

基于荧光体系的酶联免疫吸附分析法的研究进展

刘国永¹ 石宇¹ 孙健^{*2} 穆婧^{*1}

¹(深圳北京大学香港科技大学医学中心, 北京大学深圳医院精准医学研究院, 深圳 518036)

²(中国科学院长春应用化学研究所, 电分析化学国家重点实验室, 长春 130022)

摘 要 酶联免疫吸附分析(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)作为一种重要的免疫分析方法,具有高通量、信号读取方便、操作简单和成本低廉等优点,广泛应用于环境监测、食品安全检测以及医疗诊断等领域。然而,由于受比色显色原理的限制,传统 ELISA 的检测灵敏度难以提高。为了解决此问题,研究者开发了多种类型的新型检测体系。其中,荧光方法由于具有灵敏度高、操作简单以及响应快速等优势,引起了广泛关注。目前,多种新型荧光材料已被广泛用于构建 ELISA,促进了 ELISA 在分析化学和生物医疗检测中的应用。本文详细介绍了有机小分子、硅/碳纳米粒子、金属纳米簇和量子点等荧光材料构建的 ELISA,根据使用标记酶的不同,介绍了以碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等酶作为标记酶的 ELISA,评述了近五年来荧光材料在构建 ELISA 方面的研究进展,并对其应用前景与发展趋势进行了展望。

关键词 酶联免疫吸附分析; 荧光检测; 酶; 评述

酶联免疫吸附分析(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是将抗原或抗体结合在固相载体表面,利用抗原抗体的特异性结合以及抗体或者抗原上标记的酶催化特定底物发生显色反应,实现目标物检测的免疫分析方法。传统 ELISA 通常采用比色方法作为信号输出方式,如在辣根过氧化物酶(Horse-radish peroxidase, HRP)催化 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB)显色反应中, HRP/H₂O₂ 氧化无色的 TMB 为蓝色氧化产物 oxTMB; 在碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)催化对硝基苯基磷酸酯(*p*-Nitrophenyl phosphate, pNPP)的显色反应中, ALP 将无色的 pNPP 水解为黄色的对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, pNP)。然而,检测灵敏度较低、底物稳定性较差和信号干扰等问题限制了这些基于比色原理的 ELISA 方法的进一步发展。研究者针对不同的应用场景开发了不同的检测方法,例如,采用荧光、拉曼、电化学发光、化学发光和光热信号等作为响应信号^[1-3]。这些基于新型检测方法构建的 ELISA 大幅提高了检测的灵敏度与准确性,其中,荧光方法因其高灵敏度、快速响应等优势引起了广泛关注。大量新型荧光材料包括有机小分子、硅/碳纳米粒子、金属纳米簇和量子点等,被用于构建荧光 ELISA。本文系统地总结了近五年来荧光材料在构建新型 ELISA 方面的研究进展,根据所用标记酶的不同,分别介绍了基于不同荧光材料的 ELISA 检测策略,并对基于荧光体系 ELISA 的发展趋势和应用前景进行了展望。

1 不同荧光体系构建的ELISA平台

根据 ELISA 中采用的荧光材料的不同,可分为基于荧光有机小分子、硅/碳纳米粒子、金属纳米簇和量子点的 ELISA 等;此外,根据使用标记酶的不同,又可分为 ALP、HRP 和其它酶作为标记酶的 ELISA 等(图 1)。

1.1 基于荧光有机小分子的ELISA

有机小分子,如 4-甲基伞形酮、钙黄绿素和荧光素等,具有明确的分子结构、清晰的发光机制、高的荧光量子产率以及成熟的商业化体系等特性,被广泛应用于分析检测领域。酶解产物驱动原位荧光反

2022-09-14 收稿; 2023-01-29 接受

国家自然科学基金项目(No. 32101074)、吉林省科技发展规划项目(No. 20200201091JC)和北京大学深圳医院科研启动项目(No. KYQD202100X)资助。

* E-mail: jjiansun@ciac.ac.cn; jingmu1921@163.com

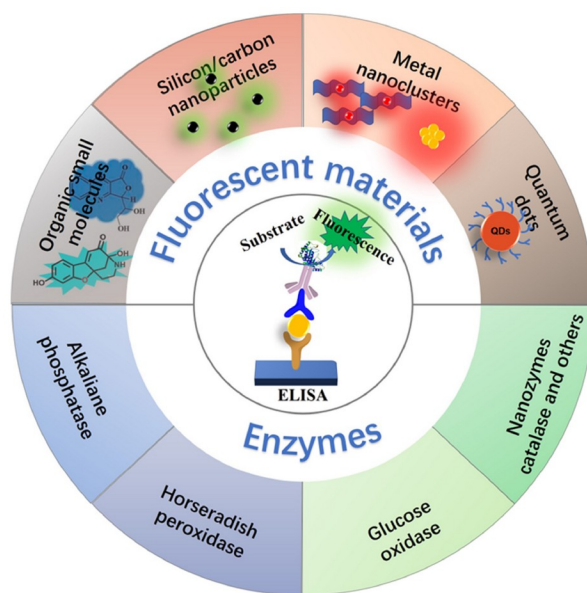


图1 基于荧光体系的 ELISA 根据不同荧光材料和标记酶分类的示意图

Fig.1 Illustration of fluorescence enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based on different fluorescent materials and labeled enzymes

应,该反应过程伴随着有机小分子荧光信号从无到有的变化,因此可用于构建 ELISA^[4]。此外,有机小分子的荧光可作为输出信号,其猝灭与恢复过程也可以整合到 ELISA 中。

1.1.1 以ALP作为标记酶的ELISA

ALP 可脱去底物磷酸单酯、双磷酸盐和多磷酸盐等磷酸化合物中的磷酸基团,是 ELISA 中一种常用的标记酶。如 ALP 可水解无荧光的 4-甲基伞形酮磷酸酯的磷酸基团,产生有荧光的 4-甲基伞形酮^[5],基于该原理,已经开发出商品化的 ELISA 试剂盒。此外,ALP 还可驱动一些简单的化学反应生成有荧光的产物,用于构建 ELISA。ALP 水解底物间羟基磷酸钠生成间苯二酚,与多巴胺(Dopamine, DA)发生荧光反应生成 Azamonardine。根据该反应原理,Zhao 等^[6]构建了一种 ALP 触发的原位生成 Azamonardine 的 ELISA 方法,用于检测心肌肌钙蛋白 I(Cardiac troponin I, cTnI)(图 2A),检出限为 0.04 ng/mL,与基于 4-甲基伞形酮的标准 ELISA 试剂盒的检出限相当。同样以 Azamonardine 的荧光为检测信号,Zhao 等^[7]还开发了一种以对氨基乙基苯基磷酸二钠为 ALP 底物的酶级联 ELISA。然而,在这两种 ELISA 中,间羟基磷酸钠和对氨基乙基苯基磷酸二钠的合成步骤复杂,不是常见的 ALP 商品化底物。商品化的抗坏血酸-2-磷酸酯(Ascorbic acid 2-phosphate, AA2P)被广泛用作 ALP 底物^[8]。Zhao 等^[9]以 AA2P 作为 ALP 的底物,利用抗坏血酸(Ascorbic acid, AA)的还原特性,与邻苯二胺(*o*-Phenylenediamine, OPD)反应,原位生成具有蓝色荧光信号的喹喔啉衍生物(图 2B),用于检测血清中的甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)含量,线性范围为 0.5~40 ng/mL,检出限为 0.21 ng/mL。该方法检测血清样品的结果与基于 pNPP 的 ELISA 试剂盒的检测结果吻合。

一些有机小分子的荧光会被金属离子猝灭,在酶促产物的作用下,有机小分子荧光可恢复,这种荧光猝灭-开启的策略可用于构建以荧光为输出信号的 ELISA。Chen 等^[10]利用 ALP 水解底物 pNPP 产生正磷酸根,恢复被 Ce^{3+} 猝灭的钙黄绿素荧光,开发了一种检测 AFP 的荧光开启型 ELISA(图 2C)。检测 AFP 的线性范围为 0.2~1.0 ng/mL 和 1.0~4.0 ng/mL,检出限为 0.041 ng/mL,检测血清样品的结果与基于 pNPP 的标准 ELISA 试剂盒检测结果一致。

上述研究中采用的发光基团均为有机小分子荧光团,容易发生聚集猝灭效应。聚集诱导发光(Aggregation-induced emission, AIE)材料具有良好的光稳定性和低背景噪声,可作为构建新型 ELISA 的材料。此外,为了保证实验结果的准确性,避免单信号结果的假阳性,多信号输出 ELISA 是一种较好的选择。如 Xiong 等^[11]以 ALP 为标记酶设计了一种双信号输出的比色-荧光 ELISA,用于测定人肠病毒

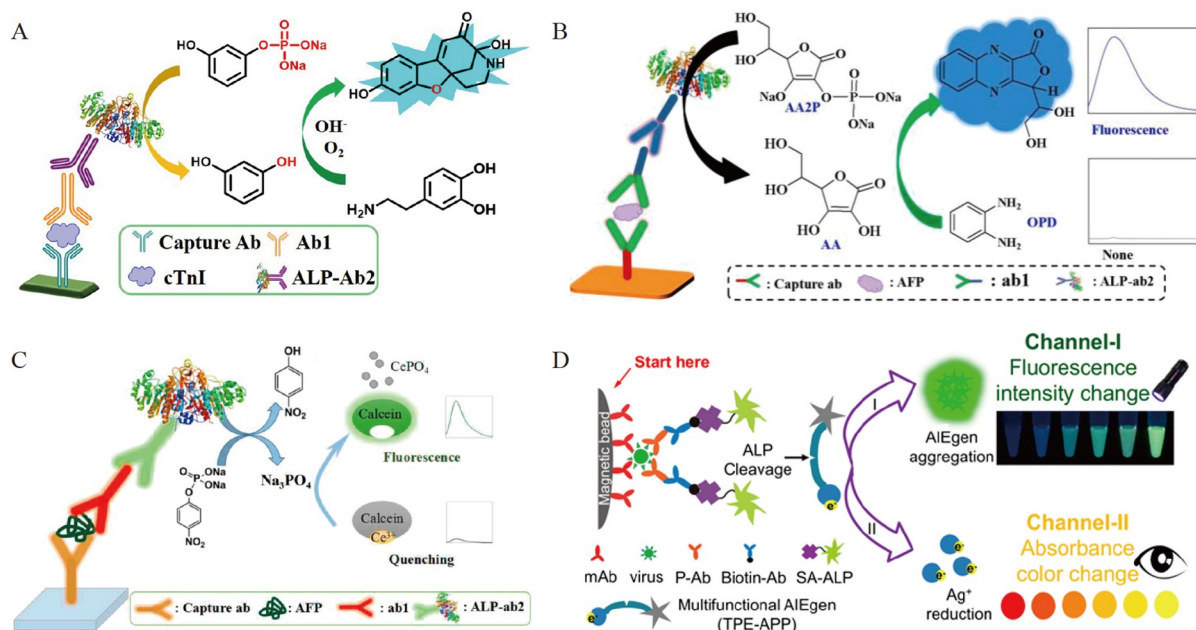


图2 (A)基于间苯二酚与多巴胺(DA)之间的荧光反应构建 ELISA 示意图^[6]; (B)基于抗坏血酸(AA)与邻苯二胺(OPD)之间的荧光反应构建 ELISA 示意图^[9]; (C)通过磷酸盐触发的钙黄绿素- Ce^{3+} 复合物荧光开启的 ELISA 示意图^[10]; (D)基于聚集诱导发光(AIE)和局域表面等离子体共振构建比色-荧光双模式 ELISA 示意图^[11]

Fig.2 (A) Schematic representation of ELISA based on the fluorogenic reaction between resorcinol and dopamine (DA)^[6]; (B) Schematic diagram of ELISA based on the fluorogenic reaction between ascorbic acid (AA) and *o*-phenylenediamine (OPD)^[9]; (C) Schematic illustration of ELISA based on phosphate triggered fluorescence turn-on of the calcein- Ce^{3+} complex^[10]; (D) A dual-channel colorimetric-fluorometric ELISA based on aggregation-induced emission (AIE) and localized surface plasmon resonance^[11]

(图2D)。在荧光模式中,免疫磁珠捕获病毒粒子,经过免疫作用结合 ALP, ALP 水解无荧光的底物,产生不溶于水的 AIE 产物,采用该模式可定量检测病毒粒子,检出限为 $1.4 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。在比色模式中,底物的水解可以同时还原 Ag^+ ,在金纳米颗粒(Gold nanoparticles, AuNPs)周围形成银纳米壳,进而在较宽的浓度范围内发生明显的颜色变化,其检出限为 $868.4 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。在临床样本检测中,与标准聚合酶链式反应结果相比,该 ELISA 的准确率为 100%,并且不需要复杂的样品预处理。这种荧光精准定量和比色可视化检测的双模式 ELISA 可为病毒的检测提供新的方法。

1.1.2 以 HRP 作为标记酶的 ELISA

在 ELISA 中,增加标记酶的含量有利于降低检出限,提高灵敏度^[3]。基于此,具有大的表面积和体积比以及高负载能力的纳米材料(如金纳米材料、磁性纳米粒子和硅纳米粒子等)常被用作酶的载体^[12],如抗体修饰的金纳米棒可负载更多的 HRP 标记物,使该荧光 ELISA 的检出限比传统 ELISA 降低了 3.5 倍(图3A)^[13]。荧光猝灭型 ELISA 是 ELISA 的常见类型,具有操作简单和灵敏度高等优点,但背景信号高,容易受到其它猝灭剂的干扰。荧光内滤效应(Inner filter effect, IFE)是指体系中猝灭剂吸收荧光材料的激发或发射光,导致荧光材料的荧光强度降低的过程,是一种常见的荧光猝灭形式。基于荧光 IFE,对苯二胺(*p*-Phenylenediamine, PPD)被 HRP/ H_2O_2 氧化的产物班德罗斯基碱能有效猝灭荧光素的荧光。基于此原理, Sun 等^[14]构建了一种 HRP 触发的荧光猝灭型 ELISA(图3B),用于检测 AFP,检出限为 0.05 ng/mL 。该方法能准确测定正常人血清与肝细胞癌患者血清中的 AFP 浓度,检测结果与基于 TMB 的标准 ELISA 试剂盒一致。

1.1.3 基于其它标记酶的 ELISA

除了最常用的标记酶 HRP 和 ALP 外,其它酶,如葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOx),可通过与抗体的偶联或纳米材料的修饰构建 ELISA。Jiang 等^[15]以 GOx 为标记酶,使用 SiO_2 涂层的 Au@Ag 核壳纳

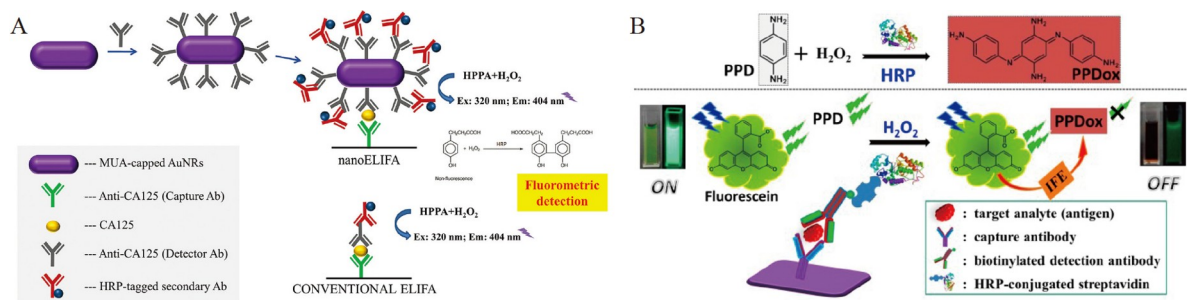


图3 (A)基于金纳米棒负载辣根过氧化物酶(HRP)的荧光 ELISA 示意图^[13]; (B)基于荧光内滤效应猝灭荧光素的 ELISA 示意图^[14]

Fig.3 Schematic diagram of fluorescent ELISA based on (A) horseradish peroxidase (HRP) loaded on gold nanorods^[13] and (B) fluorescent inner filter effect caused by Bandrowski's base^[14]

米棒构建了可对前列腺特异抗原(Prostate specific antigen, PSA)进行比色/荧光/光声三重检测的 ELISA。在荧光模式中, GOx 催化葡萄糖(Glucose, Glu)产生 H₂O₂, 蚀刻 Au@Ag@SiO₂ 中的银层, 释放的 Ag⁺被 Ag⁺-荧光探针捕获, 荧光信号增强, 检出限为 0.1 ng/mL。这种多重信号输出的 ELISA 在相关疾病的精准诊断中具有重要的应用价值。

酶在环境变化时容易发生变性, 限制了其实际应用。纳米酶是一类具有类酶活性的纳米材料^[16], 具有催化效率高、价格低廉和稳定性好等优势, 为 ELISA 的构建提供了新材料。Jiao 等^[17]利用 Au@Pt 纳米枝晶纳米酶为标记酶, 构建了温度、比色和荧光 3 种信号输出的 ELISA。这 3 种模式分别利用了 Au@Pt 纳米粒子的光热效应、OPD 氧化为 2,3-二氨基吩嗪(2,3-Diaminophenazine, oxOPD)的比色性质以及 oxOPD 猝灭碳点(Carbon dots, CDs)荧光的性质(图 3B)。在荧光模式中, cTnI 检出限可低至 0.056 pg/mL。

1.2 基于荧光硅/碳纳米粒子的 ELISA

一些硅/碳材料在室温下或加热条件下可发生化学反应, 生成荧光硅纳米粒子(Silicon nanoparticles, SiNPs)或 CDs。基于这些 SiNPs 或 CDs 荧光信号的改变可构建免疫分析平台。SiNPs 或 CDs 粒径通常为 1~10 nm, 具有优异的荧光性能、光稳定性、生物相容性和低毒性^[18]。硅/碳纳米材料作为常规半导体量子点和有机荧光染料的替代品, 在生物成像、分析传感和医疗诊断等领域发挥了重要的作用^[19]。

1.2.1 ALP作为标记酶的 ELISA

对苯二酚(Hydroquinone, HQ)和对氨基苯酚(4-Aminophenol, AP)可与含胺的硅烷分子发生化学反应^[20], 例如, HQ 与 *N*-[3-(三甲氧基硅基)丙基]乙二胺(*N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, DAMO)可在室温下产生荧光含硅聚合物点。然而, 在相同条件下, 磷酸化的 HQ 不与 DAMO 反应, 据此 Liu 等^[21]选择磷酸化的 HQ 作为 ALP 的底物, DAMO 溶液作为反应溶剂, 建立了一种原位生成荧光含硅聚合物点的 ELISA 方法, 用于检测 cTnI。该方法的线性范围为 1~300 ng/mL, 检出限为 0.1 ng/mL, 用于检测人血清中的 cTnI 浓度与基于 pNPP 的标准 ELISA 试剂盒检测结果一致。

CDs 作为光学探针具有优异的光致发光、稳定性好、合成简单、成本低和良好的生物相容性等优点^[22]。Dong 等^[23]基于 ALP 触发 CDs 荧光信号开启, 开发了一种用于检测金刚烷(Adamantane, AMD)的竞争型 ELISA 方法(图 4B)。在该方法中, CDs 的荧光首先被 MnO₂ 猝灭, ALP 水解 AA2P 产生的 AA 破坏 MnO₂ 纳米片, 伴随着 CDs 从 MnO₂ 纳米片表面释放, CDs 的荧光信号恢复。该方法的检出限为 0.035 ng/mL, 比传统 ELISA 的检出限低了一个数量级, 可准确检测鸡肉样品中 AMD 的含量。在基于荧光 CDs 的 ELISA 中, CDs 的荧光通常作为输出信号, 因此开发合适的猝灭剂是该类 ELISA 研究的重点。

1.2.2 HRP作为标记酶的 ELISA

与 HQ 和 AP 相比, PPD 的反应活性更弱一些, 在室温下, PPD 与聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)难以发生荧光反应。HRP/H₂O₂ 的产物羟基自由基(·OH)会触发 PPD 和 PEI 之间的荧光反应, 生成绿色荧光碳纳米粒子。Liu 等^[24]开发了 HRP 诱导的原位生成荧光碳纳米粒子的 ELISA(图 4A), 用于测

定 cTnI 和 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白,检出限分别为 0.19 和 0.33 ng/mL, 检测血清中 cTnI 和 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白的结果与基于 TMB 的标准 ELISA 试剂盒获得的结果相同。

TMB、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)和 OPD 等有机小分子是 HRP 的常用底物,这些底物经 HRP/H₂O₂ 催化后会产生有色物质。由于荧光 IFE,这些有色物质会猝灭荧光材料的荧光,因此,利用这些荧光猝灭作用可以构建猝灭型或比率型 ELISA^[26-27]。例如, Dong 等^[25]利用 HRP/H₂O₂ 催化 TMB 的氧化产物猝灭荧光 CDs,构建了一种用于测定鸡肉中 AMD 的猝灭型 ELISA(图 4B),检出限为 0.02 ng/mL, 比传统 ELISA 的检出限降低了约 10 倍,具有良好的选择性。

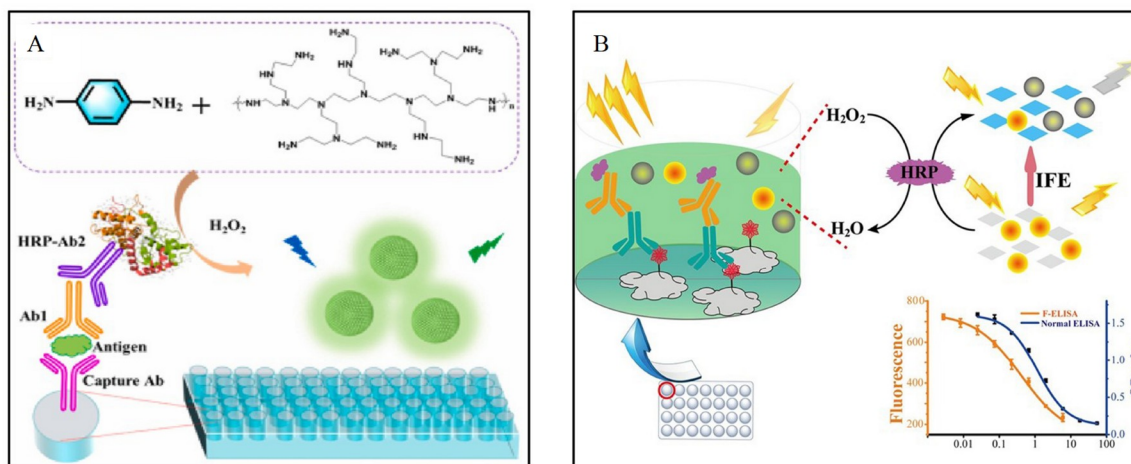


图4 (A)基于 HRP 触发的原位生成荧光碳纳米粒子的 ELISA 示意图^[24]; (B)基于 TMB 氧化产物导致碳点(CDs)荧光 IFE 的猝灭型 ELISA 示意图^[25]

Fig.4 Schematic diagram of ELISA based on (A) HRP-triggered in situ generated fluorescent carbon nanoparticles^[24] and (B) carbon dots (CDs) fluorescent IFE caused by TMB oxidation^[25]

1.2.3 基于其它标记酶的ELISA

在特定条件下, AuNPs 可催化氧化 Glu 产生 H₂O₂, 因此这种具有 GOx 活性的 AuNPs 可作为标记酶。此外, AuNPs 可被修饰在多孔和/或高比表面积载体的表面,以增强和放大响应信号,进一步提高目标物检测的灵敏度。Zhan 等^[28]利用具有 GOx 活性的 AuNPs 作为标记酶和 CDs 的荧光猝灭-开启过程,构建了一种用于肿瘤标志物癌胚抗原检测的 ELISA 方法。在该 ELISA 中, CDs 的荧光首先被 Fe²⁺猝灭,在介孔 SiO₂ 纳米颗粒上负载 AuNPs,使得该材料具有 GOx 活性,随后再连接上检测抗体,并以 Glu 为底物水解产生 H₂O₂, H₂O₂ 恢复 CDs 的荧光。该方法的线性检测范围为 0.1~80 ng/mL, 检出限为 74.5 pg/mL, 能准确测定肺癌患者血清中癌胚抗原的浓度,具有潜在的临床应用价值。

1.3 基于荧光金属纳米簇的ELISA

金属纳米簇通常由几个至几百个金属原子组成,尺寸在 1~10 nm 范围内。由于量子尺寸效应,金属纳米簇具有荧光发射可调、光稳定性强、斯托克斯位移大、低毒以及生物相容性好等优良特性,被广泛应用于生物成像、分析检测和医疗诊断等领域^[29]。金属纳米簇优异的光学特性为构建以荧光为输出信号的 ELISA 提供了基础。基于荧光金属纳米簇的 ELISA 的构建主要有两种策略: 酶诱导原位生成荧光金属纳米簇和利用酶促产物导致金属纳米簇荧光的猝灭与恢复。

1.3.1 ALP作为标记酶

配体对金属纳米簇的合成有重要的影响。利用 Cu²⁺与胸腺嘧啶之间高亲和力的特点,通过 AA 的还原作用, Qing 等^[30]首先制备了胸腺嘧啶稳定的荧光铜纳米簇(Copper nanoclusters, CuNCs)。受到荧光 CuNCs 合成过程的启发, Sun 等^[31]发展了一种基于 ALP 触发的原位生成荧光 CuNCs 的 ELISA(图 5A), 用于检测人 IgG。在该方法中, ALP 水解 AA2P 生成的 AA 还原 Cu²⁺, 在聚胸腺嘧啶存在下, 荧光 CuNCs

快速生成。该方法检测人 IgG 的线性范围为 5~200 ng/mL, 检出限为 5 ng/mL。此外, 以 DNA 为模板也可构建原位生成荧光 CuNCs 的 ELISA^[32]。这种基于原位生成荧光 CuNCs 的 ELISA 具有反应迅速、价格低廉和操作简单的优势, 在临床诊断和生物医学研究中具有巨大的应用潜力。

CuNCs 的荧光不稳定, 容易发生自猝灭, 不适合用于构建非原位 ELISA。相对于 CuNCs, 金纳米簇 (Gold nanoclusters, AuNCs) 和银纳米簇 (Silver nanoclusters, AgNCs) 的荧光信号更加稳定, 可利用 AuNCs/AgNCs 的荧光信号构建猝灭型 ELISA。通过荧光 IFE, ALP 的酶促产物 pNP 能够猝灭 AuNCs 的荧光。基于此原理, 在传统 ELISA 平台的基础上, 利用 AuNCs 作为信号探针, 可开发 ALP 触发的猝灭型荧光 ELISA (图 5B), 用于检测溴敌隆^[33]和孔雀石绿^[34], 检出限分别为 0.047 和 0.089 ng/mL。此外, 基于碘离子猝灭 AgNCs 荧光的现象, Zhu 等^[35]报道了一种间接竞争型 ELISA, 用于检测磺胺二甲嘧啶, 检出限比传统 ELISA 降低了约 5 倍。

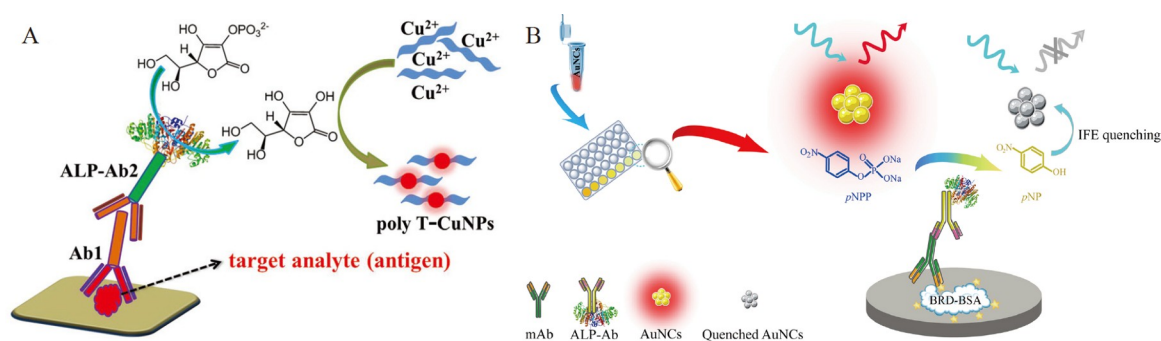


图5 (A)基于碱性磷酸酶(ALP)触发的原位生成 CuNCs 的 ELISA 示意图^[31]; (B)基于对硝基苯磷酸 (pNPP)水解产物导致 AuNCs 荧光内滤效应(IFE)的猝灭型 ELISA 示意图^[33]

Fig.5 Schematic representation of ELISA based on (A) alkaline phosphatase (ALP)-triggered synthesis of fluorescent copper nanoclusters (CuNCs)^[31] and (B) AuNCs fluorescent inner filter effect (IFE) caused by 4-nitrophenyl phosphate (pNPP) hydrolysate^[33]

此外, 还可利用 AuNCs 的荧光信号构建猝灭-开启型 ELISA。Li 等^[36]利用 AuNCs 和 CoOOH 纳米片构建了一种 ALP 触发的猝灭-开启型 ELISA, 用于检测吡虫啉。在该方法中, AuNCs 锚定在 CoOOH 纳米片的表面形成纳米复合材料, 导致 AuNC 的荧光强度显著降低, ALP 水解 AAP 产生 AA, AA 可以分解 CoOOH 纳米片, 恢复 AuNCs 的荧光。该方法对吡虫啉的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 1.3 ng/mL, 灵敏度比传统 ELISA 高 60 倍。检测自来水、河水、土壤、大米和苹果中的吡虫啉的结果与气相色谱的结果一致, 证明该方法具有检测实际样品中吡虫啉的潜能。Chen 等^[37]利用 SiNPs、AuNCs 以及 MnO₂ 纳米片, 开发了一种 ALP 触发的基于双发射系统的比率荧光 ELISA, 用于检测 1-萘酚。SiNPs 的荧光信号被用作参比信号, AuNCs 的荧光可被 MnO₂ 猝灭。在 ALP 存在下, AAP 可转化为 AA, AA 蚀刻 MnO₂ 以恢复 AuNCs 的荧光。与传统的 ELISA 相比, 该 ELISA 方法的灵敏度提高了 220 倍, 尿液样本的测定结果和高效液相色谱-荧光法测得的结果相同。

1.3.2 HRP作为标记酶的ELISA

Liu 等^[38]基于金银双金属纳米簇 (Gold-silver bimetallic nanoclusters, Au-Ag NCs) 的荧光猝灭开发了一种 HRP 触发的用于检测玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 的比率型 ELISA。抗体上标记的 HRP 在该免疫测定中起桥梁作用, 将比率荧光信号与 ZEN 浓度联系起来。HRP/H₂O₂ 氧化 OPD 生成 oxOPD, 不仅在 580 nm 处产生新峰, 而且猝灭 Au-Ag NCs 在 690 nm 处的荧光。该方法的检出限为 0.017 ng/mL, 比传统 ELISA 降低约 6.6 倍。

1.3.3 其它酶作为标记酶

为了增加标记酶的数量以及保持标记酶的生物活性, Li 等^[39]利用脲酶、抗体和 CaHPO₄, 通过温和的仿生生物矿化方法制备了一种杂化纳米花, 并进一步构建了用于检测吡虫啉的竞争型 ELISA。在该方法中, 脲酶可水解尿素产生 NH₃, NH₃ 刻蚀铜纳米粒子生成荧光 CuNCs, 基于此实现了吡虫啉的检测, 其

IC₅₀ 为 0.72 ng/mL, 比传统的 ELISA 降低了 30 倍。

Wang 等^[40]利用 AuNCs 的荧光作为输出信号, 精氨酸酶作为标记酶, 开发了一种用于检测黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 的间接竞争型 ELISA。在精氨酸酶存在时, 组装在 AuNCs 上的 L-精氨酸水解成鸟氨酸和尿素, 从而导致荧光强度降低。在竞争反应过程中, 精氨酸酶随着靶标 AFB1 增加而减少, 荧光强度随着目标 AFB1 增加而增强。该 ELISA 检测 AFB1 的线性范围为 0.01~30 ng/mL, 检出限为 3.2 pg/mL。利用商业化 AFB1 ELISA 试剂盒, 评估了该 ELISA 的准确性, 发现这两种 ELISA 的结果一致。这种竞争型 ELISA 具有重复性好、灵活性高和更稳健等优势, 但操作相对繁琐。

1.4 基于荧光量子点的 ELISA

量子点 (Quantum dots, QDs) 是一种具有特殊光电特性的半导体, 粒径分布范围通常为 1~20 nm。相比于传统荧光有机小分子, QDs 具有高量子效率、宽吸收光谱、可调谐的窄荧光发射和优良的光稳定性等优点, 被广泛应用于分析检测、生物成像和医疗诊断等领域^[41]。QDs 用于构建 ELISA 通常基于两种策略: 酶促产物诱导原位生成荧光 QDs 和酶促产物猝灭 QDs 的荧光。

1.4.1 ALP 作为标记酶的 ELISA

在基于 QDs 的荧光免疫分析方法中, QDs 经常被修饰在抗体上, 作为分析物的荧光探针^[42]。然而, QDs 与抗体偶联的过程复杂, 并容易导致抗体失去活性。利用 QDs 的原位生成过程和优异的荧光信号可以构建 ELISA, 从而避免了抗体与 QDs 的偶联。Malashikhina 等^[43]利用 CdS QDs 的原位生成, 构建了一种 ALP 触发的 ELISA, 用于检测抗牛血清白蛋白抗体。ALP 水解 pNPP 生成无机磷酸盐, 无机磷酸盐通过 Cd²⁺ 与 S²⁻ 离子的相互作用来稳定原位产生的 CdS QDs。该 ELISA 的检出限为 0.4 ng/mL, 比基于 pNPP 的标准 ELISA 试剂盒的灵敏度提高了 6.5 倍。这种由 ALP 触发的 QDs 合成的策略为 ELISA 的设计提供了新的思路。

1.4.2 其它酶作为标记酶的 ELISA

DA 的酶促产物或 H₂O₂ 能够猝灭一些 QDs 的荧光, 可利用 QDs 荧光信号的猝灭构建基于 QDs 的猝灭型 ELISA, 如 Chen 等^[44]利用 DA 功能化的 CuInS₂/ZnS QDs, 构建了一种氧化还原介导的猝灭型 ELISA, 用于检测阿尔兹海默症生物标志物 tau 蛋白。在该方法中, 酪氨酸酶催化功能化 QDs 表面的 DA 发生酶促氧化, 引起 QDs 的荧光猝灭。该 ELISA 方法检测 tau 蛋白的线性范围为 10 pmol/L~200 nmol/L, 检出限为 9.3 pmol/L。该研究为 tau 蛋白的快速检测开辟了新途径。

Lu 等^[45]使用 H₂O₂ 诱导 QDs 的荧光猝灭, 报道了一种用于检测伏马菌素 B1 (Fumonisin B1, FB1) 的竞争型 ELISA。当 FB1 存在时, FB1 与抗体竞争型结合, 导致 FB1 标记的过氧化氢酶含量减少, 不能分解 H₂O₂, 进而引起 QDs 发生荧光猝灭。该方法的检出限为 0.33 ng/mL, 比常规 ELISA 降低了 15 倍。该研究采用高效液相色谱-荧光检测法进一步证实了该 ELISA 检测的可靠性。该 ELISA 在快速、灵敏和高效检测真菌毒素方面有一定的应用潜力, 为食品质量控制和安全监测提供了参考。利用 H₂O₂ 能够猝灭 QDs 荧光的特性, 可建立多种类似的荧光猝灭型 ELISA, 用于检测四溴双酚 A^[46] 和牛 β -乳球蛋白^[47] 等。此外, 基于 GOx 分解 Glu 产生 H₂O₂, GOx 也可作为标记酶用于构建基于 H₂O₂ 敏感型 QDs 的 ELISA, 用于检测 AMD^[48] 和赭曲霉毒素 A^[49] 等。虽然这些基于荧光 QDs 的 ELISA 具有出色的检测性能, 但是, 由于猝灭效率有限, 背景信号较高。此外, QDs 含有重金属离子, 对生态环境的潜在威胁也不容忽视。

2 结论与展望

随着科学技术的不断进步, ELISA 技术也不断发展, 其中新型荧光材料的使用极大地促进了 ELISA 技术的提升, 并逐渐在 ELISA 检测中发挥了重要的作用。本文从荧光材料和标记酶两个角度出发, 根据标记酶的不同, 详细介绍了基于有机小分子、硅/碳纳米粒子、金属纳米簇和量子点等荧光材料构建的 ELISA。每一种荧光材料都有其优点与缺点, 因此有必要针对不同的应用场景和分析物, 选择不同的荧光材料制备探针。

尽管这些荧光材料和标记酶的使用使 ELISA 的方法性能得到了改善, 仍然有许多问题亟需解决。目前, 大多数已报道的基于新型荧光体系的 ELISA 仍停留在实验阶段, 离商业化标准和应用还有差距。

随着纳米材料的发展和标记技术的进步,未来会出现更成熟的荧光纳米材料以及酶标记抗体,为新型 ELISA 的构建以及商业化应用奠定基础。同时,基于新型荧光体系的 ELISA 的发展也会为其它免疫检测方法提供理论基础,推动 ELISA 技术的简单化、智能化和便携式发展,使其具有更广阔的应用前景。

References

- [1] FU X, CHEN L, CHOO J. *Anal. Chem.*, 2017, 89(1): 124-137.
- [2] SHAO Y, ZHOU H, WU Q, XIONG Y, WANG J, DING Y. *Biotechnol. Adv.*, 2021, 53: 107867.
- [3] ZHAO Q, LU D, ZHANG G, ZHANG D, SHI X. *Talanta*, 2021, 223: 121722.
- [4] FAN Y, LV M, XUE Y, LI J, WANG E. *Anal. Chem.*, 2021, 93(17): 6873-6880.
- [5] CAO X, KONG F, ZHANG Q, LIU W, LIU X, LI G, ZHONG R, FAN L, XIAO H, CAO C. *Lab Chip*, 2018, 18(12): 1758-1766.
- [6] ZHAO J, WANG S, LU S, LIU G, SUN J, YANG X. *Anal. Chem.*, 2019, 91(12): 7828-7834.
- [7] ZHAO J, WANG S, LU S, BAO X, SUN J, YANG X. *Anal. Chem.*, 2018, 90(12): 7754-7760.
- [8] PENG C, XUE Y, ZHU X, FAN Y, LI J, WANG E. *Anal. Chem.*, 2022, 94(2): 1465-1473.
- [9] ZHAO D, LI J, PENG C, ZHU S, SUN J, YANG X. *Anal. Chem.*, 2019, 91(4): 2978-2984.
- [10] CHEN C, ZHAO J, LU Y, SUN J, YANG X. *Anal. Chem.*, 2018, 90(5): 3505-3511.
- [11] XIONG L H, HE X, ZHAO Z, KWOK R T K, XIONG Y, GAO P F, YANG F, HUANG Y, SUNG H H Y, WILLIAMS I D, LAM J W Y, CHENG J, ZHANG R, TANG B Z. *ACS Nano*, 2018, 12(9): 9549-9557.
- [12] GAO Y, ZHOU Y, CHANDRAWATI R. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2020, 3(1): 1-21.
- [13] ALEX S A, CHANDRASEKARAN N, MUKHERJEE A. *New J. Chem.*, 2018, 42(19): 15852-15859.
- [14] SUN J, ZHAO J, WANG L, LI H, YANG F, YANG X. *ACS Sens.*, 2018, 3(1): 183-190.
- [15] JIANG C, HUANG Y, HE T, HUANG P, LIN J. *Chem. Commun.*, 2020, 56(36): 4942-4945.
- [16] WU J, WANG X, WANG Q, LOU Z, LI S, ZHU Y, QIN L, WEI H. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [17] JIAO L, ZHANG L, DU W, LI H, YANG D, ZHU C. *Nanoscale*, 2019, 11(18): 8798-8802.
- [18] SONG B, HE Y. *Nano Today*, 2019, 26: 149-163.
- [19] WALTHER B K, DINU C Z, GULDI D M, SERGEYEV V G, CREAGER S E, COOKE J P, GUISEPPi-ELIE A. *Mater. Today*, 2020, 39: 23-46.
- [20] CHEN C, ZHAO D, WANG B, NI P, JIANG Y, ZHANG C, YANG F, LU Y, SUN J. *Anal. Chem.*, 2020, 92(6): 4639-4646.
- [21] LIU G, ZHAO J, YAN M, ZHU S, DOU W, SUN J, YANG X. *Sci. China Chem.*, 2020, 63(4): 554-560.
- [22] HESARI M, DING Z. *Front. Chem.*, 2020, 8: 580033.
- [23] DONG B, LI H, SUN J, MARI G M, YU X, KE Y, LI J, WANG Z, YU W, WEN K, SHEN J. *Sens. Actuators, B*, 2019, 286: 214-221.
- [24] LIU J, RUAN G, MA W, SUN Y, YU H, XU Z, YU C, LI H, ZHANG C, LI L. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 198: 113823.
- [25] DONG B, LI H, MUJTABA MARI G, YU X, YU W, WEN K, KE Y, SHEN J, WANG Z. *Food Chem.*, 2019, 294: 347-354.
- [26] LUO L, SONG Y, ZHU C, FU S, SHI Q, SUN Y M, JIA B, DU D, XU Z L, LIN Y. *Sens. Actuators, B*, 2018, 255: 2742-2749.
- [27] XU Z L, YE S L, LUO L, HUA X, LAI J X, CAI X P, LIANG Q W, LEI H T, SUN Y M, CHEN Y, SHEN X. *Sci. Total Environ.*, 2020, 708: 134614.
- [28] ZHAN Y, YANG S, LUO F, GUO L, ZENG Y, QIU B, LIN Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(27): 30085-30094.
- [29] CHEN T, LIN H, CAO Y, YAO Q, XIE J. *Adv. Mater.*, 2022, 34(25): e2103918.
- [30] QING Z, HE X, HE D, WANG K, XU F, QING T, YANG X. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52(37): 9719-9722.
- [31] SUN J, HU T, XU X, WANG L, YANG X. *Nanoscale*, 2016, 8(38): 16846-16850.
- [32] LI R, LIU Q, JIN Y, LI B. *Sens. Actuators, B*, 2019, 281: 28-33.
- [33] LI H, WEN K, DONG B, ZHANG J, BAI Y, LIU M, LI P, MUJTABA M G, YU X, YU W, KE Y, SHEN J, WANG Z. *Sens. Actuators, B*, 2019, 297: 126787.
- [34] WEI Chun-Hao, YANG Guang-Xin, CHI Hai, TAO Le-Ren, KONG Cong, CAI You-Qiong. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2022, 50(1): 73-81.
魏春豪, 杨光昕, 迟海, 陶乐仁, 孔聪, 蔡友琼. *分析化学*, 2022, 50(1): 73-81.
- [35] ZHU N, ZHU Y, WANG J, GYIMAH E, HU X, ZHANG Z. *Talanta*, 2019, 199: 72-79.
- [36] LI H, JIN R, KONG D, ZHAO X, LIU F, YAN X, LIN Y, LU G. *Sens. Actuators, B*, 2019, 283: 207-214.
- [37] CHEN Z J, WU H L, SHEN Y D, WANG H, ZHANG Y F, HAMMOCK B, LI Z F, LUO L, LEI H T, XU Z L. *J. Hazard. Mater.*, 2022, 424: 127411.
- [38] LIU Z, WANG X, REN X, LI W, SUN J, WANG X, HUANG Y, GUO Y, ZENG H. *Food Chem.*, 2021, 355: 129633.

- [39] LI H, YAN X, KONG D, SU D, LIU F, SUN P, LIU X, WANG C, JIA X, LU G. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 206: 114132.
- [40] WANG Y, LU M, TANG D. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 109: 70-74.
- [41] WANG X, KONG L, ZHOU S, MA C, LIN W, SUN X, KIRSANOV D, LEGIN A, WAN H, WANG P. *Talanta*, 2022, 239: 122903.
- [42] ZHANG F, LIU B, SHENG W, ZHANG Y, LIU Q, LI S, WANG S. *Food Chem.*, 2018, 255: 421-428.
- [43] MALASHIKHINA N, GARAI-IBABE G, PAVLOV V. *Anal. Chem.*, 2013, 85(14): 6866-6870.
- [44] CHEN L, LIN J, YI J, WENG Q, ZHOU Y, HAN Z, LI C, CHEN J, ZHANG Q. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, 411(20): 5277-5285.
- [45] LU T, ZHAN S, ZHOU Y, CHEN X, HUANG X, LENG Y, XIONG Y, XU Y. *Anal. Methods*, 2018, 10(48): 5797-5802.
- [46] ZHU Y, CHAO J, ZHU F, ZHU N, ZHANG Q, GYIMAH E, YAKUBU S, ZOU Y, ZHANG Z. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(15): 3605-3613.
- [47] HE S, LI X, GAO J, TONG P, CHEN H. *J. Sci. Food Agric.*, 2018, 98(2): 519-526.
- [48] YU W, JIANG C, XIE B, WANG S, YU X, WEN K, LIN J, WANG J, WANG Z, SHEN J. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1102: 91-98.
- [49] TONG W, FANG H, XIONG H, WEI D, LENG Y, HU X, HUANG X, XIONG Y. *Foods*, 2021, 10(10): 2429.

Recent Advances on Fluorescence-based Enzyme Linked Immunosorbent Assay

LIU Guo-Yong¹, SHI Yu¹, SUN Jian^{*2}, MU Jing^{*1}

¹(Institute of Precision Medicine, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen Peking University-The Hong Kong University of Science and Technology Medical Center, Shenzhen 518036, China)

²(State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract Due to advantages in high-throughput, easy reading, simple operation and low cost, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) plays an important role in environmental monitoring, food safety testing and medical diagnosis. However, the insufficient chromogenic part of ELISA results in high detection limit, which limits the further application of ELISA in analysis and detection. To overcome this issue, the conventional ELISA has been improved by many methods. Among them, the fluorometric method has attracted widespread attention given its high sensitivity, simple operation, and fast response. Recently, a variety of fluorescent materials have been developed to construct different types of ELISA, which promotes the application of ELISA in analytical chemistry and biomedical detection. In this paper, the ELISA constructed by fluorescent materials such as organic small molecules, silicon/carbon nanoparticles, metal nanoclusters, and quantum dots was introduced in detail. Additionally, different enzymes in ELISA, including alkaline phosphatase, horseradish peroxidase and other enzyme as labeling enzymes, were systematically reviewed. Furthermore, the prospects of ELISA based on different fluorescent materials were also discussed.

Keywords Enzyme linked immunosorbent assay; Fluorescent detection; Enzyme; Review

(Received 2022-09-14; accepted 2023-01-29)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32101074), the Development Project of Science and Technology of Jilin Province, China (No. 20200201091JC) and the Scientific Research Foundation of Peking University Shenzhen Hospital (KYQD202100X).