

新型免疫层析试纸检测技术进展

梅洁¹, 王姝晗², 丁艮晓¹, 高一纯², 王寅彪²

1.河南省人民医院神经外科, 河南 郑州 450002; 2.新乡医学院公共卫生学院

摘要:免疫层析试纸检测技术是一种基于抗原抗体特异性结合反应的快速检测方法, 具有操作简便、成本低廉和无需复杂仪器等优势, 在医学诊断、食品安全检测和环境监测等领域展现出重要应用价值。该技术通过夹心法或阻断法实现靶标检测, 其中夹心法适用于检测含有多个检测位点的生物大分子, 阻断法则用于小分子半抗原类物质。近年来, 随着纳米酶和新型纳米材料的应用以及信号放大技术的创新, 免疫层析试纸检测技术不断发展。本文系统综述了新型免疫层析试纸检测技术研究进展。新型技术进展如阻断法检测抗原和抗体、通用型试纸检测半抗原及其抗体突破了传统试纸研发思路, 是试纸检测的创新应用。基于纳米抗体、新型纳米材料、纳米酶的试纸检测技术显著提升了检测灵敏度。多联检测试纸的开发实现了单次检测筛查多种靶标, 显著提升了检测效率。这些技术改进不仅拓展了免疫层析试纸的应用范围, 也为即时检测提供了更高效、灵敏的解决方案, 使得免疫层析试纸能够在精准医疗和现场快速检测中发挥更大作用。

关键词:免疫层析试纸; 夹心法; 阻断法; 新型纳米材料; 纳米酶; 多联检测

中图分类号: R446

文献标识码: B

文章编号: 2097-2717(2026)03-

Advances in novel immunochromatographic strip tests

MEI Jie¹, WANG Shuhan², DING Genxiao¹, GAO Yichun², WANG Yinbiao²

1. Department of Neurosurgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450002, China; 2. School of Public Health, Xixiang Medical University

Corresponding author: MEI Jie, E-mail: mei396284351@163.com

Abstract: Immunochromatographic strip test (ITS) is a well-established rapid detection platform leveraging the specific binding between antigens and antibodies. Prized for its simplicity, low cost, and instrument-free operation, it holds significant value in point-of-care diagnostics, food safety, and environmental monitoring. The technology achieves target detection through the sandwich format or the competitive format. The sandwich format is suitable for detecting biomolecules with multiple detection sites, while the competitive format is used for detecting small molecules including haptens. In recent years, with the application of nanozymes, novel nanomaterials, and innovations in signal amplification technologies, IST has continuously improved and developed. This paper systematically reviews the research progress of novel ITSs. New technological advancements, such as the use of competitive format for detecting antigens and antibodies, and the development of a universal strip test for detecting haptens and their antibodies, have broken through the traditional development of strip tests, representing the innovative applications of strip tests. ISTs based on nanobodies, novel nanomaterials, and nanozymes have significantly improved the sensitivity of the test. The development of multi-target detection strip tests has enabled the screening of multiple targets in a single test, greatly improving the detection efficiency. These technological improvements are expanding the applications of ISTs and providing more efficient, sensitive solutions for instant detection, promising a greater impact in precision medicine and point-of-care testing.

Keywords: Immunochromatographic strip test; Sandwich format; Blocking format; Novel nanomaterial; Nanozyme; Multi-target detection

免疫层析试纸检测技术是一种基于抗原抗体特异性反应的快速检测技术, 可在现场实现对抗原、抗体、半抗原等多种待测物的即时检测, 在医学诊断、食品安全检测、环境监测等领域存在广泛应用^[1-3]。

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(25A330004); 河南省护理医学重点实验室开放课题(HNSYHLKT202303); 河南省大学生创新创业训练计划项目(202410472013)

作者简介:梅洁, 主管护师, 硕士, 从事神经系统自身免疫性疾病发病机制与治疗研究

通信作者:梅洁, E-mail: mei396284351@163.com

免疫层析试纸从上样端至手柄端依次由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC膜)和吸附垫组成^[4]。各组成元件之间有一定重叠,能够保证液体样品顺利从上样孔流向吸附垫。结合垫中吸附有标记的抗原或抗体,能够被液体样品水化并向吸附垫流动。最常见的用于标记抗原或抗体的纳米材料是胶体金纳米颗粒,它在一定粒径下呈现特定的红色,能够为抗原抗体反应提供可识别的检测信号。NC膜上固化有检测线(test line, T线)和质控线(control line, C线),它们不随液体样品流动,分别由特定的抗原、抗体、第二抗体(二抗)等组成。T线的作用是指示检测结果的阴阳性,C线的作用是确保检测结果的有效性。随着抗原抗体在T线或C线发生免疫学反应,试纸显示特定的红色条带,呈现出“色谱”(chromatography,也称为层析),因此该技术得名免疫层析试纸检测技术。

试纸检测的原理主要有两种:夹心法和阻断法。传统的试纸检测中,夹心法适用于对含有多种检测位点的靶标进行检测,如大分子抗原、病毒、抗体等;阻断法适用于对含有一个检测位点的靶标进行检测,比如药物、小分子激素等半抗原。经典的夹心法试纸检测案例有人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)的检测和人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)抗体的检测。Tanaka等^[5]利用双抗体夹心法制备了检测HCG抗原的免疫层析试纸,检测HCG抗原时能够在T线形成双抗体包裹抗原的夹心式结构,并因胶体金纳米颗粒的聚集使T线呈现红色条带,该试纸为妊娠诊断和妊娠相关疾病的监测提供了一种简单、快速、灵敏的检测方法。Arai等^[6]基于双抗原夹心法研发了检测HIV抗体的免疫层析试纸,检测HIV抗体时能够在T线形成双抗原包裹抗体的夹心式结构,致使T线出现红色条带;该试纸展现出了良好的早期检测能力,对全球HIV防控具有重要价值。Zhang等^[7]基于阻断法研发了检测盐酸克伦特罗(clenbuterol, CL)的免疫层析试纸,检测CL时不在T线形成夹心式结构,T线不出现红色条带,为快速筛查CL残留,保障食品安全提供了快速、简便的现场检测方法。

近年来,随着纳米抗体、新型纳米材料、纳米酶以及新型检测策略与免疫层析试纸检测技术的深度结合,免疫层析试纸检测技术在抗原、抗体、半抗原检测方面的技术不断改进,应用也越来越多。本文综述了新型免疫层析试纸检测技术研究进展,以期对传染病检测、肿瘤标志物检测、违禁药物检测等领域研发基于免疫层析试纸的快速检测技术提供参考。

1 阻断法检测抗原和抗体

抗生素、农药、兽药等小分子物质大多仅含有一个检测位点,因此不能够利用夹心法进行试纸检测。阻断法利用样品中游离的半抗原阻断胶体金标记的单抗与载体蛋白-半抗原偶联物的结合,实现了对仅含有单个位点靶标的快速检测。然而,阻断法的检测靶标并不局限于半抗原,新的研究表明基于阻断法的试纸检测也可用于检测含有多个位点的靶标(如:抗原和抗体),这极大拓宽了阻断法试纸检测的应用范围。

Lin等^[8]基于阻断法制备了检测水貂肠炎病毒(mink enteritis virus, MEV)的免疫层析试纸。该试纸以胶体金标记MEV特异性单抗,以表达的MEV结构蛋白为T线,以山羊抗小鼠二抗为C线,利用样品中游离的MEV阻断金标单抗与T线的结合,仅需100 μL样本即可在2 min内完成检测,为MEV的检测提供了一种快速、便捷的现场检测技术。

Lv等^[9]基于阻断法研发了快速检测新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)抗体的免疫层析试纸。该试纸以胶体金标记单抗,T线固化抗NDV多抗,C线固化金黄色葡萄球菌A蛋白(staphylococcal protein A, SPA)。检测NDV抗体时,血清样品首先与制备的重组NDV血凝素-神经氨酸酶蛋白(hemagglutinin-neuraminidase, HN)发生反应,其中的NDV特异性抗体能够封闭重组HN蛋白与金标单抗的结合位点,进而阻止金标单抗-重组HN蛋白-抗NDV多抗“夹心式”复合物的形成,致使T线不出现红色条带。该模式检测对NDV抗体具有高度特异性,灵敏度比血凝抑制试验稍低,但较病毒中和实验高,为现场快速检测NDV抗体提供了一种简便、快速、低成本的方法。

2 通用型试纸检测半抗原及其抗体

半抗原免疫层析检测试纸的制备需要半抗原-载体蛋白偶联物以及半抗原特异性单抗两种关键试剂。当前的半抗原检测试纸大多仅用于检测药物残留,不能实现对半抗原特异性抗体的同时检测。鉴于利用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)筛选半抗原特异性单抗过程较为烦琐,工作量庞大,邢云瑞等^[10]成功将试纸检测应用于半抗原特异性单抗筛选,极大提高了单抗筛选效率。同时,其研发的免疫层析试纸是一种半抗原及其抗体通用型检测试纸,成功应用于双咪苯脲(imidocarb, IM)单抗筛选及残留检测^[10]。

该试纸利用生物素标记的载体蛋白-IM偶联物

作为探针,以胶体金标记 SPA 蛋白, T 线固化亲和素, C 线固化免疫球蛋白 G(IgG)。检测抗体时,生物素免疫探针中的 IM 组分与样品中的抗体发生反应,形成探针-抗体复合物。之后,复合物中的抗体组分与金标 SPA 蛋白结合,形成金标 SPA-抗体-探针三重复合物,三重复合物中的生物素组分被 T 线固化的亲和素识别,从而使 T 线显示红色条带。样品中抗体水平越高, T 线显色强度越深。相较于 ELISA,利用该试纸筛选 IM 单抗的检测时间从 1~2 h 缩短至 10 min。检测半抗原时,预先在反应杯中加入定量抗体、待测样品和生物素探针。样品中游离的 IM 可与抗体结合,进而阻断抗体与生物素免疫探针中 IM 组分的结合,导致后续生物素探针无法与胶体金标记的 SPA 蛋白结合,进而使得 T 线不显色,仅有 C 线因金标 SPA 与 IgG 的结合而显色。

半抗原及其抗体通用型检测试纸为半抗原抗体筛选和残留检测提供了一种高效、通用且低成本的新方法。其技术关键点在于仅需要更换生物素与载体蛋白-半抗原偶联物探针中的半抗原类型即可实现对半抗原残留及其抗体的通用性检测,实现了“一条试纸、两种用途”的目的。

3 基于纳米抗体的试纸检测

纳米抗体具有较小的尺寸(约 15 kDa)、更高的稳定性、更好的溶解性,而且易于在原核表达系统中高效生产,并可生物工程化为双价或多价形式,在诊断领域展现出独特的应用优势^[11]。

Hu 等^[12]基于纳米抗体开发了快速检测严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的免疫层析试纸。该试纸利用时间分辨荧光微球分别标记同源三价纳米抗体和单抗作为检测探针,以抗不同表位的同源三价纳米抗体为 T 线,基于夹心法实现检测。与基于双单抗夹心的检测方法相比,灵敏度提高了 4~32 倍;与商业化试纸检测相比,灵敏度提高了 32~256 倍。

Qin 等^[13]基于纳米抗体研发了快速检测重组人干扰素 $\alpha 2b$ (recombinant human interferon $\alpha 2b$, rhIFN- $\alpha 2b$)的免疫层析试纸。该试纸利用胶体金标记可特异结合 rhIFN $\alpha 2b$ 的重组纳米抗体,以重组 rhIFN $\alpha 2b$ 蛋白为 T 线,以多抗为 C 线,基于阻断法实现检测,展示了纳米抗体在药物检测方面的应用潜力。

4 基于新型纳米材料的试纸检测

新型纳米材料在提高免疫层析试纸检测灵敏度方面表现出了良好性能。相较于利用胶体金纳米颗粒

制备的试纸,基于磁纳米颗粒、量子点、上转换纳米颗粒、玻璃碳微球、铕纳米颗粒、复合材料等制备的免疫层析试纸灵敏度显著提升,而且借助特定仪器读取检测信号可实现定量检测。

Bragina 等^[14]基于磁性纳米颗粒制备了定量检测细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的免疫层析试纸。该试纸利用磁性纳米颗粒标记抗 CD9 分子的抗体,基于双抗体夹心法和磁性颗粒定量技术实现对 EVs 的检测,灵敏度比胶体金免疫层析试纸和商品化 ELISA 试剂盒高出 1~2 个数量级。

Xiao 等^[15]以量子点为标记材料,基于双抗体夹心法制备了快速检测 H7N9 禽流感病毒的免疫层析试纸,并与 3D 打印结果读取平台相结合,提高了检测结果的清晰度,检测限比胶体金免疫层析试纸高出 2 个数量级。

Shen 等^[16]研发了一种基于核壳上转换荧光纳米颗粒的免疫层析试纸,用于检测谷物中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)毒素。该方法利用通过 NaYF₄:Yb 壳层保护发光离子(Er³⁺),减少了非辐射衰变,显著提升了荧光强度,对 DON 的检测灵敏度较胶体金试纸提升 20 倍以上。

Lin 等^[17]研发了一种基于玻璃碳微球(glassy carbon microspheres, GCMs)的免疫层析试纸,用于检测前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)。该研究首次以 GCMs 作为信号标记抗 PSA 单抗(PSA-Ab2),以 PSA-Ab1 为 T 线,以山羊抗小鼠二抗为 C 线,通过测量 T 线反射的 LED 光强度(550 nm)实现定量检测,灵敏度比胶体金免疫层析试纸高出约 3 倍。

Zou 等^[18]研发了一种基于铕纳米球(europium nanospheres, EuNPs)的时间分辨荧光免疫层析试纸,通过阻断法免疫反应快速筛查鸡肉中 4,4'-二硝基苯胺(4,4'-dinitrocarbanilide, DNC)残留。该研究使用 EuNPs 标记抗体,以 DNC-4-BSA 为 T 线,以多抗为 C 线,通过记录 T 线和 C 线的荧光强度实现 DNC 的定量分析,检测限比胶体金免疫层析试纸检测限提升近 10 倍,且无需复杂的样本前处理。

Liu 等^[19]利用胶体金纳米颗粒包覆聚苯乙烯乳胶微球制备复合材料,并以该复合材料标记流感病毒特异性单抗,基于双抗体夹心法制备了检测 H3 亚型流感病毒的免疫层析试纸,复合材料形成的较大比表面积使得该试纸的检测限比胶体金免疫层析试纸显著提高 64 倍。

5 基于纳米酶的试纸检测

除了利用胶体金纳米颗粒或新型纳米材料自身

特性作为可识别的检测信号源,试纸检测也在尝试使用2种甚至多种信号提升检测灵敏度。纳米酶是一类具有类似天然酶催化活性的纳米材料,能够模拟天然酶的催化功能,具有成本效益高、稳定性强、催化活性高和信号增强等特性,在生物传感、疾病诊断和环境监测等领域具有广泛的应用前景^[20]。

Wang等^[21]基于Fe₃O₄纳米酶开发了检测EVs的免疫层析试纸。该试纸使用Fe₃O₄纳米酶标记抗CD63抗体形成纳米酶探针,以抗CD9抗体为T线,以二抗为C线,基于双抗体夹心法实现检测。阳性反应可在T线形成可见的棕色条带,而且将试纸浸入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)时,纳米酶可催化TMB氧化生成蓝色产物,显著增强T线颜色强度和检测灵敏度。

Liu等^[22]制备了基于Co-Fe@hemin-过氧化物酶纳米酶检测SARS-CoV-2的化学发光免疫层析试纸。该试纸使用纳米酶标记抗SARS-CoV-2抗体,利用双抗体夹心法实现检测,在T线形成棕色条带的同时,纳米酶可催化鲁米诺-H₂O₂反应,产生化学发光信号,显著增强检测灵敏度。

6 多联检测试纸

多联检测试纸可通过一次上样同时检测多种靶标,既可用于不同病原体的鉴别诊断以及同一病原体的分型诊断,也可用于多种小分子药物残留的快速筛查。实现多联检测的可行方案包括但不限于:(1)设置多道不同的T线;(2)在单道T线上固化多种不同抗体,并利用相应抗体分别与不同特性的纳米材料进行标记;(3)制备集成多个单试纸的多通道检测试纸。

Sun等^[23]通过在单条试纸上设置两道T线开发了一种同时检测谷物中赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)的胶体金免疫层析试纸。该试纸使用胶体金纳米颗粒同时标记抗-OTA单抗和抗-ZEN单抗,分别以载体蛋白-OTA偶联物和载体蛋白-ZEN偶联物为T1线和T2线,能够基于阻断法快速实现OTA和ZEN两种靶标的同时检测。

Zhu等^[24]基于夹心法并以单道T线实现了对甲型流感病毒、乙型流感病毒和SARS-CoV-2病毒的快速鉴别检测,为呼吸道传染病的诊断和防控提供了新的工具。该试纸的技术特点在于用于标记3种病毒特异性单抗的纳米微球具有不同的拉曼特性,通过便携式拉曼光谱仪检测单道T线上呈现的特征峰即可实现对这3种病毒的快速检测和区分。与设置三道T

线的免疫层析试纸相比,单道T线检测减少了试剂用量和成本,缩短了准备时间。

Sun等^[25]制备了一种双通道胶体金免疫层析试纸,用于快速检测西瓜果斑病菌(*Paracitovorax citrulli*)的两种菌株群。该试纸产品将两个单试纸集成在一个双通道塑料盒中,两个单试纸分别基于阻断法实现对特异性菌株群的检测。该试纸检测技术的优点在于能够快速检测和区分两种菌株群的单一感染或混合感染,从而有针对性地指导用药,适用于田间早期监测。

免疫层析试纸检测技术具有操作简便、快速即时的特点,被广泛应用于抗原、抗体及半抗原等靶标检测。夹心法和阻断法是试纸检测技术最基本的检测原理,通常被分别用于检测抗原和半抗原。当前免疫层析试纸检测技术不断发展,出现了阻断法检测抗原和抗体、通用型试纸检测半抗原及其抗体等创新性技术应用。纳米抗体、新型纳米材料、纳米酶及信号增强策略的应用极大提高了试纸检测的灵敏性。多联检测试纸的制备和应用使得试纸检测在多靶标同时检测和大规模群体监测等方面具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] KUMAR P, SARKAR N, SINGH A, et al. Nanopaper biosensors at point of care[J]. *Bioconjug Chem*, 2022, 33(6): 1114-1130.
- [2] XING G, SUN X, LI N, et al. New advances in lateral flow immunoassay (LFI) technology for food safety detection [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6596.
- [3] DI NARDO F, CHIARELLO M, CAVALERA S, et al. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives[J]. *Sensors*, 2021, 21(15): 5185.
- [4] ZHANG G, GUO J, WANG X. Immunochromatographic lateral flow strip tests[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 504: 169-183.
- [5] TANAKA R, YUHI T, NAGATANI N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385(8): 1414-1420.
- [6] ARAI H, PETCHCLAI B, KHUPULSUP K, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(2): 367-370.
- [7] ZHANG GP, WANG XN, YANG JF, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2): 27-33.
- [8] LIN P, WANG J, SONG S, et al. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of mink enteritis virus[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 839320.
- [9] LV R, GUO J, ZHANG Y, et al. Development and evaluation

- of a blocking lateral flow assay strip for detection of Newcastle disease virus antibodies[J]. *Vet Sci*, 2023,10(2):152.
- [10] 邢云瑞,孙亚宁,胡晓飞,等.一种通用型半抗原免疫层析试纸的制备及在双咪苯脲上的应用[J]. *河南农业科学*, 2024,53(9):117-125.
- [11] SALVADOR JP, VILAPLANA L, MARCO MP. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019,411(9):1703-1713.
- [12] HU W, LIU Y, LI X, et al. Nanobody-based strategy for rapid and accurate pathogen detection: A case of COVID-19 testing[J]. *Biosens Bioelectron*, 2024,263:116598.
- [13] QIN X, DUAN M, PEI D, et al. Development of novel nanobody-based lateral-flow immunochromatographic strip test for rapid detection of recombinant human interferon $\alpha 2b$ [J]. *J Pharm Anal*, 2022,12(2):308-316.
- [14] BRAGINA VA, KHOMYAKOVA E, ORLOV AV, et al. Highly sensitive nanomagnetic quantification of extracellular vesicles by immunochromatographic strips: A tool for liquid biopsy[J]. *Nanomaterials*, 2022,12(9):1579.
- [15] XIAO M, HUANG L, DONG X, et al. Integration of a 3D-printed read-out platform with a quantum dot-based immunoassay for detection of the avian influenza A (H7N9) virus[J]. *Analyst*, 2019,144(8):2594-2603.
- [16] SHEN Y, ZHAO X, ZHANG Z, et al. A novel core-shell up-conversion nanoparticles immunochromatographic assay for the detection of deoxynivalenol in cereals[J]. *Talanta*, 2024,272:125806.
- [17] LIN S, ZHONG J, CHI Y, et al. Colorimetric immunosensor based on glassy carbon microspheres test strips for the detection of prostate-specific antigen[J]. *Mikrochim Acta*, 2021,188(11):366.
- [18] ZOU M, YIN Y, GUO L, et al. A europium nanosphere-based time-resolved fluorescent immunochromatographic assay for the rapid screening of 4,4'-dinitrocarbanilide: Aiming at improving strip method performance[J]. *Biosensors (Basel)*, 2023,13(5):518.
- [19] LIU X, YANG J, LI Q, et al. A strip test for the optical determination of influenza virus H3 subtype using gold nanoparticle coated polystyrene latex microspheres[J]. *Mikrochim Acta*, 2020,187(5):306.
- [20] TIAN Q, LI S, TANG Z, et al. Nanzyme-enabled biomedical diagnosis: Advances, trends, and challenges[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024,14(8):e2401630.
- [21] WANG B, MOYANO A, DUQUE JM, et al. Nanzyme-based lateral flow immunoassay (LFIA) for extracellular vesicle detection[J]. *Biosensors (Basel)*, 2022,12(7):490.
- [22] LIU D, JU C, HAN C, et al. Nanzyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021,173:112817.
- [23] SUN Y, XING G, YANG J, et al. Development of an immunochromatographic test strip for simultaneous qualitative and quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in cereal[J]. *J Sci Food Agric*, 2015,96(11):3673-3678.
- [24] ZHU A, ZHAO B, LI J, et al. Establishment of a Raman microscope-based immunochromatographic method for the combined detection of influenza A and B viruses and SARS-CoV-2 antigen on a single T-line[J]. *RSC Adv*, 2024,14(50):37498-37511.
- [25] SUN L, XING Y, YANG X, et al. Dual-channel colloidal gold-based immunochromatographic test strip for rapidly differentiating between two major groups of *Paracitovorax citrullii* [J]. *Biosensors (Basel)*, 2025,15(3):133.

收稿日期:2025-06-04