

文章编号: 1000-7032(2026)03-0389-11

水相稳定钙钛矿量子点生物探针制备及其在 胱抑素 C 免疫层析中的应用

陈志山^{1†}, 朱宏强^{1†}, 毛梓晴^{1†}, 林紫依¹, 张绍安²,徐 佳³, 李战军^{1*}, 李 杨^{2*}

(1. 广州医科大学 生物医学工程学院, 广东 广州 511436;

2. 宁波大学 信息科学与工程学院, 浙江 宁波 315000;

3. 宁波大学 医学部, 浙江 宁波 315000)

摘要: 胱抑素 C (Cystatin C, Cys C) 是评估与监测肾功能的重要生物标志物, 也是肾脏疾病早期筛查与居家监测的关键指标之一。免疫层析具有操作简便、检测快速等优势, 适用于 Cys C 的定量检测; 然而, 传统信号标签的亮度与稳定性受限, 制约了检测性能的进一步提升。为此, 本研究构建了一种具备优异水相稳定性的钙钛矿量子点荧光生物探针用于 Cys C 的免疫层析检测。以介孔二氧化硅 (Mesoporous silica nanoparticles, MSNs) 为载体, 在孔道内原位生成 CsPbBr₃ 量子点的同时构筑 SiO₂ 封闭层, 得到 CsPbBr₃@MSNs@SiO₂ 探针, 其兼具较高荧光量子产率 (PLQY ≈ 93%) 与良好水相稳定性 (>120 h)。基于该探针构建荧光免疫层析试纸条, 实现了 Cys C 的快速定量检测, 并表现出良好的特异性及浓度依赖的信号响应。本研究为肾功能相关标志物的居家与现场快速检测提供了一种亮度高、稳定性好的荧光标记策略, 同时为金属卤化物钙钛矿量子点在生物分析与免疫层析检测中的应用拓展提供了新的思路与技术支持。

关键词: 钙钛矿量子点; 胱抑素 C; 免疫层析; 荧光; 即时检测

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20250278

CSTR: 32170.14.CJL.20250278

Preparation of Water-stable Perovskite Quantum Dot Bioprobes and Their Application in Cystatin C Lateral Flow Immunoassay

CHEN Zhishan^{1†}, ZHU Hongqiang^{1†}, MAO Ziqing^{1†}, LIN Ziyi¹, ZHANG Shaoan²,XU Jia³, LI Zhanjun^{1*}, LI Yang^{2*}

(1. School of Biomedical Engineering, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

2. Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, Ningbo University, Ningbo 315000, China;

3. NBU Health Science Center, Ningbo University, Ningbo 315000, China)

* Corresponding Authors, E-mail: zhanjunli@gzhu.edu.cn; lyChris@sina.com

Abstract: Cystatin C (Cys C) is an important biomarker for evaluating and monitoring renal function and is widely used for early screening of kidney disease. Fluorescent lateral flow immunoassay is a convenient approach for rapid and quantitative Cys C testing, yet its analytical performance is often constrained by the brightness and stability of conventional signal labels. Here, we report a water-stable perovskite quantum dot (PQD)-based fluorescent bioprobe for use in Cys C LFIA. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) were employed as nanocarriers, enabling *in situ* formation of CsPbBr₃ quantum dots within the mesopores while a SiO₂ sealing layer was simultaneously constructed. The resulting

收稿日期: 2025-12-10; 修订日期: 2025-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (52572173, 52402192); 广州市重点研发计划 (2023B03J1239); 宁波大学高级科学研究项目 (GJPY2025010)

Supported by National Natural Science Foundation of China (52572173, 52402192); Guangzhou Key Research and Development Program (2023B03J1239); High-level Scientific Research Project of Ningbo University (GJPY2025010)

†: 共同贡献作者

CsPbBr₃@MSNs@SiO₂ probes exhibited high photoluminescence quantum yield (PLQY≈93%) and excellent water stability(>120 h), providing robust signal output for LFIA readout. Based on this bioprobe, a fluorescent LFIA strip was fabricated for quantitative Cys C detection, demonstrating good specificity and a clear concentration-dependent response. This work offers a bright and water-stable labeling strategy for point-of-care testing of renal function-related biomarkers and expands the utility of metal halide PQDs in bioanalysis and LFIA-based diagnostics.

Keywords: perovskite quantum dots; Cystatin C; lateral flow immunoassay; fluorescence; point-of-care testing

1 引 言

胱抑素 C(Cystatin C, Cys C)是一种低分子量的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,主要由有核细胞以恒定速率分泌,经肾小球自由滤过,在近曲小管几乎被完全重吸收和分解^[1-2]。与传统肾功能标志物血清肌酐相比,Cys C 不易受年龄、性别和肌肉量等因素影响,被认为是更敏感、可靠的肾小球滤过率评估指标,已在慢性肾病早期筛查、预后评估及用药剂量调整等方面显示出重要临床价值^[3]。建立一种快速、准确、经济的 Cys C 定量检测方法,对于肾功能相关疾病的早期识别和疗效监控具有重要意义。

免疫层析技术(Lateral flow immunoassay, LFIA)因其成本低、操作简便、便携性强以及检测速度快等优势,已在临床诊断、食品安全检测和环境监测等领域得到广泛应用^[4-5]。传统胶体金 LFIA 主要依赖肉眼观察显色变化,通常只能提供定性或半定量结果,难以满足对低丰度生物标志物进行高灵敏定量分析的需求^[6]。相比之下,荧光 LFIA(Fluorescent LFIA, FLFIA)采用荧光材料作为信号标记,具有更高的信号强度和更宽的线性范围,可实现对目标分析物的灵敏定量检测,显著拓展了免疫层析技术的应用场景与临床实用价值^[7]。

FLFIA 的检测性能(包括灵敏度、线性范围、准确度与指标变异性等)在很大程度上取决于所采用的荧光标记材料。长期以来,研究人员陆续开发了多种荧光探针体系,如有机染料、上转换纳米粒子、传统 II~VI 族量子点以及聚集诱导发光材料等,用以提升 LFIA 的分析性能^[7-12]。然而,这些荧光材料在实际应用中仍存在不同程度的局限:有机染料容易光漂白、信号易衰减;上转换纳米粒子发光效率相对较低,且激发条件苛刻;传统量子点存在潜在生物毒性或制备过程复杂等问题;聚集诱导发光材料则在批次稳定性和标准化方面仍有待改进。上述因素均在不同程度上限制

了 FLFIA 的进一步推广与临床转化。

近年来,卤化物钙钛矿(Halide perovskites, HPs)因其极高的光致发光量子产率(Photoluminescence quantum yield, PLQY)、高摩尔消光系数、窄半峰宽以及可调发射波长等优异光学性质而备受关注^[13-19]。然而,HPs 对环境极其敏感,易受水分、氧气、热和极性溶剂等因素影响而发生降解,导致荧光迅速猝灭,严重制约了其在水相体系和生物检测中的应用。为解决上述问题,研究者提出了多种稳定化策略,包括高分子有机物包覆、表面配体工程以及构筑无机壳层进行物理隔离等,以改善 HPs 的结构稳定性与光学稳定性,并已取得显著进展^[20-21]。其中,利用二氧化硅构建核/壳结构因其化学惰性好、生物相容性佳以及工艺可控性强,成为提升 HPs 稳定性最广泛使用的策略之一。

本研究以介孔二氧化硅纳米粒子(Mesoporous silica nanoparticles, MSNs)为容纳模板,利用其规则孔道引入 HPs 前驱体 CsBr 和 PbBr₂,并通过硅酸四甲酯水解生成的 SiO₂对孔道进行封闭,在高温煅烧过程中于孔道内部原位生成 CsPbBr₃晶体并诱导 SiO₂壳层收缩,从而构建出具有核/壳结构的 CsPbBr₃@MSNs@SiO₂(PQD)。该策略同时兼顾了钙钛矿量子点的高荧光亮度与二氧化硅壳层的优异稳定性,使所得 PQD 具有显著提升的水相稳定性以及高光致发光效率。进一步对 PQD 表面进行功能化改造,利用 NaOH 活化表面羟基,引入 Silane-PEG-NHS 作为交联剂,与抗胱抑素 C 抗体实现共价偶联,制备得到具备靶向识别能力的荧光免疫探针 PQD-Ab。

在此基础上,本研究构建了一种基于 PQD-Ab 的 Cys C 荧光免疫层析试纸(PQD-Cys C-LFIA),用于 Cys C 的快速定量分析。考虑到该体系当前仍处于概念验证阶段,本文以线性范围与特异性为核心指标对其进行系统验证,以证明该策略在 Cys C 检测中的可行性。同时,我们提出后续将围

绕信号输出、偶联效率与条带体系参数进一步优化综合性能,并在性能提升后开展真实样品验证,以评估其实际应用潜力。

2 实验

2.1 试剂与材料

溴化铯(CsBr, 99.5%)、溴化铅(PbBr₂, 99%)、硅酸四乙酯(TEOS, 98%)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC, 97%)、三乙醇胺(TEA, 分析纯)、氢氧化钠(NaOH, 97%)、牛血清白蛋白(BSA, 96%)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP, K30, MW 40 000)、蔗糖(96%)、无水海藻糖(99%)、硅酸四甲酯(TMOS, 98%)、吐温-20均购自上海阿拉丁生化科技有限公司。磷酸盐缓冲液(PBS, 10 mmol/L, pH 7.4)和Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)购自北京迈瑞达公司。甲苯和无水乙醇购自广州化学试剂厂。Silane-PEG-NHS(MW 2000)购自西安瑞禧生物科技有限公司。抗Cys C捕获抗体(CSB-DA004AmN①)、抗Cys C标记抗体(CSB-DA004AmN②)、重组人Cys C蛋白以及山羊抗小鼠IgG购自武汉华美生物公司。样品垫、结合垫、吸水垫、PVC板及塑料底板购自上海金标生物技术有限公司,硝酸纤维素(NC)膜(CN140)购自赛多利斯公司。

除特别说明外,所有化学试剂均未经进一步纯化直接使用,实验用水均为去离子水。

2.2 MSNs制备

MSNs参照文献方法略加改动制备^[22]。称取5 g CTAC、0.6 g TEA倒入含有200 mL超纯水的单颈烧瓶中;将烧瓶置于95 °C水浴锅中,以200 r/min的速度磁力搅拌1 h;用注射泵将15 mL TEOS在1 min内滴加至烧瓶中,继续搅拌1 h;加入100 mL无水乙醇终止反应,8 000 r/min离心10 min收集介孔硅;用无水乙醇清洗两次后,将沉淀置于80 °C烘箱中干燥过夜;收集白色沉淀,在玛瑙研钵中研磨后置于马弗炉中550 °C煅烧6 h(升温速率5 °C/min),去除CTAC获得MSNs。

2.3 CsPbBr₃@MSNs和CsPbBr₃@MSNs@SiO₂的制备

称取CsBr 0.042 5 g与PbBr₂ 0.073 4 g溶解于含MSNs 0.2 g的20 mL去离子水中,在80 °C下磁力搅拌1 h。随后将所得混合物干燥,得到前驱体A。将前驱体A置于马弗炉中,于空气气氛下在570 °C煅烧30 min(升温速率5 °C/min),冷却后再次研磨,得到CsPbBr₃@MSNs。

称取50 mg前驱体A分散于40 mL甲苯中,加入TMOS 1 mL,在40 °C下搅拌8 h,反应结束后,离心(8 000 r/min, 5 min)收集沉淀,烘干并研磨后获得前驱体B。将前驱体B置于马弗炉中,于空气气氛下在570 °C煅烧30 min(升温速率5 °C/min),冷却后再次研磨,得到CsPbBr₃@MSNs@SiO₂(PQD)。

2.4 表面功能化

取10 mg PQD加入10 mL NaOH溶液(10 mmol/L),于室温下搅拌6 h,离心收集羟基化PQD,分散于无水乙醇中;加入适量Silane-PEG-NHS,在室温下反应2 h, PBS洗涤加入抗Cys C标记抗体(CSB-DA004AmN②),于室温孵育2 h,离心后将沉淀重悬于含5% BSA的PBS中封闭30 min;最终洗涤并重悬于保存液中,得到表面修饰的PQD-Ab探针。

2.5 表征设备

使用X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD, Bruker D8)对获得的材料表征其成分组成以及结构;使用稳态瞬态荧光光谱仪(FLS1000, Edinburgh Instruments)以450 W氙灯作为激发光源表征激发与发射光谱和PLQY;使用场发射扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM, SU8200, HITACHI)和透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM, Talos F200S, FEI Thermo)对纳米粒子的微观尺寸和形态进行了表征;使用马尔文粒径仪(ZETASIZER NANO ZS, Malvern)表征材料的水合粒径和表面电位;Brunauer-Emmett-Teller(BET)比表面积测试采用高性能比表面及微孔分析仪(BSD/3H-2000, 贝士德)完成。

2.6 CsPbBr₃@MSNs稳定测试

取洁净干燥的玻璃样品瓶(20 mL),加入CsPbBr₃或CsPbBr₃@MSNs的环己烷分散液(5 mg/mL),随后加入等体积去离子水。将样品瓶置于磁力搅拌器上,于室温300 r/min持续搅拌。在预设时间点暂停搅拌,待两相初步分层后,用移液器从环己烷相取样200 μL置于微量比色皿中,使用光谱仪表征其发射光谱。

2.7 蛋白定量

采用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。

用标准蛋白配制浓度梯度蛋白标准品:0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。每个样品设置3个复孔,按照20 μL/孔加入96孔板。

配制 BCA 工作液,将试剂 A、B 按照 50:1 体积比混合,混匀,现配现用。按照 200 μL /孔 BCA 工作液加入 96 孔板中,轻轻摇晃混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min。在酶标仪中测定 560 nm 处的吸光值。以梯度浓度蛋白标准品的吸光值为 X 轴、蛋白浓度为 Y 轴绘制标准曲线;根据标准曲线,计算样品蛋白浓度。

2.8 LFIA 试纸制备

对样品垫进行预处理:将样品垫浸泡于含 0.5% BSA 和 0.5% 吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲液中,室温平衡后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜备用。结合垫上预先喷涂并干燥固定 PQD-Ab 探针。NC 膜上喷涂检测线(T线)和对照线(C线);T线喷涂捕获抗 Cys C 抗体(CSB-DA004AmN①)(2 mg/mL),C线喷涂山羊抗鼠 IgG(1 mg/mL),喷涂后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h。随后,将 NC 膜、结合垫、样品垫和吸水垫依次粘附于 PVC 板上,确保各功能层之间适当重叠,组装完成后裁切成宽度为(4 $\pm$ 1) mm 的条状,并装入塑料底板形成完整的 LFIA 试纸条(PQD-Cys C-LFIA)。

2.9 Cys C 检测

检测时,将待测溶液 100 μL 加入 PQD-Cys C-LFIA 试纸的样品孔中,于室温下静置反应一段时间,使样品在毛细作用驱动下完成侧向流动和免疫反应。随后,使用荧光定量分析仪分别测定 T 线和 C 线的荧光强度,并根据 T/C 比值进行定量分析。

线性范围:用 PBS 缓冲液稀释重组人 Cys C 蛋白至一系列浓度:0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$, 作为 Cys C 标准品,将不同浓度的 Cys C 标准品滴加至样品孔中(100 μL /孔),静置 15 min 后,用荧光定量分析仪检测 C 线和 T 线荧光强度,收集数据在电脑上用软件分析线性范围。

3 结果与讨论

3.1 CsPbBr₃@MSNs@SiO₂(PQD)制备

如图 1(a)所示,本研究选用球形 MSNs 作为 CsPbBr₃ 量子点的封装模板,主要基于其孔径均一性、比表面积和热稳定性方面等综合优势。此外,MSNs 的球形结构与良好分散性有利于探针在免疫层析膜上实现均匀标记与稳定迁移,从而降低因颗粒聚集或流动不均带来的检测偏差。如图 1(b)~(d)所示,所制备的 MSNs 为平均粒径约 80 nm 的均匀介孔球体,孔径约 3.0 nm,比表面积为 776.41 m^2/g 。

随后将 MSNs 分散于金属盐前驱体溶液中(CsBr 和 PbBr₂),通过搅拌使前驱离子充分浸渍进入 MSNs 孔道,烘干后得到前驱体 A(Precursor A)。将前驱体 A 置于马弗炉中升温至 570 $^{\circ}\text{C}$ (文献报道 CsPbBr₃ 的熔点约为 567 $^{\circ}\text{C}$)^[23],煅烧 0.5 h 后得到产物 CsPbBr₃@MSNs。所得 CsPbBr₃@MSNs 在紫外光激发下表现出明显的绿色荧光(补充文件图 S1)。

采用 SEM 与 TEM 对 CsPbBr₃@MSNs 的形貌进行表征。与 MSNs 相比,CsPbBr₃@MSNs 在 SEM 图像中整体形貌无明显变化(图 1(e));在 TEM 图像中,可在孔道内清晰观察到黑色晶体的形成(图 1(f)),表明钙钛矿晶体成功限域于介孔结构内。

为评估 CsPbBr₃@MSNs 的环境稳定性,将 CsPbBr₃@MSNs 与热注射法制备的 CsPbBr₃ 量子点分别分散于环己烷中,并与等体积去离子水混合,通过荧光光谱仪监测其发光强度随时间的变化。如图 1(g)所示,热注射法制备的 CsPbBr₃ 在 30 s 内荧光强度迅速衰减至初始值的 15%,4 min 后荧光几乎完全猝灭(<1%)。相比之下,CsPbBr₃@MSNs 的稳定性有所提高:在 30 min 内其荧光强度仍保留约 85%,此后缓慢衰减,至 6 h 时仍保持约 52% 的初始荧光强度。然而,TEM 图像(图 S2)显示,水处理后 CsPbBr₃@MSNs 孔道内的黑色晶体基本消失。据此推测,MSNs 孔道为开放结构,难以有效阻隔 CsPbBr₃ 晶体与水 and 氧气等外界环境的接触;MSNs 仅能在一定程度上延缓外部环境因素对 CsPbBr₃ 晶体的侵蚀破坏,但不足以从根本上阻止钙钛矿晶体的破坏,因此 CsPbBr₃@MSNs 仍难以获得理想的长期水相稳定性。

为进一步提高 CsPbBr₃ 的环境稳定性,本研究构建 SiO₂ 核/壳结构彻底封闭 MSNs 的开放孔道,从结构上切断外界环境对钙钛矿晶体的影响。为避免常规硅源水解会引入水分,可能对钙钛矿晶体造成损伤并导致发光性能下降,本研究采用 TMOS 在非极性溶剂甲苯中缓慢水解生成 SiO₂,实现煅烧前对 MSNs 孔道的预封闭,并形成 SiO₂ 壳层,从而阻隔水和其他极性溶剂对内部钙钛矿晶体的侵蚀。具体而言,将前驱体 A 分散于甲苯中,加入 TMOS 并搅拌一定时间,经离心、干燥得到前驱体 B(Precursor B)。随后,将其置于马弗炉中高温煅烧,最终获得荧光强度和稳定性显著增强的 CsPbBr₃@MSNs@SiO₂(PQD)(图 S3)。

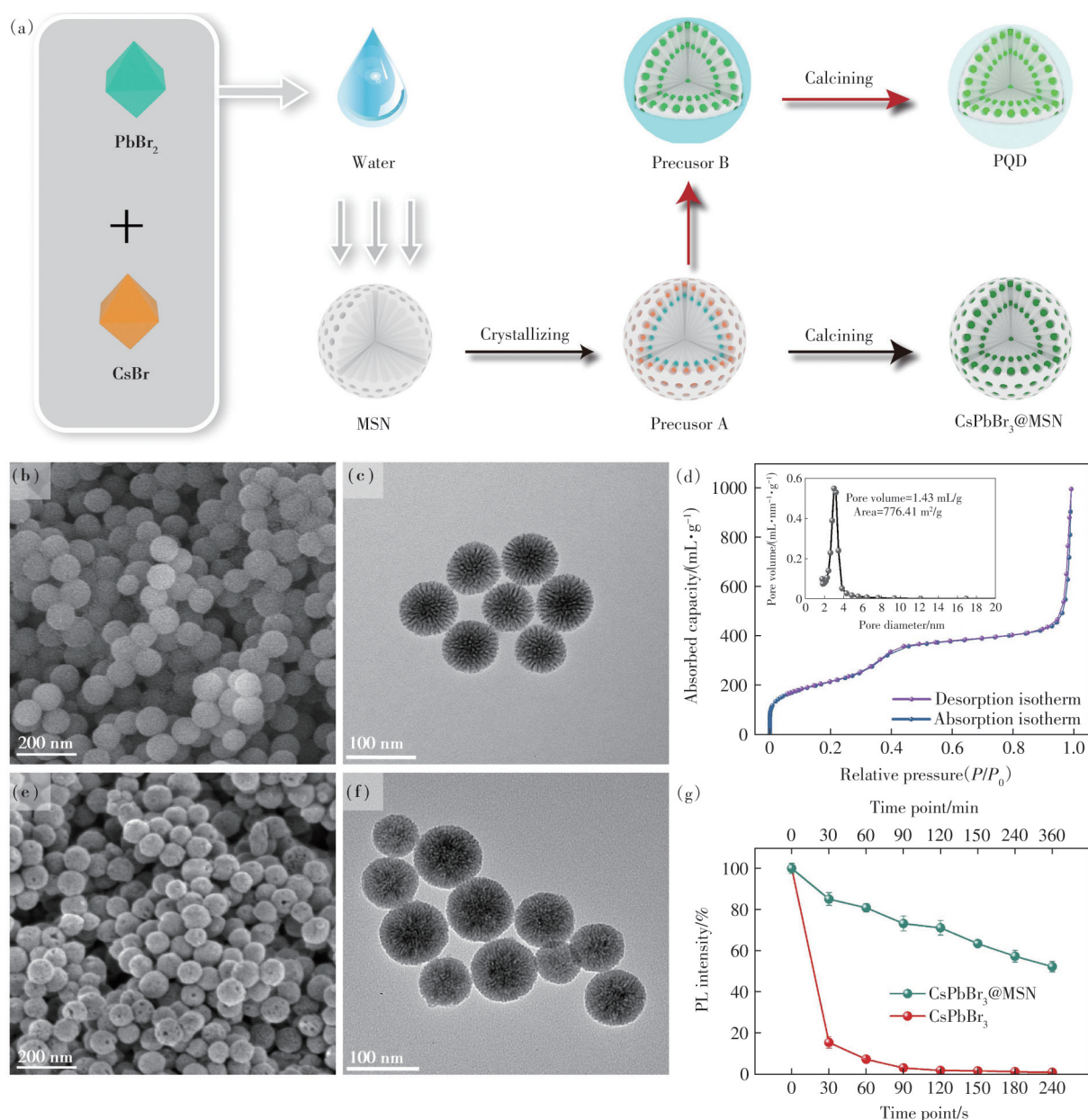


图1 (a)CsPbBr₃@MSNs和PQD制备流程示意图;MSNs的SEM(b)和TEM(c)图像;(d)MSNs的BET结果;CsPbBr₃@MSNs的SEM(e)和TEM(f)图像;(g)CsPbBr₃@MSNs的荧光稳定性测试结果

Fig.1 (a)Schematic illustration of the preparation routes of CsPbBr₃@MSNs and PQD. (b), (c)SEM and TEM images of MSNs. (d)BET characterization of MSNs. (e), (f)SEM and TEM images of CsPbBr₃@MSNs. (g)Fluorescence stability of CsPbBr₃@MSNs

PQD的SEM图像(图2(a))显示其球形结构保持完整,无明显形貌塌陷或破裂。TEM图像(图2(b))中PQD不再呈现典型的介孔特征,而是以致密的纳米球形式存在,粒径主要分布在40~70 nm。与MSNs相比,PQD粒径明显减小,说明高温煅烧过程中SiO₂壳层发生体积收缩:一方面促进孔道有效封闭,另一方面导致整体粒径缩小,从而有利于提高稳定性。小角XRD图谱(图2(c))进一步验证了孔道封闭过程:介孔结构的主要

衍射峰强度显著降低并整体向高角度偏移,表明TMOS水解生成的SiO₂对孔道产生堵塞作用,原有有序孔结构及连通性被削弱。BET比表面积测试结果(图S4)显示,孔道封闭后,PQD的比表面积由776.41 m²/g急剧下降至173.17 m²/g,进一步证明MSNs的开放孔道已被有效封闭。

前驱体A与B的XRD图谱(图S5)表明,Cs、Pb、Br以四方晶系CsPb₂Br₅晶体形式存在,其衍射峰位置与CsPb₂Br₅标准卡片(PDF#00-054-0753)

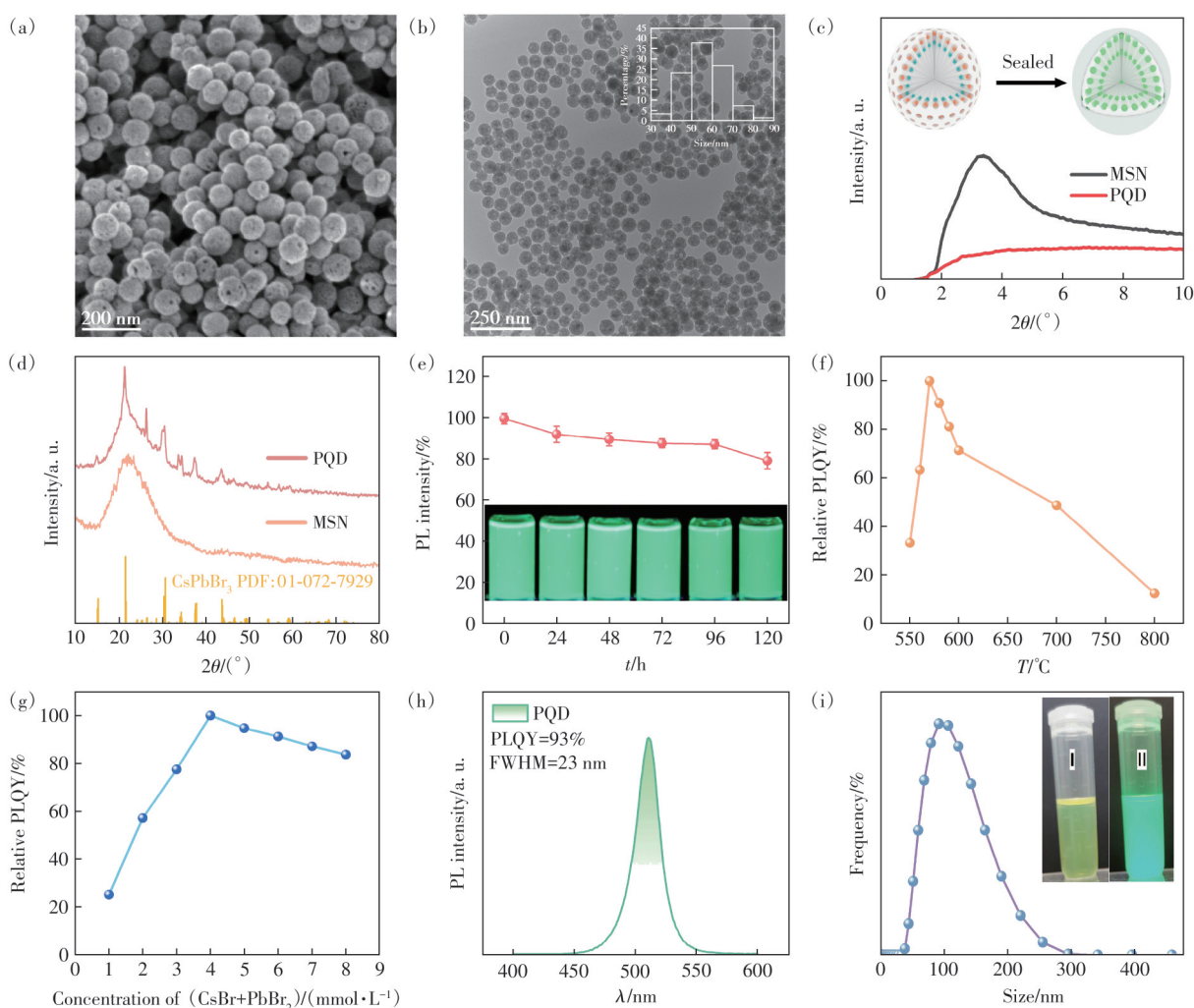


图2 PQD的SEM图像(a)、TEM图像(b)、小角XRD图谱(c)、XRD图谱(d)、荧光稳定性测试结果(e)、荧光强度与温度关系曲线(f)、荧光强度与前驱体浓度关系曲线(g)、发射光谱(h)及粒径分布图(i)

Fig.2 SEM image(a) and TEM image(b) of PQD. Small-angle XRD pattern (c) and XRD pattern (d), fluorescence stability (e), fluorescence intensity as a function of temperature (f) and ion concentration (g), emission spectrum (h), and particle size distribution (i) of PQD

在 11.6° 、 29.3° 、 33.3° 、 37.9° 等处的特征峰一致,说明 SiO_2 包覆处理并未引起 CsPb_2Br_5 晶体结构的明显变化。此外,在约 23° 处可见一上升肩峰,可归因于 SiO_2 的无定形相。相比之下,PQD的XRD图谱(图2(d))中则出现了正交相 CsPbBr_3 晶体的特征衍射峰,与标准卡片 PDF#01-072-7929 相匹配;同时, CsPb_2Br_5 的特征峰在煅烧后消失,表明 CsPb_2Br_5 晶体经高温熔融退火过程转变为 CsPbBr_3 晶体。该晶相转变也为前驱体 A、前驱体 B 与 PQD 之间的荧光强度差异提供了结构依据:煅烧后形成的正交相 CsPbBr_3 通常具有更优的光学性质和稳定性。元素映射结果(图 S6)进一步证实 Cs、Pb、Br 元素均匀分布于颗粒内部区域。

值得注意的是,PQD 在孔道封闭后表现出显

著增强的环境稳定性(图2(e)):在水中分散 120 h 后,其相对荧光强度仍可保持在初始值的 80% 以上。稳定性提升的关键在于高温处理过程中形成的“孔道封闭+致密 SiO_2 屏障”结构。与 $\text{CsPbBr}_3\text{@MSN}$ s 相比,PQD 的 TEM 图像不再呈现典型介孔特征且整体粒径减小(图2(b)),说明煅烧过程中 SiO_2 壳层发生体积收缩并促使孔道趋于封闭;另一方面,小角 XRD 中介孔衍射峰强度显著降低并向高角度偏移(图2(c)),且 BET 比表面积降至 $173.17 \text{ m}^2/\text{g}$ (图 S4),共同证明开放孔道已被有效封闭。孔道由“开放”转为“封闭”后,外界水/氧更难进入孔道内部,从结构上降低了钙钛矿晶体受侵蚀与分解的可能性。

通过系统调节 $\text{CsBr}+\text{PbBr}_2$ 浓度及煅烧温度,

最终确定最佳制备条件为 570 °C、CsBr+PbBr₂ 浓度 4 mmol/L(图 2(f)、(g))。在该条件下获得的 PQD 在 517 nm 处呈现强而窄的发射峰,半峰宽仅 23 nm, PLQY 高达 93%(图 2(h))。动态光散射结果(图 2(i))显示,PQD 在水中的水合粒径主要集中在 100 nm 附近,且其在水溶液中具有良好的分散性和尺寸稳定性,未发生明显聚集或大颗粒团聚。

3.2 PQD 表面修饰

尽管 PQD 具有优异的光学性能,但其本身缺乏生物靶向性,难以与特定生物分子选择性结合。为赋予 PQD 对目标蛋白的特异性识别能力,本研究对 PQD 表面进行生物功能化修饰,使其具备特异性结合靶标蛋白的能力,整体流程如图 3(a)所示。

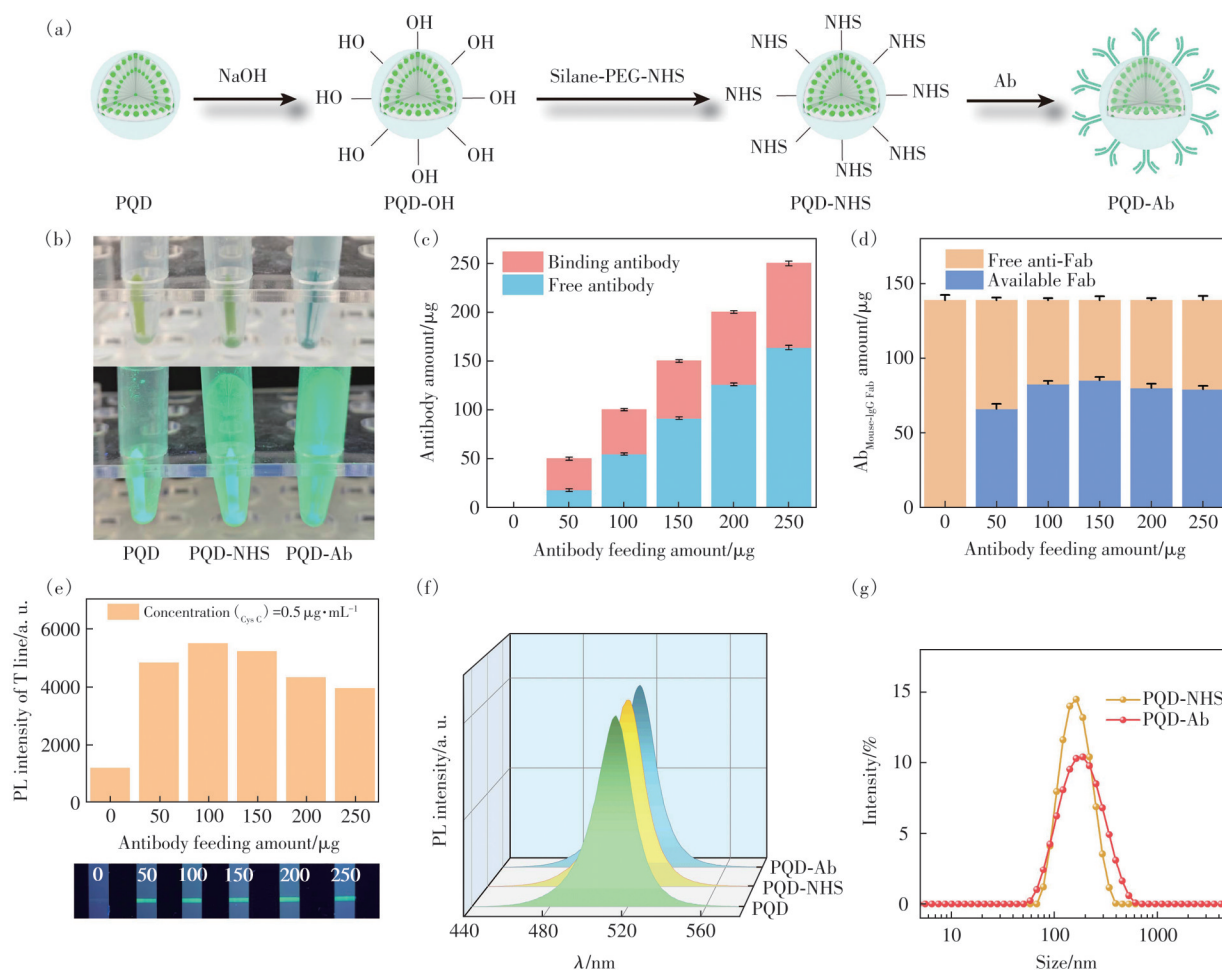


图3 (a)PQD表面修饰示意图;(b)PQD、PQD-NHS和PQD-Ab的考马斯亮蓝染色结果;(c)BCA法测定PQD-Ab的偶联效率;(d)上清液中Anti-Fab荧光强度的变化;(e)不同抗体投料量免疫层析试纸照片及其对应荧光强度;(f)PQD、PQD-NHS和PQD-Ab的发射光谱;(g)PQD-NHS和PQD-Ab的粒径分布图

Fig.3 (a)Schematic illustration of the surface modification of PQD. (b)Coomassie brilliant blue staining of PQD, PQD-NHS, and PQD-Ab. (c)Coupling efficiency of PQD-Ab determined by the BCA assay. (d)Changes in fluorescence intensity of Anti-Fab in the supernatant. (e)Images of immunochromatographic strips prepared with different antibody feeding amounts and their corresponding fluorescence intensities. (f)Emission spectrum of PQD, PQD-NHS, and PQD-Ab. (g) Particle size distribution of PQD-Ab and PQD-NHS

在高温煅烧过程中, SiO₂骨架会发生收缩并导致表面羟基(—OH)大量减少,从而使后续表面修饰可用位点不足^[24]。因此,在偶联反应前需对PQD表面羟基进行再活化。具体而言,将PQD浸泡于NaOH溶液中以激活其表面—OH基团,随后离心洗涤得到表面富含羟基的PQD-OH。基于此,选用

Silane-PEG-NHS作为交联剂,其中Silane基团可与—OH缩合,将PEG接枝到PQD表面;PEG链端能够提高PQD的亲水性与分散性,有利于其在水相中稳定分散;末端NHS活性酯则可与抗体分子上的游离氨基发生酰胺化反应,形成稳定的共价键,从而制得抗体修饰的钙钛矿量子点探针PQD-Ab。

为验证抗体是否成功偶联,采用考马斯亮蓝试剂进行定性检测。考马斯亮蓝是一种常用的生物化学染料,游离状态下呈红棕色,与蛋白质结合后呈蓝色,且颜色深浅与蛋白质含量成正比。如图 3(b)所示,将考马斯亮蓝试剂分别与 PQD、PQD-NHS 和 PQD-Ab 混合反应后,经反复离心洗涤,PQD 与 PQD-NHS 沉淀呈原本的绿色,而 PQD-Ab 沉淀则呈现明显蓝色,说明其表面抗体可与考马斯亮蓝结合,表明抗体已成功偶联至 PQD 表面。

为进一步验证 PQD-Ab 探针的制备效果,进行了激光共聚焦扫描显微实验(图 S7)。其中,绿色荧光来自 PQD,红色荧光信号源于 cy3 标记的羊抗鼠 IgG;在合并图中出现明显黄色信号,表明绿色与红色荧光发生共定位,即 PQD-Ab 与 cy3-羊抗鼠 IgG 分布于相同区域,从侧面证明 PQD 与抗体成功偶联。此外,在 PQD-Ab 的元素映射图中可以观察到来自抗体的 N 元素和 C 元素均匀分布于 PQD-Ab 表面,进一步支持了上述结论(图 S8)。

为考察抗体投料量对偶联效率的影响,实验设置不同的抗体投料量。偶联反应结束后收集上清液,采用 BCA 微量蛋白定量试剂盒测定未结合抗体的含量,从而计算偶联效率。结果表明,随着抗体投料量的增加,结合到 PQD 表面的抗体量增加,偶联效率相应提高(图 3(c))。然而,抗体分子空间尺寸约为 $14.5\text{ nm} \times 8.5\text{ nm} \times 4.0\text{ nm}$,当表面抗体覆盖过于密集时,可能发生相互遮挡并产生空间位阻,导致部分抗原结合位点(Fab)被遮蔽,从而影响其与抗原的结合能力。

为评估 PQD-Ab 表面 Fab 片段的有效暴露情况,选用针对 Fab 区域的羊抗鼠 IgG Fab 抗体(Anti-Fab)作为探针,通过测定上清液中游离 Anti-Fab 的含量变化,间接表征 PQD-Ab 表面可用 Fab 位点的数量。如图 3(d)所示,随着 Ab 投料量增加,上清液中游离 Anti-Fab 含量逐渐降低,说明更多 Anti-Fab 与 PQD-Ab 表面 Fab 位点发生结合。当 Ab 投料量为 $100\sim 150\text{ }\mu\text{g}$ 时,PQD-Ab 表面有效 Fab 暴露量达到峰值,表明此时其潜在抗原识别能力最强;当 Ab 投料量继续增加时,尽管总偶联量仍可能上升,但有效 Fab 暴露量不再增加甚至下降,提示过高的表面覆盖度可能引发位阻效应。

随后,进一步采用免疫层析试纸对上述结论进行验证。在相同 Cys C 抗原浓度条件下,当 Ab

投料量为 $100\text{ }\mu\text{g}$ 时,试纸条 T 线荧光信号最强(图 3(e)),说明该投料量下 PQD-Ab 与 Cys C 的结合效率最高,从而产生最强荧光输出。该结果与图 3(d)及图 S9 的趋势一致,进一步确定了抗体的最佳投料量范围。

从图 3(f)可以看到,PQD-Ab 的发射峰位置与未修饰 PQD 及 PQD-NHS 相比无明显位移,仍位于 517 nm 处,说明表面修饰过程并未影响 PQD 的发光中心。同时,PQD-Ab 的水合粒径与 PQD-NHS 相比,略微增大至 128 nm (图 3(g)),体系在水相中仍保持良好的分散性和胶体稳定性。

3.3 基于 PQD 的脱抑素 C 免疫层析(PQD-Cys C-LFIA)

在完成 PQD-Ab 的制备和表征后,将其应用于 Cys C 的 LFIA,制备基于 PQD 的脱抑素 C 免疫层析(PQD-Cys C-LFIA)。如图 4(a)、(b)所示,LFIA 从上到下依次由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC 膜)、吸水垫以及 PVC 背板构成。NC 膜上喷涂两条平行检测线,检测线(T 线)包被抗 Cys C 捕获抗体,用于捕获结合目标抗原的 PQD-Ab;质控线(C 线)包被羊抗鼠 IgG 用于捕获未与抗原结合的剩余 PQD-Ab,以验证层析过程是否正常。

通过对免疫层析体系的关键参数进行系统优化(包括加样体积与反应时间等),我们确定了 PQD-Cys C-LFIA 的最佳检测条件。在该条件下,加样体积为 $100\text{ }\mu\text{L}$,层析反应 15 min 即可完成读数(图 S9)。该优化条件可保证样品充分润湿与稳定迁移,同时在较短时间内获得清晰、可重复的荧光信号输出,满足快速检测需求。随后,采用不同浓度的 Cys C 标准溶液对 PQD-Cys C-LFIA 的定量性能进行评价。结果表明,在 $0.01\sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内,T/C 比值与 Cys C 浓度呈良好线性关系,其线性回归方程为:

$$y = 0.64x + 0.14, \quad (1)$$

决定系数 $R^2=0.996$ (图 4(c))。

检测限(Limit of detection, LOD) D 采用 3σ /斜率法计算:

$$D = \frac{3\sigma}{s}, \quad (2)$$

其中, σ 为空白样本的 T/C 比值标准差, s 为以 T/C 比值(y)对 Cys C 浓度(x)拟合得到的校准曲线斜率。据此计算得到本方法的 LOD 为 20.42 ng/mL (即 $0.02042\text{ }\mu\text{g/mL}$)。与此前报道的 Cys C 检测方法相比(表 S1),本研究提出基于钙钛矿量子点

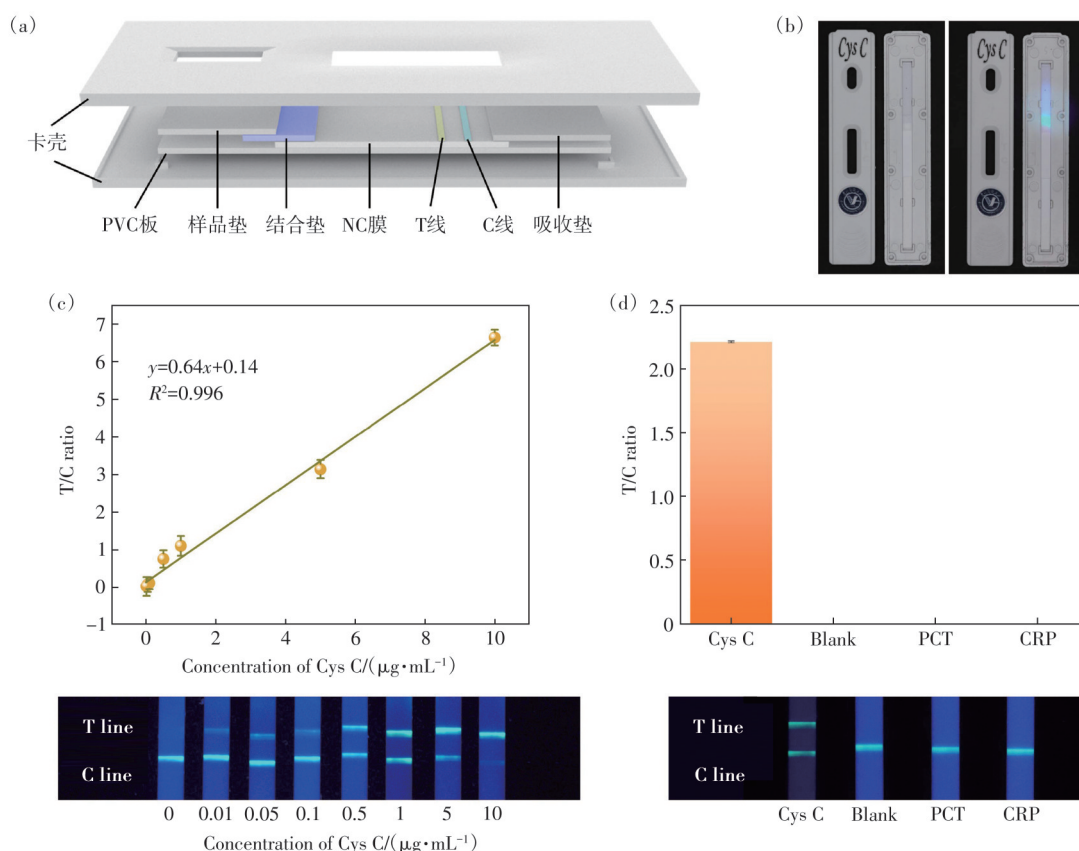


图4 (a)LFIA结构示意图;(b)PQD-Cys C-LFIA的实物照片;(c)PQD-Cys C-LFIA的线性范围测定结果;(d)PQD-Cys C-LFIA的特异性评价结果

Fig.4 (a) Schematic illustration of the structure of the immunochromatographic strip. (b) Photograph of the PQD-CysC-LFIA strip. (c) Linear range of the PQD-CysC-LFIA. (d) Specificity evaluation of the PQD-CysC-LFIA

检测 Cys C 的免疫层析方法具有相对较好的灵敏度,同时该方法具备高效的检测效率(<15 min),能够适配快速检测需求。

特异性评价中,选取了血液中常见的潜在干扰物质,如 C 反应蛋白(CRP)和降钙素原(PCT),在生理相关浓度下考察其对检测结果的影响。结果显示,加入上述干扰物后 T 线荧光信号未出现显著交叉反应或假阳性输出(图 4(d)),表明该方法具有良好的特异性。

需要指出的是,本研究目前主要完成检测策略的概念验证,现阶段重点评估了线性关系与特异性,以证明体系具备目标物识别基础上的可检测性。受限于体系仍处于原型优化阶段,其综合分析性能仍有进一步提升空间。后续工作将在此基础上进一步进行真实样品验证,以更全面评估其实际应用潜力。

综上,本研究基于高稳定性、高亮度的钙钛矿量子点荧光探针,构建了一种用于 Cys C 快速定量检测的荧光免疫层析体系。该体系制备简便、

检测时间短(15 min),并表现出良好的线性响应与特异性,为肾功能相关生物标志物的现场快速筛查提供了一种可行的新策略。

4 结 论

本研究基于 MSNs 载体构建了一种水相稳定的钙钛矿量子点,通过金属盐浸渍、TMOS 水解封闭与高温煅烧的方法在 MSNs 孔道内原位生成 CsPbBr₃ 量子点,有效解决了 HPs 点在水相环境中易降解、易猝灭的问题。所得 PQD 具有高 PLQY、窄发射峰以及在水中分散 120 h 仍保持超过 80% 初始荧光强度的优异稳定性,为钙钛矿量子点在生物检测中的应用提供了可靠载体与结构设计思路。在此基础上,本文通过表面活化及共价偶联构建了针对 Cys C 的 PQD-Ab 探针,并将其作为信号标签用于制备 Cys C 荧光免疫层析试纸(PQD-Cys C-LFIA)。实验结果表明,该试纸可在 15 min 内实现对 Cys C 的快速定量检测,在 0.01~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈良好线性关系,并具有良好特异性。综上

所述,本研究提出的水相稳定钙钛矿量子点生物探针及其在胱抑素 C 免疫层析中的应用,为肾功能相关标志物的居家与床旁检测提供了一种稳定高亮的荧光标记与信号增强平台,并为 HPs 在生物分析和免疫层析检测领域的拓展应用提供了新

的思路和技术支撑。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址: <http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20250278>

参 考 文 献:

- [1] STEVENS L A, SCHMID C H, GREENE T, *et al.* Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels [J]. *Kidney Int.*, 2009, 75(6): 652-660.
- [2] HELMERSSON-KARLQVIST J, LIPCSEY M, ÄRNLÖV J, *et al.* Cystatin C predicts long term mortality better than creatinine in a nationwide study of intensive care patients [J]. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1): 5882.
- [3] INKER L A, ENEANYA N D, CORESH J, *et al.* New creatinine- and cystatin C-based equations to estimate GFR without race [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2021, 385(19): 1737-1749.
- [4] AHMED F E. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20(5): 215-223.
- [5] BRANGEL P, SOBARZO A, PAROLO C, *et al.* A serological point-of-care test for the detection of IgG antibodies against ebola virus in human survivors [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(1): 63-73.
- [6] GUO J C, CHEN S Q, GUO J H, *et al.* Nanomaterial labels in lateral flow immunoassays for point-of-care-testing [J]. *J. Mater. Sci. Technol.*, 2021, 60: 90-104.
- [7] NGUYEN V T, SONG S, PARK S, *et al.* Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral flow assay [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 152: 112015.
- [8] LUAN J Y, SETH A, GUPTA R, *et al.* Ultrabright fluorescent nanoscale labels for the femtomolar detection of analytes with standard bioassays [J]. *Nat. Biomed. Eng.*, 2020, 4(5): 518-530.
- [9] GUPTA R, GUPTA P, WANG S A, *et al.* Ultrasensitive lateral-flow assays *via* plasmonically active antibody-conjugated fluorescent nanoparticles [J]. *Nat. Biomed. Eng.*, 2023, 7(12): 1556-1570.
- [10] BIAN L, XIONG Y F, ZHAO H, *et al.* Europium(III) chelate nanoparticle-based lateral flow immunoassay strips for rapid and quantitative detection of cystatin C in serum [J]. *J. Chromatogr. B*, 2022, 1194: 123133.
- [11] HUANG L, JIN J N, AO L J, *et al.* Hierarchical plasmonic-fluorescent labels for highly sensitive lateral flow immunoassay with flexible dual-modal switching [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(52): 58149-58160.
- [12] NATARAJAN S, SAATÇI E, JOSEPH J. Development and evaluation of europium-based quantitative lateral flow immunoassay for the chronic kidney disease marker cystatin-C [J]. *J. Fluoresc.*, 2022, 32(2): 419-426.
- [13] ZHONG Q X, CAO M H, HU H C, *et al.* One-pot synthesis of highly stable CsPbBr₃@SiO₂ core-shell nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 8579-8587.
- [14] DONG Y H, TANG X Q, ZHANG Z W, *et al.* Perovskite nanocrystal fluorescence-linked immunosorbent assay methodology for sensitive point-of-care biological test [J]. *Matter*, 2020, 3(1): 273-286.
- [15] DEY A, YE J Z, DE A, *et al.* State of the art and prospects for halide perovskite nanocrystals [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(7): 10775-10981.
- [16] WANG Y, SHEN J, SONG R L, *et al.* Highly bright and stable CsPbBr₃ perovskite nanocrystals with amphiphilic polymer binding based dual-readout lateral flow immunoassay for detection of carcinoembryonic antigen [J]. *Talanta*, 2024, 266: 125017.
- [17] 王建浦, 彭其明. 钙钛矿发光: 多学科深度交叉融合 [J]. *发光学报*, 2020, 41(11): 1335-1338.
WANG J P, PENG Q M. Perovskite luminescence: in-depth multidisciplinary integration [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(11): 1335-1338. (in Chinese)
- [18] 练惠旺, 康茹, 陈星中, 等. 全无机钙钛矿 CsPbX₃热稳定性研究进展 [J]. *发光学报*, 2020, 41(8): 926-939.
LIAN H W, KANG R, CHEN X Z, *et al.* Research progress on thermal stability of all inorganic perovskite CsPbX₃ [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(8): 926-939. (in Chinese)
- [19] 曾海波, 董宇辉. 钙钛矿量子点: 机遇与挑战 [J]. *发光学报*, 2020, 41(8): 940-944.

- ZENG H B, DONG Y H. Perovskite quantum dots: opportunities and challenges [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(8): 940-944. (in Chinese)
- [20] AHMED G H, YIN J, BAKR O M, *et al.* Successes and challenges of core/shell lead halide perovskite nanocrystals [J]. *ACS Energy Lett.*, 2021, 6(4): 1340-1357.
- [21] GHOSH CHAUDHURI R, PARIA S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications [J]. *Chem. Rev.*, 2012, 112(4): 2373-2433.
- [22] LV X, ZHANG L, XING F F, *et al.* Controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles: particle size tuning and formation mechanism investigation [J]. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2016, 225: 238-244.
- [23] ZHANG Q G, WANG B, ZHENG W L, *et al.* Ceramic-like stable CsPbBr₃ nanocrystals encapsulated in silica derived from molecular sieve templates [J]. *Nat. Commun.*, 2020, 11(1): 31.
- [24] GAO Y F, ZOU R, CHEN G F, *et al.* Large-pore mesoporous-silica-assisted synthesis of high-performance ZnGa₂O₄:Cr³⁺/Sn⁴⁺@MSNs multifunctional nanoplatform with optimized optical probe mass ratio and superior residual pore volume for improved bioimaging and drug delivery [J]. *Chem. Eng. J.*, 2021, 420: 130021.



陈志山(1993-),男,广东汕尾人,博士,助理研究员,2024年于广州医科大学获得博士学位,主要从事荧光纳米材料体外检测方面的研究。
E-mail: zhishan_chen@qq.com



李战军(1982-),男,河南安阳人,博士,教授,博士生导师,2013年于中国科学院大学获得博士学位,主要从事发光生物材料、光学诊断与治疗的研究。
E-mail: zhanjunli@gzhmu.edu.cn



朱宏强(2000-),男,江西赣州人,硕士研究生,2022年于广州医科大学获得学士学位,主要从事荧光纳米材料体外检测方面的研究。
Email: zhq000904@163.com



李杨(1984-),男,山东淄博人,博士,教授,博士生导师,2014年于华南理工大学获得博士学位,主要从事无机固体发光材料缺陷调控,特别是长余辉材料的设计、机理及应用的研究。
E-mail: lyChris@sina.com



毛梓晴(1999-),女,吉林通化人,硕士研究生,2022年于沈阳药科大学获得学士学位,主要从事荧光纳米材料体外检测方面的研究。
Email: 798324431@qq.com