

文章编号: 1005-5630(2025)01-0058-07

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.202312200138

# 基于环境病毒检测仪的量子点免疫层析试纸条的研究

吴向阳, 郑璐璐

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

**摘要:** 近年来甲型 H1N1 流感、埃博拉、乙型流感、新冠病毒等突发的具有传染性的重大疫情, 给人类的健康带来了很大影响, 因此针对环境病毒的检测和预防变得至关重要。而免疫层析试纸条技术作为一种能够实现病毒快速检测的新兴技术, 相较于酶联免疫吸附实验具有普适性和特异性强等优点, 解决了传统的病毒抗原检测流程复杂、时间长等问题, 同时也为环境监测提供了一种新的发展方向。然而, 传统的免疫层析试纸条存在检测指标单一、检测限高等缺点。基于免疫层析试纸条和量子点荧光纳米微球, 设计了一种量子点荧光免疫层析试纸条, 它具有光稳定性好、亮度高和检测限低的特点。通过仪器配套的荧光检测模块进行分析和检测时, 量子点荧光纳米微球的激发光可快速检测出环境中的病毒。该方法操作简单、数据稳定, 为环境病毒检测提供了一种新思路。

**关键词:** 环境病毒检测; 免疫层析技术; 量子点荧光纳米微球; 试纸条

**中图分类号:** TB 39 **文献标志码:** A

## Research on quantum-dot immunochromatographic test strip based on environmental virus detector

WU Xiangyang, ZHENG Lulu

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** In recent years, major infectious outbreaks such as influenza A (H1N1), Ebola, influenza B, and novel coronavirus have had a huge impact on human health and safety, so the detection and prevention of environmental viruses is crucial. As an emerging technology that can rapidly detect viruses, immunochromatographic strip technology has the advantages of universality and strong specificity compared with ELISA, which solves the problems of complicated and long time of traditional viral antigen detection process, and also provides a new development direction for environmental monitoring. However, the traditional immunochromatographic test strips have the

收稿日期: 2023-12-20

第一作者: 吴向阳 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微流控芯片。

E-mail: [w15560192190@163.com](mailto:w15560192190@163.com)

通信作者: 郑璐璐 (1982—), 女, 教授, 研究方向为医用光学和微纳加工。E-mail: [llzheng@usst.edu.cn](mailto:llzheng@usst.edu.cn)

disadvantages of single detection index and high detection limit. Based on immunochromatographic strips and quantum dot fluorescence nanospheres, a quantum dot fluorescence immunochromatographic strip was designed in this study, which has the characteristics of good photostability, high brightness, and low detection limit. By using the fluorescence detection module of the supporting instrument for analysis and detection, viruses in the environment can be quickly detected based on the excitation light of quantum dot fluorescent nanospheres. The operation is simple and the data is stable, providing a new approach for environmental virus detection.

**Keywords:** environmental virus detection; immunochromatography; quantum dot fluorescent nanospheres; test strip

## 引 言

全球自 2020 年至今, 确诊新冠病例超过 7.525 亿例, 其中包括 680 万例死亡病例。庞大的数字令人触目惊心。而当前全球新冠肺炎、甲流、乙流等疫情仍处于大流行阶段, 每年全球范围内约有 10 亿例季节性流感病例, 包括 300 万~500 万例重症病例。季节性流感每年导致约 65 万人死亡。5 岁以下儿童中, 99% 的下呼吸道感染的流感死亡病例发生在发展中国家。可见呼吸道感染是最简单且高效的感染方式。环境空气的安全问题已经严重影响到公众健康、经济发展和社会秩序等诸多方面。目前人类越来越需要重视生物安全, 尤其是未知的病毒对人类健康安全、生态环境安全等带来的不利影响<sup>[1-2]</sup>。

生物气溶胶是指空气中带有生物性粒子的颗粒<sup>[3-4]</sup>, 这些气溶胶大多数带有不同种类的病毒和微生物, 因此具有明显的传染性与致敏性。而且气溶胶颗粒悬浮在空气中很容易被吸入体内, 通过呼吸道途径传播疾病, 即所谓的“病从鼻入”, 对人类健康有很大影响。在对抗传染病的斗争中, 已经证实多种传染性能够通过气溶胶传播。因此针对环境中携带病毒微生物的生物气溶胶的采集变得至关重要。近年来市面上涌现出越来越多的环境病毒气溶胶富集检测仪器<sup>[5]</sup>, 给环境病毒监测领域做出了巨大的贡献。而配套使用的各种检测试纸条也越来越多<sup>[6-9]</sup>, 原理也不尽相同。在这期间免疫荧光层析技术脱颖而

出, 它具有灵敏度高、特异性强等优点, 能够实现快速检测, 随着标记固相材料技术的发展, 能够实现定量检测、多重检测等, 具有良好的应用前景。

免疫层析技术<sup>[10]</sup>利用免疫学原理, 结合抗原抗体的特异性反应, 实现目标标志物的检测。以有固定 T 线(检测线)、C 线(控制线)的纤维膜材料层析试纸作为固定相, 待检测的混合液作为流动相, 当流动的待测液流动相经过 T 线时, 抗原与抗体发生特异性反应, 完成目标组分分离。其较低的检测成本与快速便携的特点, 使得面向家庭的检测成为可能。此外量子点荧光纳米微球<sup>[11-12]</sup>作为荧光探针标记病毒标志物, 由于其荧光波长可调、激发光谱宽、量子产率高、发射强度高且稳定等优点, 在过去的几十年中已逐渐成为生物领域重要的荧光标记材料, 其优异的发光性能和独特的光稳定性可以赋予检测结果高精度和灵敏度。

本文设计了一种量子点荧光纳米微球免疫层析试纸条, 其中包括: 底板, 以及依次设置在底板上的样品垫、复合型结合垫、反应垫以及吸水垫, 其中样品垫用于加载样本, 复合型结合垫设有量子点荧光纳米微球标记的病毒检测克隆抗体。通过环境病毒检测仪器将空气中的病毒目标物富集到样品溶液中并加载到试纸条上进行检测, 最终分析出对应的不同病毒目标物。本研究选取了 3 种病毒作为检测目标: 新冠病毒(COVID-19)、甲型流感病毒(Influenza A Virus)和乙型流感病毒(Influenza B Virus)。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

N-羧基琥珀酰亚胺磺酸钠盐(磺基-NHS)购置于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。量子点荧光纳米微球-625由珈源量子点提供。磷酸盐缓冲溶液(peptone buffered solution, PBS)购于武汉赛维尔生物科技有限公司。样品垫与结合垫购于上海杰一生物技术有限公司,吸水垫与PVC底板由南京微测生物科技有限公司提供,硝酸纤维素膜购于上海赛多利斯公司。实验过程中所用到的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)从中国索莱宝公司购买。

实验中所用的主要仪器有环境病毒检测仪(自研)、Millipore超纯系统(德国), Beckman Coulter高速冷冻离心机(美国),超声波仪器(中国), Tecan Spark多功能酶标仪(瑞士)。

### 1.2 样品的梯度稀释

首先,使用蒸馏水或去离子水对样品稀释液进行1:10倍的稀释;接着,用样品稀释液将样品做1:5倍的稀释;然后制备标准液:提前准备好8个1.5 mL离心管,第1管中加入900  $\mu\text{L}$

样品稀释液,第2至第8管中加入同体积的样品稀释液500  $\mu\text{L}$ 。将2000 ng/mL的100  $\mu\text{L}$ 样品溶液加入第1管中,并在漩涡混合器上充分混合,然后用移液枪吸取500  $\mu\text{L}$ 加入第2管中。重复此操作以作对半稀释,在第7管中吸出500  $\mu\text{L}$ 并丢弃至废液缸内,第8管则为空白对照,并在37  $^{\circ}\text{C}$ 的黑暗处放置15 min。最后向每个试纸条的样品孔加入100~200  $\mu\text{L}$ 的被梯度稀释的样品溶液,并充分反应。最后,使用成像系统对条带进行曝光以进行显色,并观察条带的C线和T线。

### 1.3 量子点荧光纳米微球标记检测抗体

首先将10  $\mu\text{L}$ 量子点荧光纳米微球分散至MES(2-Morpholinoethanesulphonic acid)溶液中并离心。离心后分离上层清液再将其重新加入MES溶液中并进行超声分散。之后分别配置10 mg/mL的EDC溶液与NHS溶液,加入至MES溶液中,充分混合后离心。离心结束后分离上层清液并加入1 mL抗体稀释液,与目标检测抗体溶液混合后孵育1.5 h。孵育完成后加入20% BSA溶液封闭,再次离心后分离量子点荧光纳米微球,并复溶于含有10%蔗糖,5%海藻糖与1% BSA的混合液中,在4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用,如图1所示。

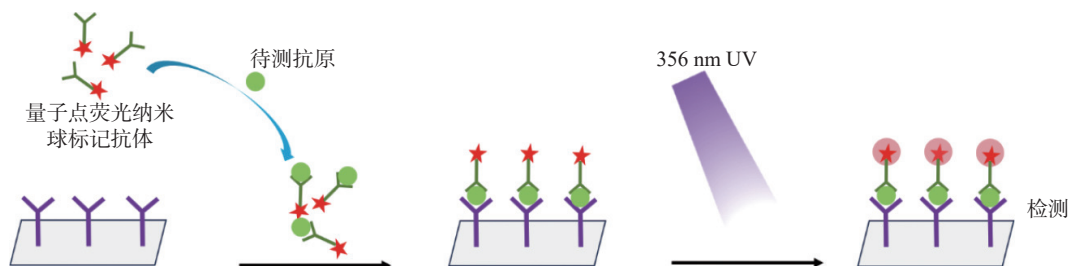


图 1 量子点荧光微球标记抗体流程图

Fig. 1 Flow chart of antibodies labeled by quantum dot fluorescent microspheres

### 1.4 免疫层析试纸条的制备

免疫层析试纸条由样品垫、结合垫、吸水垫、硝酸纤维素膜(反应垫)与PVC底板构成。首先在PVC底板上粘贴硝酸纤维素膜,在一端粘贴样品垫与结合垫,另一端粘贴吸水垫。预先配置好由含有0.1%蔗糖的PBS缓冲液稀释的山羊抗小鼠IgG溶液,使用划膜喷金仪将上述溶

液均匀预置在硝酸纤维素膜上形成C线,以同样过程处理新冠病毒COVID-19(其余病毒的捕获抗体均采用本方法)捕获抗体溶液形成T线[如图2(a)所示]。将其置于37  $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥后裁切为宽度均匀的免疫层析试纸条以备使用。制作好的量子点荧光纳米微球免疫层析试纸条配套环境病毒分析仪使用,试纸条由转盘装置

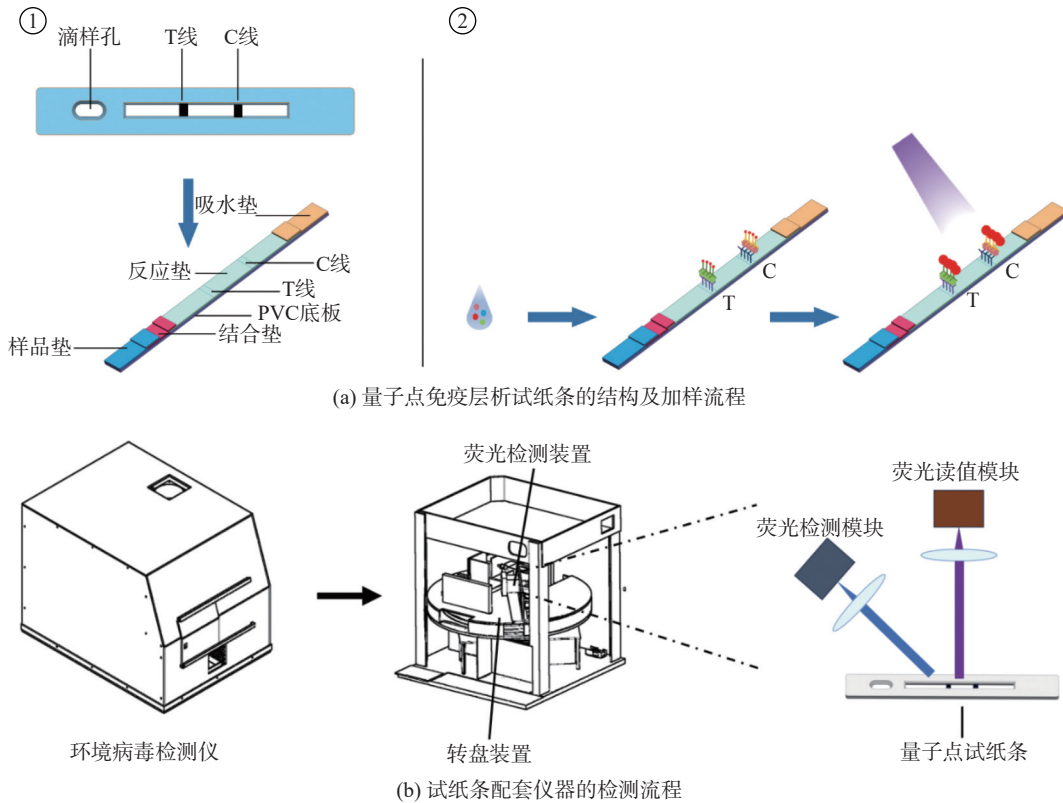


图 2 量子点免疫层析试纸条的结构及检测流程

Fig. 2 Structure and detection process of quantum-dot immunochromatographic test strip

精准运送到荧光检测装置下方, 由该装置进行荧光读取, 由分析装置分析荧光值并辨别病毒类别 [ 见图 2(b) ]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光强度与样品质量浓度的关系

为检测所设计研发的试纸条在不同的样品浓度下荧光强度的变化情况, 选取了 COVID-19 重组 N 蛋白作为检测荧光强度变化的样品, 初始质量浓度为 2 μg/mL。梯度稀释完成后将稀释样品逐个加载到试纸条上, 待完全反应后记录试纸条的荧光强度。如图 3 所示, 可明显观察到不同样品质量浓度下的荧光强度变化。

### 2.2 最小检测时间

为了检测试纸条对不同病毒样本检测的反应速度, 本研究选取能够覆盖不同检测质量浓度水平 (pg 级到 mg 级) 以及检测范围较宽的检测项

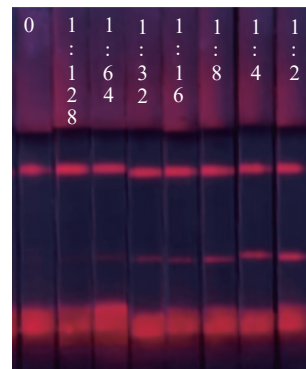


图 3 COVID-19 重组 N 蛋白荧光强度梯度图  
Fig. 3 Fluorescence intensity gradient of recombinant N protein from COVID-19

目, 如: COVID-19 重组 N 蛋白、甲型流感抗原、乙型流感抗原。这些选择的检测项目涵盖了当前热点病毒, 跨越了不同浓度水平和检测范围。

使用上述 3 种标准品作为环境病毒气溶胶样品, 并用样品稀释液将生物气溶胶标准品进行适当稀释, 最终得到 1000 倍稀释的样本。随后取 100 μL 样本溶液滴入到试纸条中并由环境病毒



检测仪读取数值。每隔 5 min 检测一次，并持续记录 3 h 内所测的样本数值。通过分析得出数值稳定后的最小时间作为测试的时间，从而确保在不同质量浓度水平的准确检测，以及找到恰当的

检测时间窗口。表 1、2、3 是测得的时间与质量浓度的数据表，从表中可知 1000 倍稀释的样本 20 min 后样本数值达到最大值且数值趋于稳定，时间曲线如图 4 所示。

表 1 检测时间浓度关系表(COVID-19 重组 N 蛋白)

Tab. 1 Detection time concentration relationship table(COVID-19 recombinant N protein)

t/min	5	10	15	20	25	30	60	120	180
数值/(a.u)	5 141.7	13 245.5	27 861.0	29 637.0	29 374.1	27 863.0	28 379.6	29 399.3	28 444.0

表 2 检测时间浓度关系表(乙型流感抗原)

Tab. 2 Time concentration correlation table(Influenza B antigen)

t/min	5	10	15	20	25	30	60	120	180
数值/(a.u)	11 234	11 329.5	11 455.7	11 218.3	11 178.1	11 405.8	11 397.5	11 121.6	11 254.1

表 3 检测时间浓度关系表(甲型流感抗原)

Tab. 3 Test time concentration relationship table(Influenza A antigen)

t/min	5	10	15	20	25	30	60	120	180
数值/(a.u)	4 947.8	4 950.4	4 959.0	4 994.9	4 983.3	4 961.3	4 978.9	4 980.0	4 970.1

### 2.3 重复性检测

为了验证试纸条的可靠性和稳定性，本研究进行了重复性测试。使用样品稀释液将 3 种环境病毒气溶胶标准品进行 1 : 100 稀释，并将标准品溶液滴到试纸条中，待 20 min 后使用环境病毒检测仪检测 20 次，输出读取的数值。图 5 是 COVID-19 重组 N 蛋白、乙型流感抗原和甲型流感抗原 3 种病毒样品的重复性测试结果统计图，结果显示重复 20 次的结果基本趋于平稳。

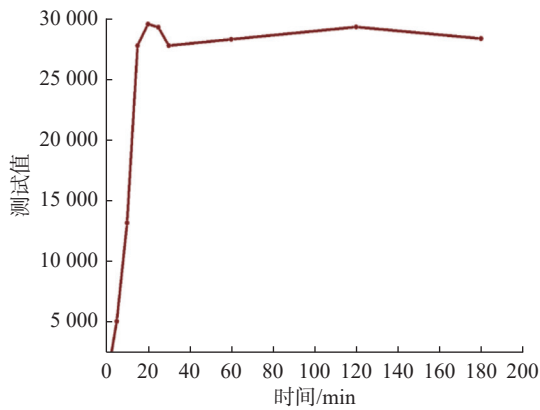
### 2.4 时间稳定性检测

为了验证试纸条的时间稳定性，选取了 3 个不同病毒样品的 1 : 100 稀释浓度样品溶液进行测试，将溶液分别加载到试纸条上并充分反应。待其处于稳定状态后，重复测试并记录各试纸条的荧光强度读取数值。在 3 h 内重复测试各样品 10 次，以第 1 轮的测定结果作为基准值。如图 6 所示，(a)、(b)、(c)分别是 COVID-19 重组 N 蛋白、乙型流感抗原、甲型流感抗原在 1 : 100 的稀释浓度下的时间稳定性图。由图 6

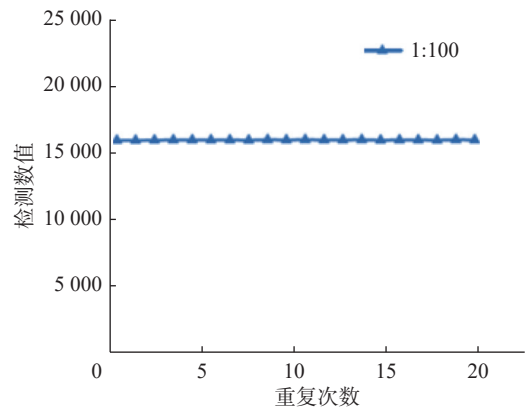
可见，20 min 后的测量荧光强度数值与 20 min 时测得的荧光强度数值波动范围并不剧烈，3 种标准品均有良好的时间稳定性，偏差最大的是乙型流感抗原，在 180 min 时的偏差是 0.05%，综合可见稳定性良好。

## 3 结 论

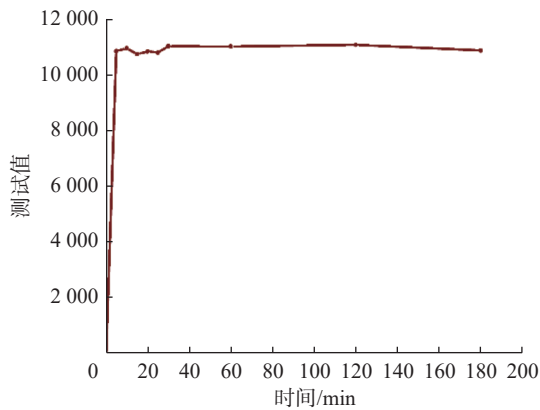
本研究利用免疫层析试技术，采用量子点荧光纳米微球作为新型标记物，设计了一种新型的免疫层析试纸条，并开发出一种环境病原体检测技术。这项技术的核心是利用不同颜色的量子点荧光纳米微球，每种量子点荧光纳米微球都标记有特定的抗体，能够针对不同的病原体进行检测。通过与环境病毒检测仪器的紫外荧光分析模块配合使用，可以快速、准确地检测出目标病原体。选取了 3 种常见的病原体作为目标物：新冠病毒 COVID-19、乙型流感和甲型流感。针对试纸条的荧光强度、最小检测时间、可重复性以及时间稳定性进行了深入的验证。实验结果表明，该试纸条具有较小的检测时间，可在不同场所下



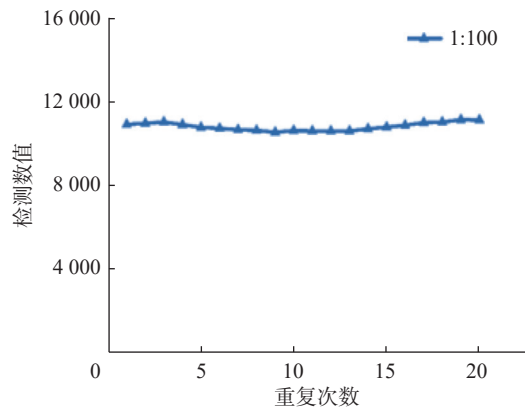
(a) 最小测试时间曲线(COVID-19重组N蛋白)



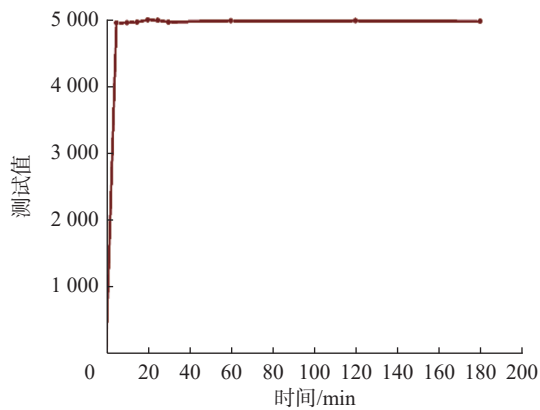
(a) 重复性测试统计图(COVID-19重组N蛋白)



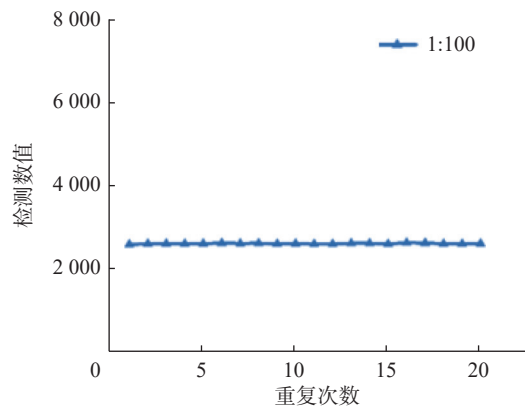
(b) 最小测试时间曲线(乙型流感抗原)



(b) 重复性测试统计图(乙型流感抗原)



(c) 最小测试时间曲线(甲型流感抗原)



(c) 重复性测试统计图(甲型流感抗原)

图 4 不同样品的最小测试时间曲线图

Fig. 4 Curve of minimum test time for different antigen samples

应对各种突发情况, 能够提供最大可能性的准确检测结果。由于量子点荧光纳米微球标记的抗体种类可以根据实际需要进行选择和更换, 因此适用于不同的病原体检测。此外, 量子点荧光纳米微球具有较强的光稳定性和化学稳定性, 试纸条具有较长的保存期限。当前, 环境中的病原体已

图 5 不同样品的重复性检测结果统计图

Fig. 5 Statistical graph of repeatability test results of different samples

经成为一项全球性的公共卫生问题。本研究所开发的量子点荧光纳米微球免疫层析试纸条具有广阔的应用前景。它可以被广泛应用于医疗、环境卫生、食品安全等领域的病原体检测中。在未来, 将继续对该技术进行改进和优化, 为保护人民健康和平安做出更大的贡献。

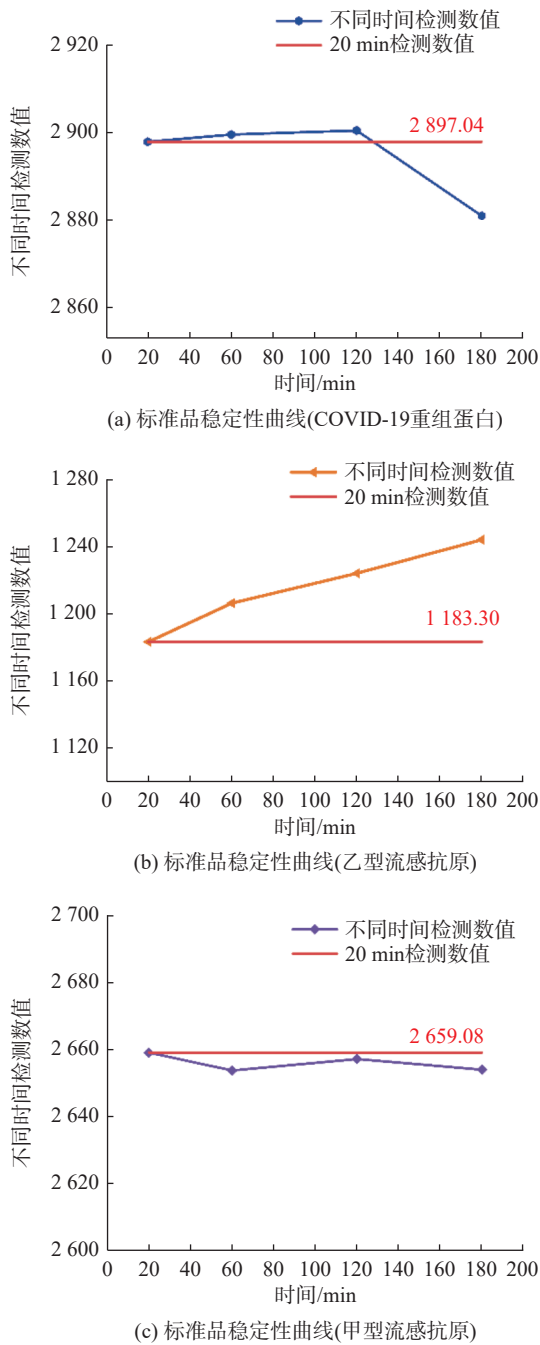


图 6 不同样品的稳定型曲线

Fig. 6 Stable curves of different samples

参考文献:

[ 1 ] BALOCH S, BALOCH M A, ZHENG T L, et al. The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic[J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2022, 250(4): 271 – 278.

[ 2 ] CHAN J F W, YUAN S F, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 514 – 523.

[ 3 ] 翟宇佳, 任小孟, 徐雄利, 等. 密闭环境空气微生物检测和监测技术研究进展 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2018, 25(6): 411 – 413.

[ 4 ] 韩丽丽, 齐秀丽, 徐莉. 生物气溶胶核酸检测技术分析 [J]. *舰船电子工程*, 2017, 37(2): 16 – 18,24.

[ 5 ] CUI F Y, ZHOU H S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 165: 112349.

[ 6 ] YANG Z J, XUE Z W, ZHENG K J, et al. A novel strategy for rapid fluorescence detection of FluB and SARS-CoV-2[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2104.

[ 7 ] LING S M, CHEN Q A, ZHANG Y M, et al. Development of ELISA and colloidal gold immunoassay for tetrodotoxin detection based on monoclonal antibody[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 256 – 260.

[ 8 ] YE Y, ZHOU Y X, MO Z Z, et al. Rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> on membrane by dot-immunogold filtration assay[J]. *Talanta*, 2010, 81(3): 792 – 798.

[ 9 ] RADHA R, SHAHZADI S K, AL-SAYAH M H. Fluorescent immunoassays for detection and quantification of cardiac troponin I: a short review[J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4812.

[ 10 ] THONGKUM W, HADPECH S, TAWON Y, et al. Semi-quantification of HIV-1 protease inhibitor concentrations in clinical samples of HIV-infected patients using a gold nanoparticle-based immunochromatographic assay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1071: 86 – 97.

[ 11 ] WANG L Z, SUN J D, YE J, et al. One-step extraction and simultaneous quantitative fluorescence immunochromatography strip for AFB<sub>1</sub> and Cd detection in grain[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131684.

[ 12 ] 廖德权. 基于量子点标记的降钙素原快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用 [J]. *数理医药学杂志*, 2021, 34(10): 1425 – 1429.

(编辑: 张 磊)