

- ty of droplet digital PCR for human cytomegalovirus[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2844-2848.
- [17] HAYDEN R T, GU Z, SAM S S, et al. Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(10): 2602-2608.
- [18] ABACHIN E, CONVERS S, FALQUE S, et al. Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid [J]. Biologicals, 2018, 52(1): 49-54.
- [19] WU X L, LIN H, CHEN S J, et al. Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Virol Methods, 2017, 248(1): 166-171.
- [20] WANG M, YANG J J, GAI Z T, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk[J]. Int J Food Microbiol, 2018, 266(1): 251-256.
- [21] TRAMONTANA A R, LESLIE D E, NOLAN A, et al. Pulmonary extensively drug-resistant tuberculosis in Melbourne: local control of a global health challenge[J]. Med J Aust, 2018, 208(10): 427-429.
- [22] PHOLWAT S, STROUP S, FOONGLADDA S, et al. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant mycobacterium tuberculosis [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57238.
- [23] SONG N, TAN Y, ZHANG L Y, et al. Detection of circulating Mycobacterium tuberculosis-specific DNA by droplet digital PCR for vaccine evaluation in challenged monkeys and TB diagnosis[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 1-9.
- [24] MCMAHON T C, BLAIS B W, WONG A, et al. Multiplexed single intact cell droplet digital PCR (MuSIC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in food enrichment cultures[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 332-341.
- [25] PAQUETTE S J, STANFORD K, THOMAS J, et al. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, *Escherichia coli* O178 and O157 in feces of western-Canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195880.
- [26] BUTCHER R, HOUGHTON J, DERRICK T, et al. Reduced-cost Chlamydia trachomatis-specific multiplex real-time PCR diagnostic assay evaluated for ocular swabs and use by trachoma research programmes[J]. J Microbiol Methods, 2017, 139(1): 95-102.
- [27] SCHACHTER J. Will droplet digital PCR become the test of choice for detecting and quantifying ocular chlamydia trachomatis infection? Maybe not[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2013, 13(8): 789-792.
- [28] JONGTHAWIN J, INTAPAN P M, LULITANOND V, et al. Detection and quantification of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* DNA in blood samples and mosquitoes using duplex droplet digital polymerase chain reaction [J]. Parasitol Res, 2016, 115(8): 2967-2972.
- [29] KOEPFLI C, NGUITRAGOOL W, HOFMANN N E, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 39183.
- [30] WEERAKOON K G, GORDON C A, WILLIAMS G M, et al. Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite Cell-Free DNA detection in diverse clinical samples[J]. J Infect Dis, 2017, 216(12): 1611-1622.

(收稿日期: 2019-02-16 修回日期: 2019-05-16)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.22.048

免疫层析试纸条检测技术的研究进展*

周梦婕^{1,3}, 李小盼², 代荣阳¹综述, 阎锡蕴^{3△}, 段德民^{2,3▲}审校

1. 西南医科大学生物化学与细胞生物学系, 四川泸州 646000; 2. 吉尔生物科技(天津)有限公司, 天津 300270; 3. 中国科学院生物物理研究所蛋白质与多肽药物实验室, 北京 100101

关键词: 免疫层析; 胶体金试纸条; 荧光试纸条; 纳米酶试纸条

中图法分类号: R446.1; R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)22-3382-05

免疫层析试纸条检测技术是 20 世纪 70 年代兴起的适用于患者床旁检测或家庭检测的检验技术, 相较于酶联免疫吸附试验(ELISA), 其具有普适性、快捷性等优点。免疫层析试纸条检测技术具有操作简便、结果快速且稳定、不需要大型设备及成本低廉等

优点, 因此在临床诊断等领域迅速普及。免疫层析试纸条检测技术随着纳米标记材料的不断进步(从胶体金到荧光微球、量子点, 再到纳米酶)而不断发展, 展现出巨大的潜能。免疫层析试纸条的应用范围也从生物大分子检测扩展到环境监测、食品卫生检测、疾

* 基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10101004002004); 北京市自然科学基金面上项目(7162126); 北京市现场物证检验工程技术研究中心开放课题(2016CSEKFKT04)。

△ 通信作者, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn; ▲ 通信作者, E-mail: dmduan@ibp.ac.cn。

病筛查与诊断等多个领域。本文从多个方面对免疫层析试纸条检测技术的发展进行总结,并对其未来进行展望。

1 免疫层析试纸条检测技术

免疫层析试纸条检测技术是基于免疫标记技术和色谱层析技术发展起来的一种可用于检测抗原、抗体或半抗原的检测技术。其特点是应用抗原-抗体特异性的免疫学反应和层析技术,并以干片式试纸的形式,达到快速、特异、准确地显色以检测待测物的目的,同时该技术不需依赖专业技术人员和大型仪器设备^[1]。其检测原理:基于毛细管床自发运送液体从样品垫至结合垫,通过液体层析将样品与示踪颗粒共同带往信号产生膜,发生抗原抗体结合反应。示踪颗粒在信号发生区显色或产生其他信号反应,10 min 左右即可直观地观察到检测结果。该技术成本低,省去了洗涤、分离等诸多烦琐的步骤,操作快捷、简便,是床旁诊断(POCT)的一种主要形式。免疫层析试纸条的检测原理主要分为双抗夹心法与竞争法两种^[2]。以胶体金人绒毛膜促性腺激素(HCG)试纸条为例,它采用的是典型的双抗夹心法,即在信号发生区为抗原夹心免疫反应,将作用于抗原不同位点的成对的抗体 1 固定于信号发生区的检测线(T 线)上,当含有 HCG 抗原的检测样品随着毛细管床的虹吸作用与另一偶联了胶体金的抗体 2 结合,继续层析并共同被运送至反应元件处时,则可与抗体 1 结合,使胶体金聚集于检测线处,发生肉眼可见的显色反应。同时多余的金标抗体-抗原复合物继续层析,被质控线上的多克隆抗体捕获显色,判定为阳性结果;若被测物不含 HCG 抗原,则检测线处不显色,只有质控线处显色,判定为阴性结果。另一种为竞争法,则是在检测线上包被待测抗体的对应抗原,与待测样品中的抗原共同竞争结合金标抗体,质控线包被多抗,如果样品中含有抗原,则金标抗原不与检测线相结合,仅质控线显色,结果为阳性,反之,若出现双线则结果为阴性,与双抗夹心法结果正好相反。

免疫层析试纸条检测技术的灵敏度是市场应用考核的一个关键指标,而标记物是影响灵敏度的一个重要因素,其中显色标记物为增强检测信号的更好的选择。目前最常用的标记物为胶体金纳米颗粒^[3],其他研究较多的纳米材料标记物有荧光微球^[4]、量子点^[5]、纳米酶^[6]等。

1.1 胶体金免疫层析试纸条检测技术 FAULK 等^[7]所在的实验室于 1971 年采用免疫金染色(IGS),将纳米金颗粒与兔抗沙门菌的抗血清相结合,采用直接免疫细胞的化学技术检测沙门菌的表面抗原,从而开创了纳米金免疫标记技术。随后胶体金因其特有的颜色与性质,被用于试纸条检测。美国食品和药物管理局(FDA)批准生产的第一个试纸条产品是用于家庭快速检测女性 HCG,而后逐渐发展,如今基于此技术的 HCG 试纸条产品在妇女生殖健康(诸如优生、

避孕和不孕)检测方面,具有巨大的市场潜力。

胶体金试纸条检测技术因其制作简单、检测快速的特点在近几年迅速发展,这种新兴的检测技术已经可以检测超过 100 种抗原物质,包括多种激素、癌症抗原、病毒、细菌、抗体、合成抗原等^[8]。其应用领域日益广泛,不仅可以用在生物检测上,还在食品检测、微生物检测、环境检测和毒品检测等多个领域中应用^[9]。

胶体金试纸条检测技术虽然优势很突出,但因胶体金颗粒本身不具备发光等特性,若依靠其自身所具有的颜色进行结果判断,则需大量颗粒聚集才能达到肉眼可见的效果,这使得它的弊端也非常明显,即灵敏度较低,从而限制了胶体金试纸条在部分对灵敏度指标要求较高的检测项目中的应用^[10]。为了进一步提高胶体金试纸条的灵敏度,研究人员进行了多方面的尝试^[11-12],研制和开发了各种可以产生特定光、电或磁信号的纳米材料,以提高灵敏度,增强反应信号。

例如:YANG 等^[13]用胶体金探针银染增强试纸条信号的方法检测相思子毒素-a。在还原剂的作用下,银离子倾向于以银的形式聚集在纳米金周围,采用银染后检测灵敏度大大提高。将银离子及还原剂干燥保存于反应垫上,当免疫层析反应结束后,将两张反应垫覆盖于信号反应区,滴加去离子水,使银离子与还原剂随液体流至胶体金的信号发生区,从而增强样品信号以检测低水平的相思子毒素-a。普通试纸条肉眼可视相思子毒素-a 的检出限为 10 ng/mL,当试纸条用银染增强技术处理后,其灵敏度增加至 100 倍,即可检测出水平为 100 pg/mL 的相思子毒素-a。CHO 等^[14]将银染增强技术用于检测心肌肌钙蛋白 I(cTnI),发现其灵敏度相较于传统试纸条可提高 51 倍,但缺点是银染试剂不稳定,难以控制反应过程。HAN 等^[15]采用胶体金和辣根过氧化物酶(HRP)双标记抗体检测肉毒杆菌神经毒素 A,试验采用两步法进行标记再染色,即标记胶体金后再标记酶示踪剂。例如:HRP,先进行传统胶体金垂直方向免疫层析,使待测抗原与金标抗体结合,随后在水平方向利用酶催化显色底物,以增强显色信号强度。与传统胶体金试纸条层析法相比,其灵敏度提高了 5 倍,由酶联免疫吸附芯片传感器(EOS)检测肉毒杆菌神经毒素 A 的检测限可达 2 ng/mL。但此技术因设计缺陷或显色液未优化而出现了可视化背景干扰较大的缺点。针对此问题,PAROLO 等^[16]通过在金标抗体上偶联 HRP,层析 15 min 并读取数值后直接加入酶催化的显色底物中,继续层析 5 min 后终止反应,并再次读取数值,从而达到信号放大的效果,优化并提高了传统的侧向层流免疫分析方法(LFIA)的性能。与 HAN 等^[15]创立的方法相比,该方法更加简便。

另一种方式是筛选适宜的核酸适配体标记胶体金。核酸适配体具有高特异性和高亲和力且易于修饰的特点,可通过调整自身空间结构实现与靶标分子

的特异性结合,从而达到检测待测物的目的。XU 等^[17]通过将合适的脱氧核糖核酸(DNA)适配子标记胶体金检测人血清凝血酶原,与传统的抗体标记相比,其检测限和线性检测范围更优,且具有更高的特异性和选择性,但其灵敏度的可提升程度却十分有限。

另外,MIRASOLI 等^[18]发表的酶催化化学发光反应的案例提示,虽然诸如以上经过改进的胶体金试纸条层析检测技术可有效提高金标抗体的灵敏度,但视觉可视化的信号放大过程复杂且昂贵^[10],不利于其大量生产和市场应用,因此科学家不断在寻找新的胶体金替代示踪剂。WANG 等^[19]采用胶体硒代替胶体金制作试纸条检测牛奶、奶粉、动物饲料中的三聚氰胺含量,均匀的胶体硒颗粒呈橙黄色,作为示踪剂有较好的肉眼可辨性。将其用于三聚氰胺检测,当牛奶、奶粉、动物饲料样品中三聚氰胺的含量分别为 50、50、100 $\mu\text{g/L}$ 时,即可肉眼直接分辨出结果。胶体硒的原理与胶体金类似,但是制备更为简单,更具成本优势,在相同标记量下,胶体硒的成本仅为胶体金的 1/27。

1.2 荧光免疫层析试纸条检测技术 鉴于胶体金试纸条灵敏度不够高和难以准确定量的缺陷,各种荧光纳米材料由于其光电磁性能及独特的结构使得其成为非常有前景的胶体金替代示踪剂^[20]。荧光试纸条免疫层析检测技术应运而生。荧光试纸条依据荧光强度的变化可对待检样品中微量或痕量物质进行定量检测,更符合目前体外诊断领域对生物大分子检测准确定量、多标记、高通量的要求。

1.2.1 荧光微球免疫层析试纸条检测技术 常见的荧光微球一般是通过物理或化学等方法在微球表面标记荧光物质或在微球内部螯合稀土元素等微小颗粒来实现,其颗粒直径一般在纳米级至微米级范围内。微球接收来自激发光源能量的同时会发射出不同波长的荧光。基于此特性,荧光微球可通过标记不同颜色的荧光物质并结合特定的单抗来实现多标记、检测不同待测物的目的。纳米微球可保护内部所包裹的荧光物质,从而增强荧光染料的稳定性,有效改良了较早发展起来的荧光素标记技术。荧光物质在一定条件下可发射荧光的特性又起到了信号放大的作用,与纳米微球相辅相成,从而大大提高了免疫层析试纸条检测技术的灵敏度。比如 SAKURAI 等^[21]报道的试纸条检测技术即是基于荧光微球的免疫层析方法,通过荧光微球标记单克隆抗体以实现对季节性流感病毒的检测,其检测灵敏度比同条件下的胶体金试纸条检测技术提高了 10~100 倍。

1.2.2 量子点免疫层析试纸条检测技术 量子点是近几年比较热门的一种半导体荧光标记物,主要是由 II~VI 或 III~V 主族元素等所组成的直径在 1~20 nm 的纳米颗粒。量子点与传统的有机染料相比,具有明显优势,比如量子点的斯托克斯位移比较大,激

发波长较宽而发射波长较窄,且量子点发射的荧光很稳定,不仅量子产率高,还可抗荧光漂白等^[22]。

WANG 等^[23]利用量子点代替胶体金作为标记物,并标记多个不同抗体组装的试纸条检测肿瘤标志物甲胎蛋白和癌胚抗原,通过对多色量子点不同荧光强度的检测,可定量检测出两种待检抗原,其检测灵敏度优于胶体金试纸条。在此基础上,采用多膜组合或单膜多标记抗体的方法能够实现多种抗原的联合定量检测。针对量子点的研究已非常广泛,凭借可定量和多标记检测的优势及高通量检测的特点,量子点已成为一种非常有潜力的荧光探针标记物,但量子点制备技术和抗原抗体标记技术难度均较大,从而使其临床应用受限。

1.2.3 上转换发光免疫层析试纸条检测技术 上转换发光是指反-斯托克斯发光,即用长波长、低能量的红外光或近红外光激发,发射出短波长、高能量的紫外线或可见光^[24]。上转换发光技术是将上转换磷光材料作为标记物的新型免疫层析技术,而上转换磷光材料是在氧化硫等惰性材料中掺杂两种稀土元素(分别作为光吸收子和光发射子)从而使其能够上转换发光产生磷光的一类示踪纳米材料^[25]。与荧光染料和量子点纳米颗粒相比,上转换纳米颗粒毒性低,灵敏度高,且发光信号稳定性好,外界背景干扰小,不受载体或样品中具有荧光特性基质的影响^[26],这种层析技术可实现快速、简便、敏感、精确、稳定的定量检测,是目前理想的荧光标记物之一。

上转换荧光纳米材料的有关报道主要集中在生物大分子检测方面,比如生物成像、光动力治疗及药物运输等^[27],在试纸条方面的应用报道较少。王金鹏^[28]利用水热法合成的上转换荧光纳米颗粒实现了对牛、羊肉等动物源性食品样品中沙丁胺醇残留物的检测。但上述转换发光技术受技术水平的制约,包括材料制备和设备精度等因素限制,使得其检测成本较高而难以市场化推广。

1.2.4 时间分辨荧光免疫层析试纸条检测技术 时间分辨荧光免疫层析技术是用稀土元素(Eu、Tb、Sm 等)作为标记物,使抗原抗体在膜上反应,镧系元素螯合物在紫外光源的激发下发射出特殊的荧光,通过波长分辨和时间延迟检测技术检测待测物的信号强度并定量分析其水平的方法^[29]。相比传统的荧光素标记物,镧系元素具有较宽的激发光谱带和较窄的发射光谱带,且其荧光寿命长,稳定性更好,荧光光谱的斯托克斯位移较大,可有效排除激发光和非特异性荧光的干扰,大大提高了信噪比和灵敏度,其检测灵敏度比胶体金试纸条等高出 2~3 个数量级,因此具有更广泛的应用前景^[30]。例如:ZHANG 等^[31]采用时间分辨试纸条层析技术检测农产品中的黄曲霉素 AFB1,检出限可达 0.3 $\mu\text{g/kg}$,其中所用的荧光标记物即包埋了 Eu^{3+} 的硅胶微粒。时间分辨技术的运用也是今后定量、多标记免疫分析的发展方向。

1.3 纳米酶免疫层析试纸条检测技术 纳米酶免疫层析试纸条检测技术是以纳米酶为标记物的又一新型检测方法。纳米酶是一类既有纳米材料的独特性能,又有催化功能的模拟酶。2007 年,GAO 等^[32]报道了 1 例无机纳米材料 Fe_3O_4 的酶学特性,引起了学术界的高度关注。研究发现,无须在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面修饰任何化学基团, Fe_3O_4 纳米颗粒本身即具有类似 HRP 的催化活性。研究显示,在有过氧化氢存在的情况下, Fe_3O_4 纳米颗粒能有效催化不同类型的天然酶底物,发生显色反应,如使 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)呈蓝色,重氮氨基苯(DAB)呈褐色,邻苯二胺(OPD)呈橙色,催化机制符合乒乓机制,催化动力学符合米氏方程。同时纳米酶还兼具纳米材料的尺寸效应和材料特性。纳米酶的尺寸效应体现在其催化活性与纳米材料的比表面积呈比例增长,尺寸越小,比表面积越大,表面活性中心就会增多,其催化活性和催化效率均会显著增强;其材料特性体现在无机纳米颗粒本身的物理性质,如 Fe_3O_4 纳米酶的超顺磁活性等。此外,纳米酶稳定、经济的特点弥补了天然酶容易变性且不易制备的缺陷。

在疾病诊断方面,将纳米酶作为标记物应用于试纸条检测技术,利用纳米酶的生物效应催化天然酶底物显色,从而增强试纸条检测信号,有效解决了传统胶体金免疫层析试纸条检测技术灵敏度低的问题^[33]。例如:埃博拉病毒的传染率和病死率极高,常规的诊断方式为反转录聚合酶链反应(RT-PCR)或 ELISA,虽然二者具有极高的特异性,但耗时且需要专业人员操作,不便在疫区推广。胶体金试纸条虽然检测快速,但其灵敏度较低,在初筛阶段不能立刻有效地诊断出是否患病。而快速、有效、灵敏地检测埃博拉病毒是防止疫情传播的关键所在。DUAN 等^[33]利用 Fe_3O_4 纳米酶的磁性和酶催化双功能特性,巧妙地设计了双功能纳米酶探针,将纳米酶应用于免疫层析试纸条技术检测埃博拉病毒。即用 Fe_3O_4 纳米酶替代胶体金偶联抗埃博拉病毒抗体,该偶联了抗埃博拉抗体的纳米酶探针具有 3 种功能:在试纸条上识别、分离和可视化埃博拉病毒。由于磁纳米颗粒本身具有过氧化物酶活性,纳米酶探针可以催化过氧化物酶底物(如 DAB)产生有颜色的产物,该产物能显著地放大检测信号。再者,纳米酶探针的磁性使得其能够快速地从样品中分离并富集。试验结果表明,纳米酶免疫层析试纸条检测技术检测埃博拉病毒的灵敏度与 ELISA 基本一致,相对于改良前的胶体金试纸条,纳米酶试纸条的灵敏度提高了 100 倍。这对于在西非等贫穷落后、缺乏必要仪器及设备的地区实现现场检测埃博拉病毒尤为关键。

不仅如此,纳米酶免疫层析试纸条技术在传染病、炎症和心肌标志物检测等领域中,也发挥了其高灵敏度和痕量检测的特性。此外,除了铁基纳米酶,更多的纳米酶材料被发现^[34],并在肿瘤的快速检测和

筛查、公安刑侦、传染病防控、食品安全等领域也有着广泛的应用价值^[35]。纳米酶是可应用于试纸条检测技术的、比较有前景的新型标记物之一。

1.4 其他免疫层析试纸条检测技术 磁性免疫层析技术作为新一代单人份快速定量检测技术逐渐发展起来,它以超顺磁性纳米颗粒代替传统的标记物(胶体金、乳胶颗粒等)进行免疫层析,通过传感器测试检测线上的磁信号,读取结合在检测线处磁颗粒的磁场强度,从而对所检样品进行定性及定量判断。目前国际上只有少数外国公司(如美国 Magna Bio Sciences 公司)拥有该项技术,而国内以西安金磁为代表的磁免疫层析技术,其基本原理与美国 Magna Bio Sciences 公司的产品类似。

2 展 望

免疫层析试纸条检测技术具有简单快速、灵敏度高、特异性强、不需要仪器设备辅助等特点,在检测时间、仪器设备、人员要求、测试费用、安全性等诸多方面具有比一般常规方法更突出的优势,已广泛应用于诸多领域,是现场检测、家庭自测的重要方法。随着新型试纸条检测技术的不断发展,有信号放大作用的新型高灵敏纳米标记物相继被发现(比如量子点、纳米酶等),试纸条检测也经历了从定性、半定量到定量检测的过程,尤其在定量检测方面取得了巨大的进展。未来试纸条检测技术的发展方向依然是定量、灵敏、多元化(比如多指标联检)、高通量检测,相信免疫层析试纸条检测技术在实际应用需求的驱动下,在生物化学、材料科学、光电技术和微流控技术等多学科交叉发展的背景下,可为疾病诊断提供更精准的服务。

参考文献

- [1] HRISTOV D R, RODRIGUEZ-QUIJADA C, GOMEZ-MARQUEZ J, et al. Designing paper-based immunoassays for biomedical applications[J]. *Sensors*, 2019, 19(3):554-578.
- [2] 王寅彪,刘肖,李青梅,等. 免疫层析试纸检测技术研究进展[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2017, 35(3):236-240.
- [3] GAO Y L, HUANG X X, ZHU Y B, et al. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2018, 39(4):351-364.
- [4] CHEN W Y, HUANG Z, LAI W H, et al. Invited review: advancements in lateral flow immunoassays for screening hazardous substances in milk and milk powder[J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(3):1887-1900.
- [5] ZHANG Y, KONG H, ZHAO Y, et al. Quantum dot-based lateral-flow immunoassay for rapid detection of rhein using specific egg yolk antibodies[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8):1685-1693.
- [6] WEI H, WANG E K. Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H_2O_2 and

- glucose detection[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(6): 2250-2254.
- [7] FAULK W P, TAYLOR G M. An immunocolloid method for the electron microscope[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(11): 1081-1083.
 - [8] NGOM B, GUO Y, WANG X, et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(3): 1113-1135.
 - [9] ZHANG B, NAN T G, HUANG L Q, et al. Development of a colloidal gold-based lateral flow dipstick immunoassay for rapid detection of chlorogenic acid and luteoloside in *flos Ionicerae japonicae* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170(1): 83-88.
 - [10] GAO X F, XU L P, ZHOU S F, et al. Recent advances in nanoparticles-based lateral flow biosensors[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 6(1): 41-57.
 - [11] QUESADA-GONZÁLEZ D, SENA-TORRALBA A, WICKSONO W P, et al. Iridium oxide (IV) nanoparticle-based lateral flow immunoassay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 46(1): 132-135.
 - [12] SHEN M J, CHEN Y Q, ZHU Y Z, et al. Enhancing the sensitivity of lateral flow immunoassay by centrifugation-assisted flow control[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(7): 4814-4820.
 - [13] YANG W, LI X B, LIU G W, et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(8): 3710-3713.
 - [14] CHO I H, SEO S M, PAEK E H, et al. Immunogold-silver staining-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography's[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(2): 271-277.
 - [15] HAN S M, CHO J H, CHO I H, et al. Plastic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor for botulinum neurotoxin A[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 587(1): 1-8.
 - [16] PAROLO C, DE LA ESCOSURA-MUNIZ A, MERKOCI A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 40(1): 412-416.
 - [17] XU H, MAO X, ZENG Q X, et al. Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(2): 669-675.
 - [18] MIRASOLI M, BURAGINA A, DOLCI L S, et al. Development of a chemiluminescence-based quantitative lateral flow immunoassay for on-field detection of 2, 4, 6-trinitrotoluene[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 721: 167-172.
 - [19] WANG Z Z, ZHI D J, ZHAO Y, et al. Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 1699-1707.
 - [20] STEICHEN S D, CALDORERA M M, PEPPAS N A. A review of current nanopartical and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48(3): 416-427.
 - [21] SAKURAI A, TAKAYAMA K, NOMURA N, et al. Fluorescent immunochromatography for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116715.
 - [22] WANG M F, BARDAJEE G R, KUMAR S A, et al. Preparative size-exclusion chromatography for purification and characterization of colloidal quantum dots bound by chromophore-labeled polymers and low-molecular-weight chromophores[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(25): 5011-5019.
 - [23] WANG C, HOU F, MA Y. Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 156-162.
 - [24] HONG W, HUANG L, WANG H, et al. Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against *Yersinia pestis* [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(2): 133-140.
 - [25] 赵露晶, 周蕾, 方菲, 等. 基于上转换磷光颗粒的 AFP 免疫层析定量检测[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(15): 2907-2909.
 - [26] QU Q, ZHU Z W, WANG Y F, et al. Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay[J]. *J Microbiol Methods*, 2009, 79(1): 121-123.
 - [27] LIM S F, RIEH N. In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nano Lett*, 2006, 6(2): 169-174.
 - [28] 王金鹏. 荧光标记免疫层析试纸条的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
 - [29] HU Z G, LI M, HUANG B, et al. Detection of hepatitis B virus PreS1 antigen using a time-resolved fluoroimmunoassay[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2012, 33(2): 156-165.
 - [30] 沈健, 林德球, 徐杰. 时间分辨荧光免疫分析技术研究现状及进展[J]. *生命科学*, 2004, 16(1): 55-59.
 - [31] ZHANG Z W, LI P W, ZHANG Q, et al. Study on time-resolved fluorescence immunochromatography for aflatoxin determination in agricultural product[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(18): 3668-3674.
 - [32] GAO L Z, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(9): 577-583.
 - [33] DUAN D M, FAN K L, YAN X Y, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74(1): 134-141.
 - [34] KUAH E, TOH S, GAO Z Q, et al. Enzyme mimics: advances and applications[J]. *Chemistry*, 2016, 22(25): 8404-8430.
 - [35] BANERJEE R, JAISWAL A. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases[J]. *Analyt*, 2018, 143(9): 1970-1996.