

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.06.003

程杰, 袁浩岚, 严家圣, 等. 基于金包覆磁性纳米探针的多模态 LFIA 检测胃癌标志物 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(6): 29-39.

基于金包覆磁性纳米探针的多模态 LFIA 检测胃癌标志物

程杰¹, 袁浩岚², 严家圣¹, 郭九川³, 郭劲宏¹

- 上海交通大学 感知科学与工程学院, 上海 200240;
- 成都理工大学 计算机与网络安全学院 (示范性软件学院), 成都 610059;
- 电子科技大学 信息与通信工程学院, 成都 611731

摘要: 多模态侧流免疫层析(Lateral Flow Immunoassay, LFIA)技术能够提供不同灵敏度水平的多种检测模式, 极大地提高了即时检测的实用性和灵活性, 已迅速发展成为一个极具潜力的研究方向. 研究中合成了一种金包裹的超顺磁性纳米晶簇(SMNC@Au)多功能纳米探针, 开发了用于同时检测胃癌标志物胃蛋白酶原(Pepsinogen, PG) I 和 II 的多模态 LFIA 传感平台. 首先通过水热法合成超顺磁性纳米晶簇, 然后通过种子生长法在其上涂覆一层金壳, 最后用 4-巯基苯甲酸修饰颗粒表面形成最终的 SMNC@Au 探针. 该多功能探针可以提供比色、磁性和表面增强拉曼散射 3 种输出信号, 且能通过磁力实现分析物的分离和富集, 简化样本的处理. 基于 SMNC@Au 纳米探针 LFIA 支持定性比色读数以及磁信号和拉曼信号的两种定量读数, 可适应不同的检测场景和要求. 检测结果表明, PG I 和 PG II 的视觉检测限分别为 10 ng/mL 和 1 ng/mL; 磁性模式的检测限分别为 0.5 ng/mL 和 0.1 ng/mL; 拉曼模式的检测限分别为 0.1 ng/mL 和 0.05 ng/mL. 两种定量模式的检测范围为 1~500 ng/mL (PG I) 和 0.1~100 ng/mL (PG II), 完全符合临床诊断标准. 该测定表明, 所开发的多模态 LFIA 在不同环境下灵敏检测分析物均有较大潜力.

关键词: 多模态探针; 多功能纳米材料; 侧流免疫层析; 胃蛋白酶原; 即时检测

中图分类号: TH776

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)06-0029-11



Multimodal Lateral Flow Immunoassay Based on Gold-Coated Magnetic Nanoprobes for Gastric Cancer Marker Detection

CHENG Jie¹, YUAN Haolan², YAN Jiasheng¹,
GUO Jiuchuan³, GUO Jinhong¹

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(62122017).

作者简介: 程杰, 博士研究生, 主要从事光电生物传感研究.

通信作者: 郭劲宏, 博士, 研究员.

1. School of Sensing Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2. College of Computer Science and Cyber Security (Pilot Software College), Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China;
3. School of Information and Communication Engineering, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China

Abstract: Multimodal lateral flow immunoassay (LFIA) technology provides various detection modes with different sensitivity levels, which significantly enhances the practicality and flexibility of point-of-care testing (POCT), rapidly evolving into a promising research direction. This study synthesized a multifunctional nanoprobe consisting of gold-coated superparamagnetic nanocrystal clusters (SMNC@Au), and developed a multimodal LFIA sensing platform for the simultaneous detection of gastric cancer biomarkers pepsinogen (PG) I and II. Superparamagnetic nanocrystal clusters (SMNC) were synthesized firstly by the hydrothermal method, followed by coating of a gold shell through the seed growth method, and finally, the surface was modified with 4-MBA to create the SMNC@Au probe. This multifunctional probe can provide three types of output signals: colorimetric, magnetic, and surface-enhanced Raman scattering (SERS), and can achieve separation and enrichment of analytes through magnetic force, simplifying the sample processing. The LFIA based on SMNC@Au probes supports qualitative colorimetric readings as well as two quantitative readings of magnetic and SERS signals, and are adaptable to different detection scenarios and requirements. Detection results indicate that the visual limits of detection for PG I and PG II are 10 ng/mL and 1 ng/mL, respectively. The magnetic mode detection limits are 0.5 ng/mL for PG I and 0.1 ng/mL for PG II, while the Raman mode detection limits are 0.1 ng/mL for PG I and 0.05 ng/mL for PG II. The quantitative detection ranges are 1 – 500 ng/mL (PG I) and 0.1 – 100 ng/mL (PG II), fully meeting the clinical diagnostic standards. This demonstrates that the developed multimodal LFIA has significant potential for sensitive analyte detection in various environments.

Key words: multimodal probe; multifunctional nanomaterials; LFIA; pepsinogen; POCT

胃癌是死亡率较高的常见癌症之一,在全球癌症死亡原因中排名第四^[1-2]。据 2020 年统计,全球每年胃癌新增病例 109 万人,死亡病例 77 万人^[3]。近年来,尽管胃癌发病率有所下降,但预计到 2040 年,这种恶性肿瘤的全球发病率将会增加 62%^[1,4]。癌症生物标志物的量化是控制和管理癌症最有效的策略之一^[5]。胃蛋白酶原(Pepsinogen, PG)是胃蛋白酶的无活性前体,根据其生化 and 免疫特性可以分为 PG I 和 PG II 两个亚群。血清中 PG I、II 的水平以及它们的比值(PG I/II)被认为是胃癌筛查的有效生物标志物,其准确检测可以有效地对患者的胃癌患病风险进行分级,并决定进一步的检查策略^[1,6]。传统的蛋白检测方法如高效液相色谱法^[7-8]、酶联免疫吸附测定法^[9]、气相色谱法^[10]等可以提供精确的检测结果,但 these 方法操作复杂、费时费力,难以满足大规模筛查的即时检测需求。因此,针对胃癌的早期筛查和治疗控制建立快速准确的特异性检测方法具有重要意义。

侧流免疫层析(Lateral Flow Immunoassay, LFIA)是一种经典的即时检测技术,因其简单、快速、便宜等优势,已被广泛应用于早期疾病诊断、食品安全检测和环境监测等领域^[11-13]。然而,基于胶体金的传统 LFIA 的灵敏度较低,定量检测困难,大多用于定性或半定量检测。为了提高 LFIA 的灵敏度,各种纳米颗粒被开发作为探针来增强信号,如荧光、上转换、磁性和光热纳米材料等^[12]。尽管这些纳米颗粒的引入使得 LFIA 可与先进的检测技术相媲美,但它们都只能提供单一维度的信息,难以满足用户在不同场景中的检测需求。例如,时间分辨荧光 LFIA 的信号读取仪器价格昂贵,在资源有限的地区普及受限^[14];磁性纳米材料能够有效地从复杂的基质中富集目标物从而提高检测灵敏度,但磁信号很容易受到外部环境的干

扰,这无疑增加了对实验环境的要求^[15-16].因此,有必要针对不同的诊断场景开发具有多维信号(多模态)输出的多功能纳米探针.

LFIA 典型的输出检测信号包括比色、荧光、磁、光热、拉曼等^[11-12, 17-22].其中,比色信号具有视觉定性解释的便捷性,是 LFIA 最优秀的特征之一^[12, 23].相对于比色信号来说,荧光信号的灵敏度较高,是定量分析最常见的选择^[11-12].由于磁信号的低背景噪声,它被认为有潜力实现比荧光信号更高的灵敏度,此外,磁性探针能够提供富集和分离功能^[15-16],但需要特殊的设备支持^[21].光热信号具有高灵敏度,可以通过手持式红外相机或普通温度计获得^[19, 24-25],并且由于光热效应能够实现精确的热量控制,因此在治疗应用、抗菌领域引起了巨大的研究兴趣^[26-27].表面增强拉曼散射则因为其激发波长较长,可以有效避免荧光猝灭和光漂白的干扰,可实现超灵敏的检测,被认为是一种极具潜力的技术^[28-29].多模态 LFIA 即是利用多功能纳米探针实现各种信号之间的组合,不仅能够保持定性模式下便捷的视觉解释,而且还集成了不同灵敏度水平的各种定量模式以适应不同的应用场景,在即时检测的实用性和灵活性方面有巨大提升,已迅速发展成为一个新兴的研究和开发方向^[30-32].例如,Huang 等^[32]将磁性材料和荧光团嵌入纳米结构中制备了一种双功能的纳米探针,结合磁性免疫分离技术和免疫荧光检测技术,无需洗脱和孵育步骤即可灵敏检测食源性病原体,但该研究没有将磁信号作为输出来进一步增加检测的弹性.Hu 等^[17]开发了一种比色-荧光-磁性纳米球多模态检测平台,实现了靶标分离富集、多信号读出和两种定量检测的多功能集成.Li 等^[24]利用自组装的多价荧光纳米抗体和金属有机碳纳米材料构建的比色、荧光和光热多模态探针,在黄曲霉毒素 B₁ 的检测中表现出优异的性能.

本研究通过金包裹超顺磁性纳米晶簇(SMNC@Au)合成了一种集成比色、磁和拉曼信号的多功能纳米探针,实现了对胃癌标志物的多模态检测.探针 SMNC@Au 是首先通过水热法合成的超顺磁性纳米晶簇作为核心,然后通过种子生长法在其上涂覆一层金壳,并在金壳表面结合 4-巯基苯甲酸(4-MBA)作为拉曼报告分子而形成的.该多功能探针可以提供比色、磁性和拉曼 3 种信号,且可以通过磁力实现分析物的分离和富集,极大简化样本的处理.最终,基于 SMNC@Au 的 LFIA 检测平台能够实现 PG I 和 PG II 的同时检测,并具有一种视觉定性模式和两种不同灵敏度的定量模式(图 1).为了证明其可行性,本研究使用了不同质量浓度的样本组进行了性能验证.结果表明,PG I 和 PG II 的视觉检测限分别为 10 ng/mL 和 1 ng/mL.在磁性模式下,可以将 PG I 和 PG II 的检测限分别降低到 0.5 ng/mL 和 0.1 ng/mL.而拉曼模式可以大幅提高 PG I 和 PG II 检测的灵敏度,其检测限分别为 0.1 ng/mL 和 0.05 ng/mL.磁性模式和拉曼模式可以分别实现从 1 ng/mL 到 500 ng/mL(PG I)和 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL(PG II)的检测范围,并具有高准确性,完全符合临床诊断标准.此外,PG I 和 PG II 之间没有内源性交叉反应.基于金包覆磁性纳米探针的多模态 LFIA 能够显著提高即时检测的灵活性和普遍适用性,在 LFIA 领域具有巨大的发展潜力.

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

无水氯化铁(FeCl_3)、乙酸钠、柠檬酸三钠二水合物(Na_3Cit)、盐酸羟胺、甘氨酸(GLY)、氯金酸(HAuCl_4)、4-巯基苯甲酸(4-MBA)购自上海麦克林生化科技有限公司.乙二醇(EG)、硼氢化钠(NaBH_4)、乙醇胺(EA)、2-(N-吗啉)-乙烷磺酸(MES)、牛血清白蛋白(BSA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司.乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和聚乙烯亚胺(PEI)溶液购自 Sigma-Aldrich(上海,中国).玻璃纤维、吸水垫和基板购自上海金标生物技术有限公司.硝酸纤维素(NC)膜购自赛多利斯有限公司.磷酸盐缓冲液(PBS)购自长春赛斯医疗生物工程股份有限公司.聚乙烯吡咯烷酮(PVP)购自 Diamond 生物技术有限公司.抗人 PG I mAb K56t1(Anti-PG I -D)、抗人 PG I mAb K50f4(Anti-PG I -C)、抗人 PG II mAb K30t2(Anti-PG II -D)、抗人 PG II mAb K28c9(Anti-PG II -C)以及标准品 PG I mAb、PG II mAb 均购自南京欧凯生物科技有限公司.兔 IgG(R-IgG)和山羊抗兔 IgG(G-IgG)购自山东亚瑞特生物科技有限公司.所有实验均使用去离子水.

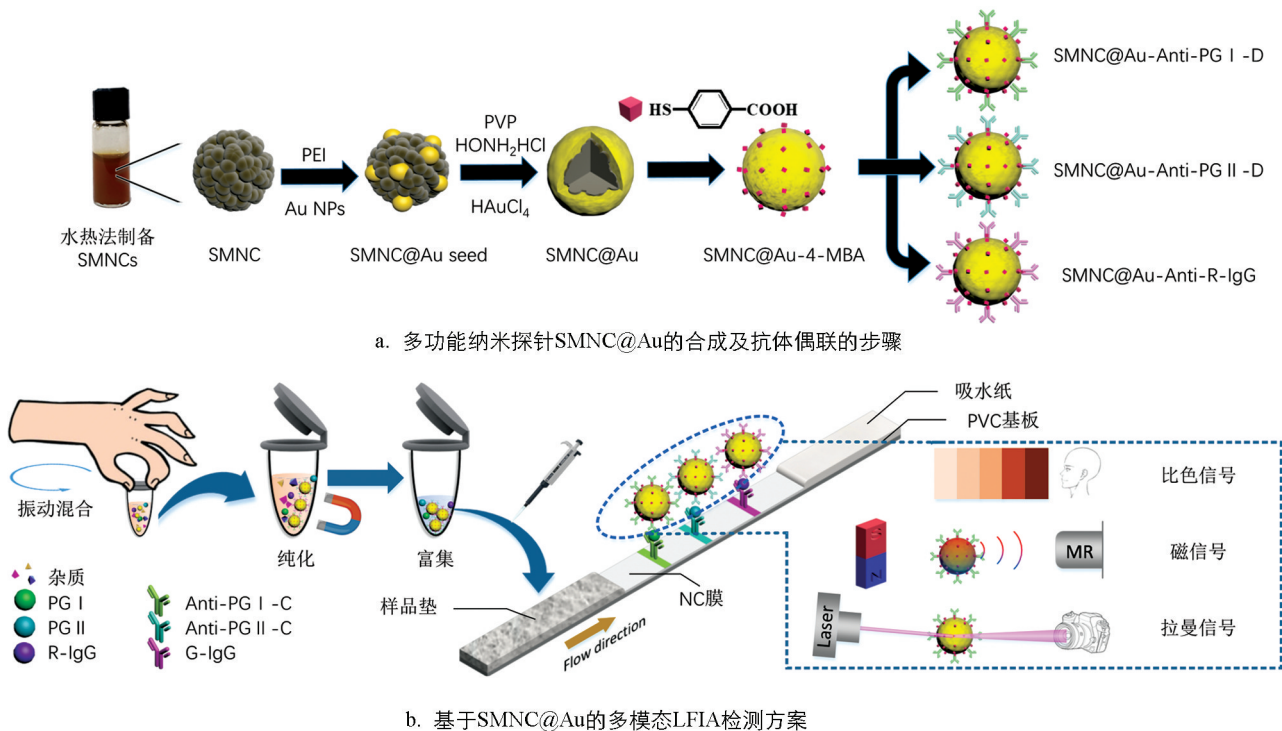


图 1 多功能纳米探针 SMNC@Au 的合成及抗体偶联的步骤和基于 SMNC@Au 的多模态 LFIA 检测方案

SMNC 和 SMNC@Au 的形态和元素分布使用 TESCAN 扫描电子显微镜 (SEM) MIRA3 表征. 动态光散射 (DLS) 设备用于表征纳米颗粒的粒径、Zeta 电势和聚合物分散性指数 (PDI). 超声波均质器 SCIENTZ-IIID (购自宁波赛特生物科技有限公司) 用于分散颗粒. LakeShore7404 振动样品磁强计 (VSM) 用于表征 SMNC 和 SMNC@Au 的饱和磁化强度. 拉曼分析仪 (购自法国侯布里亚公司) 用于检测拉曼信号. 基于本团队之前使用的微型磁检测设备^[22] 检测磁信号. 划膜喷金仪 (HM3035) 用于在 NC 膜上固定抗体. 测试条切割机 (WM-100) 用于生成侧流免疫层析试纸条. 电热鼓风机用于干燥玻璃纤维和 PVC 基板.

1.2 多功能纳米粒子的制备

图 1a 展示了核壳结构的多功能纳米探针 SMNC@Au 的合成过程. 根据文献^[33], 使用水热法合成了超顺磁性纳米晶簇 (SMNC) 来作为探针的核心. 首先向 20 mL 的乙二醇中加入 649 mg 无水 FeCl_3 和 200 mg Na_3Cit , 充分搅拌后, 添加 2 g 乙酸钠继续搅拌 30 min. 随后, 将液体倒入 50 mL 的高温反应釜中, 在 205 °C 的条件下反应 12 h. 最后, 所得液体用去离子水和乙醇磁吸洗涤 5 次, 得到粒径均匀的 SMNC 颗粒 (约 190 nm).

金壳的制备采用种子原位生长法^[34]. 首先将 10 mg 的 SMNC 颗粒分散于 1 mL 的去离子水中, 并加入 110 μL 10 mg/mL 的 PEI 溶液, 超声处理 20 min, 得到 SMNC@PEI 溶液. 将 1 mL 10 mg/mL 的 SMNC@PEI 溶液加入到 6 mL 提前制备的 Au 溶液^[35] 中, 超声处理 30 min 后, 用去离子水磁吸清洗得到 SMNC@Au 种子颗粒. 随后将 1 mg 的 SMNC@Au 种子分散在 10 mL 3 mg/mL PVP 和 0.5 mg/mL 盐酸羟胺溶液中超声处理 15 min, 并在超声过程中缓慢滴入 10 μL 50 mmol/L HAuCl_4 溶液, 继续超声处理 15 min. 经过两次去离子水洗涤后得到 SMNC@Au. 采用 4-MBA 作为表面修饰拉曼报告分子. 将 1 mg SMNC@Au 溶于 2 mL 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-MBA 乙醇溶液中, 振动过夜. 然后用乙醇洗涤两次后分散在乙醇中备用.

1.3 抗体偶联

准备 1mg SMNC@Au-4MBA 探针, 用 pH 值为 6.5 的 MES 缓冲液洗涤上述探针两次并最终分散于 1 mL 的 MES 缓冲液中. 在缓冲液中加入 1.2 mg NHS 和 1.5 mg EDC 并振动 1 h 以活化羧基. 然后利用磁铁将反应完的探针析出并分散于 1 mL 1x PBS 溶液中. 100 μL 抗体 (Anti-PG I -D, Anti-PG II -D 或 R-IgG) 加入到溶液中, 反应 4 h 用于偶联抗体. 再将 100 μL 10% BSA 溶液、200 mg/mL 甘氨酸溶液和

200 mmol/L 乙醇胺溶液加入到上述溶液中,继续振动 1 h. 随后用磁铁将探针标记后的抗体析出并用 PBS 清洗 3 次,最后存放于 1%BSA 溶液中备用.

1.4 免疫层析试纸条的组装

免疫层析试纸条由 PVC 基板、玻璃纤维(样品垫)、NC 膜和吸水纸组成,如图 1b 所示. 所用的玻璃纤维由 1.21% 的 Tris、1% 的 PVP、1% 的 S9、5% 的 T-酪蛋白组成的处理液进行浸泡,然后放置于 37 °C 的鼓风干燥箱干燥 4 h. 利用划膜喷金仪将 0.8 mg/cm 的 Anti-PG I-C、Anti-PG II-C 和 G-IgG 固定在 NC 膜上,分别形成两条测试线(T_1 和 T_2)和质控线(C). 然后将试验卡片放置于 37 °C 烘箱中过夜干燥. 最后,使用切割机将试验卡片裁切成宽度为 4.05 mm 的小条并装配卡壳,干燥保存.

1.5 检测流程

图 1b 展示了基于 SMNC@Au 的多模态 LFIA 的检测方案. 首先将 10 μ L 样品滴加到试管中,然后分别滴加质量浓度为 2 mg/mL 的 SMNC@Au-Anti-PG I-C、4 mg/mL 的 SMNC@Au-Anti-PG II-C 和 1.5 mg/mL 的 SMNC@Au-R-IgG 各 2 μ L,混合大约 1 min 后,使用磁铁富集颗粒并用移液枪吸出原有液体. 随后将样品用 100 μ L 1x PBS 稀释,然后滴加到样品垫上. 15 min 后,即可进行比色信号的观察. 20 min 后,可用自制的手持设备进行磁性模式检测. 在排除残余水分干扰后,可以在拉曼信号检测仪下对表面增强拉曼散射(SERS)信号进行测量.

2 结果与讨论

2.1 检测原理

LFIA 是基于抗原与抗体的特异性结合实现对特定目标分子的识别和捕获. 可根据分子量的大小,使用夹心法或竞争法来检测目标分子. 在本研究中,由于 PG I 和 PG II 的分子量较大,故采用更为合适的夹心法. 在预处理样品时,探针标记的抗体会先和目标结合形成复合物. 当预制备的样品溶液被滴加到样品垫上后,液体将在毛细管力的作用下沿 NC 膜流向吸水垫. 在此过程中,样品中包含有 PG I、PG II 抗原的复合物将分别被固定在两个测试线(T_1 与 T_2)上的 Anti-PG I-C 和 Anti-PG II-C 捕获,形成夹心结构. 不管样品中是否存在 PG I 和 PG II,探针标记的 R-IgG 都将被固定在质控线上的 G-IgG 捕获. 层析完成后,可以通过观察 NC 膜上的线条颜色或检测磁信号或 SERS 信号的强度来实现目标分子浓度的检测. 值得注意的是,本研究的试纸条与传统的免疫层析试纸条的结构不同,通过混合样品和探针进行预处理,不需要使用结合垫,从而精简了试条的结构. 此外,本研究利用探针 SMNC@Au 磁性在外部磁场下对样品进行富集和清洗,这极大地提高了检测灵敏度. 同时,它也为自动化样品预处理系统的集成研发提供了一个思路.

2.2 多模态探针的表征与优化

水热法合成的磁性纳米颗粒的粒径通常为 180~300 nm. 相比于化学共沉淀法,水热法合成的颗粒在磁性、分散性和比表面积方面表现更优. 因此,我们采用水热法来合成 SMNC 作为探针颗粒的核心. 所合成的 SMNC 由粒径非常小的 Fe_3O_4 纳米晶体组成,这不仅使 SMNC 具有超顺磁性,而且有利于金壳的涂覆和抗体的结合. 在其他条件不变的情况下,调整柠檬酸钠的量可以调整合成的 SMNC 粒径大小^[33],SMNC 的饱和磁化强度随着 SMNC 粒径的增大而增加. SMNC 的饱和磁化越强,操作起来越容易,产生的信号越强. 但过大的粒径可能会在免疫层析过程中引起堵塞并影响 LFIA 的结果. 使用扫描电子显微镜(SEM)和动态光散射(DLS)对合成的 SMNC 形貌和尺寸进行表征,结果如图 2a 所示. 可以看到,本研究合成的 SMNC 颗粒的平均粒径为 205 nm, PDI 为 0.018,尺寸分布均匀,金壳的合成采用种子原位生长法. 图 2c 显示了在金壳涂覆过程中纳米颗粒的 Zeta 电位变化. 首先,通过超声波将 PEI 涂覆在 Fe_3O_4 表面. 由于 PEI 中含有大量的胺基团,与 SMNC 相比,SMNC@PEI 的 Zeta 电位急剧增加. 随后,添加金纳米颗粒溶液以提供 Au 种子. 金纳米颗粒带负电,通过静电吸附在 SMNC 周围. 此时,由于仍然有很多胺基团暴露出来,纳米颗粒的电位只是略微降低. 为了得到完整的金壳,以 SMNC 周围吸附的金颗粒为种子,加入 $HAuCl_4$ 还原为金,使 Au 种子不断生长,最终在 SMNC 表面形成了一层不均匀的金壳. 此时纳米颗粒 SMNC@Au 上的胺基被金壳完全包围,Zeta 电位大幅降低. 图 2b 中显示了 SMNC@Au 颗粒的形

貌和大小, 其中的插图均为 SEM 图像. 此外, 对单个 SMNC@Au 进行了 EDS 线性扫描(图 2d), 可以发现金元素的相对强度在颗粒边缘较高, 在中心较低, 而铁元素的分布与金恰恰相反, 这证明金已成功涂覆在 SMNC 上. 最后, 测试了 SMNC 和 SMNC@Au 的磁化曲线(图 2e), 结果显示合成的颗粒无剩磁, 饱和磁化强度分别达到 73.9 emu/g 和 51.5 emu/g. 这表明本研究合成的探针保持了高饱和磁化强度.

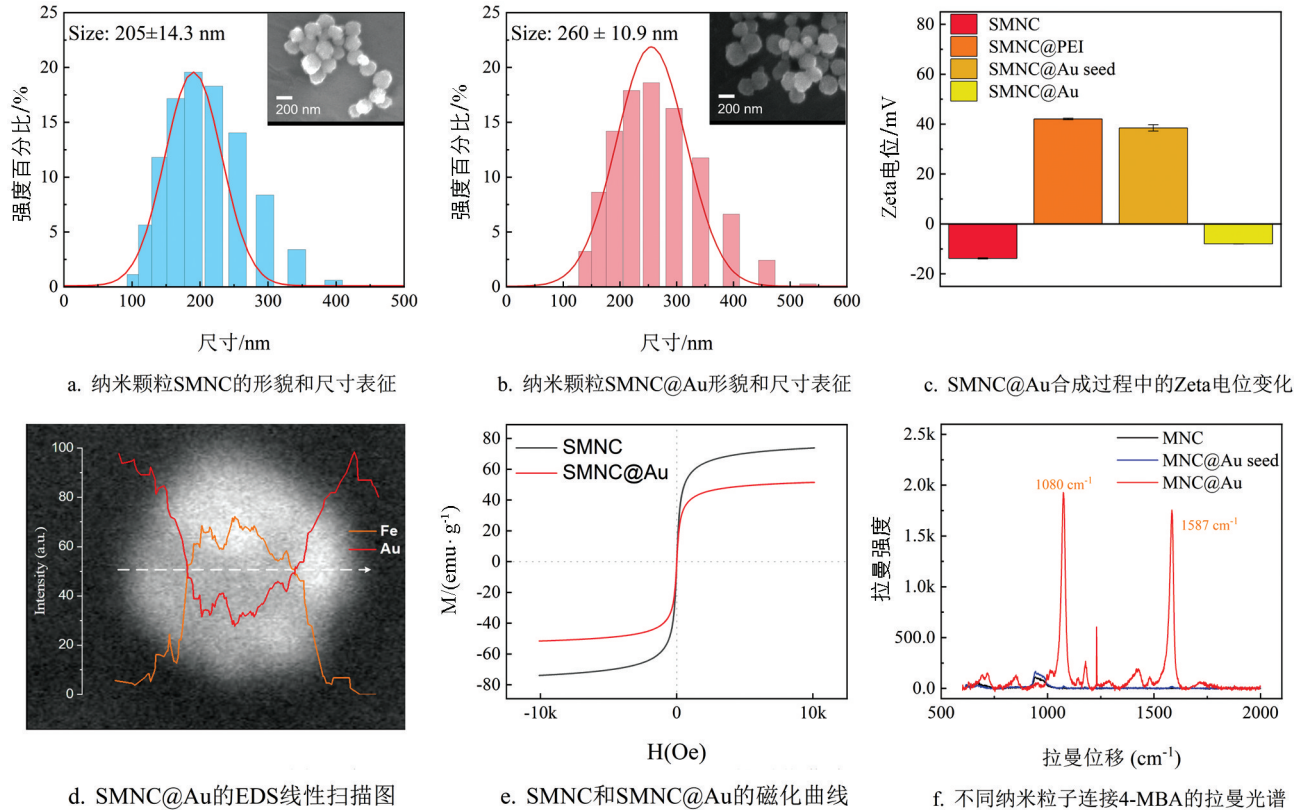


图 2 多模态探针的性能表征

产生独特且强大的拉曼信号需要两个条件: 报告分子和合适的基底. 过去的研究表明, 不均匀的胶体金表面可以显著增强拉曼信号. 本研究选择 4-MBA 作为拉曼报告分子, 因为它具有 3 个优势: 一是 4-MBA 含有硫醇基团, 可以轻易地与金壳反应形成金-硫键, 使 4-MBA 能稳定地绑定在 SMNC@Au 表面; 二是 4-MBA 的苯环振动可以产生独特的拉曼信号, 且能被胶体金增强; 三是 4-MBA 的生物相容性强, 它含有暴露的羧基, 激活后可以轻易地与蛋白质的胺基团结合. 为了证明 SMNC@Au 的 SERS 效应, 本研究分别将 0.5 mg 的 SMNC、SMNC@Au seed 和 SMNC@Au 分散在 1 mL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-MBA 溶液中, 混合均匀后, 用乙醇洗涤纳米颗粒 3 次. 然后测试了它们的拉曼信号, 结果如图 2f 所示. 4-MBA 标记的 SMNC@Au 颗粒在 4-MBA 特征峰处(1 080 cm^{-1} 和 1 587 cm^{-1})显示出强烈的信号, 证明了其显著的增强作用. 相比之下, SMNC 颗粒不能与 4-MBA 反应, 在清洗后表面没有报告分子附着, 因此无法检测到 4-MBA 的特征峰. SMNC@Au 种子表面吸附了少量的金纳米颗粒, 可以与 4-MBA 结合, 因此在拉曼信号光谱中可以观察到弱的特征峰.

2.3 多模态 LFIA 系统检测性能

为了验证本研究开发的比色—磁—拉曼多模态 LFIA 系统的性能, 使用一系列不同质量浓度的 PG I 和 PG II 的溶液样本进行测试. 根据人血清中 PG I 和 PG II 的质量浓度范围(PG I: 32.69~129.35 ng/mL; PG II: 3.51~20.68 ng/mL)^[36-39], 分别设置了 6 个不同质量浓度的 PG I (1, 10, 50, 100, 200, 500 ng/mL) 和 PG II (0.1, 1, 10, 20, 50, 100 ng/mL) 的溶液样本, 每个样本测试 3 次. 图 3 显示了层析的比色检测结果. 可以看到随着样本质量浓度的增加, T 线的颜色逐渐变深, 而 C 线的颜色基本保持不变. 通过肉眼观察得到 PG I 和 PG II 的视觉检测限分别为 10 ng/mL 和 1 ng/mL.

对于磁信号的检测, 采用课题组之前研究自制的微型检测仪^[22]进行分析, 该仪器能够自动扫描试纸条

上每点的磁强度, 从样本到结果整个检测时间低于 20 min. 记录不同质量浓度的 PG I 和 PG II 样本的磁模态信号, 如图 4a 和 4d 所示. 在 T 线和 C 线的位置可以观察到明显的磁信号峰, C 线处的磁信号强度几乎不变, 而 T 线的信号强度随着样本质量浓度的降低而减小, 当样本质量浓度过低时, 磁信号几乎淹没在噪声中. 以样本质量浓度为 X 轴, T/C 值为 Y 轴对其进行了拟合分析, 结果如图 4b 和 4e 所示, 两者呈对数关系. 对质量浓度进行对数变换, 得到了质量浓度和 T/C 值之间的线性拟合曲线(图 4c 和 4f), 其相关系数 R^2 分别为 0.973 1(PG I)和 0.970 1(PG II), 表明两者高度相关. 目前, 一般将检测限(LOD)定义为信噪比 3 : 1 时的质量浓度. 因此, 本研究使用空白样本评估了磁模态检测下系统的 LOD, PG I 和 PG II 的 LOD 分别为 0.5 ng/mL 和 0.1 ng/mL.

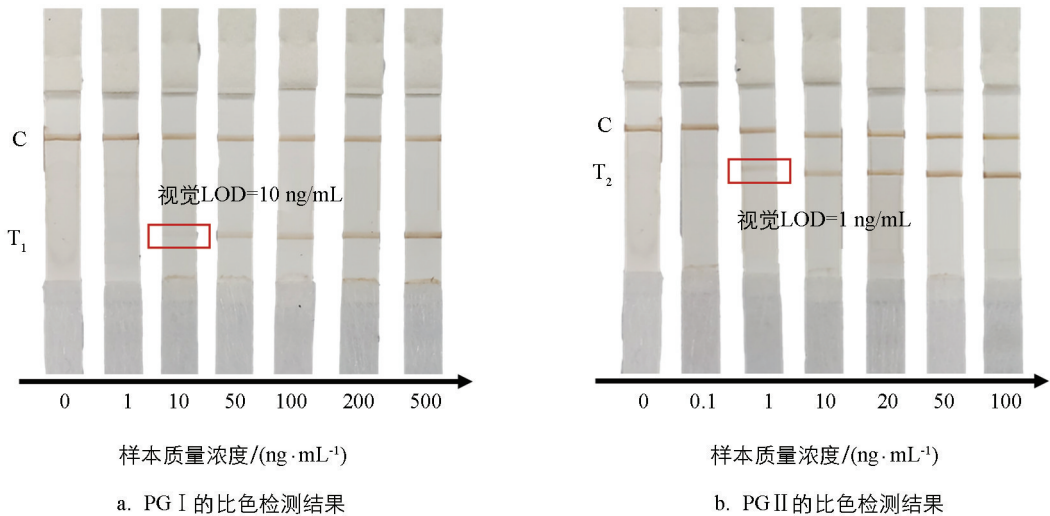


图 3 比色检测结果

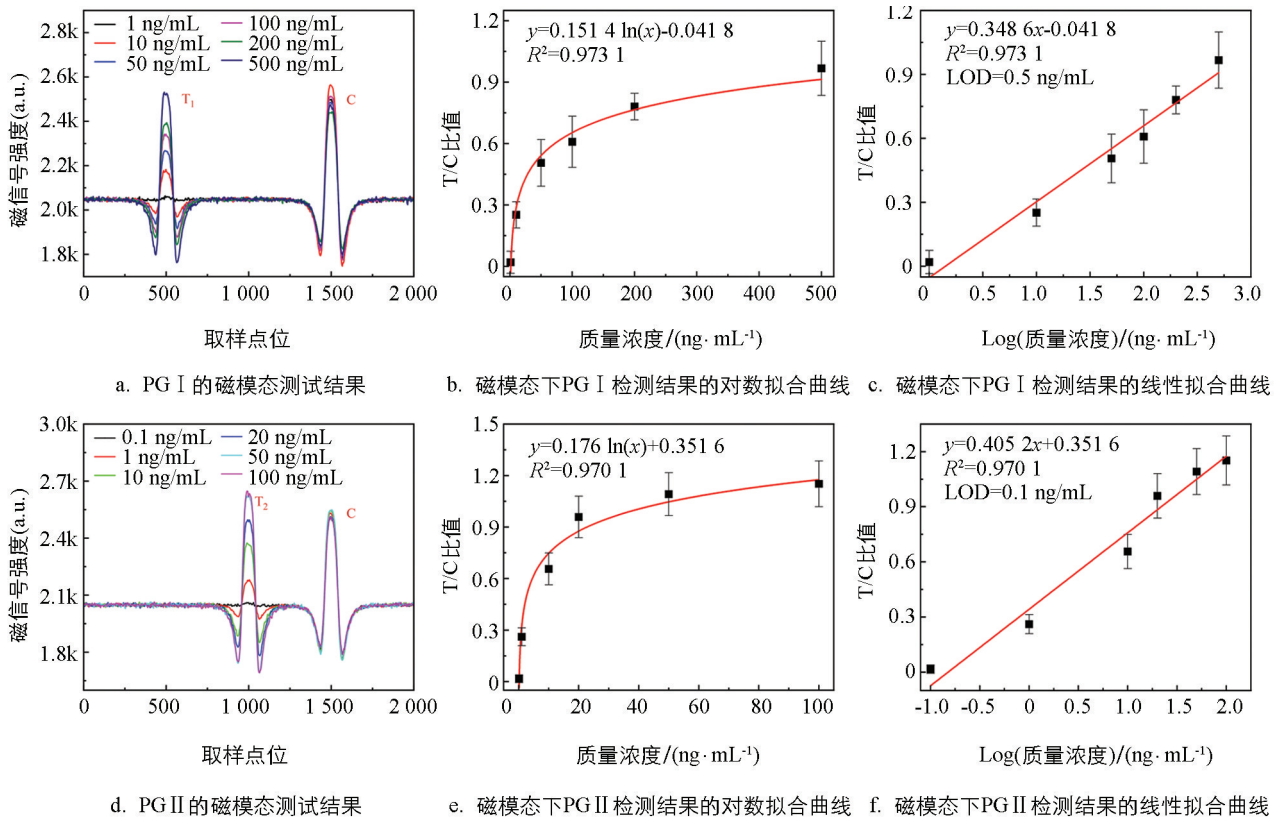


图 4 磁模态的检测结果

为了准确地检测 SERS 信号,本研究沿试纸条流动方向均匀选取 3 个区域进行拉曼映射,每个区域包含 52 个均匀分布的点. 以这 3 个区域获得的 1587 cm^{-1} 处的拉曼信号的平均值作为有效测量信号来评估拉曼模式的检测性能. 图 5 显示了拉曼模式下的测试结果. 可以看到,相比于磁模式,拉曼检测的性能表现更好. PG I 和 PG II 的线性相关系数 R^2 分别为 0.996 0 和 0.995 5, LOD 分别到达了 0.1 ng/mL 和 0.05 ng/mL . 值得注意的是,拉曼模式获得准确检测结果耗时更长,大约需要 3 h,而磁信号测试只需约 20 min.

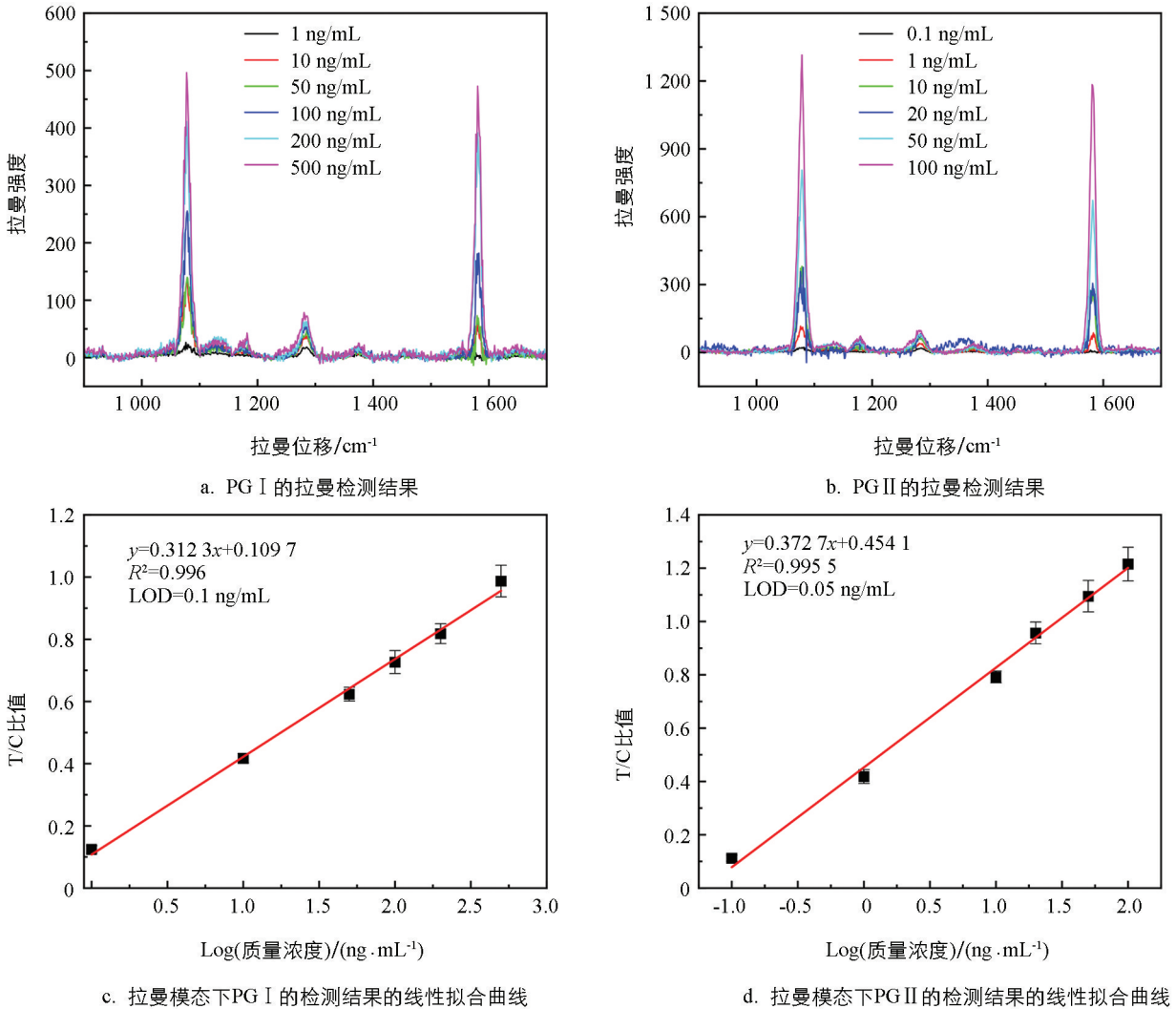


图 5 拉曼模式的检测结果

此外,使用特定质量浓度的样本来验证检测的准确性以及两种抗原之间是否存在内源性交叉反应,每个样本测试 5 次. 比色结果(图 6)显示,两条 T 线上的颜色深度与样品质量浓度呈正相关,这证明了 PG I 和 PG II 之间没有内源性交叉反应. 本研究统计了两种定量模式的重复性和准确度数据,详细统计结果如表 1 所示. 磁模式下,PG I 和 PG II 样本 5 次重复测试的变异系数(CV)分别为 8.4%~18.7%和 11.4%~21.0%,准确度分别为 80.3%~108.6%和 80.6%~110.1%. 而拉曼模式下,PG I 和 PG II 样本 5 次重复测试的变

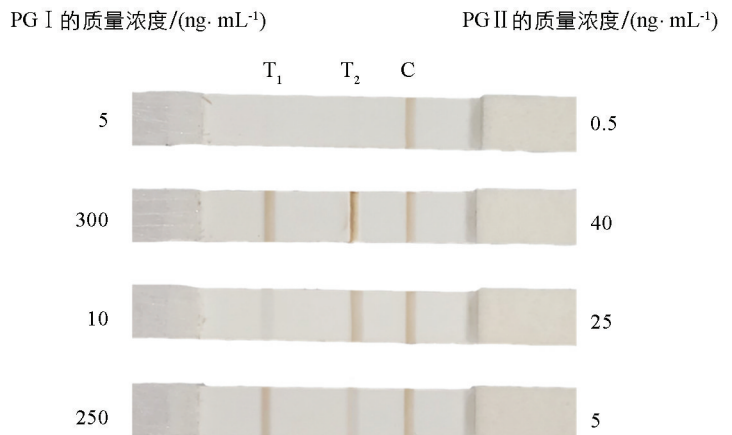


图 6 PG I 和 PG II 的交叉反应结果

异系数分别为 3.4%~6.8%和 3.2%~13.2%,准确度分别为 97.7%~104.5%和 95.6%~106.0%.

表 1 两种定量模式下的重复性和准确度测试

真实质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	磁模式			拉曼模式			
	测量值/ (ng·mL ⁻¹)	CV/% (n=5)	准确度/ %	测量值/ (ng·mL ⁻¹)	CV/% (n=5)	准确度/ %	
PG I	5	6.2±1.15	18.5	80.3	5.12±0.35	6.8	102.4
	300	276.3±23.25	8.4	108.6	293.22±10.77	3.7	97.7
	10	11.39±2.31	18.7	87.8	10.45±0.69	6.6	104.5
	250	237.46±17.74	7.5	105.3	247.26±8.38	3.4	98.9
PG II	0.5	0.62±0.13	21.0	80.6	0.53±0.07	13.2	106.0
	40	36.32±3.76	10.4	110.1	38.24±1.33	3.5	95.6
	25	24.32±2.77	11.4	102.8	24.67±0.78	3.2	98.7
	5	5.70±1.03	18.1	87.7	5.16±0.33	6.4	103.2

表 2 列出了本研究方法和一些其他免疫层析方法的性能比较. 与其他免疫层析方法相比,磁模式在相近的时间内实现了更优的检测性能,同时,本研究的仪器操作简单且造价便宜,在社区筛查和家庭自测的应用环境中具有巨大的潜力. 而拉曼模式的检测精度可以媲美实验室方法,从而满足医院诊断的更高要求.

表 2 不同检测方法的性能比较

方法	检测范围/(ng·mL ⁻¹)		LOD/(ng·mL ⁻¹)		检测时间
	PG I	PG II	PG I	PG II	
比色法	/	/	10	1	15 min
磁模式	1~500	0.1~100	0.5	0.1	20 min
拉曼模式	1~500	0.1~100	0.1	0.05	3 h
荧光 ^[37]	10~210	3~63	2.6	1.0	15 min
荧光 ^[38]	0.5~500	0.5~500	3	3	15 min
时间分辨荧光 ^[39]	3.5~328	2~55	0.125	0.05	>2 h

3 结论

本研究成功合成了一种具有磁性和表面增强拉曼散射(SERS)效应的多功能纳米探针,并基于此探针开发了用于同时检测胃癌标志物 PG I 和 PG II 的多模态 LFIA. 该检测平台可以同时有效地输出比色、磁和拉曼三重信号,并同时提供两种目标分子的一个定性和两个定量的检测结果,允许用户根据不同的测试条件灵活选择应用模式,以适应不同的场景和要求. 上述研究结果表明,这种多模态检测方法为侧流免疫层析检测提供了更加灵活高效的平台.

参考文献:

- [1] THRIFT A P, WENKER T N, EL-SERAG H B. Global Burden of Gastric Cancer: Epidemiological Trends, Risk Factors, Screening and Prevention [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20(5): 338-349.
- [2] 许永虎,徐大志. 21世纪以来胃癌治疗进展及未来展望 [J]. *中国癌症杂志*, 2024, 34(3): 239-249.
- [3] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric Cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [4] MORGAN E, ARNOLD M, CAMARGO M C, et al. The Current and Future Incidence and Mortality of Gastric Cancer in 185 Countries: A Population-Based Modelling Study [J]. *E-Clinical Medicine*, 2022, 47: 101404.
- [5] FARZIN L, SHAMSIPUR M. Recent Advances in Design of Electrochemical Affinity Biosensors for Low Level Detection of Cancer Protein Biomarkers Using Nanomaterial-Assisted Signal Enhancement Strategies [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 185-210.

- [6] MANSOUR-GHANAIE F, JOUKAR F, BAGHAEE M, et al. Only Serum Pepsinogen I and Pepsinogen I/II Ratio are Specific and Sensitive Biomarkers for Screening of Gastric Cancer [J]. *Biomolecular Concepts*, 2019, 10(1): 82-90.
- [7] CHEN X G. Analysis of Methamphetamine in Human Urine Using Ionic Liquid Dispersive Liquid-Phase Microextraction Combined with HPLC [J]. *Chromatographia*, 2015, 78(7): 515-520.
- [8] 付梅, 申春琴, 汪政希, 等. 超高液相色谱-串联质谱法测定贝类组织中环境雄激素睾酮的前处理方法优化 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2023, 45(6): 116-124.
- [9] KONISHI N, MATSUMOTO K, HIASA Y, et al. Tissue and Serum Pepsinogen I and II in Gastric Cancer Identified Using Immunohistochemistry and Rapid ELISA [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1995, 48(4): 364-367.
- [10] GJERDE H, HASVOLD I, PETTERSEN G, et al. Determination of Amphetamine and Methamphetamine in Blood by Derivatization with Perfluorooctanoyl Chloride and Gas Chromatography/Mass Spectrometry [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 1993, 17(2): 65-68.
- [11] GUO J C, CHEN S Q, TIAN S L, et al. 5G-Enabled Ultra-Sensitive Fluorescence Sensor for Proactive Prognosis of COVID-19 [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 181: 113160.
- [12] 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 and Technology*, 2021, 60: 90-104.
- [13] CHENG J, YANG G P, GUO J C, et al. Integrated Electrochemical Lateral Flow Immunoassays (eLFIA): Recent Advances [J]. *The Analyst*, 2022, 147(4): 554-570.
- [14] SURYOPRABOWO S, LIU L Q, KUANG H, et al. Fluorescence Based Immunochromatographic Sensor for Rapid and Sensitive Detection of Tadalafil and Comparison with a Gold Lateral Flow Immunoassay [J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128255.
- [15] WANG C W, CHENG X D, LIU L Y, et al. Ultrasensitive and Simultaneous Detection of Two Specific SARS-CoV-2 Antigens in Human Specimens Using Direct/Enrichment Dual-Mode Fluorescence Lateral Flow Immunoassay [J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2021, 13(34): 40342-40353.
- [16] WU Z Z, HE D Y, XU E B, et al. Rapid Detection of B-Conglutinin with a Novel Lateral Flow Aptasensor Assisted by Immunomagnetic Enrichment and Enzyme Signal Amplification [J]. *Food Chemistry*, 2018, 269: 375-379.
- [17] HU J, JIANG Y Z, TANG M, et al. Colorimetric-Fluorescent-Magnetic Nanosphere-Based Multimodal Assay Platform for Salmonella Detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(1): 1178-1184.
- [18] YANG S S, DU J Y, WEI M L, et al. Colorimetric-Photothermal-Magnetic Three-in-One Lateral Flow Immunoassay for Two Formats of Biogenic Amines Sensitive and Reliable Quantification [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1239: 340660.
- [19] YANG H Y, HE Q Y, LIN M X, et al. Multifunctional Au@Pt@Ag NPs with Color-Photothermal-Raman Properties for Multimodal Lateral Flow Immunoassay [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 435: 129082.
- [20] LIANG J J, WU L, WANG Y Q, et al. SERS/Photothermal-Based Dual-Modal Lateral Flow Immunoassays for Sensitive and Simultaneous Antigen Detection of Respiratory Viral Infections [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 389: 133875.
- [21] YANG G P, CHENG K X, CHU Z K, et al. A Miniaturized Giant Magnetic Resistance System for Quantitative Detection of Methamphetamine [J]. *Analyst*, 2021, 146(8): 2718-2725.
- [22] CHU Z K, FU M M, GUO J C, et al. Magnetic Resistance Sensory System for the Quantitative Measurement of Morphine [J]. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 2021, 15(1): 171-176.
- [23] QUESADA-GONZÁLEZ D, MERKOÇI A. Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 73: 47-63.
- [24] LI Z Q, ZHANG W, ZHANG Q, et al. Self-Assembly Multivalent Fluorescence-Nanobody Coupled Multifunctional Nanomaterial with Colorimetric Fluorescence and Photothermal to Enhance Immunochromatographic Assay [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(19): 19359-19371.
- [25] WANG Z X, ZOU R B, YI J H, et al. "Four-in-one" Multifunctional Dandelion-Like Gold@platinum Nanoparticles-

- Driven Multimodal Lateral Flow Immunoassay [J]. *Small*, 2024: 2310869.
- [26] RAY P C, KHAN S A, SINGH A K, et al. Nanomaterials for Targeted Detection and Photothermal Killing of Bacteria [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(8): 3193-3209.
- [27] WANG Z T, WANG M L, WANG X X, et al. Photothermal-Based Nanomaterials and Photothermal-Sensing: An Overview [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 220: 114883.
- [28] FU X L, CHENG Z Y, YU J M, et al. A SERS-Based Lateral Flow Assay Biosensor for Highly Sensitive Detection of HIV-1 DNA [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 78: 530-537.
- [29] LIU H F, DAI E H, XIAO R, et al. Development of a SERS-Based Lateral Flow Immunoassay for Rapid and Ultra-Sensitive Detection of Anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG in Clinical Samples [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 329: 129196.
- [30] LIU X Y, WANG K, CAO B, et al. Multifunctional Nano-Sunflowers with Color-Magnetic-Raman Properties for Multimodal Lateral Flow Immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(7): 3626-3634.
- [31] LIANG M J, CAI X F, GAO Y Y, et al. A Versatile Nanozyme Integrated Colorimetric and Photothermal Lateral Flow Immunoassay for Highly Sensitive and Reliable *Aspergillus Flavus* Detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 213: 114435.
- [32] HUANG Z, PENG J, HAN J J, et al. A Novel Method Based on Fluorescent Magnetic Nanobeads for Rapid Detection of *Escherichia Coli* O157: H7 [J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 333-341.
- [33] LIU J, SUN Z K, DENG Y H, et al. Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups [J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2009, 48(32): 5875-5879.
- [34] ZHANG C Y, WANG C W, XIAO R, et al. Sensitive and Specific Detection of Clinical Bacteria via Vancomycin-Modified $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ Nanoparticles and Aptamer-Functionalized SERS Tags [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(22): 3751-3761.
- [35] FANG Y X, GUO S J, ZHU C Z, et al. Self-Assembly of Cationic Polyelectrolyte-Functionalized Graphene Nanosheets and Gold Nanoparticles: A Two-Dimensional Heterostructure for Hydrogen Peroxide Sensing [J]. *Langmuir*, 2010, 26(13): 11277-11282.
- [36] ZHANG L, NIU Y, LV Y J, et al. Preliminary Study on Reference Interval of Serum Pepsinogen in Healthy Subjects [J]. *Patient Preference and Adherence*, 2021, 15: 2725-2730.
- [37] 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.
- [38] WU F, MAO M, CEN Y, et al. Copolymerization of $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{Phen}$ Doped Styrene and Methyl Methacrylate Nanoparticles and Use in Quantitative Detection of Pepsinogen [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(20): 12217-12223.
- [39] HUANG B, XIAO H L, ZHANG X R, et al. Ultrasensitive Detection of Pepsinogen I and Pepsinogen II by a Time-Resolved Fluoroimmunoassay and Its Preliminary Clinical Applications [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 571(1): 74-78.

责任编辑 包颖
崔玉洁