

分类号

密级

U D C

编号

南方医科大学

硕士学位论文

新型定量检测SARS-CoV-2 N蛋白免疫层析方法的建立

The establishment of novel lateral flow immunoassay for
quantitative detection of SARS-CoV-2 N protein

李成城

导师姓名

黎诚耀 教授

专业名称

输血医学

培养类型

学术型

论文提交日期

2024年 5 月 21 日

南方医科大学 2021 级硕士学位论文

新型定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白免疫层析方法的建立
The establishment of novel lateral flow immunoassay for
quantitative detection of SARS-CoV-2 N protein

课题来源：国家自然科学基金（81871655，32070929）

学 位 申 请 人	李成城
导 师 姓 名	黎诚耀
专 业 名 称	输血医学
培 养 类 型	非定向学术型
培 养 层 次	硕士研究生
所 在 学 院	检验与生物技术学院
答辩委员会主席	江振友 教授
答辩委员会委员	江丽芳 教授
	赵 卫 教授
	李婷婷 教授
	王文敬 教授

2024 年 5 月 21 日 广州

新型定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白 免疫层析方法的建立

硕士研究生：李成城

指导教师：黎诚耀

辅导教师：李婷婷

摘 要

背景和目的

SARS-CoV-2 的快速传播严重威胁全球公共卫生。为遏制 SARS-CoV-2 的大规模传播, 需要建立简便、快速、高灵敏的 SARS-CoV-2 检测方法。核酸检测是 WHO 推荐的 SARS-CoV-2 检测方法。核酸检测具有准确、灵敏和高通量的优点, 但昂贵的仪器、专业的操作人员和实验室限制了核酸检测的大规模应用。尽管 SARS-CoV-2 抗体检测和 SARS-CoV-2 抗原检测作为核酸检测的重要补充手段已被人们所接受, 但也存在着假阴性和低灵敏度的缺点。纳米金花 (Au Flower Nanoparticles, AF NPs) 是在胶体金 (金种子) 的基础上烧制的纳米颗粒。AF NPs 因具有更大的粒径和位于表面的不规则突起, 可以吸附更多的蛋白质, 从而提高检测灵敏度。本研究制备 AF NPs 并将其和免疫层析方法结合, 提高了检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的灵敏度。为进一步提高 SARS-CoV-2 N 蛋白的检测灵敏度, 在金种子的基础上添加铂元素和钯元素烧制铂包金包钯纳米颗粒 (Au@Pt@Pd Nanoparticles, Au@Pt@Pd NPs), 利用其类过氧化物酶特性放大 T 线的信号, 同时结合胶体金免疫层析分析仪实现高灵敏、快速、简便的定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。

方法

1. 将制备的 AF NPs 标记 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体 1 (mAb1) 作为检测探针。以 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体 2 (mAb2) 和羊抗鼠 IgG 分别包被在检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), 制备基于 AF NPs 的侧向免疫层析试纸条 (Au flower lateral flow immunoassay test strip, AF-LFIA) 用于检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。将 AF-LFIA 与传统胶体金法侧向免疫层析试纸条 (Au lateral flow immunoassay test strip, Au-LFIA) 对比测试 SARS-CoV-2 N 蛋白标准品和临床鼻咽样本以此评估 AF-LFIA 的性能。

2. 将制备的 Au@Pt@Pd NPs 标记 mAb1 作为检测探针。以 mAb2 和羊抗鼠 IgG 分别包被在 T 线和 C 线。Au@Pt@Pd NPs 具有类过氧化物酶特性可催化过氧化氢和释放羟基自由基, 氧化邻苯二胺 (O-pHenylenediamin, OPD) 与羟基自由基生成沉淀二氨基偶氮苯 (Diaminoazobenzene, DAB), 使 T 线的颜色逐渐加深, 可显著提高试纸条的灵敏度。制备基于 Au@Pt@Pd NPs 的侧向免疫层析试纸条 (Au@Pt@Pd lateral flow immunoassay test strip, Au@Pt@Pd-LFIA), 并结合胶体金免疫分析仪定量分析 SARS-CoV-2 N 蛋白标准品的检测结果。将 Au@Pt@Pd NPs-LFIA 与检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的 ELISA 对比测试临床鼻咽样本以此评估 Au@Pt@Pd NPs-LFIA 的性能。

结果

1. 成功制备了 AF-LFIA。通过检测 SARS-CoV-2 N 蛋白标准品可知, AF-LFIA 的检测限 (Limit of detection, LOD) 为 0.49 ng/mL, 优于传统的 Au-LFIA (LOD=0.98 ng/mL), 并且检测时间也缩短至 10 min。在 44 例新冠肺炎阳性和 50 例新冠肺炎阴性鼻咽样本的检测中, AF-LFIA 和 Au-LFIA 的敏感性分别为 65.91%、54.55%, 特异性均为 100%, 准确性分别为 84.04%、78.72%。以上数据表明, AF-LFIA 比 Au-LFIA 更加灵敏、快速的检测出 SARS-CoV-2 N 蛋白。

2. 成功制备了 Au@Pt@Pd-LFIA。通过检测 SARS-CoV-2 N 蛋白标准品可知, Au@Pt@Pd-LFIA 的检测线性范围为 0.12-31.25 ng/mL。Au@Pt@Pd-LFIA

的检测限为 0.06 ng/mL, 比 AF-LFIA 和 Au-LFIA 分别低 8 倍和 16 倍。

Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 相比, 在检测限相近的同时, 将检测时间缩短至 16 min。在 44 例新冠阳性和 50 例新冠阴性鼻咽样本的检测中, Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的灵敏性均为 84.09%, 特异性均为 100%, 准确性均为 92.55%。Au@Pt@Pd-LFIA 的性能和 ELISA 相近甚至更优。

结论

1、相比于 Au-LFIA 和 AF-LFIA, Au@Pt@Pd-LFIA 的检测限可降低至 0.06 ng/mL, 能够更灵敏的定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。

创新之处

1、首次将胶体金免疫层析分析仪和基于 Au@Pt@Pd NPs 的侧向免疫层析试纸条结合, 实现高灵敏、快速、便捷的定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。

2、制备基于纳米金花的侧向免疫层析试纸条并应用于 SARS-CoV-2 N 蛋白检测。在灵敏性和检测时间方面, AF-LFIA 均优于传统的胶体金法 SARS-CoV-2 N 蛋白检测试纸条。

关键词: 快速检测; SARS-CoV-2 N 蛋白; POCT; Au@Pt@Pd-LFIA; AF-LFIA; COVID-19

The establishment of novel lateral flow immunoassay for quantitative detection of SARS-CoV-2 N protein

Name: Chengcheng Li

Supervisor: Chengyao Li

Assistant Supervisor: Tingting Li

ABSTRACT

Background and purpose

SARS-CoV-2 is a serious threat to global public health. In order to reduce the risk of large-scale infection and transmission of SARS-CoV-2, the establishment of a simple, rapid and highly sensitive SARS-CoV-2 early detection method is necessary. Nucleic acid detection was recommended as the standard by the WHO. Nucleic acid detection is accurate, sensitive and high-throughput, but it is limited by expensive instruments, professional operators and certified laboratories. It is worth noting that the current diagnostic methods of SARS-CoV-2, including antibody detection and antigen detection, have been accepted as an important complementary means of nucleic acid detection. However high false negatives and low sensitivity are their inevitable limitations.

The Au flower nanoparticles (AF NPs) are synthesized from Au seeds, characterized by a larger particle size and irregular surface protrusions that enhance protein adsorption and improve detection sensitivity. In this study, AF NPs were prepared and combined with lateral flow immunoassay to enhance the sensitivity of

SARS-CoV-2 N protein detection. To further enhance the detection sensitivity of the SARS-CoV-2 N protein, platinum (Pt) and palladium (Pd) elements-coated gold nanoparticles (Au@Pt@Pd NPs) were synthesized using Au seeds. The peroxidase-like property of these nanoparticles was utilized to amplify the T-line signal. Au@Pt@Pd NPs were prepared and combined with lateral flow immunoassay to quantitatively analyze the SARS-CoV-2 N protein using a colloidal gold immunochromatography analyzer.

Methods

1. The mAb1 targeting SARS-CoV-2 N protein conjugated with AF NPs was employed as the detection probe. The test line (T line) and control line (C line) were coated with mAb2 targeting SARS-CoV-2 N protein and Goat anti-mouse IgG respectively. Au flower lateral flow immunoassay test strip (AF-LFIA) based on AF NPs was developed, which was evaluated by detecting SARS-CoV-2 N protein standard. AF-LFIA was used for clinical sample analysis and compared with conventional Au lateral flow immunoassay test strip (Au-LFIA).

2. The mAb1 conjugated with Au@Pt@Pd NPs was employed as the detection probe. T line and C line were coated with mAb2 and Goat anti-mouse IgG respectively. Based on the peroxide-like properties of Au@Pt@Pd NPs, hydrogen peroxide could be catalyzed to release hydroxyl free radicals which would oxidize O-pHenylenediamin (OPD). This oxidation process led to the precipitation of Diaminoazobenzene (DAB), resulting in the gradual intensification of the T line signal. Consequently, this approach significantly enhanced detection sensitivity. Au@Pt@Pd lateral flow immunoassay test strip (Au@Pt@Pd-LFIA) based on Au@Pt@Pd NPs was developed, which was combined with a colloidal gold immunoanalyzer for quantitative assaying SARS-CoV-2 N protein standard. Au@Pt@Pd-LFIA was used for clinical

sample analysis and compared with ELISA.

Results

1. The limit of detection (LOD) of AF-LFIA is 0.49 ng/mL, which is better than the traditional Au-LFIA (LOD=0.98 ng/mL) for SARS-CoV-2 N protein. Additionally, the detection time of AF-LFIA has been shortened to 10 minutes. In the detection of 44 positive and 50 negative nasopharyngeal samples, the sensitivity of AF-LFIA and Au-LFIA were 65.91% and 54.55%, respectively. The accuracy rates were 84.04% for AF-LFIA and 78.72% for Au-LFIA. These data suggest that AF-LFIA exhibits superior sensitivity and rapidity in detecting SARS-CoV-2 N protein compared to Au-LFIA.

2. The visual detection limit of Au@Pt@Pd-LFIA, with a linear detection range of 0.12-31.25 ng/mL, is 0.06 ng/mL. Compared to ELISA, the detection time of Au@Pt@Pd-LFIA was shortened to 16 minutes while the detection limit is similar to ELISA. In the detection of 44 SARS-CoV-2 positive and 50 SARS-CoV-2 negative nasopharyngeal samples, the sensitivity and accuracy of Au@Pt@Pd-LFIA and ELISA were both 84.06% and 92.55%. Au@Pt@Pd-LFIA has similar or even better performance than ELISA.

Conclusion

Compared with Au-LFIA and AF-LFIA, the detection limit of Au@Pt@Pd-LFIA can be reduced to 0.06 ng/mL, which can detect SARS-CoV-2 N protein more sensitively.

Innovation

1. It's the first time that the colloidal gold immunochromatography analyzer and the lateral immunochromatography strip based on Au@Pt@Pd NPs were combined to achieve highly sensitive, rapid and convenient quantitative detection of SARS-CoV-2 N protein.

ABSTRACT

2. A lateral flow immunoassay test strip based on AF NPs was prepared and applied to the detection of SARS-CoV-2 N protein. In terms of sensitivity and detection time, AF-LFIA is superior to the traditional Au-LFIA for SARS-CoV-2 N protein detection.

KEYWORDS: Rapid detection; SARS-CoV-2 N protein; POCT; Au@Pt@Pd-LFIA; AF-LFIA; COVID-19

目 录

前言.....	1
1. SARS-CoV-2 的生物学分型和特性.....	1
2. COVID-19 的感染机制及临床症状	2
3. COVID-19 的流行与防控.....	3
4. COVID-19 诊断方法的概述	4
5. 新型 POCT 方法的建立及在 COVID-19 诊断中的应用	7
6. 本研究的目的和意义.....	9
第一章 基于纳米金花的侧向免疫层析试纸条的制备及其应用	10
1.1 材料.....	10
1.2 实验方法.....	13
1.3 结果.....	19
1.4 讨论.....	32
第二章 基于 Au@Pt@Pd NPs 的侧向免疫层析试纸条的制备及其应用	34
2.1 材料.....	34
2.2 实验方法.....	38
2.3 结果.....	44
2.4 讨论.....	59
全文总结.....	61
参考文献.....	63
缩略词.....	77
附录.....	79

前 言

2019 年 12 月, 原因不明的肺炎在中国湖北省武汉市爆发, 在肺炎患者的肺泡及支气管等肺部组织的样本中发现大量的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)^[1]。虽然 SARS-CoV-2 与导致 2003 年 SARS 疫情的冠状病毒在基因上相互关联, 实际上却不是相同的病毒。2020 年 2 月 11 日, 世界卫生组织正式宣布这种新疾病的名称为“2019 冠状病毒病(COVID-19)”^[2]。

1. SARS-CoV-2 的生物学分型和特性

SARS-CoV-2 是一类线性单股正链的 RNA 病毒, 属于冠状病毒科轮状病毒亚属, 病毒颗粒呈椭圆形或圆形, 直径约为 60-140 nm, 具有完整的包膜和基因组^[3]。SARS-CoV-2 拥有一个大的 RNA 基因组, 由大约 30,000 个核苷酸组成, 其复制由 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRP)和相关的校对酶核酸外切酶(ExoN)介导, 其基因组能够转录多达 29 种蛋白质^[4]。

刺突糖蛋白、核衣壳蛋白、膜糖蛋白和包膜蛋白等结构蛋白因分布位置和含量决定了 SARS-CoV-2 的致病性和传播性^[5]。刺突糖蛋白具有免疫识别位点, 在 SARS-CoV-2 入侵宿主的过程中与细胞表面受体结合。它是病毒进入细胞依赖的最重要的蛋白质, 决定了病毒是否进入宿主细胞, 这一特性被用于设计疫苗^[6-8]。核衣壳蛋白的主要功能是将病毒 RNA 包装到螺旋核糖核衣壳中, 并在病毒粒子组装过程中与膜糖蛋白相互作用, 形成保护病毒 RNA 的螺旋形核衣壳。此外, 核衣壳蛋白的瞬时表达已被证明可以显著增加某些病毒样颗粒的产生, 这表明核衣壳蛋白在病毒增殖过程中发挥重要作用^[9]。膜糖蛋白由 222 个氨基酸组成, 在病毒包膜中大量存在, 决定了病毒包膜的形状^[10]。包膜蛋白是 SARS-CoV-2 主要结构蛋白中最小的, 也是最不为人所知的。它在不同的病毒亚型中高度保守, 并通过与膜糖蛋白的相互作用维持了病毒颗粒的形状并促进了颗粒的释放^[11, 12]。

由于多数病毒是 RNA 单链病毒, 在传播链中随环境的变化发生变异是不可

避免的。虽然多数的变异不会影响病毒的特性，但病毒的传播性和毒性可能会在传播的过程中发生变异，进而导致感染后的发病程度、诊断方式和防治手段等随之改变。刺突糖蛋白在遗传改变中占有很高的比例，被认为在毒性、传播能力以及免疫逃逸方面起着重要作用^[13]，其他结构蛋白的突变也可能导致新冠病毒对特异性抗体的抵抗力增强^[14]。SARS-CoV-2 是冠状病毒的新型变种，容易在传播过程中变异，目前为止出现的变异株包括 Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron、XBB.1.5 等 6 种需要防范的病毒变异株^[15,16]。

2. COVID-19 的发病机制及临床症状

四种结构蛋白帮助 SARS-CoV-2 进入宿主细胞^[17]。病毒表面的刺突糖蛋白可以识别宿主细胞中的血管紧张素转换酶 2 (ACE2)受体^[18]。核衣壳蛋白将感染过程中产生的 RNA 物质包装到病毒颗粒中^[19]。膜糖蛋白以二聚体形式存在于病毒粒子中以保持病毒的形状。包膜蛋白具有离子通道活性，促进病毒从宿主细胞的组装和释放，大大加快了病毒增殖的速度^[20,21]。病毒进入宿主细胞细胞质后，开始膜糖蛋白、包膜蛋白和核衣壳蛋白的复制、转录和翻译。这些结构蛋白聚集到病毒中，最终通过胞吐作用释放出来。其中刺突糖蛋白不被组装，以细胞-细胞融合的方式将受感染细胞变为多核细胞。宿主体内的病毒特异性抗体无法识别这些多核细胞，使得病毒在受感染生物体内能够快速复制传播^[22]。由于肺泡上皮 II 型细胞的管腔表面存在大约 83% 的 ACE2 受体，使其成为病毒入侵的主要位置，最终导致肺损伤，严重者还会引发呼吸衰竭甚至死亡^[23,24]。此外，ACE2 受体广泛分布于肺外组织，包括心脏、肾脏、肝脏和肠道，SARS-CoV-2 可以入侵上述器官中，并引发患者多器官功能障碍^[25]。

COVID-19 的临床特征多样且具有非特异性，疾病表现可以从无症状到严重肺炎，甚至死亡^[26]。发烧和咳嗽是 COVID-19 患者的最主要症状，部分患者会同时出现疲劳，咳痰，喉咙痛等症状，呼吸困难和头痛也时有发生^[27]。少部分患者表现为腹泻和呕吐等胃肠道症状^[28]。由于老人和小孩抵抗力较低，并且多数老年

人伴有高血压、慢性阻塞性肺疾病、心血管疾病等慢性疾病，患有 COVID-19 后进一步发展为危重疾病，临床表现为呼吸衰竭以及多器官衰竭，最终导致死亡^[29]。年轻的 COVID-19 患者虽然表现出较少的上呼吸道症状（如咳嗽和咽喉肿痛），但肺炎更为常见^[30]。COVID-19 常常会给患者留下或轻或重的后遗症，引发神经和精神症状^[31, 32]。COVID-19 后遗症的体征和症状包括疲劳、呼吸困难、心悸、嗅觉障碍、高血压、脱发、睡眠问题、注意力不集中、健忘症、麻木、疼痛、胃肠道症状、抑郁和焦虑等症状^[33-35]。由于 COVID-19 后遗症的具体病理生理机制尚未明确，目前尚无明确的诊断标准，因此患者难以被正确诊断和治疗^[36]。

3. COVID-19 的流行与防控

自 2019 年 12 月以来，全球记录在案的有超过 7.6 亿例病例和 690 万例死亡，但实际数字被认为更高。截至 2023 年 6 月，已接种疫苗超过 130 亿剂^[37]。根据中国疾病预防控制中心统计，在全国范围内，阳性人数在 2022 年 12 月 22 日达到高峰后开始逐步下降，并在 2023 年 1 月 23 日降低至 1.5 万（最低）；检测阳性率在 2022 年 12 月 25 日达到高峰后开始下降，在 2023 年 1 月 23 日降低至 5.5%。同时，根据国家卫健委发布的最新公告可知，对于新型冠状病毒感染将实施“乙类乙管”的疫情防控政策^[38]。

SARS-CoV-2 属于 β 属冠状病毒，对紫外线和热敏感，乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂等脂溶剂均可有效灭活病毒。SARS-CoV-2 在人群中极易传播，常通过呼吸道飞沫和密切接触传播，在相对封闭的环境中经气溶胶传播。人员接触被 SARS-CoV-2 污染的物品后也可能造成感染。目前，奥密克戎变异株因潜伏期短，传播力强，传播速度快，已成为国内外流行的优势毒株。相比之前的病毒类型，奥密克戎变异株的致病力减弱，具有更强的免疫逃逸能力，但现有疫苗仍可有效的预防该变异株所致的重症和死亡^[39]。

疫情爆发早期，免疫力低下的老人和幼童更易发生重症感染甚至死亡^[40, 41]。由于新冠疫苗的及时研制和使用，使得接种人群产生针对 SARS-CoV-2 的特异

性抗体进而获得免疫力^[42,43]。临床研究调查表明，SARS-CoV-2 既往感染者和疫苗接种者仍有几率再次感染 SARS-CoV-2^[44,45]，但以上人群感染后出现的症状较轻，常表现为无症状感染或者轻微症状，主要包括发烧、咳嗽、乏力等。并且经过隔离治疗，很快可以恢复健康，进行正常的工作和生活^[46]。

从 2019 年至今，我国坚持“预防为主、防治结合、依法科学、分级分类”的原则，结合常态化防控和疫情流行期间应急处置，明确“四方责任”，提高疫情预警灵敏性，强调保护重点人群，将“保健康、防重症”作为工作目标，将保护人民生命安全和身体健康放在第一位，维持经济社会正常发展^[47-49]。但随着经济的发展、人口的流动以及进出口贸易恢复的情况下，SARS-CoV-2 的境外输入成为中国新冠疫情防控的不稳定因素^[50]。人口的流动和人群间的密切接触导致了新冠疫情持续不断，欧洲爆发了奥密克戎大规模流行性感染^[51]。目前全球每日仍有新增确诊病例^[52]。我们应该基于现有的成绩，针对以上问题，控制传染源、阻断传播途径，做好自我防护，彻底有效的防控 SARS-CoV-2。

国家倡导每个人都是自己健康的第一责任人，我们应遵守防疫行为准则，坚持勤洗手、戴口罩、保持社交距离、咳嗽礼仪、清洁消毒等良好卫生习惯和合理膳食、适量运动等健康生活方式，自觉提高健康素养和自我防护能力；疫情严重期间减少聚集，患有基础疾病的老年人及孕妇、3 岁以下婴幼儿等尽量减少前往人员密集场所，按时按量接种新冠疫苗。据报道，SARS-CoV-2 可能通过蝙蝠、穿山甲等野生动物传播给人类^[53]。对此，我们应该禁止买卖或伤害野生动物，同时拒绝食用或减少接触野生动物，减少 SARS-CoV-2 传播的可能性。

4. COVID-19 诊断方法的概述

COVID-19 大流行仍在持续影响并改变着人们的生活方式^[54]。各国采取准确诊断和流行病学监控相结合的方法控制 SARS-CoV-2 的传播，但 SARS-CoV-2 仍在全世界范围内继续流行，并伴随不同程度的临床表现^[55]。用于诊断 COVID-19 的快速检测技术已成为大规模筛查 SARS-CoV-2 感染者的基础，也是各国统计确

切病例数并采取相应措施的先决条件^[56]。在新冠疫情爆发早期,由于针对 SARS-CoV-2 的特定治疗和疫苗的缺乏,导致隔离有症状的疑似或感染病例成为控制 SARS-CoV-2 传播的最适方法。随着 COVID-19 的大流行,各种各样的检测方法也应运而生。目前可用的诊断工具主要基于 SARS-CoV-2 的核酸、抗体和抗原三方面进行检测^[57-60]。

SARS-CoV-2 核酸检测被世卫组织推荐用于检测新冠,逆转录酶实时聚合酶链反应(RT-qPCR)也被认为是 SARS-CoV-2 检测的重要方法^[61]。以 SARS-CoV-2 的特定基因序列作为检测靶标,加入探针,酶,核苷酸等一系列反应物后进行扩增,最后通过荧光信号的数值判断病毒核酸是否存在于样本中。研发人员针对 SARS-CoV-2 基因组的不同基因(核衣壳基因、包膜基因、刺突基因、ORF1b 或 ORF8 区域等)开发了 RT-qPCR 检测方法^[62, 63]。WHO 建议使用针对包膜基因的 RT-qPCR 来筛查 SARS-CoV-2。而 CDC 提倡测定两个核衣壳基因(N1、N2)来筛查 SARS-CoV-2^[64]。核酸的检测程序大多复杂且需要昂贵的仪器设备,熟练的操作人员和特定的场地。在资源有限的环境中,它不能作为大规模筛查 SARS-CoV-2 的检测方法^[65, 66]。此外,RT-qPCR 的结果很大程度上取决于样本中病毒 RNA 的质量,在某些情况下,需要重复 2 至 3 次才能最终确认检测结果,这也大大增加了检测人员的工作量和受感染的可能性^[67, 68]。

关于 SARS-CoV-2 的研究表明,感染 SARS-CoV-2 的患者的体内会产生特异性抗体^[69, 70],例如 IgG、IgM 和 IgA^[71]。患者在感染后第 4 日开始产生抗体(IgG、IgM),发病后 20 日内可检测出特异性抗体,这种状态会持续到第 41-53 天^[72]。因此,医务人员在筛查病毒感染者和评估患者状态以及接种疫苗后的免疫反应时,可将特异性抗体作为有效的诊断生物标志物^[73]。目前市场上主流的抗体检测方法为侧向层析型检测(Lateral flow immunoassay, LFA)和酶联免疫吸附型检测(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[74-78]。

新冠抗体检测试纸条的原理是将 SARS-CoV-2 重组蛋白和鼠 IgG 抗体分别标记于胶体金后同时喷涂在结合垫上,然后将鼠抗人 IgG/IgM 抗体包被在纸条

的 T 线（检测线）上，再将羊抗鼠抗体喷涂于 C 线（质控线），待测样本中存在针对 SARS-CoV-2 的 IgG/IgM 抗体时，IgG/IgM 抗体和结合垫上胶体金标记的重组蛋白结合形成免疫复合物，通过毛细管作用层析到 T 线时，会被包被在 T 线上的鼠抗人 IgG/IgM 抗体捕获，形成肉眼可见的线条，胶体金上标记的鼠 IgG 抗体最终被包被在 C 线上的羊抗鼠抗体捕获，形成质控线。根据显示窗口上 T 线是否存在线条判断样本中 SARS-CoV-2 特异性 IgG/IgM 抗体的有无。此外，无论有无待检抗体存在，质控线都是存在的，反之则证明检测结果无效。医务人员根据 T 线的有无判断样本中是否含有针对 SARS-CoV-2 的 IgG/IgM 抗体，进一步辅助诊断 SARS-CoV-2 感染^[79, 80]。

在新冠抗体 ELISA 测试中，SARS-CoV-2 重组抗原被包被在酶标板的 96 孔中。样本在测试时添加到孔中。如果样本中存在针对 SARS-CoV-2 的 IgG /IgM 抗体，则 IgG /IgM 抗体会和孔中的重组抗原结合。反之，则不会发生抗原抗体结合反应。酶标板经过孵育后，加入含有酶标记的二抗。最后加入显色底物产生变色反应。最后使用光谱仪读取显色反应终止后的 OD 值，可以检测目标抗体的浓度^[81]。

由于新冠抗体产生的较晚，抗体的检测结果有助于疫苗研究、流行病学研究和追溯性研究。据报道显示，新冠抗体在感染两周后产生，因此新冠抗体的检测结果具有延迟性，导致抗体检测的阴性结果无法确认患者未感染 SARS-CoV-2，这种迟发反应可能导致检测结果的假阴性^[82]，此外患者被感染但尚未产生可检测水平的抗体也会导致这种情况的发生^[83]。虽然抗体检测结果可以提示我们既往感染病例数以及疫苗接种后的群体免疫力效应^[84]，但新冠抗体检测仍存在局限性，SARS-CoV-2 的既往感染患者尽管已痊愈仍可能检测出 SARS-CoV-2 抗体阳性，造成检测结果的假阳性^[85]。

SARS-CoV-2 外膜蛋白检测，即新冠抗原检测，是一种直接检测病毒成分（棘突糖蛋白，核衣壳蛋白等）或者病毒本身的检测方法。SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白是目前新冠抗原检测试剂盒中最常见的检测靶标蛋白。相比抗体检测侧重于

监控患者的恢复情况，新冠抗原检测和核酸检测常用于提示新冠病毒的实时感染^[86,87]。由于新冠抗原先于抗体出现在患者体内并且具有靶标特异性，因此被认为可以比抗体检测更早地提示 SARS-CoV-2 感染^[88]。在研发人员解决了标准化 SARS-CoV-2 重组蛋白和 SARS-CoV-2 外膜蛋白配对单克隆抗体缺乏的难题后，新冠抗原检测相关的学术成果和商品化产品不断涌现^[89-94]。抗原检测可以在 LFA 试纸上进行，以达到快速，简便，价优的检测目的，非常适用于床旁检测和居家自检。新冠抗原检测试剂盒在全球范围内大量生产和使用，助力各国监控疫情。同时研发人员也开发出了新冠抗原 ELISA 检测试剂盒，以获得更好的灵敏度和高通量检测（同时测量 96 个样品）。

随着 SARS-CoV-2 的继续传播，许多可以快速提供检测结果的测试方法也被研发出来。例如：基于 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白修饰的金芯片的表面等离子体共振（SPR）方法，可在 15 分钟内检测人血清样品中的抗体^[95]；基于局部表面等离子体共振（LSPR）的 SPR 研究，该系统可高灵敏度的检测出 RdRp 基因、E 基因和 ORF1a 基因区域^[96]。环介导的等温扩增（LAMP）是另一种正在开发的用于快速检测 SARS-CoV-2 的工具。LAMP 不需要昂贵的热循环仪仪器，被视为 PCR 检测的有效替代方法^[97]。目前市面上开发的几款基于 LAMP 的新冠检测试剂盒已经获得美国食品和药品管理局的临时授权许可^[98]。

5. 新型 POCT 方法的建立及其在 COVID-19 诊断中的应用

即时检测（Point of care test, POCT），也被称为床旁检测，是指在靠近病人的位置，在未经培训的情况下，操作者或受试者自身检测并分析样本^[99]。相比于传统检测方法，POCT 能够快速为患者提供检测结果。同时，POCT 操作简便，不需要专业的实验人员和实验环境^[100]。在大规模防控传染病和感染性疾病时，POCT 在快速诊断方面有着其他方法不能相比的优势^[101]。LFA 是最常用于 POCT 检测的方法之一。LFA 具有检测时间短、操作简单、检测费用低等优势^[102]。胶体金因其光学特性优良，性质稳定，形态可控，制备工艺简便，易于表

面功能化等特点，常常在 LFA 中作为检测探针颗粒。操作人员通过肉眼观察检测窗口中有无条带及其深浅判断检测结果^[103]。但以胶体金作为检测探针颗粒的侧向免疫层析试纸条的灵敏度往往不能满足检测需求。为此，研究人员在胶体金的基础上开发了多种形式的纳米颗粒以满足高灵敏度的需求^[104-106]。

纳米金花(Au nanoflowers, AuNFs)是一类表面分布着不规则刺突的球状纳米粒子，其外观形似花状。与球形胶体金相比，纳米金花在突刺处形成更强的电场效应^[107]，确保在标记蛋白质的过程中，抗原/抗体牢牢的吸附在纳米金花表面。并且纳米金花因为具有更高的比表面积，可以使蛋白质结合纳米金花的空间位阻减少，达到吸附更多蛋白质的效果^[108]，这些性能使得纳米金花在 POCT 产品中具有更低的检出限。纳米金花已被广泛用于食品、饲料中真菌毒素，细菌等的检测^[109]。因此，本研究选用纳米金花作为标记颗粒，偶联 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体制备检测探针，研制基于纳米金花的免疫层析方法，并评价该方法的灵敏性、特异性、准确性等性能，及其检测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白的效果，为纳米金花的应用开发提供一个新的方向。

纳米酶是具有酶样活性的纳米材料，广泛应用于生物传感器、诊断试剂等医学研究领域^[110]。与天然酶相比，纳米酶不但具有类过氧化物酶活性，还有着制备简单，成本低廉和高稳定性等优点。据报道，第 8 族金属元素 Pt 和 Pd 具有类过氧化物酶活性，可以催化 H_2O_2 产生 O_2 ，并且三金属纳米粒子由于其高效的电荷转移能力以及不同元素之间可能存在的协同作用，表现出了比单金属和双金属纳米粒子更优异的催化活性^[111]。本研究在胶体金的基础上添加 Pt 和 Pd 两种金属元素烧制成一种三金属纳米酶 (Au@Pt@Pd NPs)。通过将 Au@Pt@Pd NPs 偶联 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体制备检测探针，用于研制 SARS-CoV-2 N 蛋白检测试纸条，Au@Pt@Pd NPs 不但具有类似纳米金花表面的不规则刺突，还可以通过催化底物放大检测信号，进一步提高灵敏度。同时结合胶体金免疫层析分析仪定量分析检测结果，通过灵敏性，特异性，精密性，稳定性，准确性等指标评估该方法。

6. 本研究的目的是和意义

在新冠疫情的全球流行时期及后疫情时代，大规模筛查新冠感染是不可避免的。核酸检测被世界卫生组织推荐为诊断新冠感染的“金标准”，但是由于核酸检测需要专业的实验室，熟练的操作人员，昂贵的仪器设备，难以进行快速筛查。并且高昂的检测费用也不适合贫困社区或卫生保健系统进行大规模常态化新冠感染筛查。大规模的筛查可能引发待测人群的交叉感染。相对密闭的筛查环境也会加重感染人群的临床症状。目前的疫情防控需要一种可靠的即时检测（POCT）。研究者开发了针对 SARS-CoV-2 的 IgG/IgM 抗体的新冠抗体检测试纸条作为核酸检测的辅助手段。但 SARS-CoV-2 抗体通常在感染两周后的患者体内才能检测到，因此新冠抗体检测无法有效诊断和筛查新冠早期感染。新冠抗原检测虽然可以早期筛查和诊断 COVID-19，但存在着灵敏度较低，假阴性高等缺点。因此，需要研发一种灵敏、简单、快速、廉价的新冠抗原检测方法。

本研究通过烧制 Au@Pt@Pd NPs 作为新冠抗原单克隆抗体的标记颗粒，制备检测探针，开发了 Au@Pt@Pd-LFIA，用于鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白的定量检测。同时制备 AFLFA、Au-LFIA 和 ELISA 验证了 Au@Pt@Pd-LFIA 不但具备快速、便捷的优点，还有着更高的灵敏度并且能够提供定量检测结果，有利于确诊新冠感染的同时辅助判断感染程度。

第一章 基于纳米金花的侧向免疫层析试纸条的制备及其 应用

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与耗材

材料	厂家
SARS-CoV-2 N 蛋白	北京博奥龙免疫技术有限公司
SARS-CoV-2 N 蛋白配对抗体	杭州隆基生物科技有限公司
牛血清白蛋白 (BSA)	上海西格玛奥德里奇贸易有限公司
碳酸钠	上海麦克林生化科技有限公司
碳酸氢钠	上海麦克林生化科技有限公司
氯化钠	上海麦克林生化科技有限公司
氯化钾	上海麦克林生化科技有限公司
磷酸二氢钾	上海麦克林生化科技有限公司
十二水合磷酸氢二钠	上海麦克林生化科技有限公司
吐温 20	上海麦克林生化科技有限公司
曲拉通	北京索莱宝生物科技有限公司
氢氧化钠	广东光华科技股份有限公司
羊抗鼠 IgG 抗体	北京博尔西科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	广东光华科技股份有限公司
浓盐酸	广东光华科技股份有限公司
氯金酸	上海源叶生物技术有限公司
柠檬酸三钠	广东光华科技股份有限公司
抗坏血酸	广东光华科技股份有限公司

氯铂酸	上海源叶生物技术有限公司
酪蛋白钠	杭州毕肯莱博生物科技有限公司
PVA	上海阿拉丁生化科技有限公司
海藻糖	上海阿拉丁生化科技有限公司
蔗糖	上海阿拉丁生化科技有限公司
联苯二胺	上海阿拉丁生化科技有限公司
1.5 mL EP 管	爱思进生物技术（杭州）有限公司
15 mL、50 mL 离心管	爱思进生物技术（杭州）有限公司
吸水纸	上海金标生物科技有限公司
样品垫	上海金标生物科技有限公司
CN95 硝酸纤维素膜	德国赛多利斯公司
玻璃纤维素膜 SB06	上海金标生物科技有限公司
PVC 胶体金底板	上海金标生物科技有限公司

1.1.2 主要仪器与设备

仪器	厂家
Mili-Q 纯水仪	深圳艾维迪泰生物科技有限公司
pH 酸碱计	德国赛多利斯科学仪器有限公司
微量移液器（加样枪）	北京大龙兴创实验仪器有限公司
电子天平	德国赛多利斯科学仪器有限公司
磁力搅拌器	北京大龙兴创实验仪器有限公司
高速低温离心机	圣湘生物科技股份有限公司
XYZ 三维划膜喷金仪	上海金标生物科技有限公司
微电脑自动切条仪	上海金标生物科技有限公司
恒温干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
Epoch 超微量微孔板分光光度计	美国 Bio-Tek 公司
超声波清洗机	上海洁盟医疗科技有限公司

1.1.3 鼻咽拭子样本的收集

本研究中收集到的鼻咽拭子样本分为三个部分：

- (1) 广州中医药大学深圳医院提供的 44 例 SARS-CoV-2 阳性鼻咽样本，50 例 SARS-CoV-2 阴性鼻咽样本，所有 SARS-CoV-2 阴性和阳性样本均由核酸检测确定。
- (2) 呼吸道合胞病毒阳性样本及甲、乙型流感病毒阳性样本分别来自中山大学附属第三医院和中部战区总医院，所有样本均通过医院检测确定。

1.1.4 主要试剂配制

- (1) 1×PBS (pH7.4)：准确称量 0.2 g KH_2PO_4 ，3.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，8 g NaCl ，0.2 g KCl 溶解于约 900 mL 纯水中，使用浓盐酸调节 pH 至 7.4，然后定容至 1 L，高压灭菌后备用。
- (2) 0.2 mol/L K_2CO_3 ：准确称取 1.38 g K_2CO_3 于烧杯中，加入超纯水至完全溶解，并定容至 50 mL，高压灭菌后，置于 4℃ 保存备用。
- (2) 1 mol/L 联苯二胺：准确称取 16.9 g 联苯二胺溶解于 80 mL 超纯水，再用超纯水定容至 100 mL，最后置于 36℃ 保存备用。
- (2) 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)：准确称取 3.03 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶解于 350 mL 纯水，使用浓盐酸调节 pH 至 8.0，然后用纯水定容至 500 mL，高压灭菌后，最后置于 4℃ 保存备用。
- (3) 划线缓冲液 (0.02 mol/L PB, pH7.4)：首先配制 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L PB, pH7.4)，先准确称取 0.592 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 5.803 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 90 mL 超纯水中，再使用 NaOH 调节 pH 值至 7.4，然后定容至 100 mL。取 10 mL 配制好的 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液，用纯水稀释 10 倍，然后定容至 100 mL，高压灭菌后，置于 4℃ 保存备用。
- (5) 结合垫处理液：准确称取 1 g 酪蛋白钠，10 g 蔗糖，10 g 海藻糖，2 g 吐温 20，0.1 g 叠氮化钠，溶于适量的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中，再

定容至 200 mL，最后置于 4℃ 保存备用。

- (6) 样品垫处理液：准确称取 0.5 g Tween-20，0.5 g 曲拉通，1 g BSA 加入到 100 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中混匀，最后置于 4℃ 保存备用。
- (7) 标记封闭液：准确称取 2.5 g BSA 溶解于 250 mL 的 1×PBS (pH 7.4) 中，等到 BSA 完全溶解后即得 10% 的 BSA，最后置于 4℃ 保存备用。
- (8) 复溶液：准确称取 5 g BSA，2.5 g 海藻糖，5 g 蔗糖，0.05 g 叠氮化钠，溶解于适量 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中，再定容至 50 mL，最后置于 4℃ 保存备用。
- (9) 样本稀释液：准确称取 0.5 g Tween-20，0.5 g 曲拉通加入到 100 mL 的 1×PBS (pH 7.4) 中混匀，最后置于 4℃ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 玻璃器皿的准备

- (1) 首先使用洗洁精清洗参与 Au NPs 和 AF NPs 烧制的玻璃容器，再使用超纯水洗净容器表面残留的洗洁精。最后将所有的玻璃器皿置于王水 (HNO₃: HCl=1: 3) 中，浸泡 24 小时。
- (2) 将所有玻璃容器捞出，使用超纯水清洗干净，最后置于 65℃ 低温干燥箱中烘干备用。

1.2.2 Au NPs 的制备

- (1) 首先将 400 mL 的超纯水倒入准备好的烧杯中，加热搅拌至 95℃；
- (2) 加入 4 mL 2 % 的 HAuCl₄ 溶液后，继续加热搅拌；
- (3) 等到再次沸腾后，一次性加入 8 mL 2 % 柠檬酸钠溶液，继续加热搅拌 30 min；
- (4) 停止加热后继续搅拌，使胶体金溶液冷却恢复至室温，最后置于 4℃ 保存。

1.2.3 AF NPs 的制备

1.2.3.1 金种的制备

- (1) 首先将 50 mL 超纯水加入锥形烧瓶中，加热搅拌至 95℃；
- (2) 再加入 0.5 mL 1% HAuCl₄ 溶液后，继续加热搅拌；
- (3) 等到溶液沸腾后，一次性加入 2 mL 1% 柠檬酸钠溶液，继续加热搅拌；
- (4) 计时 30 min 后停止加热，继续搅拌，直至金种子液冷却至室温，最后置于 4℃ 保存。

1.2.3.2 AF NPs 的制备

- (1) 首先将 4 mL 1 mol/L 对苯二酚溶液置于 60℃ 水中，加热 30 min；
- (2) 再将 100 mL 超纯水加入锥形烧瓶中，再置于加热磁力搅拌器上加热搅拌至 45℃；
- (3) 依次在超纯水中加入 8 mL 金种子液，1.8 mL 2% HAuCl₄ 溶液，7.92 mL 1% 柠檬酸钠溶液后，停止加热；
- (4) 然后一次性加入 2.16 mL 1 mol/L 对苯二酚，继续搅拌，直至纳米金花溶液冷却至室温。
- (5) 将 100 mL 金纳米花溶液在 6000 rpm，10 min，4℃ 条件下离心，弃上清，用 35 mL 超纯水重悬纳米金花溶液，置于超声波清洗机中，超声 5 min，最后置于 4℃ 保存。

1.2.4 纳米颗粒的标记

1.2.4.1 Au NPs 标记 mAb1

- (1) 首先使用烧制好的胶体金溶液 润洗 EP 管管壁，备用。
- (2) 取 5 支润洗后的 EP 管，做好标记后，依次加入 1 mL 胶体金，再分别在 EP 管盖上加 0 μL、5 μL、10 μL、15 μL、20 μL 的 0.2 M 碳酸钾，涡旋混匀 5 s 后，瞬离，再在每支 EP 管管盖上加 15 μg mAb1，摸索该抗体

的最佳标记 pH。

- (3) 选取最佳碳酸钾的用量,在装有 1 mL 胶体金的 EP 管盖上加入 15 μg mAb1, 涡旋混匀 5 s 后, 瞬离, 室温静置标记 15 min。
- (4) 加入 100 μL 10% BSA, 涡旋混匀 5 s 后, 瞬离, 室温静置封闭 20 min。
- (5) 4℃下 10000 $\times$ g 离心 15 min, 弃上清。
- (6) 加入 150 μL 复溶液重悬胶体金溶液, 4℃保存。

1.2.4.2 AF NPs 标记 mAb1

- (1) 用烧制好的纳米金花溶液润洗 EP 管管壁, 备用。
- (2) 取 5 支润洗后的 EP 管, 做好标记后, 依次加入 1 mL 纳米金花溶液, 再分别在 EP 管盖上加入 0 μL 、5 μL 、10 μL 、15 μL 、20 μL 的 0.2M 碳酸钾, 涡旋混匀 5 s 后, 瞬离, 再在每支 EP 管管盖上加入 15 μg mAb1, 摸索该抗体的最佳标记 pH。
- (3) 选取最佳碳酸钾的用量, 在装有 1 mL 金纳米花的 EP 管盖上加入 15 μg mAb1, 涡旋混匀 5 s 后, 瞬离, 室温静置标记 15 min。
- (4) 加入 100 μg 10% BSA, 涡旋混匀 5 s 后, 瞬离, 室温静置封闭 30 min。
- (5) 4℃下 6000 rpm 离心 10 min, 弃上清。
- (6) 加入 150 μL 复溶液重悬胶体金溶液, 4℃保存。

1.2.5 样品垫和结合垫的处理

- (1) 使用结合垫处理液将玻璃纤维素膜浸泡 60 min, 置于 56℃干燥箱中烘 24 h, 再按 30 mm $\times$ 6 mm 的尺寸裁切作为结合垫。
- (2) 使用样品垫处理液将玻璃纤维素膜浸泡 30 min, 置于 56℃干燥箱中烘 48 h, 再按 30 mm $\times$ 18 mm 的尺寸裁切作为样品垫。

1.2.6 基于 Au NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡的制备

- (1) 将标记成功的 Au NPs-mAb1 用喷金划膜仪按照 5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 喷涂在结合垫上,

56℃烘 2 h，密封保存。

- (2) 将 1 mg/mL 的 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体 mAb2 和 1 mg/mL 的羊抗鼠抗体在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上以 1 μ L/cm 的划线速度划出检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)，56℃烘 1 h，密封保存。
- (3) 按照顺序，依次将样品垫、处理好的结合垫、NC 膜和吸水纸粘贴在 PVC 底板上。
- (4) 将粘贴好的检测大板裁切成 4 mm 宽的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测试纸条，装入卡壳的内部的凹槽中，组成基于 Au-LFIA，置于室温下干燥密封保存。

1.2.7 基于 AF NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡的制备

- (1) 将标记成功的 AF NPs-mAb1 用喷金划膜仪按照 5 μ L/cm 喷涂在结合垫上，56℃烘 2 h，密封保存。
- (2) 将 1 mg/mL 的 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体 mAb2 和 1 mg/mL 的羊抗鼠抗体在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上以 1 μ L/cm 的划线速度划出检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)，56℃烘 1 h，密封保存。
- (3) 按照顺序，依次将样品垫、处理好的结合垫、NC 膜和吸水纸粘贴在 PVC 底板上。
- (4) 将粘贴好的检测大板裁切成 4 mm 宽的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测试纸条，装入卡壳内部的凹槽中，组成 AF-LFIA，置于室温下干燥密封保存。

1.2.8 Au-LFIA 和 AF-LFIA 性能参数的优化

为获得 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的最佳检测性能，本研究对 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的性能参数做了以下优化。原则上采取控制单一变量的方法对 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的性能参数进行优化。

1.2.8.1 Au NPs 和 AF NPs 标记 mAb1 用量的优化

通过改变 Au NPs 和 AF NPs 上标记的 mAb1 用量，制备不同条件的 Au-LFIA

和 AF-LFIA 检测梯度浓度稀释的标准品 (31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL)，来确定最佳的 mAb1 用量。分别以 5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL 和 20 μ g/mL 的 mAb1 标记 Au NPs 和 AF NPs，组装成检测卡后，检测标准品，达到最佳反应时间后，以 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为评判 mAb1 最优用量的标准。

1.2.8.2 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的 mAb2 包被浓度的优化

通过改变 mAb2 的包被浓度，制备不同条件的 Au-LFIA 和 AF-LFIA 检测梯度浓度稀释的标准品 (31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL)，来确定最佳的 mAb2 用量。分别以 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、1.5 μ g/mL 和 2 μ g/mL 的用量包被在 T 线上，分别组装成检测卡后，检测标准品，达到最佳反应时间后，以 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为评判 T 线 mAb2 包被浓度的标准。

1.2.8.3 Au-LFIA 反应时间的优化

取高、中、低三份标准品 (31.25 ng/mL、3.91 ng/mL、0.98 ng/mL)，分别平行测试 3 次。加样后开始观察检测卡背景是否干净，每隔 5 min 记录一次检测卡的层析结果，连续监测 20 min。检测卡显示窗口背景干净且 T 线颜色不再变化时，则为反应的最佳时间。

1.2.8.4 AF-LFIA 反应时间的优化

取高、中、低三份标准品 (31.25 ng/mL、3.91 ng/mL、0.49 ng/mL)，分别平行测试 3 次。加样后开始观察检测卡显示窗口背景是否干净，每隔 5 min 记录一次检测卡的层析结果，连续监测 20 min。检测卡显示窗口背景干净且 T 线颜色不再变化时，则为反应的最佳时间。

1.2.9 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的性能评价

1.2.9.1 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的灵敏度

基于以上性能参数的最优条件,研制 Au-LFIA 和 AF-LFIA。为评价 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的灵敏性,分别取 100 μL 梯度浓度稀释的标准品 (62.5 ng/mL、31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL、0.03 ng/mL、0.015 ng/mL) 依次加入 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的加样孔中,达到最佳反应时间后,以 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为评价 Au-LFIA 和 AF-LFIA 灵敏度的标准。

1.2.9.2 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的特异性

用制备好的 Au-LFIA 和 AF-LFIA 检测新冠病毒阳性、呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV) 阳性、甲型流感病毒 (Influenza A virus, Flu A) 阳性、乙型流感病毒 (Influenza B virus, Flu B) 阳性鼻咽样本,以检测卡的 T 线是否出现条带作为评价 Au-LFIA 和 AF-LFIA 特异性的标准。

1.2.9.3 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的稳定性

采用 6 个月的实时稳定试验验证 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的稳定性,将适量的两种检测卡分别密封后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中。每间隔一个月取出所需数量的检测卡, Au-LFIA 分别检测高、中、低三份标准品 (31.25 ng/mL, 7.81 ng/mL, 0.98 ng/mL), AF-LFIA 分别检测高、中、低三份标准品 (31.25 ng/mL, 7.81 ng/mL, 0.49 ng/mL), 每份标准品平行测试三次,以 T 线条带的显色在 6 个月内是否保持均一作为评价 Au-LFIA 和 AF-LFIA 稳定性的标准。

1.2.10 Au-LFIA 和 AF-LFIA 应用于临床鼻咽样本的检测

取来自广州中医药大学深圳医院提供的 44 例新冠病毒阳性鼻咽样本和 50 例新冠病毒阴性鼻咽样本,对比评估 AF-LFIA 和 Au-LFIA 的灵敏性、特异性、

准确性等性能。

1.3 结果

1.3.1 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的原理及示意图

1.3.1.1 Au-LFIA 的原理及结构示意图

本研究制备的基于 Au NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡 Au-LFIA 的结构和检测原理如图 1-1A, 1-1B 所示。Au-LFIA 由样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸、PVC 底板五部分组成, 当待检样本中存在 SARS-CoV-2 N 蛋白时, N 蛋白会被结合垫上胶体金标记的 mAb1 捕获形成 NP-mAb1-Au NPs 免疫复合物。在毛细管力的层析作用下, 免疫复合物层析至 T 线时, 会被 T 线上包被的 mAb2 结合, 从而在 T 线区域形成红色条带, 过量的免疫复合物以及 mAb1-Au NPs 会被 C 线上包被的羊抗鼠抗体结合, C 线区域形成红色条带。当待检样本中不存在 SARS-CoV-2 N 蛋白时, T 线区域不显示红色条带, 但 C 线区域显示红色条带。

Au-LFIA 的组装图如图 1-1C 所示, 检测卡由塑料上下壳和 Au-LFIA。Au-LFIA 的结果判读如图 1-1D 所示: 当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阴性时, Au-LFIA 的 T 线不显色, C 线显色, 检测结果为阴性, 受检者未感染 SARS-CoV-2; 当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阳性时, Au-LFIA 的 T 线和 C 线都显色, 检测结果为阳性, 受检者感染 SARS-CoV-2; 当 Au-LFIA 的 C 线没有条带时, 检测结果视为无效。

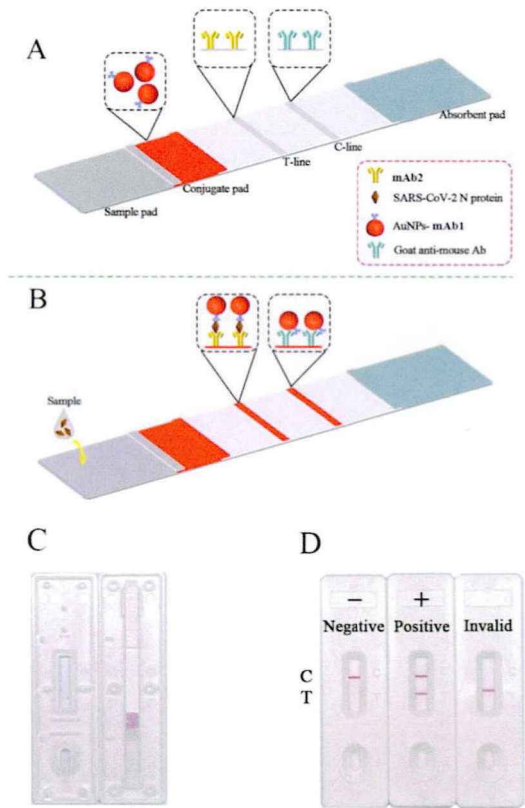


图 1-1 Au-LFIA 的检测原理与结果示意图

Figure 1-1 The principle and result diagram of the Au-LFIA

A、Au-LFIA 的结构示意图；B、Au-LFIA 的检测原理；

C、Au-LFIA 的组装实物图；D、Au-LFIA 的结果示意图

1.3.1.2 AF-LFIA 的原理及结构示意图

(1) 本研究制备的基于 AF NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡 AF-LFIA 的结构和检测原理如图 1- 2A, 1-2B 所示。AF-LFIA 由样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸、PVC 底板五部分组成，当待检样本中存在 SARS-CoV-2 N 蛋白时，N 蛋白会被结合垫上 AF NPs 标记的 mAb1 捕获形成 NP-mAb1-AF NPs 免疫复合物。在毛细管力的层析作用下，免疫复合物层析至 T 线时，会被 T 线上包被的 mAb2 结合，从而在 T 区域形成深蓝色条带，过量的免疫复合物以及 mAb1-Au NPs 被 C 线上包被的羊抗鼠抗体结合，C 线区域形成深蓝色条带。当待检样本中不存在

SARS-CoV-2 N 蛋白时，T 线区域不显示深蓝色条带，但 C 线区域显示深蓝色条带。

(2) AF-LFIA 的组装图如图 1-2C 所示，检测卡由塑料上下壳和 AF-LFIA 组成。AF-LFIA 的结果判读如图 1-2D 所示：当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阴性时，AF-LFIA 的 T 线不显色，C 线显色，检测结果为阴性，受检者未感染 SARS-CoV-2；当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阳性时，AF-LFIA 的 T 线和 C 线都显色，检测结果为阳性，受检者感染 SARS-CoV-2；当 AF-LFIA 的 C 线没有条带时，检测结果视为无效。

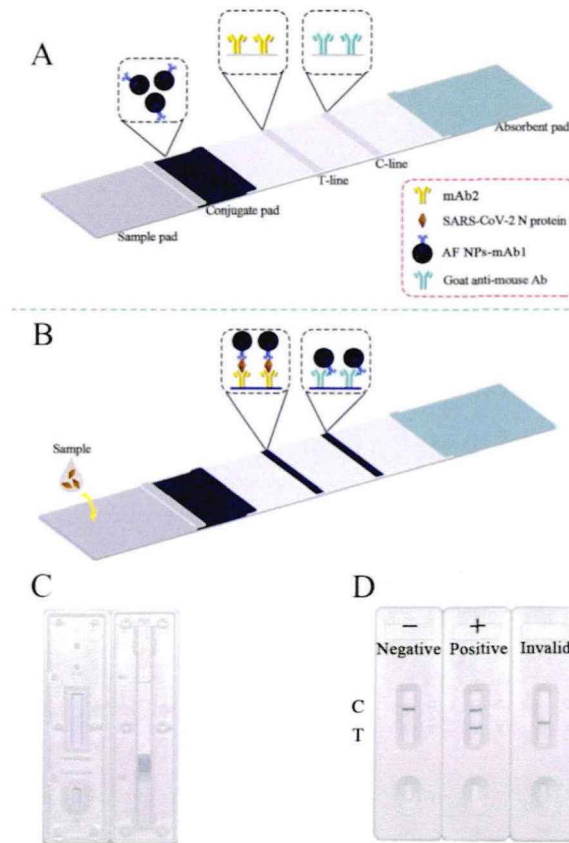


图 1-2 AF-LFIA 的检测原理与结果示意图

Figure 1-2 The principle and result diagram of the AF-LFIA

A、AF-LFIA 的结构示意图；B、AF-LFIA 的检测原理；

C、AF-LFIA 的组装实物图；D、AF-LFIA 的结果示意图

1.3.2 Au NPs 和 AF NPs 的表征及标记

1.3.2.1 Au NPs 的表征及标记

(1) 本研究以水热法烧制 Au NPs。根据透射电镜结果图片显示, Au NPs 粒径约为 40 nm, 颗粒大小均一, 分散无聚集(图 1-3A)。胶体金溶液外观呈酒红色, 澄清透明, 无聚集沉淀状。全波长扫描显示胶体金吸收峰在 528 nm 左右($\lambda_{\max}=528$), 波峰尖耸紧凑, 表明胶体金颗粒大小均一(图 1-3B)。

(2) 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 标记胶体金溶液时, 6 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液可使其颜色不再发生变化, 即临界值。因此 6 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液是胶体金溶液标记 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 时调节 pH 值的最佳用量(图 1-3C)。

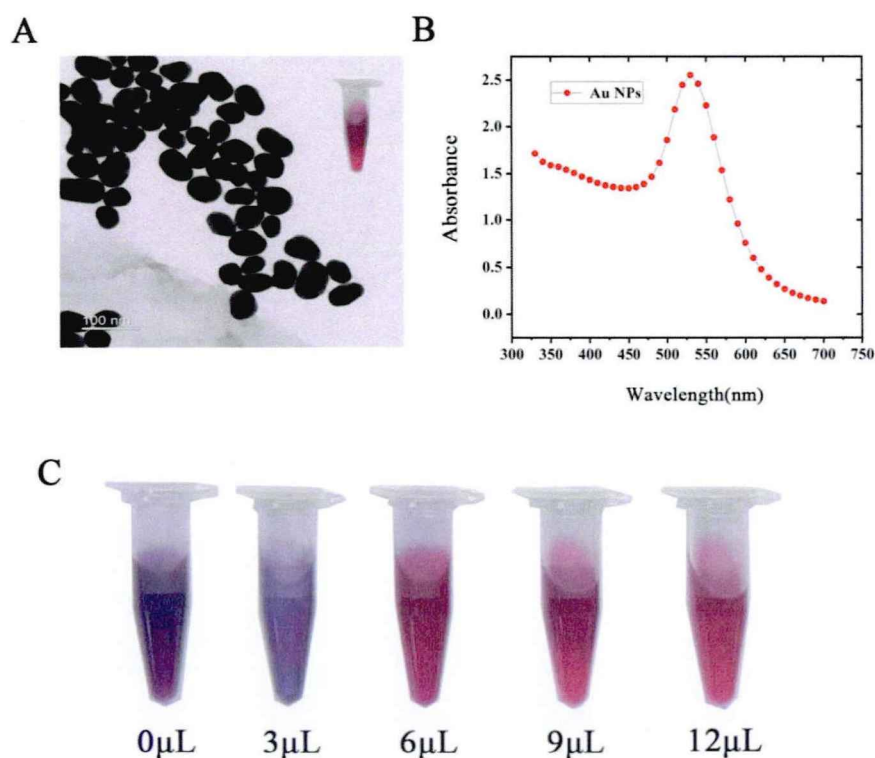


图 1-3 胶体金颗粒表征及标记

Figure 1-3 Characterization and labeling of Au NPs

A、Au NPs 电镜图和溶液表现; B、胶体金吸收光谱;

C、胶体金标记 mAb1 时, 不同 K_2CO_3 用量与“死金”的变化

1.3.2.2 AF NPs 的表征及标记

(1) 本研究以种子生长法烧制 AF NPs, 用 20 nm 粒径左右的 Au NPs 作为金种子, 金种子溶液呈亮红色, 澄清透明, 无聚集沉淀。根据透射电镜结果图片显示, 金种子颗粒粒径约为 20 nm, 颗粒大小均一, 分散无聚集(图 1-4A)。在此基础上按照 1.2.2.2 烧制 AF NPs。纳米金花溶液呈深蓝色, 无聚集沉淀。根据透射电镜结果图片显示, AF NPs 表面布满不规则刺突样结构, 粒径约为 50 nm, 分散无聚集(图 1-4A)。全波长扫描显示 AF NPs 吸收峰在 610 nm 左右($\lambda_{\max}=610$), 波峰紧凑, 表明 AF NPs 大小均一(图 1-4B)。

(2) 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 标记纳米金花溶液时, 3 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液可使其颜色不再变化, 即临界值。因此 3 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液是纳米金花溶液标记 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 时调节 pH 值的最佳用量(图 1-4C)。

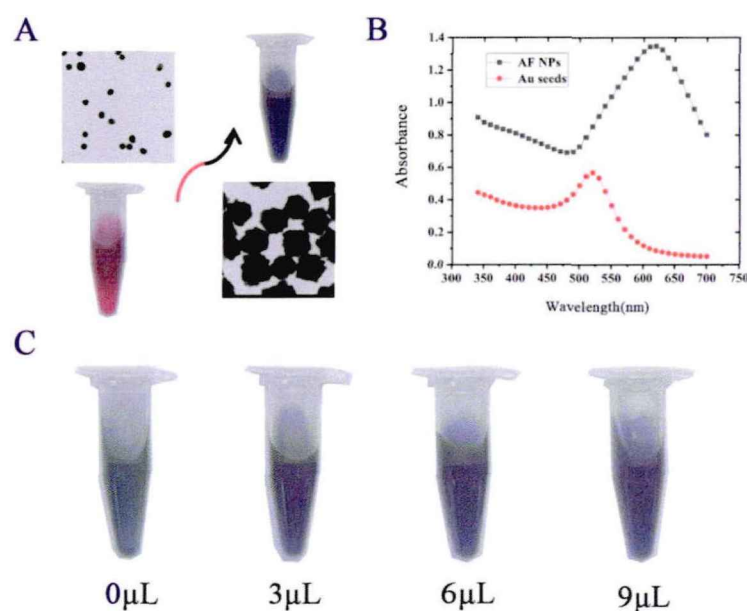


图 1-4 金纳米花颗粒表征及标记

Figure 1-4 Characterization and labeling of AF NPs

A、金种子溶液表现和电镜图以及金纳米花溶液表现和电镜图;

B、金种子和金纳米花吸收光谱;

C、纳米金花标记 mAb1 时, 不同 K_2CO_3 用量与“死金”的变化

1.3.3 性能参数的优化

1.3.3.1 Au NPs 和 AF NPs 上标记 mAb1 用量的优化

(1) 如图 1-5 所示, 当 Au NPs 上标记 mAb1 用量为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时, Au-LFIA 可测得标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的最低浓度为 0.98 ng/mL。此时 Au-LFIA 的 T 线显色达到平台期, 且检测卡显示窗口背景干净。即 Au NPs 上标记 mAb1 最优用量为 15 $\mu\text{g/mL}$ 。

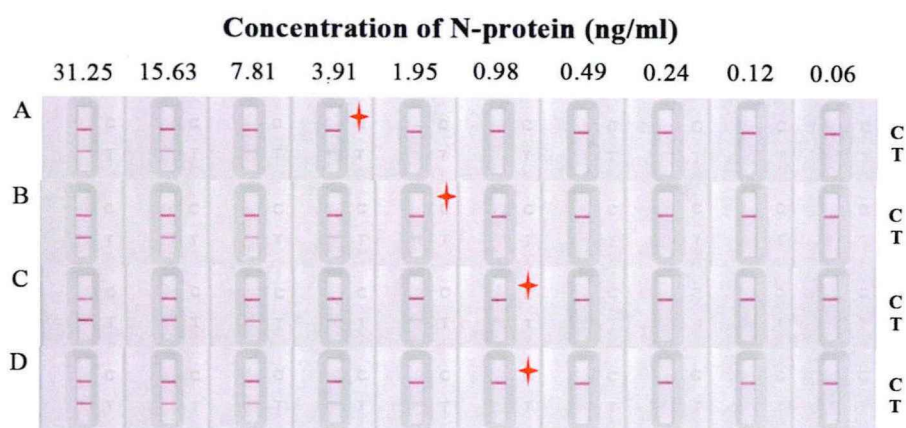


图 1-5 Au NPs 上标记 mAb1 用量的优化

Figure 1-5 Optimization of the amount of mAb1 labeled onto Au NPs.

A、Au NPs 上标记 mAb1 用量为 5 $\mu\text{g/mL}$; B、Au NPs 上标记 mAb1 用量为 10 $\mu\text{g/mL}$;

C、Au NPs 上标记 mAb1 用量为 15 $\mu\text{g/mL}$; D、Au NPs 上标记 mAb1 用量为 20 $\mu\text{g/mL}$

(2) 如图 1-6 所示, 当 AF NPs 上标记 mAb1 用量为 15 μg 时, AF-LFIA 可测得标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白最低浓度为 0.49 ng/mL。此时 AF-LFIA 的 T 线显色达到平台期, 且检测卡背景干净。即 AF NPs 上标记 mAb1 最优用量为 15 μg 。

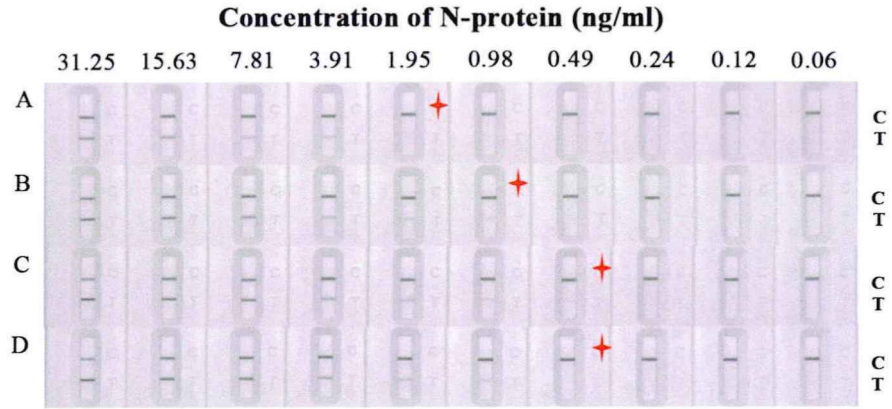


图 1-6 AF NPs 上标记 mAb1 用量的优化

Figure 1-6 Optimization of the amount of mAb1 labeled onto AF NPs

A、AF NPs 上标记 mAb1 用量为 5 $\mu\text{g/mL}$ ；B、AF NPs 上标记 mAb1 用量为 10 $\mu\text{g/mL}$ ；
C、AF NPs 上标记 mAb1 用量为 15 $\mu\text{g/mL}$ ；D、AF NPs 上标记 mAb1 用量为 20 $\mu\text{g/mL}$

1.3.3.2 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的 T 线 mAb2 包被浓度的优化

(1) 如图 1-7 所示，当 Au-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 1mg/mL 时，Au-LFIA 可测得标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的最低浓度为 0.98 ng/mL，此时 Au-LFIA 的 T 线显色达到平台期，且检测卡显示窗口背景干净。即 Au-LFIA 的 T 线 mAb2 最优包被浓度为 1mg/mL。

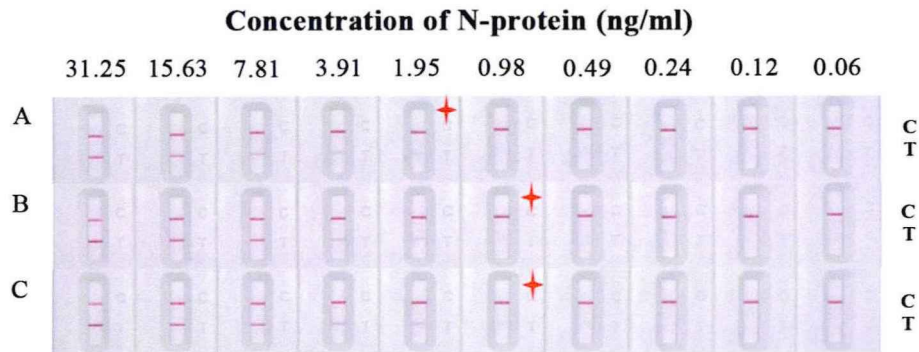


图 1-7 Au-LFIA 的 T 线上标记 mAb2 用量的优化

Figure 1-7 Optimization of the concentration of mAb2 coated on T-line of Au-LFIA

A、Au NPs 上包被 mAb2 浓度为 0.5 mg/mL；B、Au NPs 上包被 mAb2 用量为 1 mg/mL；
C、Au NPs 上包被 mAb2 用量为 1.5 mg/mL

(2) 如图 1-8 所示, 当 AF-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 1 mg/mL 时, AF-LFIA 可测得标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的最低浓度 0.49 ng/mL, 此时 AF-LFIA 的 T 线显色达到平台期, 且检测卡背景干净。即 AF-LFIA 的 T 线 mAb2 最优包被浓度为 1 mg/mL。

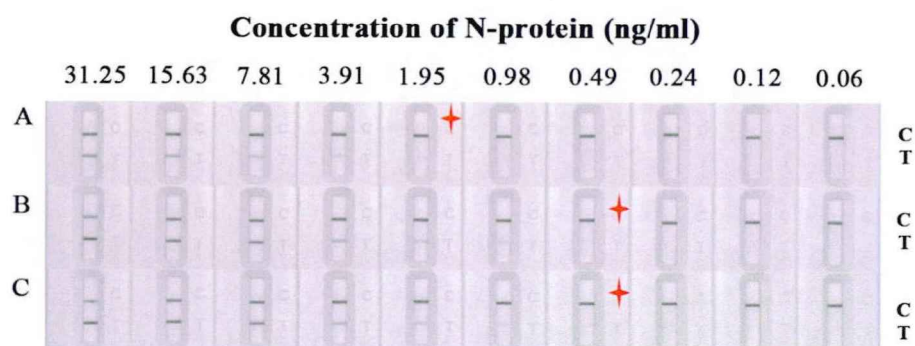


图 1-8 AF-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度的优化

Figure 1-8 Optimization of the concentration of mAb2 coated on T-line of AF-LFIA

A、T 线上包被 mAb2 浓度为 0.5 mg/mL; B、T 线上包被 mAb2 用量为 1 mg/mL;

C、T 线上包被 mAb2 用量为 1.5 mg/mL

1.3.3.3 Au-LFIA 和 AF-LFIA 反应时间的优化

(1) 如图 1-9 所示, Au-LFIA 测试高、中、低三份标准品 (31.25 ng/mL、3.91 ng/mL、0.98 ng/mL), 平行测试三次, 在加样后 15 min 时, 检测卡显示窗口背景干净。即 Au-LFIA 的最佳反应时间为 15 min。

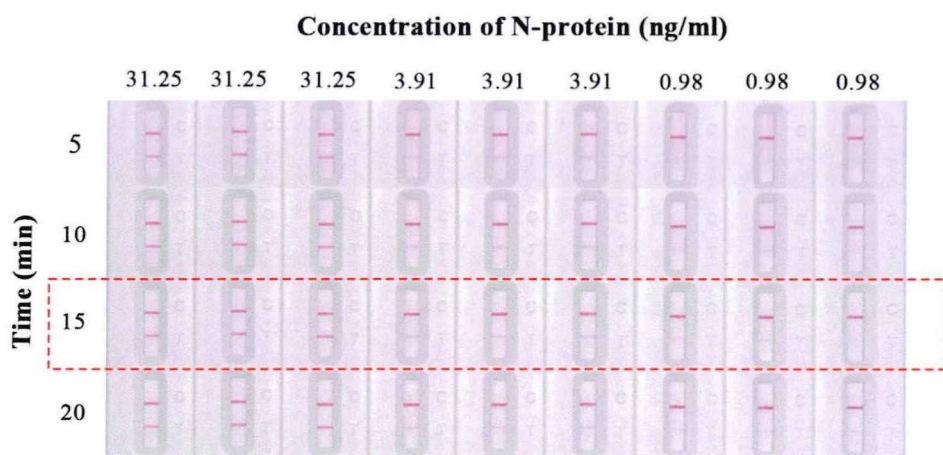


图 1-9 Au-LFIA 反应时间的优化

Figure 1-9 Optimization of reaction time of Au-LFIA

(2) 如图 1-10 所示，AF-LFIA 测试高、中、低三份标准品（31.25 ng/mL、3.91 ng/mL、0.98 ng/mL），平行测试三次，在加样后 10 min，检测卡显示窗口背景干净。即 AF-LFIA 的最佳反应时间为 10 min。

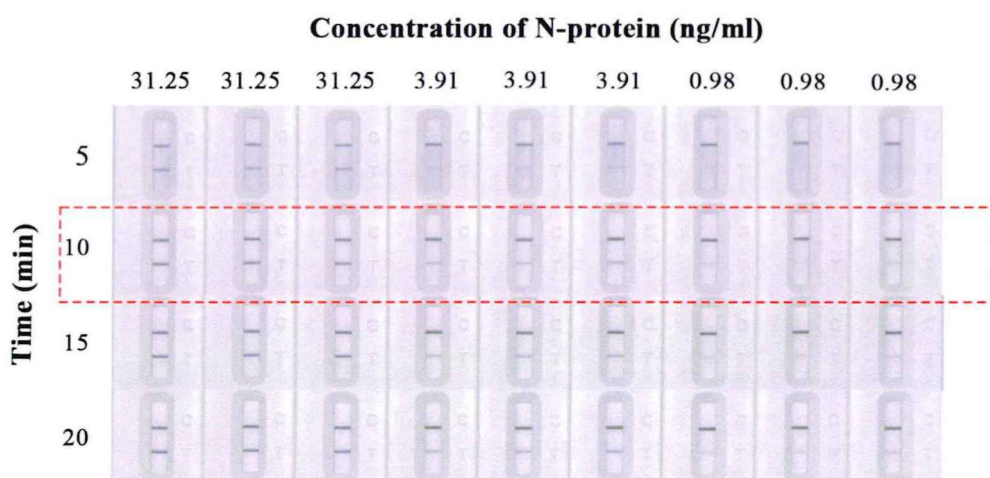


图 1-10 AF-LFIA 反应时间的优化

Figure 1-10 Optimization of reaction time of AF-LFIA

1.3.3.4 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的性能优化指标汇总

以上优化指标汇总见表 1-1 所示，Au NPs 和 AF NPs 上标记 mAb1 的最适用量为 15 μ g/mL。Au-LFIA 和 AF-LFIA 的 T 线 mAb2 最适包被浓度为 1 mg/mL。

Au-LFIA 和 AF-LFIA 的最适反应时间分别为 15 min 和 10 min。

表 1-1 Au-LFIA 和 AF-LFIA 最佳工艺指标总结

Table 1-1 Summary of best process indexes of Au-LFIA and AF-LFIA

优化性能指标	Au-LFIA	AF-LFIA
标记 mAb1 的最适用量	15 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$
T 线 mAb2 最适包被浓度	1 mg/mL	1 mg/mL
最适反应时间	15 min	10 min

1.3.4 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的性能评价

1.3.4.1 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的灵敏度评价

(1) 如图 1-11 所示，在最优条件下，当标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的浓度为 0.98 ng/mL 时，Au-LFIA 的 T 线显色达到平台期，即 Au-LFIA 的 LOD 为 0.98 ng/mL 。

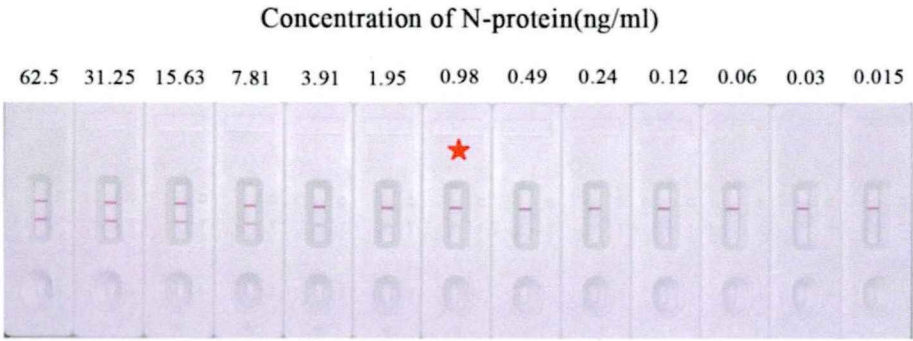


图 1-11 Au-LFIA 的灵敏度验证测试

Figure 1-11 The sensitivity validation test of Au-LFIA

(3) 如图 1-12 所示，在最优条件下，当标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的浓度为 0.49 ng/mL 时，AF-LFIA 的 T 线显色达到平台期，即 AF-LFIA 的 LOD 为 0.49 ng/mL 。

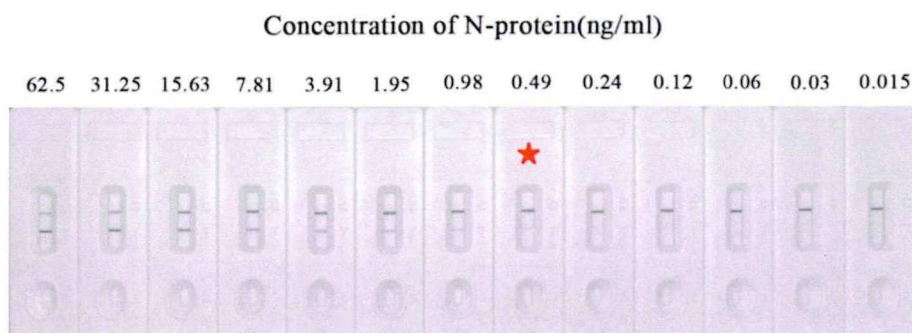


图 1-12 AF-LFIA 的灵敏性验证测试

Figure 1-12 The sensitivity validation test of AF-LFIA

1.3.4.2 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的特异性评价

如图 1-13、1-14 所示，Au-LFIA 和 AF-LFIA 分别测试新冠病毒阳性、RSV 阳性、Flu A 阳性、Flu B 阳性鼻咽样本。检测结果显示除新冠病毒阳性外，其余呼吸道病毒检测结果全部为阴性，以上结果表明 Au-LFIA 和 AF-LFIA 和 RSV、FluA、FluB 等呼吸道病毒无交叉反应。

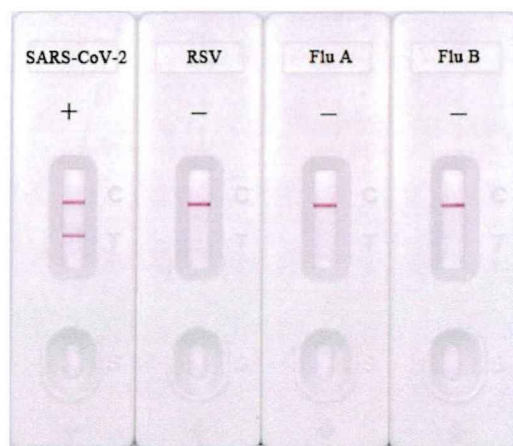


图 1-13 Au-LFIA 的特异性验证测试

Figure 1-13 The specific validation test of Au-LFIA

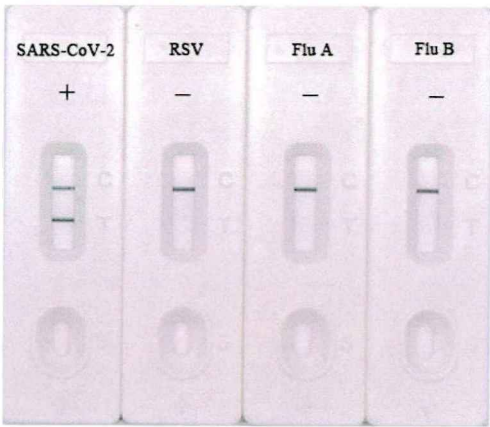


图 1-14 AF-LFIA 的特异性验证测试

Figure 1-14 The specific validation test of AF-LFIA

1.3.4.3 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的稳定性评价

如图 1-15、1-16 所示，Au-LFIA 测试高、中、低三份标准品（31.25 ng/mL，7.81 ng/mL，0.98 ng/mL），平行测试三次， AF-LFIA 测试高、中、低三份标准品（31.25 ng/mL，7.81 ng/mL，0.49 ng/mL），平行测试三次，检测结果显示 6 个月内 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的 T 线显色能够保持均一，Au-LFIA 和 AF-LFIA 均具有良好的稳定性，有效期可达 6 个月。

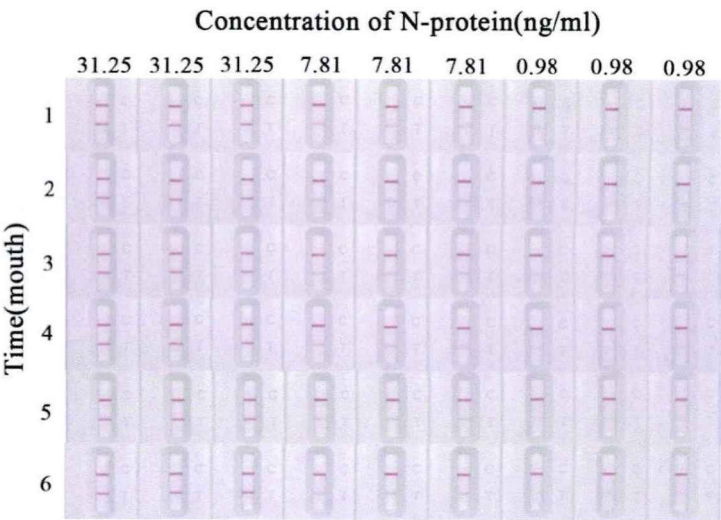


图 1-15 Au-LFIA 的稳定性测试

Figure 1-15 The stability test of Au-LFIA

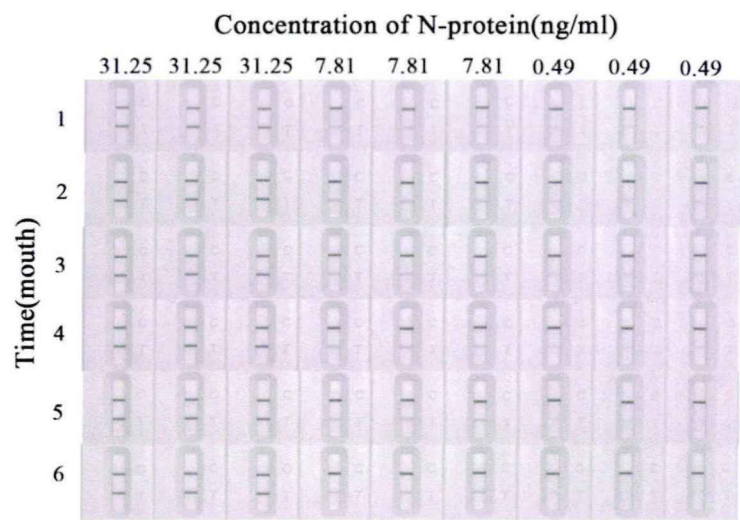


图 1-16 AF-LFIA 的稳定性测试结果

Figure 1-16 The stability test of AF-LFIA

1.3.5 Au-LFIA 和 AF-LFIA 应用于临床鼻咽样本的检测

如下表 1-2 所示，使用制备好的 Au-LFIA 和 AF-LFIA 分别对 44 份已确诊的新冠病毒感染阳性鼻咽样本和 50 份新冠病毒感染阴性鼻咽样本进行检测。在 44 份新冠阳性样本的检测中，24 份经 Au-LFIA 检测为阳性，29 份经 AF-LFIA 检测为阳性，在 50 份新冠阴性样本的检测中，Au-LFIA 和 AF-LFIA 的检测结果均为阴性。由此可知，Au-LFIA 和 AF-LFIA 的灵敏性分别为 54.55%和 65.91%，准确性分别为 78.72%和 84.04%。统计学分析两种方法的准确性检测结果， $P < 0.05$ ，具有统计学意义。

表 1-2 Au-LFIA 和 AF-LFIA 对临床样本的检测

Table 1-2 Detection of clinical samples by Au-LFIA and AF-LFIA

Clinical samples	Au-LFIA		AF-LFIA	
	Negative	Positive	Negative	Positive
Negative group (n=50)	50	0	50	0
Positive group (n=44)	20	24	15	29
Total	70	24	65	29
Specificity (%)	100% (50/50)		100% (50/50)	
Sensitivity (%)	54.55% (24/44)		65.91% (29/44)	
Accuracy (%)	78.72% (74/94)		84.04% (79/94)	

1.4 讨论

SARS-CoV-2 大范围传播导致了全球数以亿计的人群深受疫情的危害，各国政府在疫情防控中无法及时为全部的疑似病例和密接者提供必要的治疗，进而采取隔离或者居家政策。SARS-CoV-2 核酸检测是世卫组织推荐的检测方法，也是金标准。但昂贵的仪器设备、专业的场地和熟练的操作人员等要求也限制了核酸检测的大规模实施。新冠抗体检测是目前诊断 SARS-CoV-2 常用的方法之一，但由于新冠病毒感染产生的抗体存在窗口期，以及新冠痊愈患者的体内仍存留抗体，这些因素导致新冠抗体检测不能满足早期检测 SARS-CoV-2 的需求。新冠抗原检测具有快速，便捷，成本低廉，准确等优点，满足人们在新冠感染早期检测出 SARS-CoV-2 的需求。

据研究报道，Benjamin D Grant 等人测试了基于羧基红色乳胶微球的新冠抗原检测试纸条，LOD 为 0.65 ng/mL，检测时间为 20 min^[112]；Erica Frew 等人利用胶体金颗粒制备了新冠抗原检测卡，LOD 为 2.0×10^2 TCID₅₀/mL，检测时间为 15 min^[113]；Tao Peng 等人通过铜沉积诱导的信号放大胶体金纳米颗粒的横向流动免疫分析法的灵敏度，使得 LOD 低至 10 pg/mL，检测时间为 18 min^[114]。本研究制备了 AF-LFIA 用于检测鼻咽样本中的 SARS-CoV-2 N 蛋白，并以相同的方法制备传统的 Au-LFIA 用作对比。AF-LFIA 的 LOD 为 0.49 ng/mL，在灵敏度上优于 Benjamin D Grant 等人的方法以及 Au-LFIA（LOD 为 0.98 ng/mL），

但低于 Tao Peng 等人的方法。就检测时间而言, AF-LFIA 优于研究报道的几种方法, 在快速检测方面具有明显优势。

综上所述, 本研究制备的 AF-LFIA 是一种灵敏、快速、简便的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测方法, 可用于 COVID-19 的快速诊断、居家自检以及大规模筛查, 是对 COVID-19 诊断方法的有效补充。但和 Tao Peng 等人的方法相比, AF-LFIA 仍存在灵敏度不够高的局限性, 并且无法定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白, 因此需要建立一种更加灵敏的定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法。

第二章 基于 Au@Pt@Pd NPs 的侧向免疫层析试纸条的

制备及其应用

2.1 材料

2.1.1 主要试剂及耗材

材料	厂家
SARS-CoV-2 N 蛋白	北京博奥龙免疫技术有限公司
SARS-CoV-2 N 蛋白 配对抗体	杭州隆基生物科技有限公司
牛血清白蛋白 (BSA)	上海西格玛奥德里奇贸易有限公司
碳酸钠	上海麦克林生化科技有限公司
碳酸氢钠	上海麦克林生化科技有限公司
氯化钠	上海麦克林生化科技有限公司
氯化钾	上海麦克林生化科技有限公司
磷酸二氢钾	上海麦克林生化科技有限公司
十二水合磷酸氢二钠	上海麦克林生化科技有限公司
吐温 20	上海麦克林生化科技有限公司
曲拉通	北京索莱宝生物科技有限公司
氢氧化钠	广东光华科技股份有限公司
羊抗鼠 IgG 抗体	北京博尔西科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	广东光华科技股份有限公司
浓盐酸	广东光华科技股份有限公司
氯金酸	上海源叶生物技术有限公司
柠檬酸三钠	广东光华科技股份有限公司
抗坏血酸	广东光华科技股份有限公司

氯铂酸	上海源叶生物技术有限公司
酪蛋白钠	杭州毕肯莱博生物科技有限公司
聚乙烯醇 (PVA)	上海阿拉丁生化科技有限公司
海藻糖	上海阿拉丁生化科技有限公司
蔗糖	上海阿拉丁生化科技有限公司
联苯二胺	上海阿拉丁生化科技有限公司
氯铂酸	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
四氯钼钠	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
过氧化氢 (H ₂ O ₂ , 30 wt%)	西陇科学股份有限公司
四甲基联苯胺 (TMB)	广州速研生物科技有限公司
浓硫酸	珠海市华成达化工有限公司
高碘酸钠	广东光华科技股份有限公司
冰乙酸	上海麦克林生化科技有限公司
硼氢化钠	西陇科学股份有限公司
二甲亚砜 (DMSO)	广东光华科技股份有限公司
乙二醇	上海阿拉丁生化科技有限公司
乙三醇	上海阿拉丁生化科技有限公司
1.5mL EP 管	爱思进生物技术 (杭州) 有限公司
15mL、50mL 离心管	爱思进生物技术 (杭州) 有限公司
吸水纸	上海金标生物科技有限公司
样品垫	上海金标生物科技有限公司
CN 95 硝酸纤维素膜	德国赛多利斯公司
玻璃纤维素膜 SB06	上海金标生物科技有限公司
PVC 底板	上海金标生物科技有限公司

2.1.2 主要仪器与设备

仪器	厂家
----	----

胶体金免疫层析分析仪	广州蓝勃生物技术有限公司
洗板机	深圳市汇松科技发展有限公司
酶标仪	深圳市汇松科技发展有限公司
恒温干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
Mili-Q 纯水仪	深圳艾维迪泰生物科技有限公司
pH 酸碱计	德国赛多利斯科学仪器有限公司
微量移液器（加样枪）	北京大龙兴创实验仪器有限公司
电子天平	德国赛多利斯科学仪器有限公司
磁力搅拌器	北京大龙兴创实验仪器有限公司
其余仪器设备和 1.1.2 相同	

2.1.3 鼻咽样本的收集

本部分研究中收集到的鼻咽样本来源同 1.1.3

2.1.4 主要试剂配制

2.1.4.1 Au@Pt@Pd-LFIA 相关试剂的配制

- (1) 1×PBS (pH7.4)：准确称量 0.2 g KH_2PO_4 ，3.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，8 g NaCl ，0.2 g KCl 溶解于约 900 mL 纯水中，调节 pH 至 7.4，定容至 1 L，高压灭菌后备用。
- (2) 0.2 mol/L K_2CO_3 ：准确称量 1.38 g K_2CO_3 于烧杯中，加入超纯水至完全溶解，并定容至 50 mL，高压灭菌后，置于 4℃ 保存备用。
- (2) 1 mol/L 联苯二胺：准确称量 16.9 g 联苯二胺溶解于 80 mL 超纯水，再用超纯水定容至 100mL，置于 36℃ 保存备用。
- (2) 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)：准确称量 3.03 g Tris 溶解于 350 mL 纯水，使用浓盐酸调节 pH 至 8.0，再用纯水定容至 500 mL，高压灭菌后，置于 4℃ 保存备用。

- (3) 划线缓冲液 (0.02 mol/L PB, pH7.4): 首先配制 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L PB, pH7.4), 先称取 0.592 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 5.803 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 90 mL 超纯水中, 再使用 NaOH 调节 pH 值至 7.4 后定容至 100 mL。取 10 mL 配制好的 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 用纯水稀释 10 倍, 定容至 100 mL, 高压灭菌后, 置于 4℃ 保存备用。
- (5) 结合垫处理液: 准确称量 1 g 酪蛋白钠, 10 g 蔗糖, 10 g 海藻糖, 2 g Tween-20, 0.1 g 叠氮化钠, 溶于适量的 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液中, 最后定容至 200 mL, 置于 4℃ 保存备用。
- (6) 样品垫处理液: 准确称量 0.5 mL Tween-20, 0.5 mL 曲拉通, 1 g BSA 加入到 100 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液中混匀, 置于 4℃ 保存备用。
- (7) 标记封闭液: 准确称量 2.5 g BSA 溶解于 250 mL 的 1×PBS (pH 7.4) 中, BSA 完全溶解后即得 10% 的 BSA, 置于 4℃ 保存备用。
- (8) 复溶液: 准确称量 5 g BSA, 2.5 g 海藻糖, 5 g 蔗糖, 0.05 g 叠氮化钠, 溶解于适量 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中, 定容至 50 mL, 置于 4℃ 保存备用。
- (9) 样本稀释液: 准确称量 0.5 mL Tween-20, 0.5 mL 曲拉通加入到 100 mL 的 1×PBS (pH 7.4) 中混匀后, 置于 4℃ 保存备用。

2.1.4.2 ELISA 相关试剂的配制

- (1) 碳酸盐缓冲液 (CBS): 准确称量 1.11 g 碳酸钠, 2.35 g 碳酸氢钠, 溶解于 0.7 L 超纯水中, 调节 pH 至 9.6, 再定容至 0.8 L;
- (2) 0.05% PBST: 在 2000 mL 的 1×PBS 中加入 1 mL 的吐温 20, 再使用 1×PBS 定容至 2 L, 混匀后即可使用。
- (3) 封闭液: 准确称量 10 g BSA 溶解于 1000 mL 的 1×PBS 中, 待 BSA 溶解后, 置于 4℃ 保存备用。
- (4) 样本稀释液: 准确称量 10g BSA 溶解于 1000 mL 的 1×PBS 中, 待 BSA 溶

解后，置于 4℃ 保存备用。

- (5) HRP-二抗稀释液：准确称量 5 g BSA 溶解于 1000 mL 的 0.05% PBST 中，待 BSA 溶解后，置于 4℃ 保存备用
- (6) TMB 缓冲液：准确称量无水乙酸钠 3.4 g，一水合柠檬酸 4.2 g，溶于 4.9 L 纯水中，调节 pH 为 3.6,再定容至 5 L。
- (7) TMB 显色液 A 液：将 0.4 g 四甲基联苯胺（TMB）溶于 200 mL 的二甲基亚砷（DMSO）中，加入 300 mL 甲醇，搅拌混匀后，再加 500 mL TMB 缓冲液搅拌 2 h（暗处避光），置于 4℃ 保存备用。
- (8) TMB 显色液 B 液：将 420 μ L 过氧化氢（H₂O₂）加入 600 mL TMB 缓冲液中，混匀后，置于 4℃ 保存备用。
- (9) 终止液：在烧杯中加入 175 mL 纯水，将 27.175 mL 浓硫酸（98%）沿着玻璃棒缓慢加入烧杯中，最后加超纯水定容至 250 mL。

2.2 实验方法

2.2.1 玻璃器皿的准备

- (1) 使用洗洁精清洗参与金种子和 Au@Pt@Pd NPs 烧制的玻璃容器后，用超纯水洗净容器表面残留的洗洁精。再将所有的玻璃器皿置于王水（HNO₃: HCl=1: 3 中，浸泡 24 小时。
- (2) 将玻璃容器捞出，使用超纯水清洗干净，置于 65℃ 干燥箱中烘干。

2.2.2 金种的制备

- (1) 将 50 mL 超纯水加入锥形烧瓶中，加热搅拌至 95℃；
- (2) 加入 1% HAuCl₄ 溶液 0.5 mL，继续加热搅拌；
- (3) 溶液沸腾后，一次性加入 2 mL 1% 柠檬酸钠溶液，继续加热搅拌；
- (4) 30 min 后停止加热，继续搅拌，直至金种子液冷却至室温，置于 4℃ 保存。

2.2.3 Au@Pt@Pd NPs 的制备

- (1) 将 1 mL 20 mmol/L 氯铂酸和 3 mL 20 mmol/L 氯钯酸混匀;
- (2) 将 42 mL 金种溶液置于 95℃水浴环境中, 搅拌混匀后, 将步骤(1)中的混合液一次性加入金种液中;
- (3) 将 4 mL 20 mmol/L 抗坏血酸溶液在 30 min 内匀速滴加至金种液后, 停止加热, 待 Au@Pt@Pd NPs 溶液冷却至室温, 置于 4℃保存。

2.2.4 Au@Pt@Pd NPs 标记 mAb1

- (1) 用烧制好的 Au@Pt@Pd 溶液润洗 EP 管管壁, 备用。
- (2) 取 5 支润洗后的 EP 管, 做好标记后, 依次加入 1 mL 胶体金, 再分别在 EP 管盖上加 0 μ L、5 μ L、10 μ L、15 μ L、20 μ L、25 μ L、30 μ L 的 0.2 M 碳酸钾, 涡旋混匀 5s 后, 瞬离, 再在每支 EP 管管盖上加 15 μ g mAb1, 摸索该抗体的最佳标记 pH 条件。
- (3) 选取最佳碳酸钾的用量后, 在装有 1 mL Au@Pt@Pd NPs 的 EP 管盖上加 15 μ g mAb1, 涡旋混匀 5s 后, 瞬离, 室温静置标记 15 min。
- (4) 加入 100 μ L 10% BSA, 涡旋混匀 5s 后, 瞬离, 室温静置封闭 30 min。
- (5) 4℃下 10000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清。
- (5) 加入 150 μ L 复溶液重悬 Au@Pt@Pd 溶液, 4℃保存。

2.2.5 样品垫和结合垫的处理

- (1) 使用结合垫处理液将玻璃纤维素膜浸泡 60 min, 置于 56℃干燥箱中烘 24 h, 再按 30 mm $\times$ 6 mm 的尺寸裁切作为结合垫。
- (2) 使用样品垫处理液将玻璃纤维素膜浸泡 30 min, 置于 56℃干燥箱中烘 48 h, 再按 30 mm $\times$ 18 mm 的尺寸裁切作为样品垫。

2.2.6 基于 Au@Pt@Pd NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡的制备

- (1) 将标记成功的 Au@Pt@Pd NPs-mAb1 用喷金划膜仪按照 5 μ L/cm 喷涂在结合垫上, 56℃烘 2 h, 密封保存。

- (2) 将 1 mg/mL 的 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体 mAb2 和 1 mg/mL 的羊抗鼠抗体在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上以 1 μ L/cm 的划线速度划出检测线和质控线, 56 $^{\circ}$ C 烘 1 h, 密封保存。
- (3) 按照顺序, 依次将样品垫、处理好的结合垫、NC 膜和吸水纸粘贴在 PVC 底板上。
- (4) 将粘贴好的检测大板裁切成 4 mm 宽的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测试纸条, 装入卡壳的内部的凹槽中, 组成基于 Au@Pt@Pd NPs 的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测卡, 置于室温下干燥密封保存。

2.2.7 HRP 标记 mAb1

- (1) 称取 3 个 30 KD 超滤管, 使用超纯水 12000 r/10 min 超滤 3 次后备用, 称取 5 mg HRP 溶解于 1 mL 蒸馏水中;
- (2) 在 HRP 溶液中加入 0.2 mL 新配制的 0.1 M NaIO₄ 溶液, 室温下避光搅拌 20 min 后, 加入 0.16 M 乙二醇水溶液 0.5 mL, 漩涡混匀 10 s 后, 瞬离, 静置 30 分钟;
- (3) 将所需抗体用 1xPBS 超滤 3 次 (12000 r/10 min), 加入 250 μ L 0.01 M 碳酸盐缓冲液后混匀备用;
- (4) 将醛化好的 HRP 溶液加入超滤管中, 用 1 mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液超滤 3 次 (12000 r/10 min)。将产物取出后, 用 1 mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液将醛化好的 HRP 溶液体积加至 130 μ L;
- (5) 在处理好的 HRP 溶液中加 20 μ L 0.2 M pH9.5 碳酸盐缓冲液, 使醛化好的 HRP 溶液的 pH 升高到 9.0~9.5, 根据抗体的含量取相应体积的醛化 HRP 溶液, 然后和准备好的抗体溶液混匀, 室温避光轻轻搅拌 2 h;
- (6) 在混合溶液中加入 0.1 mL 新配制的 4 mg/mL NaBH₄ 终止液, 漩涡混匀 3 s 后, 瞬离, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h;
- (7) 将上述溶液加入超滤管中, 用 1 $\times$ PBS 超滤 3 次 (12000 r/10 min);
- (8) 将最终产物和甘油 1: 1 混合, 置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

2.2.8 SARS-CoV-2 N 蛋白 ELISA 的操作步骤

- (1) 包板: 用碳酸盐缓冲液 (CBS) 将 mAb2 稀释成 $1\ \mu\text{g/mL}$, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 置于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 过夜 (12-14 h);
- (2) 洗涤: 使用 0.05% PBST 洗液将酶标板洗两次, 去除酶标孔中多余的抗体;
- (3) 封闭: 将 $200\ \mu\text{L}$ 的封闭液加入到酶标板孔中进行封闭, 置于 37°C 封闭 2 h;
- (4) 洗涤: 使用 0.05% PBST 洗液将包被板洗两次, 去除酶标孔中多余的封闭液;
- (5) 加样本: 用 ELISA 样本稀释液将新冠 N 蛋白倍比稀释后或者将待测样本加入酶标板孔中 $100\ \mu\text{L}$, 置于 37°C 孵育 1 h;
- (6) 洗涤: 使用 0.05% PBST 洗液将酶标板洗五次, 去除酶标孔中多余的样本;
- (7) 加 HRP-mAb1: 用抗体稀释液将标记好的 HRP-mAb1 按 1:12000 稀释, 每孔加 $100\ \mu\text{L}$, 置于 37°C 孵育 30 min;
- (8) 洗涤: 使用 0.05% PBST 洗液将酶标板洗五次, 去除酶标孔中多余的 HRP-mAb1;
- (9) 显色: 按照 1:1 比例混匀 TMB 显色液的 A 液和 B 液, 在酶标孔中加 $100\ \mu\text{L}$ 配置好的显色液后, 37°C 孵育 10 min;
- (10) 终止: 每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液, 终止反应;
- (11) 读值: 读取终止后酶标板的 OD 值 ($450\ \text{nm}$)。

2.2.9 Au@Pt@Pd-LFIA 性能参数的优化

为获得 Au@Pt@Pd-LFIA 的最佳性能, 本研究对 Au@Pt@Pd-LFIA 的性能参数做了以下优化。原则上采取控制单一变量的方法对 Au@Pt@Pd-LFIA 的性能参数进行优化。

2.2.9.1 Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 用量的优化

通过改变 Au@Pt@Pd NPs 上标记的 mAb1 用量, 制备不同条件的 Au@Pt@Pd-LFIA 检测梯度浓度稀释的标准品 ($31.25\ \text{ng/mL}$ 、 $15.63\ \text{ng/mL}$ 、 7.81

ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL），来确定最佳的 mAb1 用量。分别以 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 mAb1 标记 Au@Pt@Pd NPs，组装成检测卡后，检测标准品，以 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为评估 Au@Pt@Pd-LFIA 上标记 mAb1 最优用量的标准。

2.2.9.2 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度的优化

通过改变 mAb2 的包被浓度，制备不同条件的 Au@Pt@Pd-LFIA 检测梯度浓度稀释的标准品（31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL），来确定最佳的 mAb2 用量。分别以 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 mAb2 包被在 T 线上，组装成检测卡后，检测标准品，达到最佳反应时间后，以 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为评价 T 线 mAb2 最优包被浓度的标准。

2.2.9.3 Au@Pt@Pd-LFIA 反应时间的优化

使用 Au@Pt@Pd-LFIA 检测梯度浓度稀释的标准品（31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL、0.03 ng/mL）。在加样后观察检测卡显示窗口是否干净，每隔 5min 记录一次检测卡层析结果，连续监测 20min。当显示窗口背景干净且 T 线颜色不再变化时，则为最优反应时间。

2.2.9.4 H₂O₂ 浓度和催化时间的优化

利用棋盘分步法选择最优的 H₂O₂ 浓度和催化时间。将 H₂O₂ 浓度设为 0%、1.25%、2.5%、5%、10%五个条件，催化时间设为 0 s、15 s、30 s、60 s、120 s 五个条件，使用 Au@Pt@Pd-LFIA 测试 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度为 0.49 ng/mL 的标准品，在滴加显色液后，以 T 线显色达到平台期且显示窗口背景干净时的

H₂O₂ 浓度和催化时间作为最优条件。

2.2.10 Au@Pt@Pd-LFIA 的性能评价

2.2.10.1 Au@Pt@Pd-LFIA 的灵敏度

基于以上性能参数的最优条件, 制备并评价 Au@Pt@Pd-LFIA 的灵敏度, 取 100ul 梯度浓度稀释的标准品 (125 ng/mL、62.5 ng/mL、31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL、0.03 ng/mL) 依次加入 Au@Pt@Pd-LFIA 加样孔中, 达到最佳反应时间后, 以催化后 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线显色达到平台期的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度作为 Au@Pt@Pd-LFIA 的可视检测限。使用胶体金免疫分析仪读取催化前后的 T 线和 C 线的信号值, 每个标准品平行检测 3 次, 以标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度和 T/C 值分别作为横纵坐标, 绘制 Au@Pt@Pd-LFIA 的标准曲线并建立线性方程, 评价过程中的数值均以 $\bar{x} \pm SD$ (平均值 $\pm$ 标准差) 表示。以 T/C 值为 0 时的 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度为 Au@Pt@Pd-LFIA 的定量检测限。

2.2.10.2 Au@Pt@Pd-LFIA 的特异性

用建立好的 Au@Pt@Pd-LFIA 检测新冠病毒阳性、RSV 阳性、Flu A 阳性和 Flu B 阳性鼻咽样本, 以检测卡 T 线是否出现条带作为评价 Au@Pt@Pd-LFIA 特异性的标准。

2.2.10.3 Au@Pt@Pd-LFIA 的精密度

使用同一批次的 Au@Pt@Pd-LFIA 分别在催化前后对高、中、低三份精密性标准品 (31.25 ng/mL、7.81 ng/mL、0.12 ng/mL) 进行批内精密性检测, 每份标准品平行检测 3 次, 所得变异系数 (Coefficient of variation, CV) 为批内精密度; 使用 3 批不同批次的 Au@Pt@Pd-LFIA 分别在催化前后检测同样的精密性标准品, 每份标准品平行检测 3 次, 所得 CV 为批间精密度。公式: $CV = (SD / \bar{x})$

×100%

2.2.10.4 Au@Pt@Pd-LFIA 的稳定性

采用 6 个月的实时稳定试验验证 Au@Pt@Pd-LFIA 的稳定性，将适量的检测卡分别密封后，置于 37℃干燥箱中。每间隔一个月取出所需数量的检测卡，分别检测高、中、低三份标准品（31.25 ng/mL，3.91 ng/mL，0.98 ng/mL），每份标准品平行检测 3 次，以 T 线条带的显色在 6 个月内是否保持均一作为评价 Au@Pt@Pd-LFIA 稳定性的标准。

2.2.10.5 方法学对比

采用双抗体夹心法制备的 SARS-CoV-2 N 蛋白检测 ELISA 作为对比方法，通过检测梯度浓度稀释的标准品（125ng/mL、62.5 ng/mL、31.25 ng/mL、15.63 ng/mL、7.81 ng/mL、3.91 ng/mL、1.95 ng/mL、0.98 ng/mL、0.49 ng/mL、0.24 ng/mL、0.12 ng/mL、0.06 ng/mL、0.03 ng/mL），评价 Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 间的灵敏度差异。

2.2.11 临床鼻咽样本的检测

使用制备好的 Au@Pt@Pd-LFIA 测试来自广州中医药大学深圳医院提供的 44 例新冠病毒阳性鼻咽样本和 50 例新冠病毒阴性鼻咽样本，并使用制备的 SARS-CoV-2 N 蛋白 ELISA 检测作为对比方法评估 Au@Pt@Pd-LFIA 的灵敏性、特异性、准确性。

2.3 结果

2.3.1 Au@Pt@Pd-LFIA 的原理及示意图

（1）本研究制备的 Au@Pt@Pd-LFIA 的结构和检测原理如图 2-1A，2-1B 所示。Au@Pt@Pd-LFIA 由样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸、PVC 底板五部分组成，当待检鼻咽样本中存在 SARS-CoV-2 N 蛋白时，则会被结合垫上

Au@Pt@Pd NPs 标记的 mAb1 捕获形成 SARS-CoV-2 N 蛋白-mAb1-Au@Pt@Pd NPs 免疫复合物。在毛细管力的层析作用下,免疫复合物层析至 T 线时,会被 T 线上包被的 mAb2 结合,从而在 T 线区域形成黑色条带,过量的免疫复合物以及 mAb1-Au@Pt@Pd NPs 会被 C 线上包被的羊抗鼠抗体结合, C 线区域形成黑色条带。当待检样本中不存在 SARS-CoV-2 N 蛋白时, T 线区域不显示黑色条带,但 C 线区域显示黑色条带。为提高检测灵敏度,在 T 线区域滴加 OPD 显色液, 1 min 后, Au@Pt@Pd NPs 会将 OPD 催化成 DAB,加深 T 线的颜色。最后用胶体金免疫层析分析仪定量分析催化后的 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T/C 比值。

(2) Au@Pt@Pd-LFIA 的组装图如图 2-1C 所示,检测卡由塑料上下壳和 Au@Pt@Pd-LFIA 组成。结果判读如图 2-1D 所示:当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阴性时, Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线不显色, C 线显色,受检者未感染 SARS-CoV-2;当待测鼻咽样本中 SARS-CoV-2 N 蛋白为阳性时, Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线和 C 线都显色,受检者感染 SARS-CoV-2;当 C 线没有条带时,检测结果视为无效。2-1E 为胶体金免疫层析分析仪实物图,用于定量分析 Au@Pt@Pd-LFIA 的检测结果。

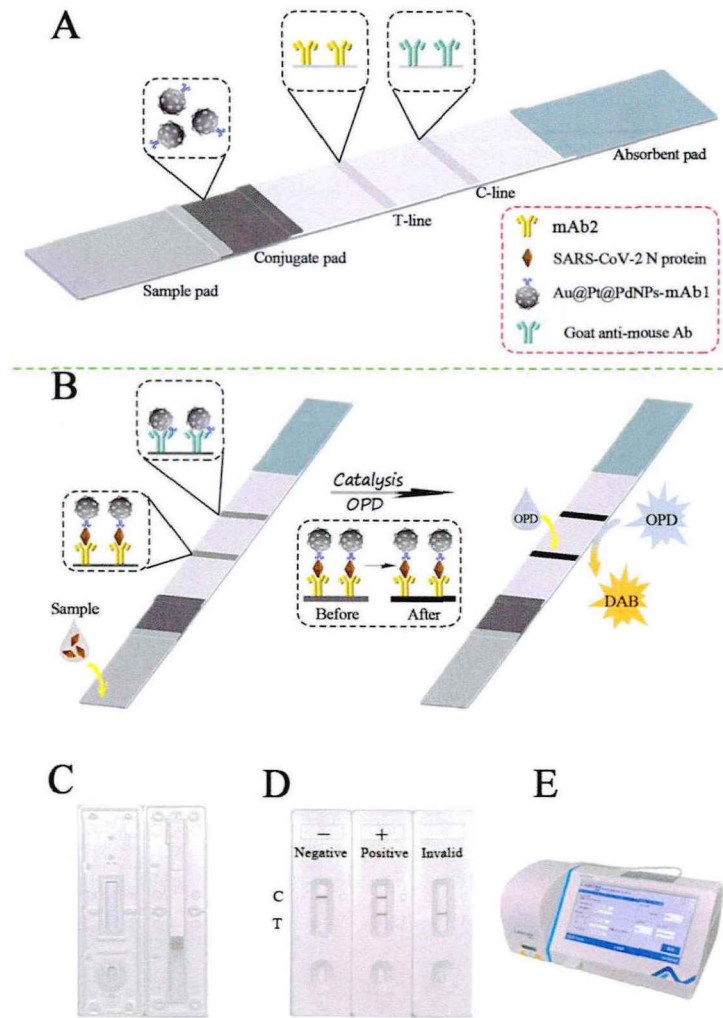


图 2-1 Au@Pt@Pd-LFIA 的检测原理与结果示意图

Figure 2-1 The principle and result diagram of the Au@Pt@Pd-LFIA

- A、Au@Pt@Pd-LFIA 的结构示意图；B、Au@Pt@Pd-LFIA 的检测原理；
C、Au@Pt@Pd-LFIA 的组装实物图；D、Au@Pt@Pd-LFIA 的结果示意图；
E、胶体金免疫层析分析仪实物图

2.3.2 Au@Pt@Pd NPs 的表征及标记

(1) 通过两步水热法成功合成了 Au@Pt@Pd NPs(图 2-2A)。首先制备金种子溶液。透射电镜 (TEM) 结果显示金种子颗粒的直径约为 20 nm。金种子溶液

的颜色为亮红色，澄清透明，无聚集。全波长扫描显示 525 nm 处的吸收峰是金种子的特征吸收峰(图 2-2B)。Au@Pt@Pd NPs 呈海胆状，平均粒径接近 50 nm。Au@Pt@Pd 溶液的颜色为黑色，全波长扫描显示 525 nm 处无吸收峰(图 2-2B)。两种颗粒在形态上的显著差异是 Au@Pt@Pd NPs 表面的刺突状结构，随着氯铂酸六水合物和四氯钯(II)酸钠的加入，Au@Pt@Pd NPs 的颗粒直径显著增大，表面的刺突状结构增多，溶液的颜色由浅红色变为黑色。同时金种子 525nm 处的特征吸收峰完全消失，表明氯铂酸六水合物和四氯钯(II)酸钠成功的包裹在金种子的表面。同时能量色散 X 射线(EDS)光谱结果确认 Au@Pt@Pd NPs 是由 Au、Pd 和 Pt 元素形成的(图 2-2C,2-2D)。其中 Au 原子的质量百分含量和原子百分含量分别为 29.49%和 8.49%，Pt 原子的质量百分含量和原子百分含量分别为 6.62%和 1.92%，Pd 原子的质量百分含量和原子百分含量分别为 12.13%和 6.47%(图 2-2E,2-2F)，这些结果表明 Au@Pt@Pd NPs 成功合成。在 mAb1 标记 Au@Pt@Pd NPs 后,使用 Zeta 电位分析 Au@Pt@Pd NPs-Ab1。如图 2-2G 所示，Au@Pt@Pd NPs 共轭标记 mAb1 后 Zeta 电位从 -16.6 ± 2.51 mV 变为 -1.34 ± 0.37 mV。此外，共轭标记后的 Au@Pt@Pd NPs 水动力直径从 161.4 ± 1.30 nm 显著增加到 224 ± 3.11 nm(图 2-2H)。这些结果表明，mAb1 成功标记 Au@Pt@Pd NPs。

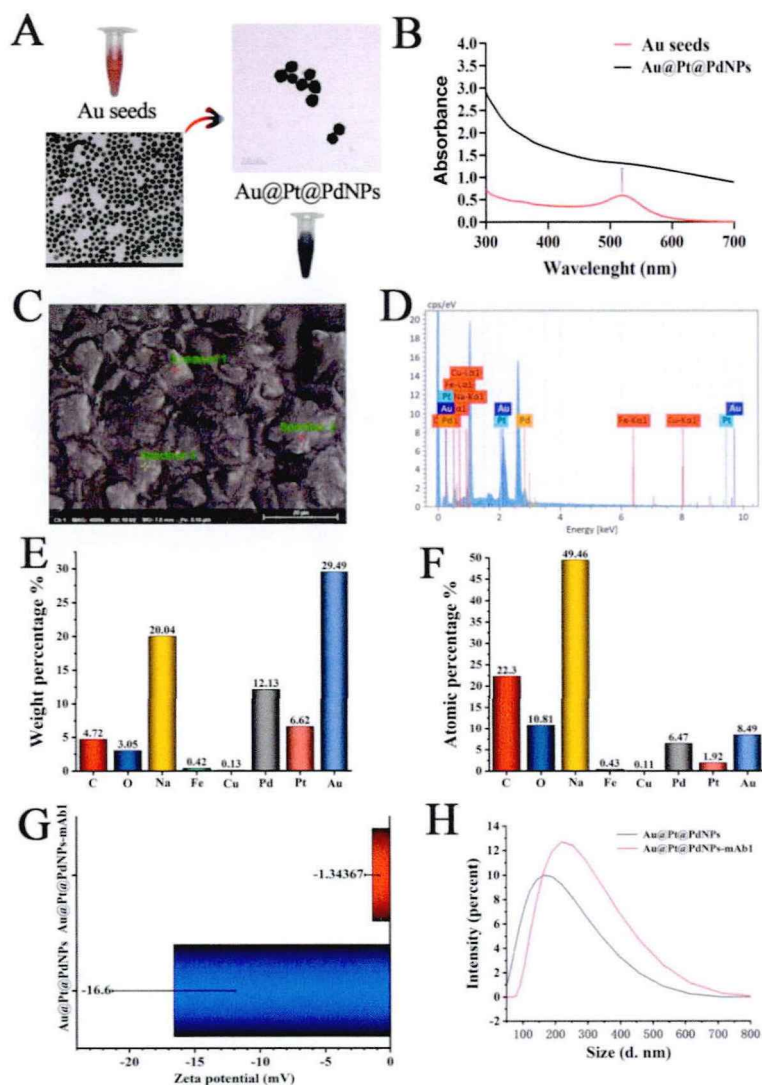


图 2-2 Au@Pt@Pd NPs 表征及标记

Figure 2-2 The characterization and labeling of Au@Pt@Pd NPs

A、金种子和 Au@Pt@Pd NPs 的溶液表现和电镜图；

B、金种子和 Au@Pt@Pd NPs 的吸收光谱；

C、Au@Pt@Pd NPs 的 SEM 图；D、Au@Pt@Pd NPs 的能量色散 X 射线（EDS）结果；

E、Au@Pt@Pd NPs 的元素质量百分比图；F、Au@Pt@Pd NPs 的原子含量百分比图；

G、Au@Pt@Pd NPs 标记 mAb1 前后的 Zeta 电位；H、Au@Pt@Pd NPs 标记 mAb1 前后的水动力直径

(2) 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 标记 Au@Pt@Pd NPs 时，25 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液可使

Au@Pt@Pd NPs 溶液的颜色不再发生变化，即临界值。因此 25 μL 0.2 M K_2CO_3 溶液是 Au@Pt@Pd NPs 溶液标记 15 $\mu\text{g/mL}$ mAb1 时调节 pH 值的最佳用量（图 2-3）。

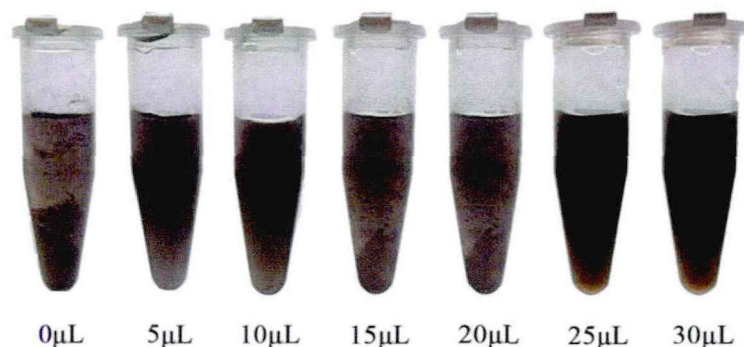


图 2-3 Au@Pt@Pd NPs 的 pH 调节

Figure 2-3 The adjustment of PH for Au@Pt@Pd NPs

2.3.3 性能参数的优化

2.3.3.1 Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 用量的优化

如图 2-4 所示，当 Au@Pt@Pd NPs 标记的 mAb1 用量为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时，Au@Pt@Pd-LFIA 可测出标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的最低浓度为 0.24 ng/mL（催化前）。此时 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线显色达到平台期，且检测卡显示窗口背景干净，即 Au@Pt@Pd NPs 上标记的 mAb1 最适标记量为 15 $\mu\text{g/mL}$ 。

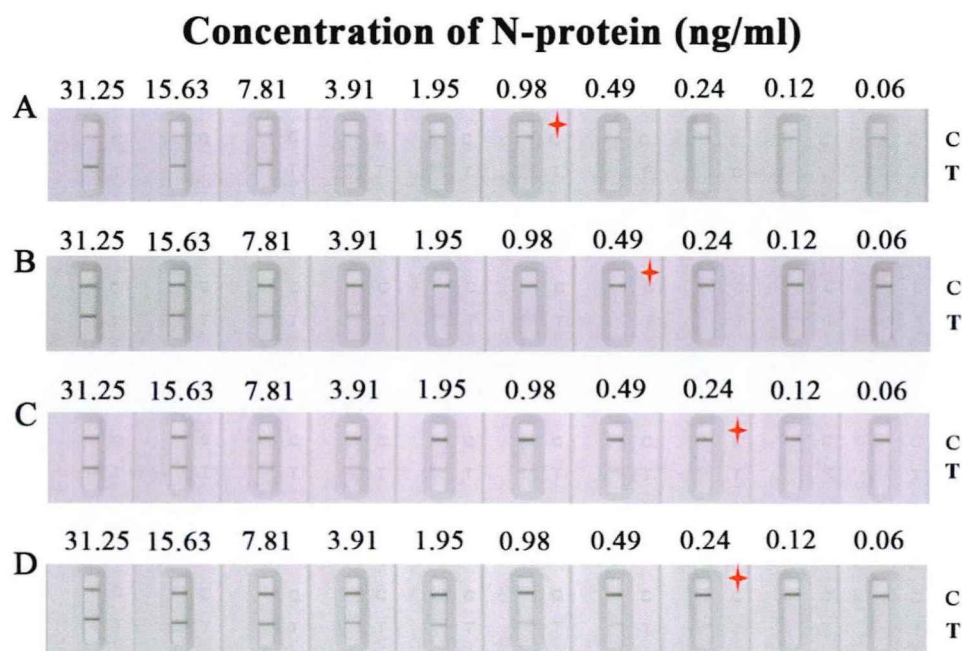


图 2-4 Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 用量的优化

Figure 2-4 Optimization of the amount of the mAb1 labeled on Au@Pt@Pd NPs

- A 、Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 的用量为 5 μ g/mL;
- B 、Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 的用量为 10 μ g/mL;
- C 、Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 的用量为 15 μ g/mL;
- D 、Au@Pt@Pd NPs 上标记 mAb1 的用量为 20 μ g/mL

2.3.3.2 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度的优化

如图 2-5 所示, 当 T 线上 mAb2 包被浓度为 1mg/mL 时, Au@Pt@Pd-LFIA 可测出标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白的最低浓度为 0.24 ng/mL (催化前)。此时 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线显色达到平台期, 且检测卡显示窗口背景干净, 即 T 线上 mAb2 最适包被浓度为 1mg/mL。

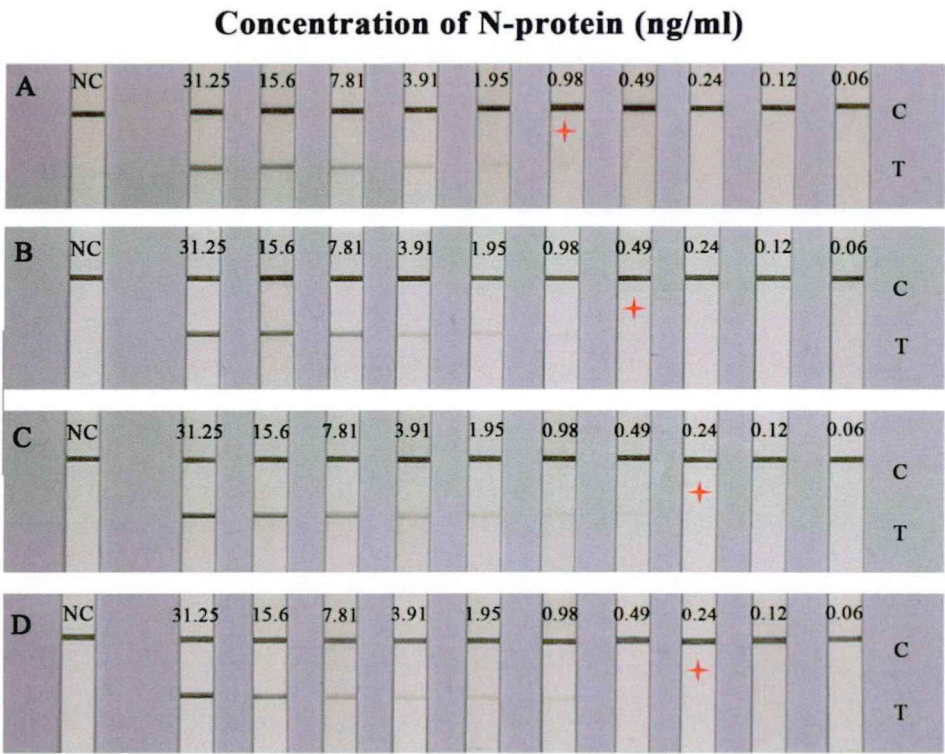


图 2-5 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度的优化

Figure 2-5 Optimization of the concentration mAb2 coated on T-line of Au@Pt@Pd-LFIA

- A 、 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 0.25 mg/mL;
- B 、 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 0.5 mg/mL;
- C 、 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 1 mg/mL;
- D 、 Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线上 mAb2 包被浓度为 2 mg/mL

2.3.3.3 Au@Pt@Pd-LFIA 反应时间的优化

如图 2-6 所示，在加样后 15 min 时，检测卡 T 线颜色不再发生变化且显示窗口背景干净。即 Au@Pt@Pd-LFIA 的最适反应时间为 15 min。

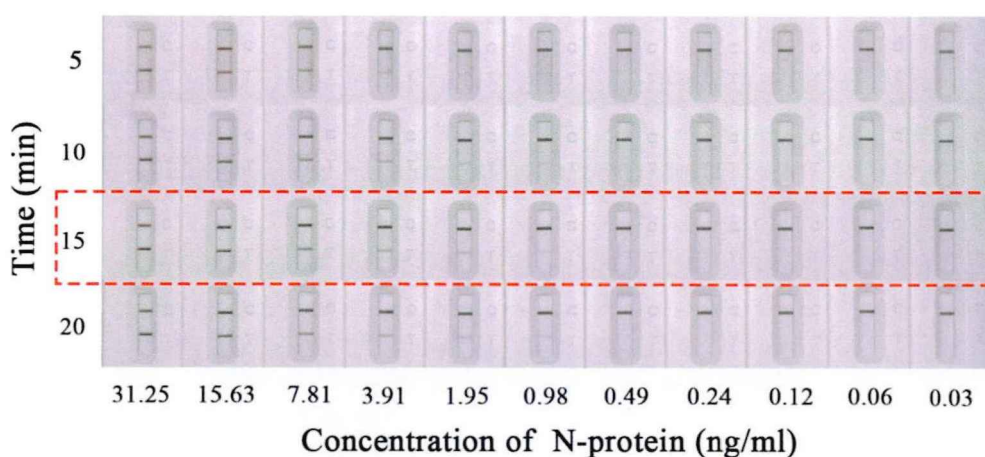


图 2-6 Au@Pt@Pd-LFIA 的反应时间的优化

Figure 2-6 Optimization of reaction time for Au@Pt@Pd-LFIA

2.3.3.4 H₂O₂ 浓度和催化时间的优化

如图 2-7 所示，显色底物中 H₂O₂ 的浓度为 2.5% 且催化时间为 60 s 时，T 线显色达到平台期，且检测卡显示窗口背景干净。即显色底物中 H₂O₂ 的最适浓度为 2.5% 且最适催化时间为 60 s。

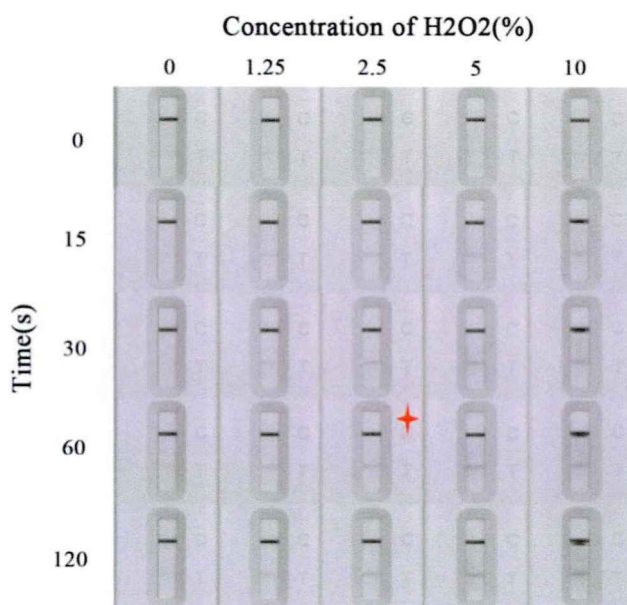


图 2-7 H₂O₂ 的浓度和催化时间的优化

Figure 2-7 Optimization of H₂O₂ concentration and catalytic time

2.3.3.5 Au@Pt@Pd-LFIA 性能优化指标汇总

以上优化指标汇总见表 2-1，Au@Pt@Pd-LFIA 上标记 mAb1 的最适用量为 15μg/mL，Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线 mAb2 最适包被浓度为 1mg/mL，Au@Pt@Pd-LFIA 的最适反应时间分别为 15min，显色底物中最适 H₂O₂ 浓度和最适催化时间分别为 2.5%和 60s。

表 2-1 Au@Pt@Pd-LFIA 的最佳工艺指标总结

Table 2-1 Summary of the best process specifications for Au@Pt@Pd-LFIA

优化性能指标	Au@Pt@Pd-LFIA
Au@Pt@Pd NPs的最适 mAb1 标记量	15 μg/mL
Au@Pt@Pd-LFIA的T 线 mAb2 最适包被浓度	1 mg/mL
最适反应时间	15 min
H ₂ O ₂ 最适浓度	2.5%
最适催化时间	60 s

2.3.4 Au@Pt@Pd-LFIA 的性能评价

2.3.4.1 Au@Pt@Pd-LFIA 灵敏度的评价

如图 2-8A 所示，使用最适条件下的 Au@Pt@Pd-LFIA 测试梯度浓度稀释的标准品，当 SARS-CoV-2 N 蛋白的浓度为 0.24 ng/mL 时，Au@Pt@Pd-LFIA 的 T 线显色达到平台期，即催化前 Au@Pt@Pd-LFIA 的检测限为 0.24 ng/mL。在使用显色底物催化后，Au@Pt@Pd-LFIA 的检测限降低至 0.06 ng/mL，Au@Pt@Pd-LFIA 催化后的检测限比催化前的降低了 4 倍。同时使用胶体金免疫分析仪读取 T/C 值，随着标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度的增高，T/C 值不断增大。以 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度为 X 轴坐标，T/C 值为 Y 轴坐标，绘制标准曲线。如图 2-8B、2-8C 所示，催化前后 Au@Pt@Pd-LFIA 的线性方程分别为 $Y=2.2-2.22/1+(X/31.23)^{0.8}$ ， $R^2=0.992$ ； $Y=1.82-1.82/1+(X/13.23)^{0.91}$ ， $R^2=0.991$ ，线性范围为 0.12- 31.25 ng/mL。由于标准品中 SARS-CoV-2 N 蛋白浓度低于 0.12 ng/mL

时，胶体金免疫分析仪测得 T/C 值为 0，所以 Au@Pt@Pd-LFIA 的 LOQ 为 0.12 ng/mL。

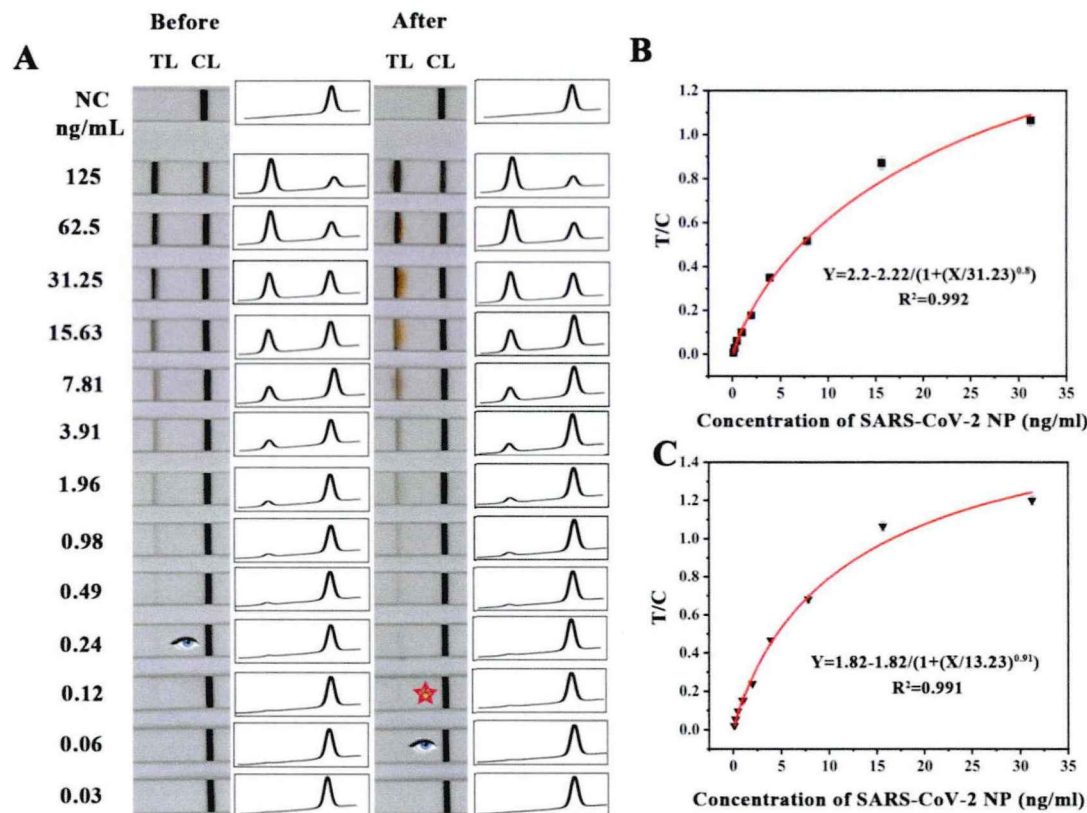


图 2-8 催化前后 Au@Pt@Pd-LFIA 的标准品测试结果和线性方程

Figure 2-8 Test results and linear equation of Au@Pt@Pd-LFIA before and after catalysis

A、催化前后 Au@Pt@Pd-LFIA 的标准品测试结果；

B、催化前 Au@Pt@Pd-LFIA 的线性方程；C、催化后 Au@Pt@Pd-LFIA 的线性方程

2.3.4.2 Au@Pt@Pd-LFIA 特异性的评价

如图 2-9 所示，Au@Pt@Pd-LFIA 测试新冠病毒阳性、RSV 阳性、Flu A 阳性、Flu B 阳性的鼻咽样本。检测结果显示除新冠病毒阳性外，其余呼吸道病毒检测结果全部为阴性，以上研究结果表明 Au@Pt@Pd-LFIA 和 RSV、Flu A、Flu B 等病毒无交叉反应

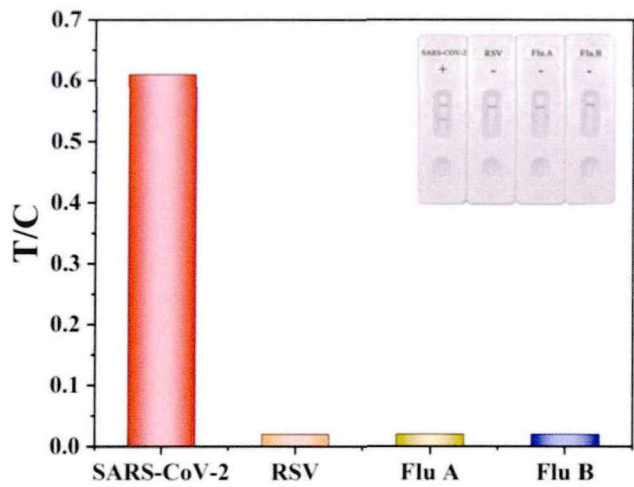


图 2-9 Au@Pt@Pd-LFIA 的特异性验证测试

Figure 2-9 The specific validation test of Au@Pt@Pd-LFIA

2.3.4.3 Au@Pt@Pd-LFIA 的精密性

使用制备好的 Au@Pt@Pd-LFIA 分别测试三份精密性标准品（31.25 ng/mL、7.81 ng/mL、0.12ng/mL）验证 Au@Pt@Pd-LFIA 的批间和批内精密性。结果如图 2-10 所示，催化前，Au@Pt@Pd-LFIA 的批内 CV 为 1.3%-9.52%。催化后，Au@Pt@Pd-LFIA 的批间 CV 为 1.61%-9.48%。表明 Au@Pt@Pd-LFIA 具有较好的精密性。

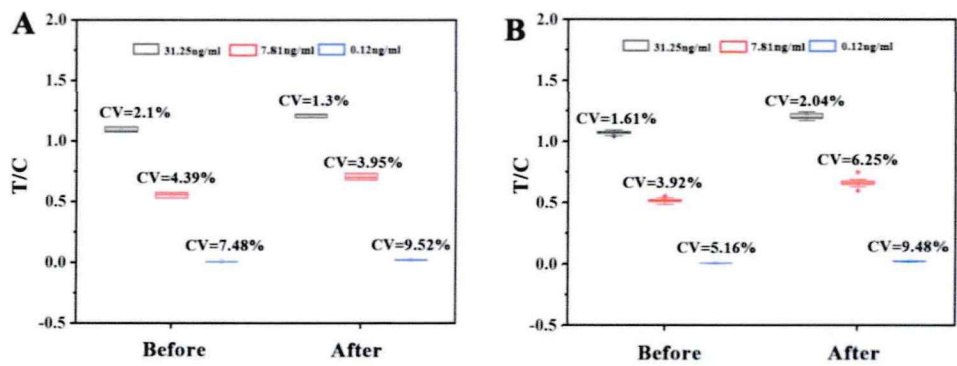


图 2-10 Au@Pt@Pd-LFIA 的精密性验证测试

Figure 2-10 The precision verification test of Au@Pt@Pd-LFIA

A、催化前后 Au@Pt@Pd-LFIA 的批内精密性；B、催化前后 Au@Pt@Pd-LFIA 的批间精密性

2.3.4.4 Au@Pt@Pd-LFIA 的稳定性评价

如图 2-11 所示，在催化前后，Au@Pt@Pd-LFIA 的 T/C 值的曲线变化波动均较小，CV 值均小于 10%，表明 Au@Pt@Pd-LFIA 的有效保存期可达 6 个月。

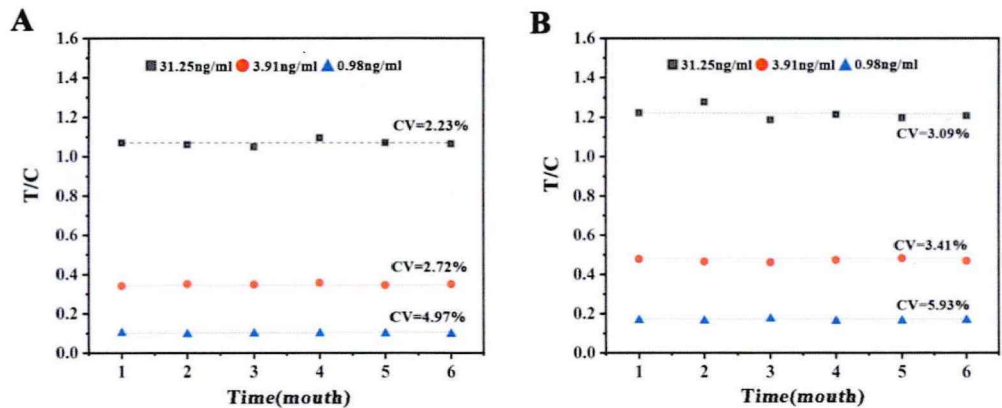


图 2-11 Au@Pt@Pd-LFIA 的稳定性验证测试

Figure 2-11 The stability verification test of Au@Pt@Pd-LFIA

A、催化前 Au@Pt@Pd-LFIA 6 个月的测试结果；B、催化后 Au@Pt@Pd-LFIA 6 个月的测试结果

2.3.4.5 方法学的对比

如图 2-12 所示，使用制备的 ELISA 检测标准品，ELISA 的检测线性范围是 0.12-1.95 ng/mL，检测时间为 2 h，线性方程为 $Y=0.083X+0.152$, $R^2=0.997$ 。根据 2.3.4.1 可知 Au@Pt@Pd-LFIA 的 LOD 为 0.06 ng/mL，检测时间为 16 min。对比两种方法可知，Au@Pt@Pd-LFIA 的检测限接近于 ELISA，并且在检测时间上远低于 ELISA。根据 1.3 可知 Au-LFIA 和 AF-LFIA 的检测限分别为 0.98 ng/ml 和 0.49 ng/ml，比 Au@Pt@Pd-LFIA 高了 16 倍和 8 倍。Au-LFIA 的检测时间(15min)接近于 Au@Pt@Pd-LFIA，AF-LFIA 的检测时间(10 min)短于 Au@Pt@Pd-LFIA。四种方法的检测时间指标如下表 2-2 所示

表 2-2 Au-LFIA、AF-LFIA、Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的检测检测时间比较

Table 2-2 Comparison of detection time for Au-LFIA, AF-LFIA , Au@Pt@Pd-LFIA and ELISA

	Au-LFIA	AF-LFIA	Au@Pt@Pd-LFIA	ELISA
LOD (ng/mL)	0.98	0.49	0.06	0.12
Detection time (min)	15	10	16	120

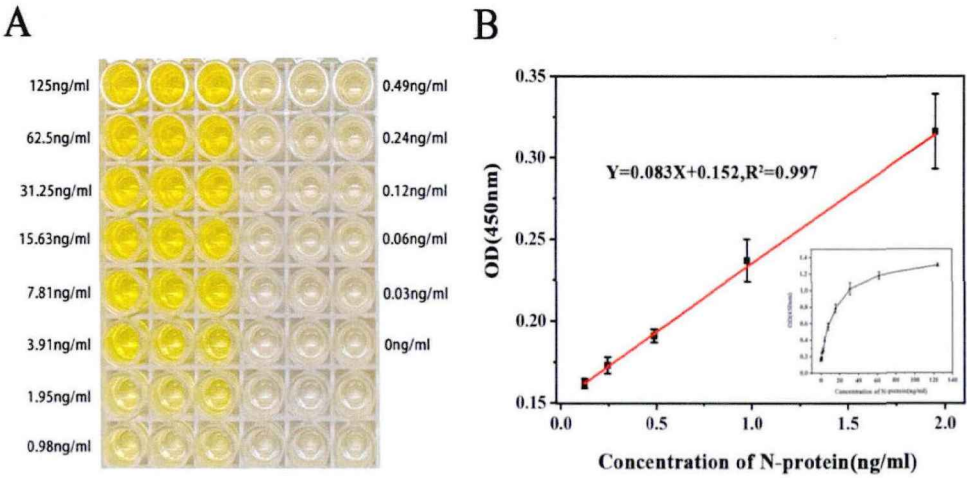


图 2-12 ELISA 的标准品测试和线性方程

Figure 2-12 standard testing and linear equation for ELISA

A、ELISA 测试标准品的实物图；B、ELISA 的线性方程

2.3.5 临床鼻咽样本的检测

如表 2-3 所示，使用制备好的 Au@Pt@Pd-LFIA 和 Au-LFIA、AF-LFIA、ELISA 分别对 44 份已确诊的新冠阳性鼻咽样本和 50 份新冠阴性鼻咽样本进行检测。在 44 份新冠阳性样本的检测中，Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 检测均检测出 37 份阳性，AF-LFIA 和 Au-LFIA 分别检测出 29 和 24 份。在 50 份新冠阴性样本的检测中，Au@Pt@Pd-LFIA 和 Au-LFIA、AF-LFIA、ELISA 均检测为阴性。Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的准确性、灵敏性和特异性均为 92.55%、84.09%和 100%，Au-LFIA 的准确性、灵敏性和特异性分别为 78.72%、54.55%和 100%，

AF-LFIA 的准确性、灵敏性和特异性分别为 84.04%、65.91%和 100%。四种检测方法中 Au@Pt@Pd-LFIA 与 ELISA 的灵敏性和准确性优于 AF-LFIA 和 Au-LFIA。统计学分析四种方法的准确性, $P < 0.05$, 具有统计学意义。如图 2-13 所示, 通过绘制 ROC 曲线分析五种方法 (RT-PCR、ELISA、Au@Pt@Pd-LFIA、AF-LFIA 和 Au-LFIA) 检测的准确性, Au@Pt@Pd-LFIA、ELISA、AF-LFIA、Au-LFIA 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.92、0.92、0.83、0.78。RT-PCR 的结果最优, AUC 值接近 1, Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的 AUC 值相同且优于 AF-LFIA 和 Au-LFIA, Au@Pt@Pd-LFIA 的准确性较好。这些结果表明, Au@Pt@Pd-LFIA 具有高灵敏性, 强特异性, 可定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。

表 2-3 Au-LFIA、AF-LFIA、ELISA 和 Au@Pt@Pd-LFIA 对临床样本的检测

Table 2-3 Detection of clinical samples by Au-LFIA,AF-LFIA, ELISA,and Au@Pt@Pd-LFIA

Samples	Au@Pt@Pd-LFIA		Au-LFIA		AF-LFIA		ELISA	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Negative group (n=50)	50	0	50	0	50	0	50	0
Positive group (n=44)	7	37	20	24	15	29	7	37
Total	57	37	70	24	65	29	57	37
Specificity (%)	100% (50/50)		100% (50/50)		100% (50/50)		100% (50/50)	
Sensitivity (%)	84.09% (37/44)		54.55% (24/44)		65.91% (29/44)		84.09% (37/44)	
Accuracy (%)	92.55% (87/94)		78.72% (74/94)		84.04% (79/94)		92.55% (87/94)	

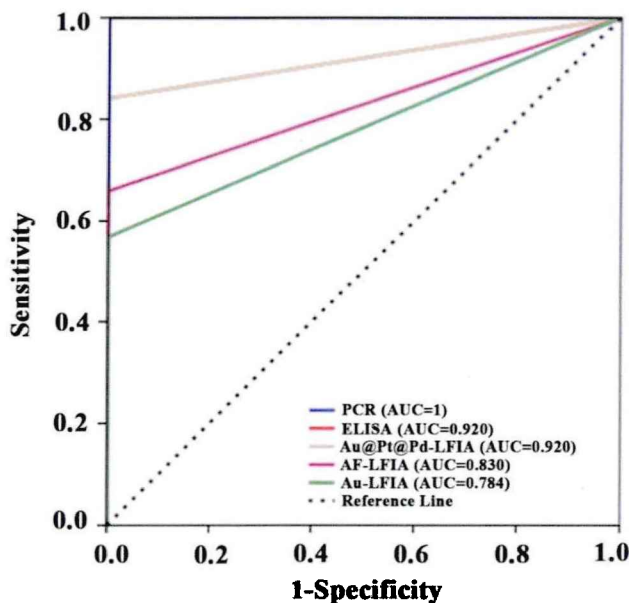


图 2-13 五种方法的 ROC 曲线

Figure 2-13 ROC curves for five methods

2.4 讨论

新冠抗原检测能快速、简便的检测 SARS-CoV-2，符合当下的疫情防控政策，既能满足社区、医院大规模筛查新冠患者，也方便人们居家自检，避免前往医院检测时导致的二次感染。从尽早发现 SARS-CoV-2 的角度出发，新冠抗原检测优于新冠抗体检测，不存在窗口期。相比于核酸检测，新冠抗原检测操作要求低，检测速度快，不需要专业的设备和场地。但是传统的新冠抗原检测的灵敏度较低，不能有效检测出新冠抗原含量低的样本，同时传统的新冠抗原检测多是定性检测，操作者无法像新冠核酸检测一样获取数字信息进而判断新冠感染程度。

基于以上问题，Daniel W Bradbury 等人结合镀铂金纳米酶和横向流动免疫方法，开发了一种新颖的 3D 打印套管用于检测 SARS-CoV-2 N 蛋白，其检测限为 0.1 ng/mL，检测时间为 40min^[115]；Dan Liu 等人建立了纳米酶化学发光试纸法快速灵敏的检测 SARS-CoV-2 抗原，其检测限为 0.1 ng/mL，检测时间为 16min^[116]；Kseniya V. Serebrennikova 等人将 SERS 和侧向免疫分析结合，用于

SARS-CoV-2 N 蛋白的定量检测, 其检测限为 0.1 ng/mL, 检测时间为 20min^[117]。本研究制备了 Au@Pt@Pd-LFIA, 用于检测鼻咽样本中的 SARS-CoV-2 N 蛋白。Au@Pt@Pd-LFIA 的检测线性范围为 0.12-31.25 ng/mL, 肉眼可视检测限为 0.06 ng/mL。在灵敏度方面, Au@Pt@Pd-LFIA 和上述列举的几种方法相似并接近于 ELISA (LOD 为 0.12 ng/mL), 都可以高灵敏定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。在可视检测限方面, Au@Pt@Pd-LFIA 分别比 AF-LFIA 和 Au-LFIA 低 8 倍和 16 倍。对于临床鼻咽样本, Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的检测结果基本一致, 表明在检 Au@Pt@Pd-LFIA 定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的性能可达到 ELISA 的水准, 并且在检测时间方面优于 ELISA。据 2.3.5 可知, 三种快速检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法中, Au@Pt@Pd-LFIA 的灵敏性和准确性均优于 AF-LFIA 和 Au-LFIA。

综上所述, 本研究建立的 Au@Pt@Pd-LFIA, 是一种高灵敏、快速和定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法, 可用于 SARS-CoV-2 的快速筛查, 并提供数字化结果辅助诊断新冠感染程度。

全文总结

针对传统 Au-LFIA 在灵敏性上存在的局限性,本研究基于 AF NPs 和 Au@Pt@Pd NPs 分别制备了 AF-LFIA 和 Au@Pt@Pd-LFIA。AF NPs 外观形似花状,是一类表面分布着不规则刺突的球状纳米粒子,刺突处的电场效应能够牢牢地吸附更多的蛋白质。且 AF NPs 相比胶体金具有更好的比色性。这些性能使得 AF-LFIA 在 SARS-CoV-2 N 蛋白检测中具有更低的检出限。在灵敏度上 AF-LFIA ($\text{LOD}=0.49 \text{ ng/mL}$) 优于传统的 Au-LFIA ($\text{LOD}=0.98 \text{ ng/mL}$),同时检测时间也缩短至 10min。经过验证,AF-LFIA 具有良好的特异性和稳定性,并且对于临床鼻咽样本,AF-LFIA 也有着不错的表现。

经查阅文献,SARS-CoV-2 N 蛋白的检测限仍可继续降低,且 AF-LFIA 无法定量检测 SARS-CoV-2 N 蛋白,因此烧制了 Au@Pt@Pd NPs,利用其类过氧化物酶活性,通过催化 OPD,加深 T 线的颜色,达到更低的检测限。同时结合胶体金免疫分析仪,定量分析 Au@Pt@Pd-LFIA 的检测结果。Au@Pt@Pd-LFIA 检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的线性范围为 0.12-31.25 ng/mL,检测限接近传统 ELISA 水平 ($\text{LOD}=0.12 \text{ ng/mL}$)。同时 Au@Pt@Pd-LFIA 的检测限为 0.06 ng/mL,比 Au-LFIA 和 AF-LFIA 分别低 16 倍和 8 倍。在 94 份鼻咽样本检测中,Au@Pt@Pd-LFIA 和 ELISA 的灵敏性、准确性和特异性均相同。Au@Pt@Pd-LFIA 的检测性能在接近 ELISA 水准的同时将检测时间缩短至 16min。在三种快速检测 SARS-CoV-2 N 蛋白方法中,Au@Pt@Pd-LFIA 的灵敏性和准确性也均优于 AF-LFIA 和 Au-LFIA。并且 Au@Pt@Pd-LFIA 的批内和批 CV 均小于 10%,表明其具有良好的精密性。经过实时稳定性验证,Au@Pt@Pd-LFIA 的有效期可达 6 个月。

综上所述,本研究建立的 AF-LFIA 可以快速、简便、灵敏、低成本的检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。Au@Pt@Pd-LFIA 作为提高 SARS-CoV-2 N 蛋白检测灵敏度的方法,具有比 AF-LFIA 更加灵敏的性能外,还能够结合胶体金免疫层析分

析仪定量分析 SARS-CoV-2 N 蛋白的检测结果。AF-LFIA 和 Au@Pt@Pd -LFIA 是对 SARS-CoV-2 N 蛋白检测应用方面的补充和创新。

参考文献

- [1] Ren L L, Wang Y M, Wu Z Q, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study[J]. Chin Med J (Engl), 2020,133(9):1015-1024.
- [2] Singh D, Yi S V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2[J]. Exp Mol Med, 2021,53(4):537-547.
- [3] V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2[J]. Nat Rev Microbiol, 2021,19(3):155-170.
- [4] Wang M Y, Zhao R, Gao L J, et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020,10:587269.
- [5] Harrison A G, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis[J]. Trends Immunol, 2020,41(12):1100-1115.
- [6] Yorsaeng R, Atsawawaranunt K, Riad A. Editorial: COVID-19 booster vaccination: increasing immunity against life-threatening infection[J]. Front Public Health, 2023,11:1342118.
- [7] Jackson C B, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022,23(1):3-20.
- [8] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. Nat Rev Microbiol, 2021,19(3):141-154.
- [9] Eltayeb A, Al-Sarraj F, Alharbi M, et al. Overview of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein[J]. Int J Biol Macromol, 2024,260(Pt 2):129523.
- [10] Lapierre L A, Roland J T, Manning E H, et al. Coronavirus M Protein Trafficking in Epithelial Cells Utilizes a Myosin Vb Splice Variant and Rab10[J]. Cells, 2024,13(2).

-
- [11] Chen X, Tian L, Zhang L, et al. Deubiquitinase USP39 promotes SARS-CoV-2 replication by deubiquitinating and stabilizing the envelope protein[J]. *Antiviral Res*, 2024,221:105790.
- [12] Zhang R, Qin H, Prasad R, et al. Dimeric Transmembrane Structure of the SARS-CoV-2 E Protein[J]. *bioRxiv*, 2023.
- [13] Zhang T, Magazine N, McGee M C, et al. Th2 and Th17-Associated Immunopathology Following SARS-CoV-2 Breakthrough Infection in Spike-Vaccinated ACE2-humanized Mice[J]. *bioRxiv*, 2023.
- [14] Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants[J]. *Elife*, 2020,9.
- [15] Lo C, Lo C, Komorowski A S, et al. Evaluating in vivo effectiveness of sotrovimab for the treatment of Omicron subvariant BA.2 versus BA.1: a multicentre, retrospective cohort study[J]. *BMC Res Notes*, 2024,17(1):37.
- [16] Johnston T S, Li S H, Painter M M, et al. Immunological imprinting shapes the specificity of human antibody responses against SARS-CoV-2 variants[J]. *medRxiv*, 2024.
- [17] Lu J, Tan S, Gu H, et al. Effectiveness of a broad-spectrum bivalent mRNA vaccine against SARS-CoV-2 variants in preclinical studies[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024:2321994.
- [18] Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020,9(1):275-277.
- [19] Huang Y, Huang C, Chen J, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 replication by a ssDNA aptamer targeting the nucleocapsid protein[J]. *Microbiol Spectr*, 2024:e341023.
- [20] Zhang R, Qin H, Prasad R, et al. Dimeric Transmembrane Structure of the

- SARS-CoV-2 E Protein[J]. bioRxiv, 2023.
- [21] Lapierre L A, Roland J T, Manning E H, et al. Coronavirus M Protein Trafficking in Epithelial Cells Utilizes a Myosin Vb Splice Variant and Rab10[J]. Cells, 2024,13(2).
- [22] Zhang H, Penninger J M, Li Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target[J]. Intensive Care Med, 2020,46(4):586-590.
- [23] Ren L L, Wang Y M, Wu Z Q, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study[J]. Chin Med J (Engl), 2020,133(9):1015-1024.
- [24] Ashraf U M, Abokor A A, Edwards J M, et al. SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion[J]. pHygiol Genomics, 2021,53(2):51-60.
- [25] Gong J, Dong H, Xia Q S, et al. Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study[J]. BMC Infect Dis, 2020,20(1):963.
- [26] Wu J, Li J, Zhu G, et al. Clinical Features of Maintenance Hemodialysis Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China[J]. Clin J Am Soc NepHrol, 2020,15(8):1139-1145.
- [27] Ga'Al A, Kapsack A, Mahmud A, et al. Predictors of later COVID-19 test seeking[J]. J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can, 2024,8(4):299-308.
- [28] Ballini A, Cantore S, Serrettiello E, et al. Multiparametric correlation of laboratory biomarkers to multiorgan failure outcome in hospitalized COVID-19 patients: a retrospective observational study[J]. Eur Rev Med parmacol Sci, 2023,27(18):8962-8974.
- [29] Qiu H, Wu J, Hong L, et al. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an

- observational cohort study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020,20(6):689-696.
- [30] Al-Sarraj S, Troakes C, Hanley B, et al. Invited Review: The spectrum of neuropathology in COVID-19[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2021,47(1):3-16.
- [31] Divani A A, Andalib S, Biller J, et al. Central Nervous System Manifestations Associated with COVID-19[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2020,20(12):60.
- [32] Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19[J]. *Nature*, 2021,594(7862):259-264.
- [33] Zeng N, Zhao Y M, Yan W, et al. A systematic review and meta-analysis of long term pPhysical and mental sequelae of COVID-19 pandemic: call for research priority and action[J]. *Mol Psychiatry*, 2023,28(1):423-433.
- [34] Moldofsky H, Patcai J. Chronic widespread musculoskeletal pain, fatigue, depression and disordered sleep in chronic post-SARS syndrome; a case-controlled study[J]. *BMC Neurol*, 2011,11:37.
- [35] Lam M H, Wing Y K, Yu M W, et al. Mental morbidities and chronic fatigue in severe acute respiratory syndrome survivors: long-term follow-up[J]. *Arch Intern Med*, 2009,169(22):2142-2147.
- [36] 冠状病毒病（COVID-19）[EB/OL].[2024-02-21].
<https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-%28covid-19%29>.
- [37] 中国疾病预防控制中心[EB/OL].[2024-02-21].
https://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/szkb_11803/jszl_13141/202402/t20240206_272824.html.
- [38] 关于印发新型冠状病毒感染防控方案（第十版）的通知[EB/OL]. [2024-02-21].
<http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202301/bdc1ff75feb94934ae1dade176d>

30936.shtml.

- [39] Gaudet L A, Pillay J, Saba S, et al. Associations between SARS-CoV-2 infection and incidence of new chronic condition diagnoses: a systematic review[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023,12(1):2204166.
- [40] Liu Q, Qin C, Liu M, et al. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis[J]. *Infect Dis Poverty*, 2021,10(1):132.
- [41] Ciapponi A, Berrueta M, P K P E, et al. Safety of COVID-19 vaccines during pregnancy: A systematic review and meta-analysis[J]. *Vaccine*, 2023,41(25):3688-3700.
- [42] Upreti S, Samant M. A Review on Immunological Responses to SARS-CoV-2 and Various COVID-19 Vaccine Regimens[J]. *pHarm Res*, 2022,39(9):2119-2134.
- [43] Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald C J, et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2022,28(2):202-221.
- [44] Flacco M E, Acuti M C, Baccolini V, et al. Risk of reinfection and disease after SARS-CoV-2 primary infection: Meta-analysis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2022,52(10):e13845.
- [45] Nainu F, Abidin R S, Bahar M A, et al. SARS-CoV-2 reinfection and implications for vaccine development[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020,16(12):3061-3073.
- [46] Lindstrom J C, Engebretsen S, Kristoffersen A B, et al. Increased transmissibility of the alpha SARS-CoV-2 variant: evidence from contact tracing data in Oslo, January to February 2021[J]. *Infect Dis (Lond)*,

- 2022,54(1):72-77.
- [47] 对十四届全国人大一次会议第4167号建议的答复 中华人民共和国国家卫生健康委员会[EB/OL].[2024-02-21].
<http://www.nhc.gov.cn/wjw/jiany/202310/b4257bbdb50b43c79ef69971aa8ab9ed.shtml>.
- [48] 国家卫生健康委员会2023年11月15日新闻发布会文字实录[EB/OL].
[2024-02-21].
<http://www.nhc.gov.cn/xcs/s3574/202311/53b7a4cfc1804f0e9eb1f369cf4e21f7.shtml>.
- [49] 杜国庆.境外输入疫情背景下航站楼设备运维质量影响因素研究[D].
山东建筑大学, 2023.
- [50] 王直欢,刘贤超,戴明城,等.港口境外新冠疫情输入风险时空分析——
以东北亚核心港口为例[J].上海海事大学学报, 2023,44(04):76-
8244(04):76-82.
- [51] Nyberg T, Bager P, Svalgaard I B, et al. A standardised protocol for relative
SARS-CoV-2 variant severity assessment, applied to Omicron BA.1 and Delta
in six European countries, October 2021 to February 2022[J]. Euro Surveill,
2023,28(36).
- [52] 2019冠状病毒病[EB/OL].[2024-02-21].
<https://www.who.int/zh/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [53] Temmam S, VongpHayloth K, Baquero E, et al. Bat coronaviruses related to
SARS-CoV-2 and infectious for human cells[J]. Nature, 2022,604(7905):330-
336.
- [54] Brown A, Flint S W, Kalea A Z, et al. Negative impact of the first COVID-19
lockdown upon health-related behaviours and psychological wellbeing in
people living with severe and complex obesity in the UK[J].

- EClinicalMedicine, 2021,34:100796.
- [55] Zhu W, Wang H, Zhou H, et al. Clinical characteristics and risk factors of non-mild outcomes in patients with Omicron variant COVID-19 in Shanghai, China[J]. J Infect Dev Ctries, 2024,18(1):44-52.
- [56] Rai P, Kumar B K, Deekshit V K, et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021,105(2):441-455.
- [57] Lane D, Allsopp R, Holmes C W, et al. A high throughput immuno-affinity mass spectrometry method for detection and quantitation of SARS-CoV-2 nucleoprotein in human saliva and its comparison with RT-PCR, RT-LAMP, and lateral flow rapid antigen test[J]. Clin Chem Lab Med, 2024.
- [58] Yuce M, Filiztekin E, Ozkaya K G. COVID-19 diagnosis -A review of current methods[J]. Biosens Bioelectron, 2021,172:112752.
- [59] Pradhan M, Shah K, Alexander A, et al. COVID-19: clinical presentation and detection methods[J]. J Immunoassay Immunochem, 2022,43(1):1951291.
- [60] Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review[J]. RadiographHy (Lond), 2021,27(2):682-687.
- [61] Gupta N, Augustine S, Narayan T, et al. Point-of-Care PCR Assays for COVID-19 Detection[J]. Biosensors (Basel), 2021,11(5).
- [62] Chan J F, Yip C C, To K K, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens[J]. J Clin Microbiol, 2020,58(5).
- [63] Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand[J]. Virol J, 2020,17(1):177.

-
- [64] Rai P, Kumar B K, Deekshit V K, et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021,105(2):441-455.
- [65] Lane D, Allsopp R, Holmes C W, et al. A high throughput immuno-affinity mass spectrometry method for detection and quantitation of SARS-CoV-2 nucleoprotein in human saliva and its comparison with RT-PCR, RT-LAMP, and lateral flow rapid antigen test[J]. Clin Chem Lab Med, 2024.
- [66] Safiabadi T S, LeBlanc J J, Sadiq Z, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection[J]. Clin Microbiol Rev, 2021,34(3).
- [67] Peng L, Liu J, Xu W, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens[J]. J Med Virol, 2020,92(9):1676-1680.
- [68] Kim J H, Kang M, Park E, et al. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV[J]. Biochip J, 2019,13(4):341-351.
- [69] Fox T, Geppert J, Dinnes J, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2022,11(11):CD13652.
- [70] Xiao M, Zhang Y, Zhang S, et al. AntiHspHolidip Antibodies in Critically Ill Patients With COVID-19[J]. Arthritis Rheumatol, 2020,72(12):1998-2004.
- [71] Wang X, Guo X, Xin Q, et al. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients[J]. Clin Infect Dis, 2020,71(10):2688-2694.
- [72] Wang C, Wang C, Qiu J, et al. Ultrasensitive, high-throughput, and rapid

- simultaneous detection of SARS-CoV-2 antigens and IgG/IgM antibodies within 10 min through an immunoassay biochip[J]. *Mikrochim Acta*, 2021,188(8):262.
- [73] Wang J J, Zhang N, Richardson S A, et al. Rapid lateral flow tests for the detection of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2021,21(4):363-370.
- [74] Fox T, Geppert J, Dinnes J, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022,11(11):CD13652.
- [75] Johnson L, Bartlett M L, Ramirez F, et al. Development of automated microfluidic immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen[J]. *J Immunol Methods*, 2024,524:113586.
- [76] de Araujo W R, Lukas H, Torres M, et al. Low-Cost Biosensor Technologies for Rapid Detection of COVID-19 and Future Pandemics[J]. *ACS Nano*, 2024,18(3):1757-1777.
- [77] Goto T, Sasaki T, Chong Y, et al. SARS-CoV-2 strain-specific anti-spike IgG ELISA utilizing spike protein produced by silkworms[J]. *Hum Antibodies*, 2023,31(3):27-33.
- [78] Uwamino Y, Tanaka S, Shibata A, et al. The utility of smartpHone-based quantitative analysis of SARS-CoV-2-specific antibody lateral flow assays[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2024,108(3):116166.
- [79] Gaeta A, Angeloni A, Napoli A, et al. Anti-N SARS-CoV-2 assays for evaluation of natural viral infection[J]. *J Immunol Methods*, 2023,518:113486.
- [80] Wu S W, Chen Y J, Chang Y W, et al. Novel enzyme-linked aptamer-antibody sandwich assay and hybrid lateral flow strip for SARS-CoV-2 detection[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024,22(1):5.

-
- [81] Yamani L N, Juniastuti, Megasari N, et al. SARS-CoV-2 IgG antibody status in unvaccinated and 2-dose vaccinated Indonesians by AstraZeneca[J]. *J Public Health Afr*, 2023,14(12):2697.
- [82] Miller M R, Tkachenko A, Guag J, et al. Comparative evaluation of assay performance for SARS-CoV-2 detection in animal oral samples, lung homogenates, and pHospHate-buffered saline using the TaqPath COVID-19 Combo kit[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2024:689397781.
- [83] Miller M R, Tkachenko A, Guag J, et al. Comparative evaluation of assay performance for SARS-CoV-2 detection in animal oral samples, lung homogenates, and pHospHate-buffered saline using the TaqPath COVID-19 Combo kit[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2024:689397781.
- [84] Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019[J]. *Int J Infect Dis*, 2020,94:49-52.
- [85] Miller M R, Tkachenko A, Guag J, et al. Comparative evaluation of assay performance for SARS-CoV-2 detection in animal oral samples, lung homogenates, and pHospHate-buffered saline using the TaqPath COVID-19 Combo kit[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2024:689397781.
- [86] Wertenauer C, Pfeifer C, Roskos M, et al. Rapid antigen tests for SARS-CoV-2-a synopsis of the medical evidence[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2023,107(2):116027.
- [87] Chaimayo C, KaewnapHan B, Tanlieng N, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand[J]. *Virol J*, 2020,17(1):177.
- [88] WolfI-Duchek M, Bergmann F, Jorda A, et al. Sensitivity and Specificity of SARS-CoV-2 Rapid Antigen Detection Tests Using Oral, Anterior Nasal, and NasopHaryngeal Swabs: a Diagnostic Accuracy Study[J]. *Microbiol Spectr*,

- 2022,10(1):e202921.
- [89] Saulle I, Vicentini C, Clerici M, et al. Antigen presentation in SARS-CoV-2 infection: the role of class I HLA and ERAP polymorphisms[J]. *Hum Immunol*, 2021,82(8):551-560.
- [90] Mackin S R, Desai P, Whitener B M, et al. Fc-gammaR-dependent antibody effector functions are required for vaccine-mediated protection against antigen-shifted variants of SARS-CoV-2[J]. *Nat Microbiol*, 2023,8(4):569-580.
- [91] A μ gusto D G, Hollenbach J A. HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection[J]. *Curr Opin Immunol*, 2022,76:102178.
- [92] Cottone E, Van Hoecke F, Martens G A, et al. Pitfalls of SARS-CoV-2 antigen testing at emergency department[J]. *Infect Dis (Lond)*, 2022,54(10):731-737.
- [93] Wertenaue C, Pfeifer C, Roskos M, et al. Rapid antigen tests for SARS-CoV-2-a synopsis of the medical evidence[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2023,107(2):116027.
- [94] Gans J S, Goldfarb A, Rosella L. Rapid Antigen Tests for SARS-CoV-2-Reply[J]. *JAMA*, 2022,327(19):1926.
- [95] Forest-Nault C, Koyuturk I, Gaudreault J, et al. A Biosensor Assay Based on Coiled-Coil-Mediated Human ACE2 Receptor Capture for the Analysis of Its Interactions with the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain[J]. *Methods Mol Biol*, 2024,2762:89-105.
- [96] Qiu G, Gai Z, Tao Y, et al. Dual-Functional Plasmonic pHotothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection[J]. *ACS Nano*, 2020,14(5):5268-5277.
- [97] Nawab M, Riaz S K, Ismail E, et al. Integrated approach for detection of

- SARS-CoV-2 and its variant by utilizing LAMP and ARMS-PCR[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2024,23(1):11.
- [98] In Vitro Diagnostics EUAs - Molecular Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 | FDA[EB/OL].[2024-02-21].<https://www.fda.gov/medical-devices/covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-molecular-diagnostic-tests-SARS-CoV-2>.
- [99] 王薇,付群,郑艳敏,等,应用于食品检测领域的分子即时检测技术研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024,15(01):48-5615(01):48-56.
- [100] Florkowski C, Don-Wauchope A, Gimenez N, et al. Point-of-care testing (POCT) and evidence-based laboratory medicine (EBLM) - does it leverage any advantage in clinical decision making?[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2017,54(7-8):471-494.
- [101] Randell E W, Thakur V. Leading POCT Networks: Operating POCT Programs Across Multiple Sites Involving Vast Geographical Areas and Rural Communities[J]. *EJIFCC*, 2021,32(2):179-189.
- [102] Wang F, Li X, Liu Z, et al. A Magnetic-Optical Triple-Mode Lateral Flow Immunoassay for Sensitive and Rapid Detection of Respiratory Adenovirus[J]. *Anal Chem*, 2024,96(5):2059-2067.
- [103] 刘真真. 基于磁性SERS免疫层析的呼吸道病毒快速高灵敏定量检测技术研究[D]. 军事科学院, 2023.
- [104] Zhang P, Sun H, Guan W, et al. Au@Cu Nanoarrays with Uniform Long-Range Ordered Structure: Synthesis and SERS Applications[J]. *Micromachines (Basel)*, 2018,9(12).
- [105] Leong N, Yaacob M H, Md Z A, et al. Colloidal surface-enhanced Raman spectroscopic study of grouper epidermal mucus using acidified sodium sulphate as the aggregating agent[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol*

Spectrosc, 2024,311:123974.

- [106] Hu X, Liu Q, Wu Y, et al. Magnetic metal-organic frameworks containing abundant carboxylic groups for highly effective enrichment of glycopeptides in breast cancer serum[J]. *Talanta*, 2019,204:446-454.
- [107] Xie J, Zhang B, Gui X, et al. Planting gold nanoflower for harvesting reproducible SERS substrate[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2024,308:123793.
- [108] Rogers K E, Nag O K, Susumu K, et al. pHotothermal-Enhanced Modulation of Cellular Membrane Potential Using Long-Wavelength-Activated Gold Nanoflowers[J]. *Bioconj μ g Chem*, 2023,34(2):405-413.
- [109] 庞佳瑞,基于纳米抗体免疫层析试纸条的黄曲霉素B₁快速检测技术研究[D]. 河南工业大学, 2023.
- [110] Qin Z, Li Y, Gu N. Progress in Applications of Prussian Blue Nanoparticles in Biomedicine[J]. *Adv Healthc Mater*, 2018,7(20):e1800347.
- [111] Sun Y, Xie Z, Pei F, et al. Trimetallic Au@Pt@Pd nanozyme-enhanced lateral flow immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein[J]. *Anal Methods*, 2022,14(48):5091-5099.
- [112] Grant B D, Anderson C E, Williford J R, et al. SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Antigen-Detecting Half-Strip Lateral Flow Assay Toward the Development of Point of Care Tests Using Commercially Available Reagents [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(16): 11305-9.
- [113] Frew E, Roberts D, Barry S, et al. A SARS-CoV-2 antigen rapid diagnostic test for resource limited settings [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23009.
- [114] Peng T, Jiao X, Liang Z, et al. Lateral Flow Immunoassay Coupled with Copper Enhancement for Rapid and Sensitive SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Detection [J]. *Biosensors*, 2021, 12(1).

- [115] Bradbury D W, Trinh J T, Ryan M J, et al. On-demand nanozyme signal enhancement at the push of a button for the improved detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in serum [J]. *Analyst*, 2021, 146(24): 7386-93.
- [116] Liu D, Ju C, Han C, et al. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 173: 112817.
- [117] Serebrennikova K V, Byzova N A, Zherdev A V, et al. Lateral Flow Immunoassay of SARS-CoV-2 Antigen with SERS-Based Registration: Development and Comparison with Traditional Immunoassays [J]. *Biosensors*, 2021, 11(12).

缩略词

英文缩写	英文全称	中文对照
COVID-19	Corona Virus Disease 2019	2019 冠状病毒病
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
POCT	Point of care testing	即时检测
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2	血管紧张素转化酶 2
SARS	Severe acute respiratory syndrome	重症急性呼吸综合征
Au NPs	Au Nanoparticles	胶体金纳米颗粒
AF NPs	Au nanoflower particles	纳米金花颗粒
Au@Pt@Pd NPs	Au@Pt@Pd Nanoparticles	铂包金包钯纳米颗粒
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
kDa	Kilo Dalton	千道尔顿
OD	Optical density	光密度
CV	Coefficient of variation	变异系数
LOD	Limit of detection	检测限
LOQ	Limit of quantitation	定量检测限
Au-LFIA	Au lateral flow immunoassay test strip	胶体金侧向免疫分析试纸条
AF-LFIA	Au flower lateral flow immunoassay test strip	纳米金花侧向免疫分析试纸条
Au@Pt@Pd-LFIA	Au@Pt@Pd Lateral flow immunoassay test strip	铂包金包钯侧向免疫分析试纸条
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面等离子共振
LSPR	Local surface plasmon resonance	局域表面等离子共振

SERS	Surface enhanced Raman Scattering	表面增强拉曼散射
LAMP	loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增

附 录

附表 S1 94 例新冠患者的详细信息与检测结果

Attached table S1 is detailed information and test results of 94 COVID-19 patients

Sample Number	Gender	Age	RT-PCR(CT-value)	Au@Pt@Pd-LFIA	ELISA	AF-LFIA	Au-LFIA
1	Male	61	19.25	1.03	2.32	+	-
2	Female	24	23.1	4.13	3.15	+	+
3	Male	73	21.31	3.72	3.43	+	+
4	Male	70	17.64	0.43	0.56	-	-
5	Female	32	31.75	<0.12	<0.12	-	-
6	Female	44	20.94	>31.25	73.87	+	+
7	Female	14	22.71	2.31	2.33	+	+
8	Female	60	16.97	4.81	2.82	+	+
9	Male	65	12.32	1.07	1.29	-	-
10	Female	27	10.19	8.03	7.17	+	+
11	Male	31	12.29	7.75	7.08	+	+
12	Female	50	12.66	0.73	0.83	-	-
13	Male	18	17.88	<0.12	2.06	-	-
14	Female	63	11.94	7.88	<0.12	+	+
15	Male	37	15.57	8.58	6.63	+	+
16	Male	45	18.51	7.99	7.11	+	+
17	Male	26	19.42	0.46	0.49	-	-
18	Male	28	21.02	0.88	0.93	-	-
19	Male	47	20.03	0.50	0.57	-	-
20	Female	27	19.88	0.52	0.59	-	-
21	Female	76	17.20	1.22	1.10	+	-
22	Male	34	20.35	>31.25	68.40	+	+
23	Female	69	21.58	10.60	10.59	+	+
24	Female	29	23.50	3.53	3.19	+	+
25	Female	31	30.2	>31.25	43.88	+	+
26	Male	85	37.68	1.55	1.44	+	-
27	Male	42	22.97	>31.25	34.59	+	+
28	Female	36	29.24	28.79	29.45	+	+

29	Female	30	33.02	<0.12	<0.12	-	-
30	Female	29	15.09	1.67	1.60	+	-
31	Male	26	14.64	>31.25	33.51	+	+
32	Male	34	14.38	0.95	0.93	-	-
33	Female	59	14.75	>31.25	39.64	+	+
34	Male	35	23.06	4.04	3.70	+	+
35	Male	42	19.57	3.32	3.67	+	-
36	Female	85	20.29	>31.25	35.66	+	+
37	Female	45	23.24	>31.25	40.83	+	+
38	Female	26	29.95	<0.12	<0.12	-	-
39	Female	57	23.92	<0.12	<0.12	-	-
40	Female	71	23.45	11.95	14.72	+	+
41	Female	51	24.47	14.84	14.92	+	+
42	Male	81	30.27	<0.12	<0.12	-	-
43	Male	58	26.09	<0.12	<0.12	-	-
44	Female	24	29.11	5.87	3.70	+	+
45	Male	54	>38	<0.12	<0.12	-	-
46	Male	54	>38	<0.12	<0.12	-	-
47	Male	32	>38	<0.12	<0.12	-	-
48	Female	54	>38	<0.12	<0.12	-	-
49	Female	41	>38	<0.12	<0.12	-	-
50	Male	57	>38	<0.12	<0.12	-	-
51	Male	60	>38	<0.12	<0.12	-	-
52	Male	69	>38	<0.12	<0.12	-	-
53	Male	59	>38	<0.12	<0.12	-	-
54	Male	45	>38	<0.12	<0.12	-	-
55	Male	41	>38	<0.12	<0.12	-	-
56	Male	43	>38	<0.12	<0.12	-	-
57	Female	69	>38	<0.12	<0.12	-	-
58	Male	49	>38	<0.12	<0.12	-	-
59	Male	60	>38	<0.12	<0.12	-	-
60	Male	35	>38	<0.12	<0.12	-	-
61	Female	54	>38	<0.12	<0.12	-	-
62	Male	60	>38	<0.12	<0.12	-	-
63	Male	39	>38	<0.12	<0.12	-	-
64	Male	59	>38	<0.12	<0.12	-	-
65	Male	65	>38	<0.12	<0.12	-	-
66	Female	31	>38	<0.12	<0.12	-	-
67	Male	45	>38	<0.12	<0.12	-	-
68	Male	54	>38	<0.12	<0.12	-	-

附录

69	Male	33	>38	<0.12	<0.12	-	-
70	Female	58	>38	<0.12	<0.12	-	-
71	Female	38	>38	<0.12	<0.12	-	-
72	Female	25	>38	<0.12	<0.12	-	-
73	Male	57	>38	<0.12	<0.12	-	-
74	Male	61	>38	<0.12	<0.12	-	-
75	Female	35	>38	<0.12	<0.12	-	-
76	Male	51	>38	<0.12	<0.12	-	-
77	Female	30	>38	<0.12	<0.12	-	-
78	Male	43	>38	<0.12	<0.12	-	-
79	Male	47	>38	<0.12	<0.12	-	-
80	Male	59	>38	<0.12	<0.12	-	-
81	Male	40	>38	<0.12	<0.12	-	-
82	Female	29	>38	<0.12	<0.12	-	-
83	Male	43	>38	<0.12	<0.12	-	-
84	Male	30	>38	<0.12	<0.12	-	-
85	Male	76	>38	<0.12	<0.12	-	-
86	Male	55	>38	<0.12	<0.12	-	-
87	Male	61	>38	<0.12	<0.12	-	-
88	Female	40	>38	<0.12	<0.12	-	-
89	Male	35	>38	<0.12	<0.12	-	-
90	Male	50	>38	<0.12	<0.12	-	-
91	Male	44	>38	<0.12	<0.12	-	-
92	Male	42	>38	<0.12	<0.12	-	-
93	Female	85	>38	<0.12	<0.12	-	-
94	Male	67	>38	<0.12	<0.12	-	-