光信号的亮度值。结果发现, 在抗体剂量为 2 mg 时, PG I 和 PG II 的亮度值都最大 (图 3g, 图 3j)。

2.2.2 激活时间的优化

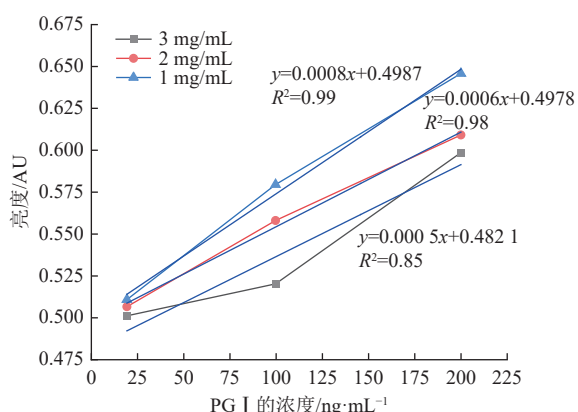
羧酸活化可以为后续的实验提供更好的反应条件, 并可以提高反应的效率和选择性。实验验证了 15、30、45、60 min 的 4 个激活时间, 并通过检测它们的荧光值和粒径进行了综合判断。结果如图 3h 和图 3k 所示, 当微球活化时间不够时, 荧光值相对较低, 粒径变化不明显; 当微球过度活化时, 信号值略有减小, 粒径明显增大。因此, 选择信号值相对较高且粒径不显著增加的条件作为最

佳激活时间。结果表明,在 PG I 的筛选试验中,15 min 的激活时间最有效,而 30 min 是 PG II 的最佳选择。

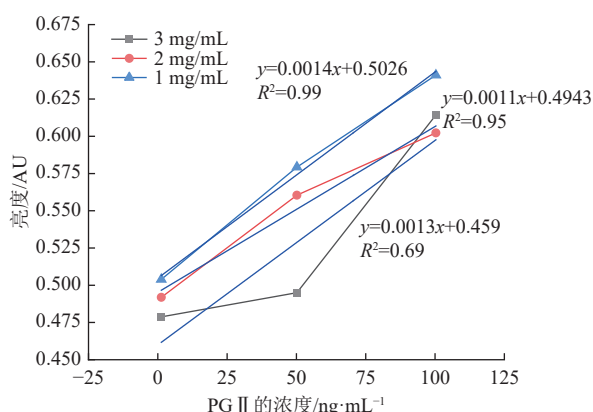
2.2.3 对反应性抗体用量的优化

抗原-抗体反应是成比例的,反应性抗体的数量会直接影响免疫反应的速度。为了避免钩子效应,增加了线性范围的上限,PG I 单抗和 PG II 单抗分别在 1、2、3 mg/mL 浓度下制备封装抗体的 T1 和 T2 线。C 线为 1 mg/mL 的山羊抗小鼠 IgG。测试条在 37 °C 的恒温器中保存 4 h 后组装起来用

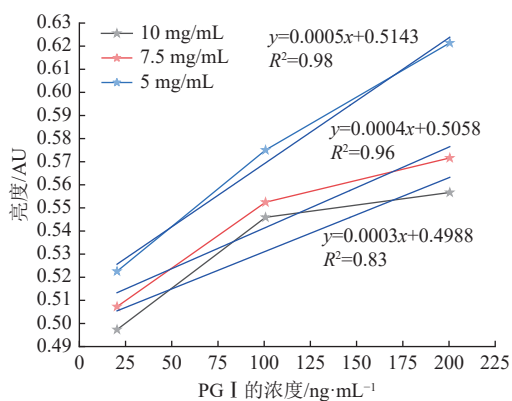
于检测。荧光信号值与浓度呈回归线性图,如图 4a 和图 4b 所示。根据线性方程的斜率和 R^2 选择反应性抗体数量的最优条件。斜率越大,灵敏度越高。从图中可以看出,当 PG I 的抗体封装量浓度为 1 mg/mL 时,斜率最大, R^2 为 0.99, 探针信号强度最大;当 PG II 的喷洒抗体量浓度为 3 mg/mL 时,探针信号强度最好时,斜率最大, R^2 为 0.99。因此,PG I T 线的最佳抗体包覆盖量为 1 mg/mL; PG II T 线的最佳抗体包覆盖量为 3 mg/mL。



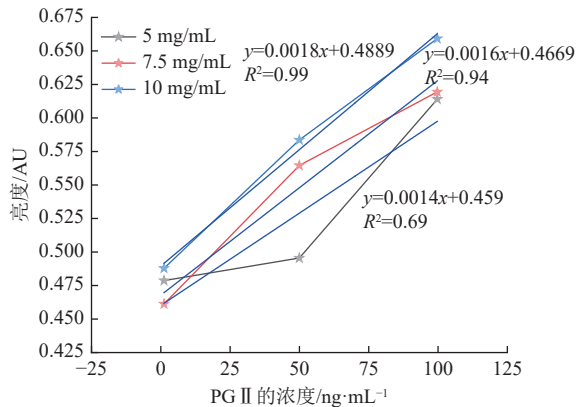
a. 在 PG I 的 T 线上的最佳抗体包膜量



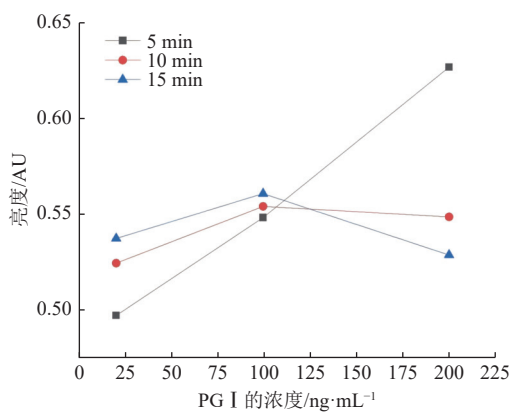
b. 在 PG II 的 T 线上的最佳抗体包膜量



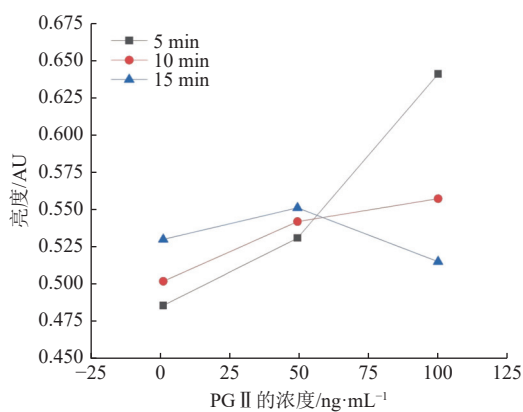
c. PG I 的最佳喷淋抗体量



d. PG II 的最佳喷淋抗体量



e. PG I 的免疫动力学优化



f. PG II 的免疫动力学优化

图 4 PG I 和 PG II 反应性抗体量的优化

此外,本文还筛选了喷洒在偶联垫上的抗体浓度。选择5、7.5、10 mg/mL这3种条件,并以3 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷雾体积喷洒在处理后的玻璃纤维上。然后将纤维放在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温烘箱中干燥10 h,然后取下试纸进行安装。根据荧光信号值和逐滴排列的抗原浓度绘制回归方程,如图4c和图4d所示。同样,选择最大斜率和 R^2 收敛到0.99作为最优条件。当喷洒PG I抗体浓度为5 mg/mL时,斜率最大, R^2 为0.98,检测灵敏度最好。当PG II喷洒抗体浓度为10 mg/mL时,斜率最大, R^2 为0.99,检测灵敏度最好。因此,PG I的最佳喷抗体量为5 mg/mL,PG II的最佳喷抗体量为10 mg/mL。

2.2.4 免疫动力学的优化

免疫层析法是一个动态的过程。为了确定最合适的检测时间,以5、10、15 min作为不同的反应时间,并记录检测线上相应的信号强度。如图4e和图4f所示,当检测时间为5 min时,荧光信号值随浓度梯度的增加而增加,在10 min时,荧光信号值仍随浓度的增加而增加,但梯度不显著。

在15 min时,荧光信号值随浓度的增加而降低。由此可以确定,PG I和PG II的荧光强度均在5 min内达到饱和。因此,本研究确定5 min为最佳检测时间。

2.3 标准曲线的建立和性能

2.3.1 标准曲线的建立

为了验证实验的可行性,在优化条件下制备了6个不同浓度的标准PG I和II样品和1个样品缓冲液作为对照,寻找PG I和II浓度与C/T值的关系。具体准备如下:用样品缓冲液以梯度法稀释PG I的标准物和准备成一系列浓度梯度的标准溶液进行测试,总共7个浓度梯度(0、20、50、75、100、150、200 ng/mL),和每个浓度稀释5倍后,取75 μL 的样品,检测C线和T线信号值。对每个浓度重复试验3次,对于PG II也是一样的。分别选择0、1.5、5、10、50、75、100 ng/mL这7个浓度梯度,每组设置3个平行线。使用有机长余辉纳米侧流免疫层析试验条的便携式UOP-LFIAs检测装置,总的测试时间小于5 min。

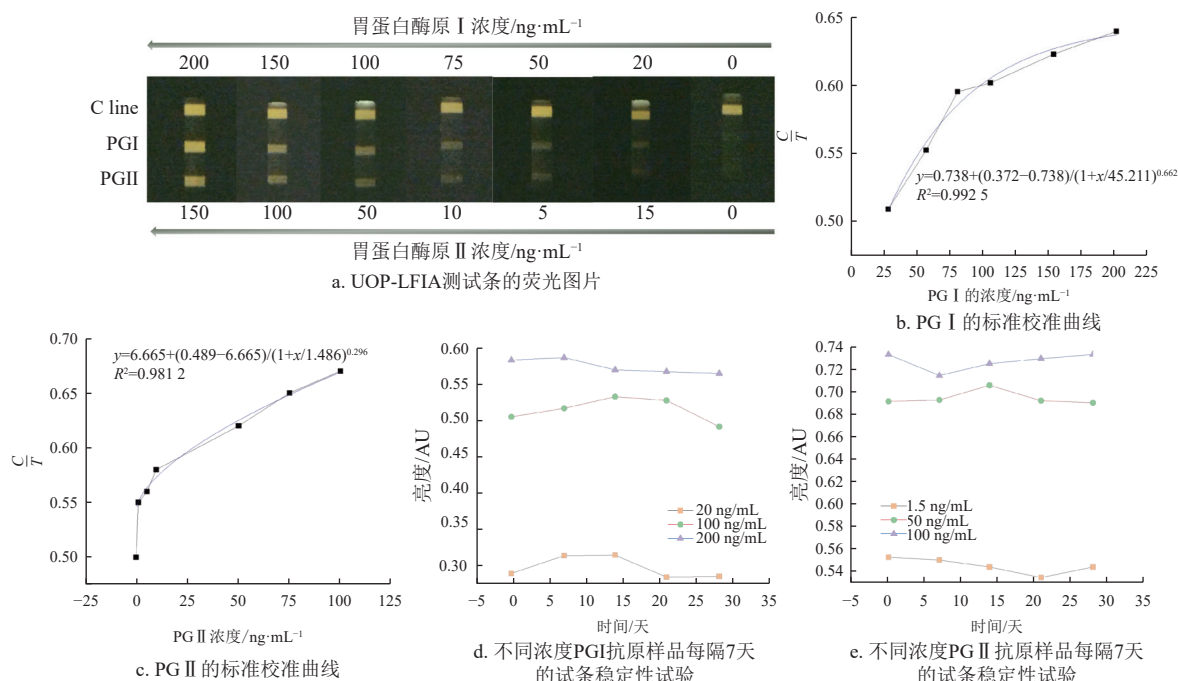


图5 PG I、PG II的标准校准曲线图和不同浓度PG I抗原、PG II抗原每隔7天的稳定性试验。

图5a为有机长余辉纳米侧流免疫层析测试条的荧光图。随着PG I和II浓度的增加,T1L和T2L上的荧光强度逐渐增加,而CL上的光强度保持稳定。此外还绘制了以T线信号为纵坐标,以目标浓度的对数值为水平坐标的标准曲线。如图5b

和5c所示,PG I的线性回归方程为:

$$y = 0.738 + \frac{0.372 - 0.738}{1 + \left(\frac{x}{45.211}\right)^{0.622}} \quad (1)$$

$R^2 = 0.9925$, 检测限为0.36 ng/mL, 检测范围

为 0.36~1 200 ng/mL; PG II 的线性回归方程为:

$$y = 6.665 + \frac{0.489 - 6.665}{1 + \left(\frac{x}{1.486}\right)^{0.296}} \quad (2)$$

$R^2=0.9812$, 检测限为 0.57 ng/mL, 检测范围为 0.57~500 ng/mL。因此, 本实验中建立的有机长余辉纳米侧流免疫层析法是可行的。

2.3.2 稳定性

为了测试试验条的存储性能, 试验条的密封袋与干燥剂每隔一周更换一次, 同时不同浓度的 PGI 和 PG II 抗原试验条的荧光信号值将重新测定, 结果如图 5d 和图 5e 所示。28 天后, 用不同浓度的 PG I 和 PG II 抗原进行色谱检测的试验条的荧光信号值没有明显变化, 表明其具有良好的稳定性。

2.3.3 精度

回收率试验是一种用于评价该试验准确性的指标。使用开发的联合检测分析试验条进行样品回收率试验: 分别加入浓度为 20、75、150 ng/ml 的 PG I 样品, 得到 3 个混合样品; 加入浓度约为 1.5、50、100 ng/ml 的 PG II 样品, 得到 3 个混合样品。每个样品重复试验 3 次, 分别计算 PG I 和 PG II 的回收率。如表 1 所示, 从实验结果可以看出, 所开发的有机长余辉纳米侧流免疫层析试验条对 PG I 的低、中、高值样品进行检测后, 回收率分别为 97.00%、108.00% 和 99.00%, 平均回收率分别为 101.30%。PG II 检测的低、中、高值样品的回收率分别为 109.00%、92.00% 和 107.00%, 平均回收率分别为 93.00%。

表 1 回收率数据

项目	预测浓度 /ng·mL ⁻¹	检测浓度的平 均值±SD/ng·mL ⁻¹	回收率 /%	变异系数 /%	平均回收率 /%
PG I	20.00	23.43±1.48	97.00	0.71	101.30
	75.00	53.03±5.21	108.00	1.09	
	150.00	86.30±8.10	99.00	1.37	
PG II	1.50	8.3±1.76	109.00	2.19	93.00
	50.00	54.31±7.04	92.00	1.58	
	100.00	98.17±9.27	107.00	2.23	

2.3.4 性能对比

进一步地, 将自主研发的分析方法与现有报道的方法进行了深入对比。由表 2 数据可直观得出: 1) 灵敏度上, 双金属纳米酶标记试纸条的灵敏度最高 (PG I: 0.001 ng/mL, PG II: 0.000 5 ng/mL), 传统免疫层析试纸条灵敏度最低 (PG I: 1~10 ng/mL, PG II: 1~5 ng/mL); 2) 检测时间上, UOP-LFIAs 试纸条检测时间最短 (5 min), 双金

属纳米酶标记试纸条时间最长 (30~60 min); 3) 成本上, 传统免疫层析试纸条成本最低 (2~5 元/次), 双金属纳米酶标记试纸条成本最高 (超过 50 元/次); 4) 检测范围上, UOP-LFIAs 试纸条检测范围最广 (PG I: 0.36~1 200 ng/mL, PG II: 0.57~500 ng/mL), 传统免疫层析试纸条检测范围较窄 (PG I: 1~50 ng/mL, PG II: 1~20 ng/mL)。

可以由此判断出: 传统免疫层析试纸条成本低廉、操作简便, 适合大规模筛查; 荧光免疫层析试纸条在灵敏度、检测时间和成本之间实现了较好的平衡, 适合中等规模实验室和临床使用; 双色量子点标记试纸条和自驱动纳米马达试纸条虽然灵敏度和检测范围优, 但成本较高, 适合高精度检测需求; 双金属纳米酶标记试纸条灵敏度极高, 但成本和时间开销较大, 适合超高精度检测场景。而 UOP-LFIAs 试纸条的检测时间最短、检测范围最广, 在灵敏度和成本控制等方面也展现出显著优势, 适合临床即时检测和中等规模筛查。本研究充分证明, 所建立的检测方法不仅灵敏度高, 检测特异性卓越, 且检测效率高, 为相关领域的研究与应用提供了有力支持。

2.3.5 临床样本检测

为了进一步证明该检测平台的可靠性, 将该试剂条应用于真实血清样本中 PG I、PG II 的临床检测。血清样本来自当地一家医院。本试验共检测了 40 份不同的 PG I 和 PG II 的新鲜血液样本。对于每个血清样品, 每 5 μ L 样品加入 75 μ L 稀释剂 (pbs+1% 蛋白+5% 表面活性剂) 彻底混合, 然后滴入试条中, 5 min 后用便携式 UOP-LFIAs 检测装置读取试条的结果。实验结果如图 6a 和图 6b 所示。医院所使用的检测方法是酶联免疫吸附试验的方法, 使用的是罗氏诊断产品 (上海) 有限公司的 Elecsys 胃蛋白酶原检测试剂盒和 Cobas e601 型号检测仪。将测量结果与医院给定的测量值比较, 图中离散点被用来证明本文系统的准确性, 可以观察到这些点拟合近似直线相关系数 $R^2 > 0.98$, 结果证明所提出的便携式 UOP-LFIAs 检测装置的荧光传感器有很高的可靠性。

与市面上多数荧光分析仪相较, 本文的测试设备展现出了卓越的便携性, 其体积小 (9×5×2 cm), 重量轻盈 (仅 220 g), 单手即可轻松操作, 充分满足用户对便携性的高要求。使用时, 只需简单几步: 将血液样本置于测试条上, 随后插入仪器, 轻触测试按钮, 静候 5 min, 即可完成操

作。整个流程便捷直观, 极适合个人家庭健康数据的日常监测。不仅如此, 该设备的应用场景广泛,

不仅限于家庭使用, 亦能完美融入医院环境及户外等场合, 如图 6c 所示, 其适用性得到了充分验证。

表 2 不同即时检测方法检测胃蛋白酶原的分析性能比较

方法	灵敏度 (PG I, PG II) /ng·mL ⁻¹	检测时间/min	成本/元·次 ⁻¹	检测范围 (PG I, PG II) /ng·mL ⁻¹	文献
传统免疫层析	1~10, 1~5	10~15	2~5	1~50, 1~20	[28-29]
荧光免疫层析	0.1, 0.05	15~20	5~10	0.1~100, 0.05~50	[30]
双色量子点标记	0.01, 0.005	20~30	>20	0.01~200, 0.005~100	[31]
自驱动纳米马达	0.005, 0.002	5~10	>30	0.005~150, 0.002~75	[32]
纳米颗粒LFIA	0.05, 0.02	10~15	10~15	0.05~150, 0.02~75	[6]
双金属纳米酶标记	0.001, 0.000 5	30~60	>50	0.001~200, 0.000 5~100	[33]
荧光微球	0.02, 0.01	15	15~20	0.02~150, 0.01~75	[34]
UOP-LFIAs	0.36, 0.57	5	10~20	0.36~1 200, 0.57~500	本文

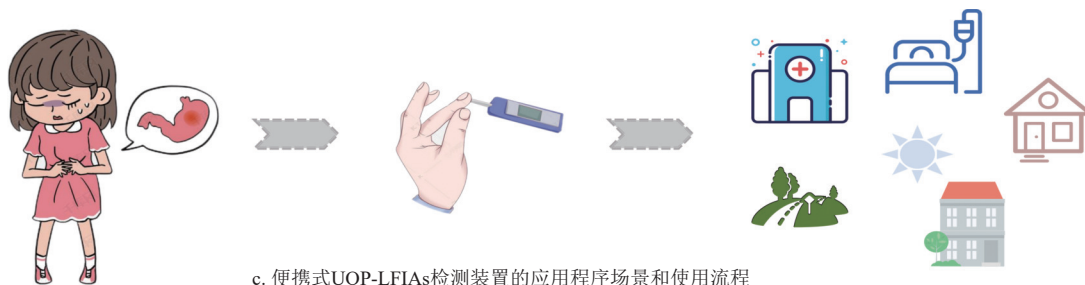
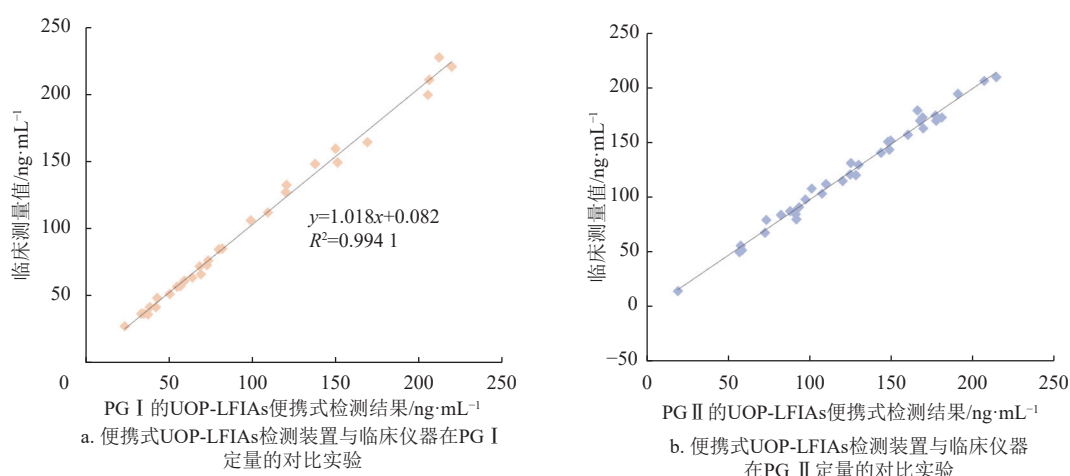


图 6 便携式 UOP-LFIAs 检测装置与临床仪器在 PG I、PG II 的对比实验和便携式 UOP-LFIAs 检测装置的应用程序场景

3 结束语

相较于传统的探针技术, 本文精心构建了一种有机长余辉纳米侧流免疫层析试验条 (UOP-LFIAs), 并配套开发了一个专为 PG I 和 PG II 快速同步检测设计的便携式 UOP-LFIAs 检测装置。该有机长余辉纳米探针的制备流程简洁高效, 不仅发光效能卓越, 色散性能优异, 还具备快速信噪比提升与低成本制造的优势。同时, 本文还设计了一款便携式光学传感装置, 能够同时检测 PG I 与 PG II, 且检测结果仅需 5 min 即可呈现。

实验结果显示, 在联合检测平台上, 胃蛋白

酶原 I 和 II 的检测灵敏度分别达到了 0.36 ng/mL 和 0.57 ng/mL, 检测范围则分别覆盖了 0.36~1 200 ng/mL 和 0.57~500 ng/mL, 这一性能超越了传统的商用酶联免疫吸附试验法。此生物传感检测平台以快速、经济且高效的特点, 为检测领域带来了革新。有机长余辉纳米探针凭借其出色的抗背景荧光干扰能力, 显著提升了分析精度, 并实现了大规模制备, 对胃炎早期筛查、诊断和预防^[35-36]至关重要, 为即时诊断领域开辟了一条快速、便携且经济有效的新途径。此外, 随着医疗大数据的蓬勃发展, 该检测系统还展现出在个人健康管理领域的巨大潜力, 为未来的医疗健康服务提供有力支持。

参考文献

- [1] KOHN J. A rapid method of estimating blood-glucose ranges[J]. *Lancet*, 1957, 273(6986): 119-121.
- [2] LOU D D, FAN L, JIANG T, et al. Advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay for point-of-care testing[J]. *View*, 2022, 3(1): 20200125.
- [3] BAHADIR E B, SEZGINTÜRK M K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 82: 286-306.
- [4] 黄正壮. 侧流免疫层析技术的研究进展[J]. *黑龙江科学*, 2022, 13(20): 70-72.
HUANG Z Z. Research progress of lateral flow immunochromatography[J]. *Heilongjiang Science*, 2022, 13(20): 70-72.
- [5] 李娜, 杜汉宇, 王真真, 等. 侧流免疫层析技术在兽医诊断中的应用[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(4): 104-108.
LI N, DU H Y, WANG Z Z, et al. Application of lateral flow immunochromatography in veterinary diagnosis[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2023, 44(4): 104-108.
- [6] 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]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75: 166-180.
- [7] TANAKA R, YUHI T, NAGATANI N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(8): 1414-1420.
- [8] HE X Y, HAO T J, GENG H X, et al. Sensitization strategies of lateral flow immunochromatography for gold modified nanomaterials in biosensor development[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2023, 18: 7847-7863.
- [9] GUO J C, CHEN S Q, GUO J H, et al. Nanomaterial labels in lateral flow immunoassays for point-of-care-testing[J]. *Journal of Materials Science & Technology*, 2021, 60: 90-104.
- [10] BOCK S, KIM H M, KIM J, et al. Lateral flow immunoassay with quantum-dot-embedded silica nanoparticles for prostate-specific antigen detection[J]. *Nanomaterials*, 2021, 12(1): 33.
- [11] ZHANG H Y, LUO J X, BELOGLAZOVA N, et al. Portable multiplex immunochromatographic assay for quantitation of two typical algae toxins based on dual-color fluorescence microspheres[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(21): 6041-6047.
- [12] KRIZKOVA S, NGUYEN H V, STANISAVLJEVIC M, et al. Microchip capillary electrophoresis: Quantum dots and paramagnetic particles for bacteria immunoseparation: Rapid superparamagnetic-beads-based automated immunoseparation of Zn-proteins from staphylococcus aureus with nanogram yield[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1274: 67-79.
- [13] LI Q R, YANG Y X, HU F, et al. Rapid detection of escherichia coli O157: H7 by a fluorescent microsphere-based immunochromatographic assay and immunomagnetic separation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 564: 32-39.
- [14] QU Q, ZHU Z, WANG Y, et al. Rapid and quantitative detection of Brucella by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 79(1): 121-123.
- [15] LI L P, ZHOU L, YU Y, et al. Development of up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay for rapidly quantitative detection of hepatitis B surface antibody[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 63(2): 165-172.
- [16] XU Y, LIU Y H, WU Y, et al. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(12): 5611-5614.
- [17] QIU W W, BARYEH K, TAKALKAR S, et al. Carbon nanotube-based lateral flow immunoassay for ultrasensitive detection of proteins: Application to the determination of IgG[J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(7): 436.
- [18] HUANG Q Q, GAO H Q, YANG S M, et al. Ultrastable and colorful afterglow from organic luminophores in amorphous nanocomposites: Advanced anti-counterfeiting and in vivo imaging application[J]. *Nano Research*, 2020, 13(4): 1035-1043.
- [19] CAI S Z, SHI H F, TIAN D, et al. Enhancing ultralong organic phosphorescence by effective π -type halogen bonding[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(9): 1705045.
- [20] BOLTON O, LEE K, KIM H J, et al. Activating efficient phosphorescence from purely organic materials by crystal design[J]. *Nature Chemistry*, 2011, 3(3): 205-210.
- [21] WANG Y S, GAO H Q, YANG J, et al. High performance of simple organic phosphorescence host-guest materials and their application in time-resolved bioimaging[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(18): e2007811.
- [22] 王伟光, 张鑫, 贺飞, 等. 激基复合物有机长余辉材料的研究进展[J]. *科学通报*, 2024(26): 3849-3863.
WANG W G, ZHANG X, HE F, et al. Research progress of exciplex organic long afterglow materials[J]. *China Industrial Economics*, 2024(26): 3849-3863.
- [23] 苏艳. 有机聚合物长余辉发光材料制备及防伪技术研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2019.
SU Y. Study on preparation and anti-counterfeiting technology of organic polymer long afterglow luminescent materials[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2019.
- [24] ZHOU Z H, ZHENG W, KONG J T, et al. Rechargeable and LED-activated ZnGa₂O₄: Cr³⁺ near-infrared persistent luminescence nanoprobes for background-free biodetection[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(20): 6846-6853.
- [25] ZHOU Y D, LU S, ZHI J H, et al. Microscopic afterglow bioimaging by ultralong organic phosphorescent nanoparticles in living cells and zebrafish[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(16): 6516-6522.
- [26] PATERSON A S, RAJA B, GARVEY G, et al. Persistent luminescence strontium aluminate nanoparticles[EB/OL]. [2023-10-11]. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac501>

- 2624.
- [27] HAI O, PEI M K, YANG E L, et al. Exploration of long afterglow luminescence materials work as round-the-clock photocatalysts[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2021, 866: 158752.
- [28] 王嘉森, 李进让, 吴慕坤. 胃蛋白酶试纸条检测诊断咽喉反流性疾病的可行性分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(7): 501-505.
WANG J S, LI J R, WU M K. Feasibility analysis of pepsin strip test in diagnosis of laryngopharyngeal reflux disease[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2019, 54(7): 501-505.
- [29] 赵水娣, 李彬, 贾宁人. 血清胃蛋白酶原临床检测中的稳定性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(20): 2395-2397.
ZHAO S D, LI B, JIA N R. Stability analysis of serum gastric proenzyme in clinical detection[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 32(20): 2395-2397.
- [30] 李小溪, 李筱涵, 陈澎, 等. 四种胃蛋白酶原检测试剂的性能比较[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(7): 1270-1273.
LI X X, LI X H, CHEN P, et al. Comparative analysis of four reagents in detection of serum pepsinogen[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17(7): 1270-1273.
- [31] CAO Y, CHEN Z H, LI X J, et al. Dual-color quantum dot-loaded nanoparticles based lateral flow biosensor for the simultaneous detection of gastric cancer markers in a single test line[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1218: 339998.
- [32] GUO J C, LI Y, WANG B, et al. Self-propelled Janus nanomotor as active probe for detection of pepsinogen by lateral flow immunoassay[J]. *Mikrochimica Acta*, 2022, 189(12): 468.
- [33] MENG X M, ZUO W C, WU P C, et al. Bimetallic nanozyme: A credible tag for in situ-catalyzed reporter deposition in the lateral flow immunoassay for ultrasensitive cancer diagnosis[J]. *Nano Letters*, 2024, 24(1): 51-60.
- [34] LI K J, LI X Q, FAN Y L, et al. Simultaneous detection of gastric cancer screening biomarkers plasma pepsinogen I/II using fluorescent immunochromatographic strip coupled with a miniature analytical device[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 286: 272-281.
- [35] HAJ-SHEYKHOESLAMI A, RAKHSHANI N, AMIRZARGAR A, et al. Serum pepsinogen I, pepsinogen II, and gastrin 17 in relatives of gastric cancer patients: Comparative study with type and severity of gastritis[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 6(2): 174-179.
- [36] FANG Z J, ZHANG H, GUO J C, et al. Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice[J]. *Talanta*, 2024, 266: 124996.

责任编辑 叶 芳