

胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状

董旭旭¹, 孙威², 曹攀¹, 刘晓丹²

1 扬州大学 表面工程研究所, 江苏 扬州 225127

2 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

董旭旭, 孙威, 曹攀, 刘晓丹. 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3243-3254.

DONG XX, SUN W, CAO P, LIU XD. Colloidal gold immunochromatographic test strip for virus detection: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3243-3254.

摘 要: 胶体金免疫层析试纸条技术是一种快速、灵敏和精准的固相标记检测技术, 胶体金免疫层析试纸条具有价格低廉、操作简便、检测快捷和特异性强的优点, 具有在短时间内灵敏、准确地定性检测出相关病毒的潜在能力, 有效解决传统检测方法在医学、兽医、动植物病毒检测和农药残留检测等领域存在检测时间长、设备不便和专业性强的弊端。目前在检测领域, 该技术在检测细菌性疾病、病毒性疾病和预防传染性疾病大面积扩散等方面都有应用, 因此, 该技术在检验方面具有巨大的发展空间。文中主要对胶体金免疫层析技术进行综述, 并对该技术在生物病毒检测方面进行总结和展望。

关键词: 胶体金; 病毒检测; 免疫层析试纸; 快速检测

Received: January 21, 2022; **Accepted:** March 21, 2022; **Published online:** March 29, 2022

Supported by: Jiangsu Province Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund Project, China (CX(21)3162); National Natural Science Foundation of China Youth Project (32002420)

Corresponding author: LIU Xiaodan. E-mail: liuxiaodan@ yzu.edu.cn

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(21)3162); 国家自然科学基金青年项目 (32002420)

Colloidal gold immunochromatographic test strip for virus detection: a review

DONG Xuxu¹, SUN Wei², CAO Pan¹, LIU Xiaodan²

1 Institute of Surface Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu, China

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Colloidal gold immunochromatographic strip is a fast, sensitive and accurate solid-phase labeling detection technology, which has the advantages of low price, easy operation, rapid detection and high specificity, with the potential to qualitatively detect the relevant viruses in a short time with desired sensitivity and accuracy. It effectively addresses the disadvantages of long detection time, equipment inconvenience and professionalism requirement of the traditional detection methods used in the medical, veterinary, animal, plant virus detection, pesticide residue detection and other areas. Presently, the technology has been applied in the detection of bacterial diseases, viral diseases and prevention of extensive spread of infectious diseases, and has sufficient room for further development. This review summarizes the application of colloidal gold immunochromatography strip for biological virus detection, followed by prospecting future perspectives.

Keywords: colloidal gold; virus detection; immunochromatographic test strip; rapid detection

作为一种能够实现快速检测效果的方法, 胶体金标记技术是 20 世纪末新兴的体外诊断技术, 该方法以胶体金作为标记物, 通过电镜观察对细胞或组织进行免疫学定位、定性以及定量的研究。20 世纪 60 年代, Feldherr 等首次提出胶体金作为一种用于电镜示踪标记物^[1]。随后, Faulk 和 Taylor 将胶体金应用到免疫组织学作为示踪物^[2]。免疫胶体金技术作为一种新型的免疫标记技术, 比传统酶联免疫标记 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、聚合酶链反应 (PCR) 技术等检测方法更加方便快捷, 基于胶体金的示踪技术特别是胶体金免疫层析技术成为了当前检测发展的一个热点。近年来, 随着胶体金免疫层析技术的迅速发展, 其展现出巨大的检测优势, 解决了实际生活中病毒检测流程复杂、时间长、高损耗的问题。

胶体金免疫层析试纸条技术是一种通过体

外检测对检测物质进行定性、半定量以及定量检测的技术, 它是将胶体金标记技术、免疫检测技术、层析分析技术和单 (多) 克隆抗体技术等多种技术相结合的一种固相标记检测技术^[3]。在实际应用中, 该试纸条具有特异性高、反应迅速、操作简单、成本低等特点。它利用胶体金标记抗原或抗体作为示踪剂, 以硝酸纤维素膜作为反应的载体, 依据微孔膜的毛细管层析原理, 将含有游离胶体金颗粒的待测液体, 于检测线处通过特异性抗原抗体的结合, 在硝酸纤维素膜捕获区域上聚集形成肉眼可见的显色^[4], 整个反应过程时间短, 且检测的准确度高, 在检测领域发展前景广阔。本文主要介绍胶体金的制备方法、试纸条的主要结构、检测原理和胶体金免疫层析试纸条在各类病毒检测中的应用, 并对其现阶段的发展进行分析展望。

1 胶体金的制备

胶体金又称为金溶胶,是由氯金酸还原成金原子后形成的分散性良好的金颗粒溶液^[5],还原氯金酸可制备出直径约为 1–150 nm 的胶体金颗粒,形貌呈圆球状^[6]。胶体金颗粒结构主要是由一个基础金核和双离子层组成,外离子层呈正电荷,内离子层呈负电荷,胶体金颗粒因内部离子层呈现 zeta 电势,可以保持胶体金颗粒之间相互排斥,不易发生聚集融合现象,保证了胶体金颗粒之间分散稳定(图 1A)^[7]。

胶体金的制备方法可分为两类,分别是物理法和化学法。物理法制备主要有热分解、光化学、超声化学和辐射分解等方法,虽然物理方法制备胶体金技术趋向成熟,但采用物理方法制备的胶体金难以控制颗粒大小和质量,制备后使用不便。化学法制备胶体金颗粒以氯金酸作为主要还原材料,常用白磷、抗坏血酸、柠檬酸三钠、乙醇、鞣酸-柠檬酸钠等材料作为还原剂^[8]。化学法制备胶体金颗粒技术相对稳定,制备颗粒的大小与还原剂添加剂量相关,现如今主要采用化学法进行胶体金颗粒的制备。化学法中,柠檬酸三钠是制备胶体金颗粒最为常用的还原剂,柠檬酸三钠制备胶体金颗粒过程简单,制备出的颗粒尺寸易调控且稳定,

不易发生聚集现象,制备的胶体金溶液透明度高,视觉效果良好^[9],本课题组采用柠檬酸三钠法制备出的胶体金颗粒在电镜下观察大小均一,分散性好(图 1B)。胶体金颗粒制备过程中影响因素多,如反应物的加入量、反应过程中的 pH 值和反应物加入的时间等多种因素,对胶体金颗粒的制备大小会产生影响,制备过程中使用双蒸馏水、超纯水或去离子水,确保玻璃器皿清洁,防止胶体金溶液制备过程中吸附于容器内壁或者发生集聚现象,影响胶体金颗粒的品质,制备良好的胶体金溶液呈现酒红色^[10]。

2 胶体金免疫层析试纸条的检测原理

胶体金试纸条的组成主要由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水滤纸和PVC底板5部分组成^[12]。胶体金试纸条根据其功用可分为3个区域,分别为加样区、反应区和吸附区。加样区主要是由样品垫和胶体金垫组成,通过层析作用实现样品与胶体金颗粒之间的结合;反应区即NC膜部分,包含检测线和质控线,检测线主要检测样品中是否包含待测物质,质控线则为了确保检测的有效性;吸附区即为吸水滤纸部分,该部分为检测反应过程提供层析动力。胶体金免疫层析试纸条具体结构分布如图2所示。

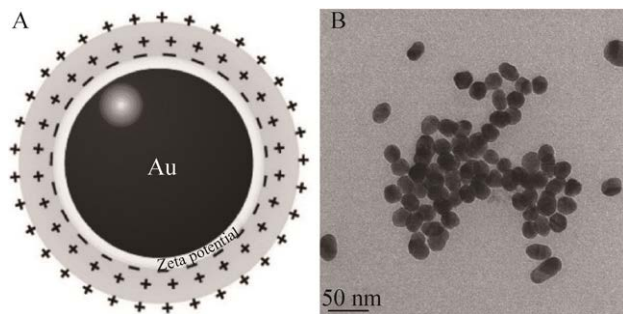


图1 胶体金颗粒 A: 胶体金颗粒结构示意图^[11]; B: 胶体金颗粒在透射电镜下观察的形貌
Figure 1 Colloidal gold particles. (A) Schematic diagram of colloidal gold particle structure^[11]. (B) Morphology of colloidal gold particles observed under the transmission electron microscope.

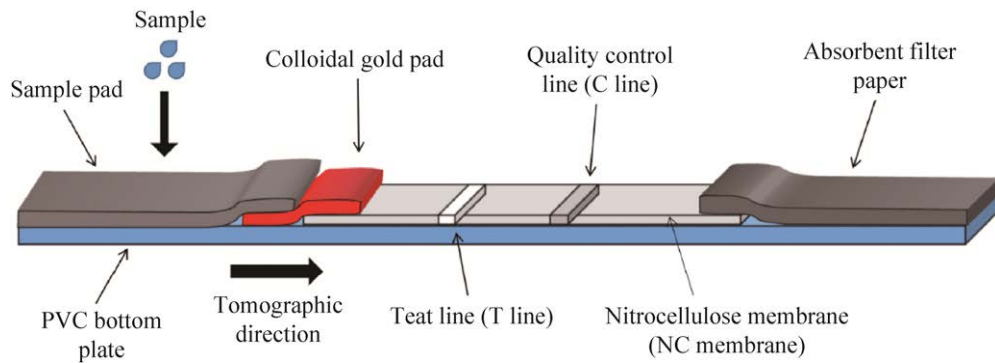


图2 胶体金免疫层析试纸条基本结构

Figure 2 Basic structure of colloidal immunochromatographic test strip.

2.1 检测原理

胶体金免疫层析试纸条定性检测原理可分为两大类：竞争法和非竞争法。非竞争法又可分为夹心法和间接法。

竞争法^[13]主要用于检测小分子物质，其原理是通过对胶体金标记抗体的竞争实现检验效果，该方法采用少量的抗体与胶体金进行偶联，并于检测线处包被抗原。检测过程中，样品中存在检测的抗原时，样品中的抗原首先与胶体金偶联的抗体发生结合，因胶体金标记抗体含量少，检测线处的抗原同样品中的抗原竞争有限的胶体金偶联抗体。整个反应过程中，有限的胶体金标记抗体与样品中的抗原发生结合，无法再与检测线处的抗原结合并聚集显色（图 3A）。

夹心法^[13]又称双抗体夹心法，其原理是胶体金偶联物和检测线处包被物均为特异性抗体，样品中若存在待检测物质时，检测物质首先与胶体金标记抗体结合，依据试纸条的毛细作用继续移动到检测线处与检测线抗体结合，形成胶体金标记抗体-检测物-检测线抗体的双抗体夹心结构（图 3B）。双抗体夹心法的检测物需在两个不同的位点上与抗体结合，该方法主要适用于大分子物质如细菌和病毒的检测。

间接法^[14]的原理是胶体金偶联物为抗抗

体，检测线处采用特异性抗原，检测物质中的 IgG 类型抗体和 IgM 类型抗体首先与胶体金标记抗体结合，由毛细作用移动到检测线处与特异性抗原结合，形成检测线抗原-检测物-胶体金偶联抗抗体的结构，胶体金颗粒因间接作用在检测线处聚集显色（图 3C）。间接法主要适用于血清抗体的检测，检测动物体内是否含有该病原特异性抗体，以达到间接检测病原的作用。

胶体金免疫层析试纸条需要半定量和定量检测，半定量检测方式基于定性检测，通过在 NC 膜处喷涂多道不同递增或递减浓度的捕获试剂（多道检测线）来实现半定量浓度的评估^[14]。目前常使用便携式条带阅读器进行定量观测，检测线出现红色条带并稳定后，采用便携式条带阅读器读取测量线上红色带的吸光度，检测物质浓度由检测物标准浓度与测量线红带强度的校准曲线计算得出，对于定量检测还可以采用耦合信号传感器，如光学、电和磁阅读器对信号进行数字化，但成本也会提高^[15]。

2.2 其他类型试纸条

常见的试纸条检测还有荧光法、化学发光法和核酸层析法。荧光试纸条采用荧光标记物（如量子点、上转换纳米颗粒）作为探针，具有荧光稳定性好、高亮度和低光漂白的特性，与胶体金试纸条相比灵敏度高，该试纸条也存在

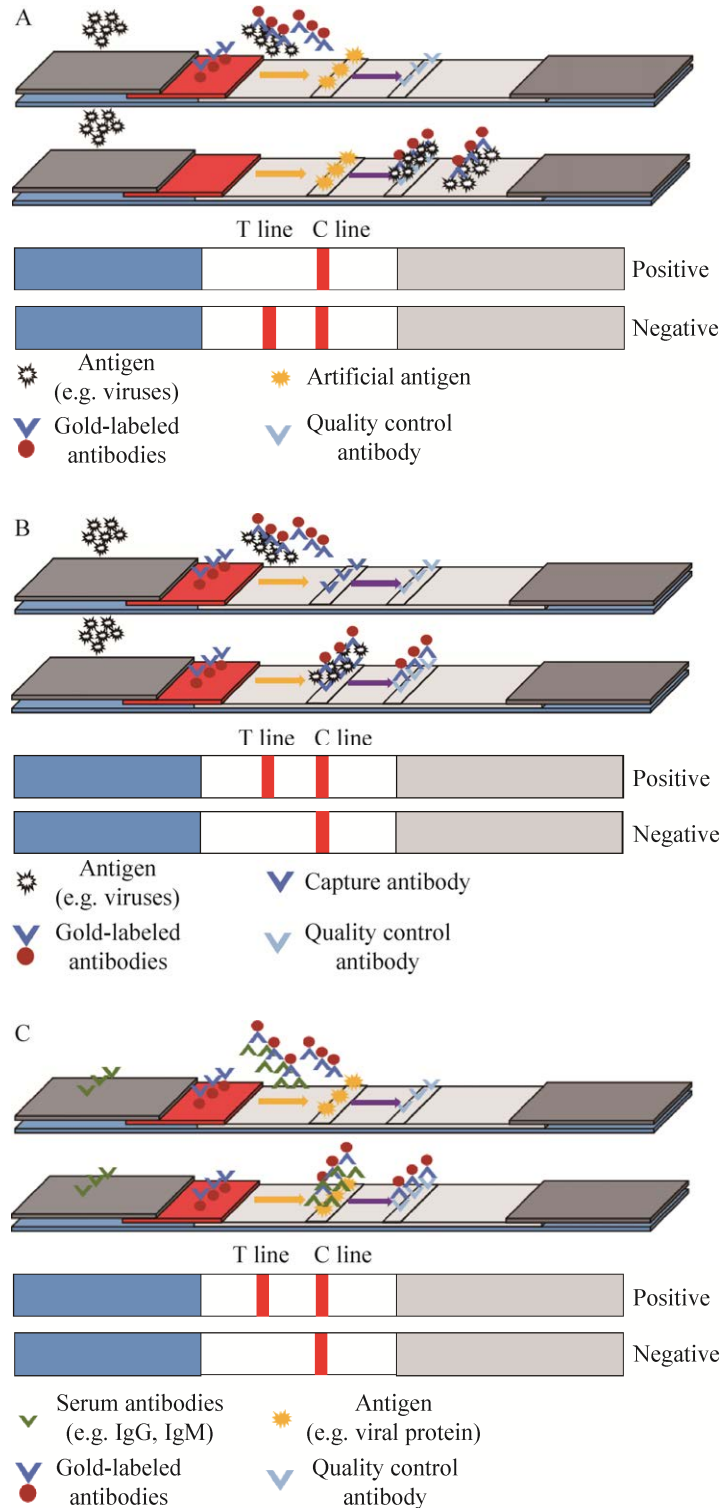


图3 胶体金免疫层析试纸条的检测原理 A: 竞争法; B: 夹心法; C: 间接法

Figure 3 Detection principle of the colloidal gold immunochromatographic test strip. (A) Competitive detection. (B) Sandwich method detection. (C) Indirect detection.

一些弊端,需要光激发设备下激发高能量可见光,存在受荧光背景干扰影响灵敏度等问题^[16]。发光试纸条采用化学发光的原理,化学发光与荧光和比色法测量方式相比,能够实现高信噪比,提高灵敏度。化学发光结果检测不需要光激发设备,仅需进行光学检测,无附加光源和背景干扰。发光试纸条相比胶体金试纸条不能被肉眼观测,且对复杂样品的检测灵敏度不高,其检测灵敏度受限^[16]。核酸检测试纸条原理需要核酸引物搭配标记物(如荧光素、生物素)实现检测的可视化,具有较高的灵敏度和良好的特异性,从样品到结果需要经过样品制备、扩增和检测,需要一定的检测环境,整体操作相较胶体金试纸条更加复杂^[17]。

3 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用

胶体金试纸条具有高特异性、可重复性和稳定性强的优势,其检出率也普遍高达90%以上,如Maheshwari等^[18]制备的胶体金试纸条,对比ELISA法其特异性达100%,敏感度为90%,检测结果一致性高。胶体金免疫层析试纸条在检测多重病毒时,交叉反应性低。采用多个不同批次试纸条检测同一病毒,结果无差异。试纸条在室温条件下保存,约可实现4-6个月内显色无明显差异,在4℃条件下可保存较长时间^[19]。胶体金试纸条由于胶体金暴露于空气中,存在变色现象,且微量胶体金吸附显色,使信号难以被察觉,限制了胶体金试纸条的灵敏度。胶体金免疫层析试纸条灵敏度低于荧光、放射性和酶比色技术,目前有多种方案采取偶联生物亲和素等方式提高其灵敏度,以实现半定量和定量检测,成果显著。

3.1 在动物病毒诊断中的应用

近年来,世界各地动物病毒病暴发严重,

部分病毒病传染性强,有一定的致死率,不利于养殖产业的发展^[20],如猪圆环病毒^[21]、猪流行性腹泻病毒^[22]和传染性喉气管炎病毒^[23]等。猪圆环病毒中的猪圆环病毒2型(porcine circovirus type 2, PCV2)引起多起猪类疾病,导致猪体消瘦,造成免疫损伤,董林^[24]应用胶体金免疫层析技术检测PCV2,制备出可以快速准确检测出PCV2的胶体金试纸条,对123份疑似感染样本进行检测并对比ELISA法,试纸条的敏感性为95.2%,特异性高达97.4%,符合率为92.6%。猪流行性腹泻病毒主要容易引起猪幼崽腹泻和脱水,导致猪幼崽死亡率增加,在临床上与其他猪肠胃病难以区分,传统的检测方法不利于管理突发的猪流行性腹泻。Kim等^[25]研制出能够检测目标病原体的商业用途免疫色谱分析法,该方法能够在短时间内检测出目标病原体,与荧光PCR检测结果几乎一致,比荧光PCR灵敏度低10倍,但检测速度快20倍以上,其快速诊断对于病害防治具有重大意义。细粒棘球蚴病^[26]是一种严重危害公共健康的寄生性疾病,绵羊、牛和人等中间宿主在摄入被污染的水或食物后被感染,我国每年感染此病的牲畜多达千万。Zhuo等^[27]利用胶体金标记热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)抗体开发了一种稳定和特异性高的免疫色谱带检测方法,能够快速检测细粒肠杆菌,间接达到对感染目标的检测和监测作用,试纸条和ELISA法的阳性率分别为2.61%和1.65%(728份),准确性高达99%,有利于感染绵羊的预检查和随后的确认和控制。传染性喉气管炎病毒(infectious laryngotracheitis virus, ILTV)是一种近年来威胁我国鸡养殖业的高传染性病毒,感染后鸡死亡率增大,为降低损失,Yu等^[28]研究基于针对ILTV中Gj蛋白的单克隆抗体的膜层析,制备出能够快速检

测 ILTV 的胶体金免疫层析试纸条, 反应仅需 15 min, 能够迅速排除养殖场中受感染的雏鸡, 准确率高达 99.6%, 且试纸在 4 °C 下保存 12 个月后, 依然显示出良好的稳定性和结果的可重复性。

胶体金试纸条在人类感染病毒及人畜共患病检测领域也有很广泛的应用。如常见的狂犬病毒^[29]的抗体检测, Wang 等^[30]制备出能够快速检测狂犬病毒抗体的胶体金免疫层析试纸条, 采用胶体金标记纯化的狂犬病毒糖蛋白作为示踪剂, 能够有效区分出有免疫能力和无免疫能力的动物, 与荧光抗体病毒中和试验相比, 其特异性和敏感度分别为 98.2% 和 90.4%, 检验结果高度一致, 可在室温下保存 12 个月, 12 个月仅灵敏度略微降低。现如今全球性重大防疫灾害新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[31], 急需能够有效抵御疫情扩散的疫苗, 为监测疫苗研究产生抗体的效果和时效, Liu 等^[32]制备出能够检测新冠病毒抗体 IgM 和 IgG 的胶体金免疫层析试剂盒, 可作为初步评价疫苗接种者抗体效果的辅助方法, 为该疫苗潜在的临床应用价值提供参考指标, 其测试过程中样品里 IgG 的阳性检出率为 100%, IgM 和 IgG 均为阳性的样品阳性检出率也较高。为实现 SARS-CoV-2 的快速检测, 涌现出各种采用胶体金免疫层析试纸条检测抗体抗原的方法, Huang 等^[33]研究开发了一种基于胶体金纳米颗粒的层析检测方法, 通过间接免疫色谱法实现了针对 SARS-CoV-2 的 IgM 抗体的快速诊断和现场检测。Baker 等^[34]发现, N-乙酰神经氨酸对 SARS-CoV-2 刺突糖蛋白具有亲和力, 通过与胶体金颗粒结合制备出针对 SARS-CoV-2 抗原的胶体金免疫层析试纸条, 可实现 30 min 内检测出 SARS-CoV-2, 检测限在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右, 都可

作为 SARS-CoV-2 诊断方法的重要补充。禽流感^[35]是一种影响人类和小型哺乳动物的高传染性疾病, 导致发热、呼吸道症状、血液中毒和黏膜疾病等一系列不适现象, 严重可危及生命, Li 等^[36]制备了一种新型胶体金免疫层析试纸条结构, 通过使用 1% HAuCl₄ 和 10 mmol/L NH₂OH·HCl 的混合物来诱导额外的金纳米颗粒聚集在硝化纤维素条上固定的免疫金颗粒周围, 以提高检测灵敏度, 由结果可知该方法使试纸条灵敏度提高 100 倍。Chen 等^[37]也研制出一种双读出化学发光的金横向流动试验系统来检测血清样本和全样本中的肿瘤生物标志物, 它基于辣根过氧化物酶和抗体同时被标记在金纳米颗粒的表面, 实现检测结果视觉和化学发光双读出 (图 4), 经试验证明灵敏度较传统胶体金层析技术更高, 其敏感度甚至优于 ELISA, 最低检测限达 0.02 pg/mL , 解决了胶体金层析技术速度快但灵敏度偏低的弊端。

3.2 在植物病毒诊断中的应用

植物病毒^[38]是当今社会的一大问题, 它可以引起许多植物疾病, 给世界各地的农业和林业造成重大的生产和经济损失。植物病毒的扩

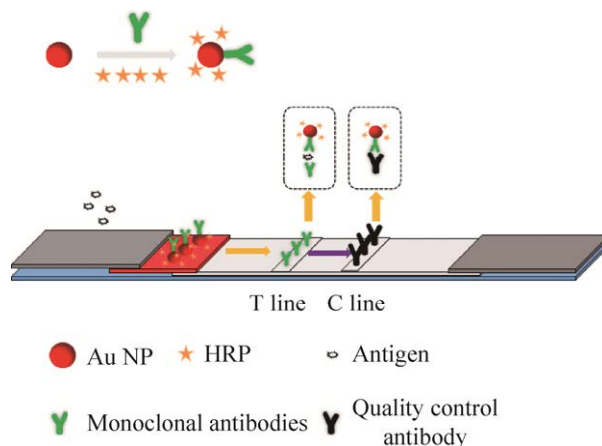


图 4 双读出化学发光的金横向流动结构
Figure 4 Dual readout chemiluminescence gold lateral flow assay system.

散传播严重威胁植物的活力和寿命,对作物的产量和质量产生负面影响,如香蕉束顶病毒(banana bunchy top virus, BBTV)^[39]、番茄环纹斑点病毒(tomato zante spot virus, TZSV)^[40]、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)和马铃薯Y病毒(potato virus Y, PVY)^[41]等。有效和早期识别传染性植物病毒有助于病毒的管理和减少损失,如从受感染物质中将病毒清除和使用农药控制病媒至关重要。BBTV引起香蕉束状病毒病,导致作物产量大幅下降,Wei等^[42]制备出采用DNA修饰胶体金的低成本的胶体金层析试纸条,能够在几分钟内定性和定量(光学响应)检测扩增DNA,其检测灵敏度和准确率高,蛋白基因片段浓度最低检测限低至80 copy/ μL ,与荧光PCR具有相同的检测限。番茄环纹斑点病毒导致感染植株无果和萎缩死亡,可侵染茄科、菊科和豆科等多种植物,传播途径广泛,对农作物生产带来极大影响,田金艳^[43]采用双抗体夹心法制备出检测番茄环纹斑点病毒的胶体金免疫层析试纸条,通过与其他5种植物病毒进行检测显示该试纸条特异性高,其灵敏度也较高,稀释810倍仍可检测出结果。TMV、CMV、PVY是危害烟草的主要病毒,传染性强且不利于烟草大面积培养,阮小蕾等^[44]通过竞争法制备出双重和三重胶体金免疫层析试纸条,可以实现同时检测多种烟草病毒,降低了成本和工作量,有利于病毒病的预防,3种病毒检出率均高于90%,这种简单、快速、敏感的检测方法对农业生产中的植物病害有很大的预警前景。胶体金免疫层析技术在检测植物病毒应用方面相比于其他方面较少,更多的应用主要针对植物中有毒有害物质成分的检测^[45],如玉米烯酮(zearalenone, ZEN)^[46]。ZEN是存在于小麦、玉米等谷物中的致病毒素,

这种毒素对人和畜都具有毒性作用, Sun等^[47]制备了一种用于检测残留ZEN的快速免疫色谱检测带,采用竞争法免疫层析试纸条原理并搭配试带读取器实现半定量和定量的检测,适用于现场快速检测霉菌毒素。2019年, Xu等^[48]研究出通过金纳米颗粒(AuNPs)表面多巴胺(DA)氧化自聚合方法合成聚多巴胺(PDA)包覆金纳米颗粒(Au@PDAs)试纸条结构用于检测ZEN(图5), PDA层作为AuNPs和抗ZEN单克隆抗体(mAb)之间的连接物,形成一个探针(Au@PDA-mAb),首次作为胶体金免疫层析试纸条中的信号扩增标记,基于Au@PDA试纸条的检测限低至7.4 pg/mL,检测限比传统的胶体金试纸条低10倍,色强度、胶体稳定性和单抗偶联效率都更加显著。聚多巴胺包覆金纳米颗粒扩大了胶体金免疫层析试纸条的灵敏度,为农产品和食品中其他超灵敏检测提供了一种新的检测方法。

3.3 在水生生物病毒诊断中的应用

传统检测方法进行水生生物病毒检测时,由于检测条件受限,不适宜大规模测量,也极

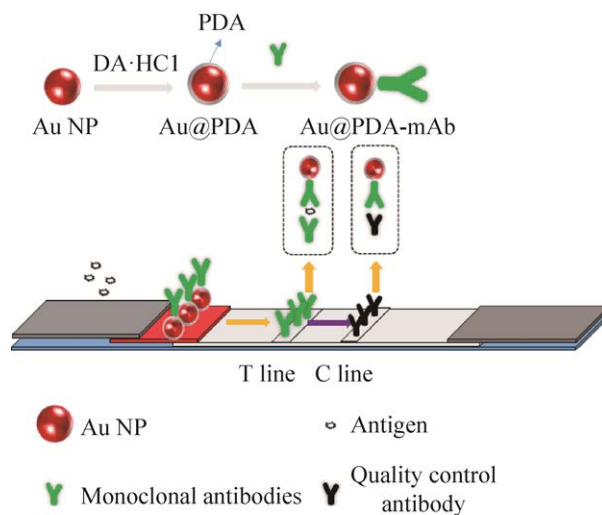


图5 聚多巴胺包覆金纳米颗粒试纸条结构
Figure 5 Structure of polydopamine-coated gold nanoparticle test strips.

其不利于水产养殖户进行病毒检测预防和治疗。近年来,逐步出现基于胶体金免疫层析试纸条技术对水生生物病毒检测的研究,有效解决了养殖户对养殖产物病毒检测的需求,如软壳海龟系统性败血症球形病毒 (soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus, STSSSV)^[49]、病毒性神经坏死(viral nervous necrosis, VNN)^[50]和病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)^[51]等,严重影响水产养殖的经济发展。软壳龟因其营养和药用价值深受人们喜爱,STSSSV的暴发导致软壳龟死亡率提高,Zhang等^[52]建立一种基于竞争法的胶体金免疫层析试纸条检测系统,有利于控制STSSSV的暴发和传播,在保护生物不受损伤的情况下对幼体进行检测筛选,所测量阳性样本与ELISA检测结果一致,检出率高,可作为快速方便的现场诊断工具。病毒性神经坏死是严重影响全球多种海洋鱼类养殖的病毒性疾病之一,VNN被分为3种独立的血清型,Shyam等^[53]研究制备了一种检测红斑石斑鱼VNN (red-spotted grouper VNN, RGNNV)的胶体金免疫层析试纸条,主要针对检测石斑鱼RGNNV的感染,该方法以脑组织作为检测RGNNV的样本,同荧光PCR检测结果相比,敏感性偏低(94.92%),但特异性100%匹配,检出率也高达96.81%。全球多种不同的海洋和淡水来源的鱼类中已经检测出病毒性出血性败血症病毒,感染面积大且死亡率高,为解决VHSV对水产养殖橄榄比目鱼等的影响,Kong等^[54]制备了一种特异性高的检测VHSV(基因型IVa)的胶体金免疫层析试纸条,该方法以橄榄比目鱼的心脏作为检测VHSV的靶器官,同荧光PCR检测结果相比特异性达100%,敏感性为93.9%,诊断有效性高达97.3%,这种简单快捷准确的检测方法非常适用于水产大规

模检测。

4 总结与展望

现如今,胶体金免疫层析试纸条占据市场更大的优势,该试纸条采用免疫层析技术具有其他传统检测方法不具备的独特优势。具体包括:(1)胶体金试纸条可实现即时检测,相比ELISA、实时荧光定量分析和PCR等检测方式可以更加快捷定性地获得检测结果。(2)胶体金免疫层析试纸条检测过程十分方便,不需要高端的仪器和设备、高技术的人才和特定的检测地点,经济适用并且安全环保,保存时间长,检测效果良好。(3)胶体金标记蛋白质时胶体金颗粒与蛋白质分子结合属于物理吸附过程,标记对蛋白质的生物活性影响小,不会影响检测的精准度。

胶体金试纸条虽然快速、便携易使用和保质期长,但也存在一些缺陷,其检出率虽高却不能达到100%,可能存在错检、漏检现象,并且检测病毒存在窗口期,检测时间受到一定限制,可作为初步即时诊断工具。常见的试纸条主要以定性检测为主,信号强度低,定量辨别力差,但大多数检测需要进行定量检测,随着研究进一步加深,试纸条的半定量以及定量检测逐步完善,可以采用多种方式进行定量检测,如Chen等^[37]提出的双读出化学发光模型和Xu等^[48]提出的聚多巴胺包覆金颗粒模型都有效提高了胶体金免疫层析试纸条的检测限,可实现超灵敏检测,逐步解决传统试纸条定量检测精准度不及ELISA和PCR等方法的问题。其次胶体金试纸条的多联检测也使检测更加便捷,通过在一张试纸条上喷涂多反应物检测线,实现一次反应显示多项检测结果,适用于大批量样品多项检测,更节约了检测的成本。本课题组针对鳜多种病毒(如传染性脾肾坏死病毒、鳜

鱼弹状病毒、大口黑鲈虹彩病毒和弹状病毒)检测进行胶体金免疫层析试纸条制备,通过实验得出单病毒检测胶体金免疫层析试纸条检测效果良好,但对于多病毒分别检测的经济效益和检测时间有待提高,我们正在进行多病毒检测的多联试纸条研究,初步实验结果表明双病毒多联试纸条较单病毒检测试纸条的检测效果更佳,后期还将进行三联以及四联试纸条试验来研究验证。胶体金试纸条的多元检测可以实现一次取样,多种病毒同时检测,经济和实用性效益更高,这也是现阶段主要的研究目标。

综上所述,胶体金免疫层析试纸条是一种能够解决基层大批量快速检测的手段,相比于其他检测方法具有诸多优点,已经在多个领域有所发展,因其快速便捷的检测性能,有效地起到早期预防治疗的作用。目前胶体金免疫层析技术仍在大步向前,对于多病毒同时检测的多联试纸条技术,以及超灵敏定量精准检测技术仍需进一步研究。

REFERENCES

- [1] Feldherr CM, Marshall JM Jr. The use of colloidal gold for studies of intracellular exchanges in the ameba *Chaos chaos*. *J Cell Biol*, 1962, 12(3): 640-645.
- [2] Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 1971, 8(11): 1081-1083.
- [3] 武晋慧, 孟利. 免疫胶体金技术及其应用研究进展. *中国农学通报*, 2019, 35(13): 146-151.
Wu JH, Meng L. Immunocolloidal gold technology: advances and application. *Chin Agric Sci Bull*, 2019, 35(13): 146-151 (in Chinese).
- [4] Raeisossadati MJ, Danesh NM, Borna F, et al. Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 235-246.
- [5] 章先, 付子贤, 周一钊, 等. 赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮-二联胶体金免疫层析试纸条的制备及应用. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1235-1245.
- Zhang X, Fu ZX, Zhou YZ, et al. Dual flow immunochromatographic assay for simultaneous determination of ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples. *Microbiol China*, 2019, 46(5): 1235-1245 (in Chinese).
- [6] 龚频, 王思远, 陈雪峰, 等. 胶体金免疫层析试纸条技术及其在食品安全检测中的应用研究进展. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 358-364.
Gong P, Wang SY, Chen XF, et al. Research progress of colloidal gold immunochromatographic test strip technology and its application in food safety testing. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(13): 358-364 (in Chinese).
- [7] 刘悦. 食物过敏原胶体金免疫层析检测试纸条的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
Liu Y. Development of colloidal gold-based immunochromatographic strips for the detection of food allergen[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2017 (in Chinese).
- [8] 徐欢, 董斌, 林月霞, 等. 纳米胶体金的制备及粒径的测定. *广东药学院学报*, 2010, 26(2): 127-130.
Xu H, Dong B, Lin YX, et al. Preparation of colloidal gold nanoparticles and size diameter determination. *Journal of Guangdong pharmaceutical university*, 2010, 26(2): 127-130.(in Chinese).
- [9] Omidfar K, Khorsand B, Larijani B. Development of a new sensitive immunostrip assay based on mesoporous silica and colloidal Au nanoparticles. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 1253-1259.
- [10] 曹涤非, 薛佳莹, 崔向红, 等. 柠檬酸三钠法制备胶体金及其应用. *化学工程师*, 2019, 33(12): 12-14, 24.
Cao DF, Xue JY, Cui XH, et al. Preparation and application of colloidal gold by trisodium citrate. *Chem Eng*, 2019, 33(12): 12-14, 24 (in Chinese).
- [11] 蒋旭, 李青竹, 邱月红, 等. 胶体金免疫层析技术研究进展. *畜禽业*, 2015(5): 28-30.
Jiang X, Li QZ, Qiu YH, et al. Advances in colloidal gold immunochromatographic techniques. *Livest Poult Ind*, 2015(5): 28-30 (in Chinese).
- [12] Ngom B, Guo YC, Wang XL, et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(3): 1113-1135.
- [13] Mahmoudi T, Guardia MDL, Shirdel B, et al. Recent advancements in structural improvements of lateral flow assays towards point-of-care testing. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, 116: 13-30.
- [14] 张玲. 白斑综合征病毒 (WSSV) 胶体金免疫半定量

- 快速检测试纸条的研制与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2016.
- Zhang L. Development of a semiquantitative immunochromatographic test strip (SIT-strip) to detect white spot syndrome virus[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2016 (in Chinese).
- [15] Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: principles, designs and labels. *Trac Trends Anal Chem*, 2016, 82: 286-306.
- [16] Zhang Q, Fang L, Jia BY, et al. Optical lateral flow test strip biosensors for pesticides: recent advances and future trends. *Trac Trends Anal Chem*, 2021, 144: 116427.
- [17] Nguyen HV, Nguyen VD, Nguyen HQ, et al. Nucleic acid diagnostics on the total integrated lab-on-a-disc for point-of-care testing. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111466.
- [18] Maheshwari Y, Vijayanandraj S, Jain RK, et al. Field-usable lateral flow immunoassay for the rapid detection of a *Macluravirus*, large cardamom chirke virus. *J Virol Methods*, 2018, 253: 43-48.
- [19] Jiang T, Liang Z, Ren WW, et al. Development and validation of a lateral flow immunoassay using colloidal gold for the identification of serotype-specific foot-and-mouth disease virus O, A and Asia 1. *J Virol Methods*, 2011, 171(1): 74-80.
- [20] 祖立闯, 王金良, 李娇, 等. 胶体金免疫层析技术在动物疫病诊断上的应用. *动物医学进展*, 2010, 31(8): 101-105.
- Zu LC, Wang JL, Li J, et al. Application of gold immunochromatography assay in animal disease. *Prog Vet Med*, 2010, 31(8): 101-105 (in Chinese).
- [21] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [22] Pijpers A, Van Nieuwstadt AP, Terpstra C, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec*, 1993, 132(6): 129-131.
- [23] Fuchs W, Veits J, Helferich D, et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res*, 2007, 38(2): 261-279.
- [24] 董林. 猪圆环病毒 2 型诊断试剂盒的研制与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- Dong L. Development and application of porcine *Circovirus* Type2 diagnostic kit[D]. Changchun: Jilin University, 2015 (in Chinese).
- [25] Kim YK, Lim SI, Cho IS, et al. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea virus: the lateral immunochromatography assay. *J Virol Methods*, 2015, 225: 4-8.
- [26] Carmena D, Cardona GA. Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Vet Parasitol*, 2014, 202(3/4): 69-94.
- [27] Zhuo XH, Yu YC, Chen XQ, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip based on HSP70 for the rapid detection of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Vet Parasitol*, 2017, 240: 34-38.
- [28] Yu JF, Lin Y, Cao Y, et al. Development and application of a colloidal gold test strip for the rapid detection of the infectious laryngotracheitis virus. *Poult Sci*, 2020, 99(5): 2407-2415.
- [29] Atanasiu P, Tsiang H, Perrin P, et al. Immunogenicity and protective activity of glycoprotein extracted from rabies virus: results from comparison of preparations obtained by different methods of purification (author's transl). *Ann Microbiol (Paris)*, 1976, 127B(2): 257-267.
- [30] Wang HL, Feng N, Yang ST, et al. A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody. *J Virol Methods*, 2010, 170(1/2): 80-85.
- [31] Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, et al. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). *Virusdisease*, 2020, 31(1): 13-21.
- [32] Liu J, Yan WQ, Liu ZJ, et al. A colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies after vaccination. *Med Nov Technol Devices*, 2021, 11: 100084.
- [33] Huang C, Wen T, Shi FJ, et al. Rapid detection of IgM antibodies against the SARS-CoV-2 virus via colloidal gold nanoparticle-based lateral-flow assay. *ACS Omega*, 2020, 5(21): 12550-12556.
- [34] Baker AN, Richards SJ, Guy CS, et al. The SARS-CoV-2 spike protein binds sialic acids and enables rapid detection in a lateral flow point of care diagnostic device. *ACS Cent Sci*, 2020, 6: 2046-2052.
- [35] Tang RB, Chen HL. An overview of the recent outbreaks of the avian-origin influenza A (H7N9) virus in the human. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(5): 245-248.
- [36] Li JF, Zou MQ, Chen Y, et al. Gold immunochromatographic strips for enhanced detection of avian influenza and Newcastle disease viruses. *Anal Chim Acta*, 2013, 782: 54-58.
- [37] Chen YP, Sun JS, Xianyu YL, et al. A dual-readout chemiluminescent-gold lateral flow test for multiplex

- and ultrasensitive detection of disease biomarkers in real samples. *Nanoscale*, 2016, 8(33): 15205-15212.
- [38] Prendeville HR, Ye XH, Morris TJ, et al. Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *Am J Bot*, 2012, 99(6): 1033-1042.
- [39] Chen Y, Hu XP. High-throughput detection of banana bunchy top virus in banana plants and aphids using real-time *TaqMan*(®) PCR. *J Virol Methods*, 2013, 193(1): 177-183.
- [40] Dong JH, Cheng XF, Yin YY, et al. Characterization of tomato zonate spot virus, a new *Tospovirus* in China. *Arch Virol*, 2008, 153(5): 855-864.
- [41] 朱贤朝. 中国烟草病害. 北京: 中国农业出版社, 2002.
Zhu XZ. Tobacco Diseases of China. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2002 (in Chinese).
- [42] Wei JT, Liu HX, Liu F, et al. Miniaturized paper-based gene sensor for rapid and sensitive identification of contagious plant virus. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(24): 22577-22584.
- [43] 田金艳. 番茄环纹斑点病毒单克隆抗体的制备与胶体金免疫层析试纸条研制[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
Tian JY. Preparation of monoclonal antibodies against tomato zante spot virus (TZSV) and development of colloidal gold immunochromatographic assay for detection of TZSV[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [44] 阮小蕾, 邓海滨, 王晓宾, 等. 多重烟草病毒胶体金检测试纸条的研制及应用. *烟草科技*, 2018, 51(10): 33-38.
Ruan XL, Deng HB, Wang XB, et al. Preparation and application of colloidal gold test paper for the detection of multiple tobacco viruses. *Tob Sci Technol*, 2018, 51(10): 33-38 (in Chinese).
- [45] 孙翠萍, 万宇平, 王效东, 等. 黄曲霉毒素 M1 胶体金快速检测试纸条的研制. *吉林畜牧兽医*, 2013, 34(1): 19-21.
Sun CP, Wan YP, Wang XD, et al. Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of aflatoxin M1. *Jilin Animal Husbandry Vet Med*, 2013, 34(1): 19-21 (in Chinese).
- [46] Nahle S, Khoury A, Atoui A. Current status on the molecular biology of zearalenone: its biosynthesis and molecular detection of zearalenone producing *Fusarium* species. *Eur J Plant Pathol*, 2021, 159(2): 247-258.
- [47] Sun YN, Hu XF, Zhang Y, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of zearalenone in corn. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(46): 11116-11121.
- [48] Xu SL, Zhang GG, Fang BL, et al. Lateral flow immunoassay based on polydopamine-coated gold nanoparticles for the sensitive detection of zearalenone in maize. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(34): 31283-31290.
- [49] 李登峰, 周永强, 刘联国, 等. 一种甲鱼系统性败血症球状病毒灭活疫苗及其制备方法: 中国, 102626514. 2012-08-08.
Li DF, Zhou YQ, Liu LG, et al. Soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus inactivated vaccine and its preparation method: China, 102626514. 2012-08-08 (in Chinese).
- [50] Costa JZ, Thompson KD. Understanding the interaction between *Betanodavirus* and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 53: 35-49.
- [51] Kim SJ, Qadiri SSN, Kim JO, et al. Kinetics of infectious virus and viral RNA copy number in the blood of olive flounder infected with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Virus Res*, 2019, 267: 16-20.
- [52] Zhang LP, Li DF, Liu LG, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus. *J Virol Methods*, 2015, 221: 39-45.
- [53] Shyam KU, Jeong HN, Oh MJ, et al. Development of a lateral flow immuno-chromatic strip assay for the detection of nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). *Aquaculture*, 2020, 520: 734944.
- [54] Kong KH, Jeong HN, Shyam KU, et al. Development and validation of a lateral flow immunochromatographic assay for specific detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2021, 537: 736491.

(本文责编 郝丽芳)