

基于智能手机免疫比浊法的糖尿病肾病标志物快速检测研究

张雅琼, 杨燕, 孟雪娟*, 李晓春

(太原理工大学 人工智能学院, 生物医学精准检测与仪器研究所, 山西 晋中 030600)

摘要: β_2 -微球蛋白是反映糖尿病肾病早期肾功能损伤的重要标志物, 其快速、准确检测对于糖尿病肾病的早期诊断与病情监测具有重要意义。该研究构建了一种用于 β_2 -微球蛋白定量检测的胶乳增强免疫比浊试剂体系。通过将 β_2 -微球蛋白抗体偶联至羧基化聚苯乙烯胶乳微球表面制备免疫胶乳, 当抗原存在时可形成免疫复合物并引起溶液浊度变化, 实现 β_2 -微球蛋白的定量检测。进一步将该试剂体系与自主搭建的智能手机免疫比浊检测平台相结合, 通过手机内置环境光传感器进行信号的便携式采集与分析。该体系在0~60 mg/L范围内表现出良好的线性响应, 检出限为0.85 mg/L。加标回收率为93.5%~106%, 批间变异系数为5.7%~9.9%, 在准确性、重复性及特异性方面均具有良好性能。自制试剂与市售试剂的检测结果一致性较好($r^2=0.9884$), 且智能手机免疫比浊平台与酶标仪检测结果相关性高($r^2=0.9935$)。该试剂体系结合智能手机检测平台具有操作简便、检测快速、成本低和便携性强等优点, 为糖尿病肾病标志物的即时检测和基层应用提供了一种可行的技术方案。

关键词: 糖尿病肾病; β_2 -微球蛋白; 胶乳增强免疫比浊; 智能手机; 即时检测

中图分类号: O657.3; R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-1011-10

Rapid Detection of a Diabetic Kidney Disease Biomarker Using Smartphone-based Immunoturbidimetric Assay

ZHANG Ya-qiong, YANG Yan, MENG Xue-juan*, LI Xiao-chun

(Institute of Biomedical Precision Testing and Instrumentation, College of Artificial Intelligence, Taiyuan University of Technology, Jinzhong 030600, China)

Abstract: β_2 -microglobulin is an important biomarker for early renal impairment in diabetic kidney disease, and its rapid and accurate quantification is essential for early diagnosis and disease monitoring. In this study, a latex-enhanced immunoturbidimetric reagent system for the quantitative detection of β_2 -microglobulin was constructed. Immunolates were prepared by conjugating β_2 -microglobulin antibody to the surface of carboxylated polystyrene latex microspheres, and the immune complex was formed in the presence of the antigen, resulting in turbidity changes of the solution, thereby enabling quantitative determination of β_2 -microglobulin. The reagent system was further integrated with a self-developed smartphone-based immunoturbidimetric detection platform, using the built-in ambient light sensor for portable signal acquisition and analysis. The detection system showed a good linear relationship in the range of 0–60 mg/L, and the limit of detection was 0.85 mg/L. The spike recovery ranged from 93.5% to 106%, and the coefficient of variation between batches was 5.7%–9.9%, demonstrating good accuracy, repeatability and specificity. The test results of self-made reagents were consistent with commercial reagents ($r^2=0.9884$), and the correlation coefficient between the detection results of the smartphone immunoturbidimetric platform and the microplate reader was 0.9935. The latex-enhanced immunoturbidimetric reagent combined with the smartphone detection platform has the advantages of easy operation, fast detection, low cost and strong portability, providing a promising point-of-care testing solution for rapid detection of diabetic kidney disease biomarkers.

收稿日期: 2026-02-04; 修回日期: 2026-03-12

基金项目: 山西省基础研究计划(202203021212265); 山西省自然科学基金面上项目(202303021221027); 横向课题(老年人疾病标志物检测技术与仪器开发)

* 通讯作者: 孟雪娟, 博士, 副教授, 研究方向: 智能装备制造与生物医学应用, E-mail: mengxuejuan@tyut.edu.cn

网络首发日期: 2026-04-10

Key words: diabetic kidney disease; β_2 -microglobulin; latex-enhanced turbidimetric immunoassay; smartphone; point-of-care testing

糖尿病肾病(DKD)作为糖尿病的主要并发症之一,近年来发病率持续升高,对公共卫生体系造成较大负担^[1]。流行病学调查显示,2024年全球糖尿病成年患者已达5.89亿,预计2050年将增至8.53亿^[2]。DKD占终末期肾病发病率的30%~50%,约40%的患者需要肾替代治疗,导致患者遭受巨大的身体和经济负担^[3-4]。糖尿病肾病早期多无明显症状,随着病程延长逐渐出现蛋白尿、高血压及肾功能下降,最终可能发展为尿毒症^[5]。早期诊断糖尿病肾病对改善肾功能并指导药物治疗、延缓疾病进展具有重要意义^[6]。肾活检虽然是诊断肾脏疾病的金标准,但其侵入性强,难以满足早期评估需求,因此亟需一种快速简便的肾损伤检测方法以实现早期诊断和病情监测。 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)是一种内源性血清蛋白,正常情况下,其在血清、尿液、唾液等体液中的水平相对稳定^[7]。 β_2 -MG可经肾小球滤过,在近端肾小管中几乎被完全重吸收并由上皮细胞分解代谢,其血清水平的异常升高通常反映肾脏功能损伤^[8-9]。血清 β_2 -MG的正常参考范围为0~3 mg/L^[10-11],且受年龄、性别及肌肉组织含量的影响较小,相比尿素和肌酐等常用肾功能检测指标具有更高的稳定性和可靠性^[12-13]。 β_2 -微球蛋白已被广泛认为是肾功能早期损伤的敏感标志物,在糖尿病肾病的早期诊断中具有重要临床价值。

免疫比浊法能在液相条件下动态监测抗原与抗体的结合过程,二者特异性结合形成的复合物会引起溶液浊度改变,通过吸光度测量可实现对抗原或抗体的定量分析^[14-15]。根据光学检测原理,该方法可分为透射比浊法和散射比浊法,其中透射比浊法因检测范围宽、速率快和抗干扰能力较好等优势,常用于多种生化指标的测定^[16-17]。然而,对于低浓度样品,复合物颗粒较小导致浊度变化微弱,透射光衰减有限,影响检测灵敏度。为此,发展出了胶乳颗粒增强免疫比浊法(PETIA),通过将抗体或抗原偶联在胶乳微球表面,当抗原抗体结合时会形成大分子复合物,使透射光衰减显著增加,实现更高灵敏度的定量检测^[18-20]。该方法已用于肌红蛋白、超敏C-反应蛋白、甲胎蛋白等多种蛋白的定量分析。此外,免疫比浊法常用的检测仪器包括Beckman Coulter IMMAGE800特定蛋白分析仪、罗氏生化分析仪、日立7180全自动生化分析仪等^[21]。然而,这些仪器价格昂贵、体积庞大、需专业操作,且传统胶乳增强免疫比浊试剂盒灵敏度仍相对较低^[22-23],限制了其在家庭和基层场景的应用。因此,开发糖尿病肾病标志物的高灵敏度、便携式检测技术及仪器具有重要意义。

近年来,智能手机的普及与性能提升推动了其在荧光分析^[24-25]、比色分析^[26-27]、显微成像^[28]和电化学发光^[29]等检测中的应用。这些检测平台大多依赖于手机摄像头,但不同品牌手机在像素数、互补金属氧化物半导体(CMOS)传感器灵敏度、镜头质量、光圈尺寸等方面具有不同的相机特性^[30],使检测结果存在较大差异且准确度受限。相比之下,智能手机内置的环境光传感器(ALS)可直接测量光强,不同手机在相同光照条件下的检测结果一致性高,克服了摄像头带来的偏差。Wang等^[31]通过智能手机环境光传感器监测HRP-H₂O₂-TMB体系的颜色褪变,实现了尿糖含量的比色检测;Zhao等^[32]利用智能手机环境光传感器实现了对微流控芯片中流动液滴的连续动态荧光检测。此外,本团队在前期研究中基于智能手机环境光传感器构建了小型化光强检测装置,实现了急性心肌梗死标志物的快速定量检测^[33]。上述研究表明,智能手机及其环境光传感器可代替复杂的传统光学系统,并完成数据采集和分析,为现场即时检测提供了可靠方案。

本研究开发了一种基于智能手机免疫比浊法的糖尿病肾病标志物快速检测平台(图1)。胶乳微球偶联抗体形成免疫探针,抗原存在时形成抗原-抗体-胶乳微球免疫复合物,导致溶液浊度增加(图1A)。通过优化检测波长、反应温度和时间,以及免疫体系中的微球大小、活化剂用量、偶联体系pH值、偶联时间、抗体用量等条件,实现了基于PETIA的高灵敏 β_2 -MG检测体系构建。此外,通过智能手机ALS检测反应溶液透射光强度的变化,并基于Lambert-Beer定律实现了目标物的定量检测(图1B)。该平台操作简便、检测快速、成本低,在基层医疗机构的糖尿病肾病早期筛查和居家用户健康管理等领域具有广阔的应用前景。

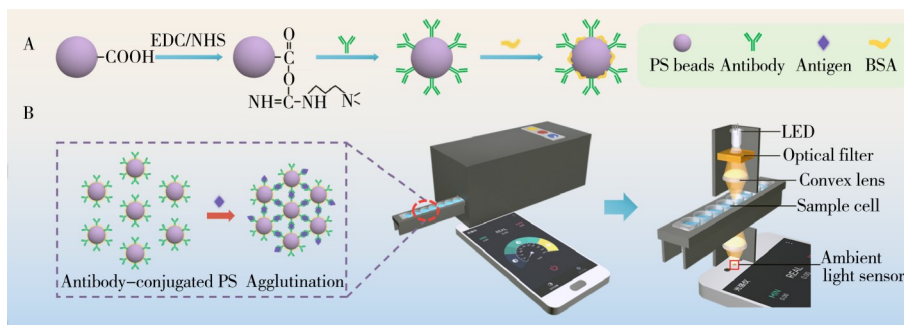


图1 免疫胶乳制备流程(A)和基于智能手机的检测装置示意图(B)

Fig. 1 Schematic diagram of immunolatex preparation process(A) and smartphone-based detection device(B)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

本研究所用主要仪器设备包括酶标仪(Multiskan FC, 美国赛默飞世尔)、紫外-可见分光光度计(UV-3100PC, 上海美普达)、数控超声波清洗器(KQ-400DE, 昆山超声仪器)、微孔板恒温振荡器(MB100-4A, 杭州奥盛)、快速混匀器(上海精密仪器仪表)、纳米粒度及Zeta电位分析仪(辽宁丹东百特)以及Huawei P10智能手机(华为)。

不同粒径的羧基化胶乳微球(PS微球, 平均粒径分别为107、128、165、208 nm, Bangs Laboratories Inc.); β_2 -MG多克隆抗体及抗原标准品购自上海西宝生物科技股份有限公司; 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、2-吗啉乙磺酸(MES)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氯化钠(NaCl)和牛血清白蛋白(BSA)购自上海迈瑞尔生化科技有限公司; 吐温20(Tween-20)和4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)购自北京索莱宝科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)和三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris-HCl)购自上海百生跃生物科技有限公司; 聚乙二醇6000(PEG-6000)购自上海吉纳睿生化科技有限公司。

1.2 智能手机免疫比浊平台的设计

采用SolidWorks软件对装置结构进行设计, 通过3D打印完成加工与组装。装置内部集成检测光路与载样模块, 包括发光二极管(LED)、滤光片、凸透镜及样品架等。白光LED提供稳定的入射光源, 光线经过滤光片获得特定波长单色光, 然后由凸透镜聚焦至待测溶液; 穿过溶液的透射光经二次聚焦后由智能手机环境光传感器采集, 实现光强信号的获取, 并通过手机端光强检测应用程序进行实时显示与记录(图1B)。

免疫比浊反应中, 抗原-抗体免疫复合物的形成会引起入射光的散射、反射及吸收, 从而导致透射光强度衰减。Lambert-Beer定律公式为:

$$A = \lg \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \varepsilon cl \quad (1)$$

式中, A 为吸光度, I_0 为入射光强; I_t 为透射光强; ε 为摩尔吸光系数, c 为溶液浓度, l 为液层厚度。由该关系可知, 溶液中免疫复合物的生成量与吸光度 A 成正比。本研究根据该式将采集的光强信号转换为吸光度信号, 以减少试剂空白及容器差异带来的系统误差。利用标准品建立吸光度与浓度之间的标准曲线, 通过将未知样品的吸光度代入曲线即可计算得到其最终检测浓度。

1.3 β_2 -MG检测体系的建立

1.3.1 β_2 -MG免疫胶乳的制备 采用共价偶联法制备 β_2 -MG免疫胶乳。取适量10%的羧基化PS微球, 加入pH 6.0的100 mmol/L MES缓冲液, 离心清洗两次并重悬, 再分别加入10 mg/mL EDC和NHS(二者质量比1:2), 立即混匀后于37 °C下活化20 min, 离心去上清, 并用pH 7.0的50 mmol/L HEPES缓冲液清洗两次, 再用该缓冲液重悬并超声分散, 得到活化后的羧基PS微球。加入一定量 β_2 -MG抗体, 在37 °C下振荡孵育2 h, 然后加入一定量10% BSA溶液并使其终浓度为1%, 在37 °C下振荡反应2 h封闭微球多余活性位点, 离心去上清, 沉淀用pH 7.4 PBS溶液清洗两次, 最后用pH 8.0的50 mmol/L Tris-

HCl缓冲液(含0.5% BSA、0.1% Tween-20)重悬,得到偶联抗体后的免疫胶乳,超声分散后于4℃冰箱保存。

1.3.2 β_2 -MG 检测试剂的配制及仪器测定过程 β_2 -MG的检测试剂包括试剂I(R1)和试剂II(R2)两种。R1: 80 mmol/L PBS缓冲液(pH 7.4)、0.8%氯化钠、0.2% Tween-20、1%聚乙二醇6000; R2: 50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)、0.5%牛血清白蛋白、0.1% Tween-20、免疫胶乳。

在酶标仪上测定免疫反应前后吸光度的变化(ΔA),检测过程及参数如下:取180 μ L R1试剂,加入2 μ L样本,37℃孵育5 min后加入60 μ L R2试剂,快速摇匀(15 s)后立即在波长578 nm下检测吸光度值 A_1 ,37℃孵育5 min后再次检测吸光度值 A_2 ,计算两次检测的吸光度差值 $\Delta A=A_2-A_1$, ΔA 的大小反映了免疫比浊反应的强度。智能手机免疫比浊仪检测过程同上。

1.4 检测条件与免疫胶乳制备条件优化

胶乳增强免疫比浊法采用固定波长监测抗原-抗体反应引起的吸光度变化(ΔA)。检测时样本中的抗原和免疫胶乳上的抗体特异性结合形成免疫复合物,导致溶液浊度随时间递增,其动力学曲线直接反映复合物生成速率与总量。由于 ΔA 受波长选择、反应动力学及检测时间窗共同影响,在酶标仪上对检测波长(350~750 nm)、反应温度(4、25、37℃)和时间(0~15 min)进行优化以选择最适检测条件。在免疫胶乳制备环节,通过改变作为载体的羧基化PS微球的粒径、活化剂(EDC/NHS)的用量、偶联缓冲液的pH值、偶联时间、抗体用量等关键参数,评估其对免疫检测性能的影响,并筛选出提升检测性能的最优条件组合。

1.5 β_2 -MG 检测试剂性能分析

对不同状态下的胶乳微球进行透射电镜(TEM)表征、动态光散射(DLS)分析及Zeta电位测试,以评估制备免疫胶乳试剂的结构特征及体系稳定性。通过对裸胶乳微球、免疫胶乳(偶联抗体后的胶乳微球)以及免疫反应后胶乳的对比表征,分析抗体偶联及免疫反应对胶乳颗粒的形貌、分散状态、粒径分布及表面电荷特性等方面的影响。

同时,对自制试剂的定量响应能力、检测准确性、特异性、批间一致性进行验证。在胎牛血清中加入 β_2 -MG标准品溶液,配制成5、10、30、50 mg/L的待测溶液进行加标回收试验,每个水平重复测定5次;选取与 β_2 -MG在肾损伤及炎症状态下可能共存的高丰度或相关蛋白作为非目标物,包括C反应蛋白(CRP)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、免疫球蛋白G(IgG)、白蛋白(ALB)、胱抑素C(CysC)及视黄醇结合蛋白4(RBP4),通过在临床极端浓度条件下考察非目标物对检测信号的影响,验证试剂的抗交叉反应能力;在固定 β_2 -MG浓度条件下,分别加入常见血清内源性干扰物和常用药物,包括葡萄糖(Glu)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、血红蛋白(Hb)、胆红素(Bil)、甘油三酯(TG)、抗坏血酸(AA)、阿莫西林(AMX)及氨氯地平(AML),验证检测体系的抗干扰能力;用5个不同制备批次的试剂检测低、中、高3个 β_2 -MG浓度水平,考察免疫胶乳试剂的批间稳定性。

1.6 智能手机免疫比浊体系可靠性验证

本研究构建的智能手机免疫比浊检测体系由自制检测试剂与手机端检测模块两部分组成。为评估自制试剂在 β_2 -MG检测中的可靠性与适用性,采用自制试剂与商品化试剂分别对一系列不同浓度的 β_2 -MG标准品进行测定,对两种试剂所得检测结果进行相关性分析,并对其检测灵敏度、线性范围及响应特性等性能参数进行对比,评估自制试剂与商品化试剂在检测性能方面的差异。在此基础上,将自制试剂分别应用于智能手机免疫比浊检测平台和酶标仪检测平台进行平行测试,通过比较两种检测平台所得结果的一致性与相关性,进一步验证智能手机检测平台在 β_2 -MG定量分析中的准确性与可靠性。

2 结果与讨论

2.1 检测条件选择

2.1.1 检测波长选择 将检测后的溶液置于紫外-可见分光光度计进行全波长扫描(350~750 nm)。结果如图2A~B所示,在短波长区(<450 nm),吸光度变化无序,与抗原浓度缺乏相关性;在长波长区(>650 nm),各抗原浓度组的吸光度与试剂空白(试剂检测纯水时的吸光度)的差值缩小,灵敏度下降;

波长范围在500~600 nm时,吸光度变化均匀,不同抗原浓度组的吸光度与试剂空白的差异较大,灵敏度较高。另外,由于血样中的血红蛋白、胆红素、脂浊在340 nm附近的吸收最强,而随波长延长其吸收迅速降低,因此在实际样本检测时,可将检测波长设置在600 nm附近,虽然测定的灵敏度有所下降,但避开了血样中干扰物质的吸收,能有效提高测定的准确度和抗干扰性。综合考虑灵敏度、准确性和抗干扰能力,最终选择的检测波长范围为500~600 nm。后续实验中确定检测波长为578 nm。

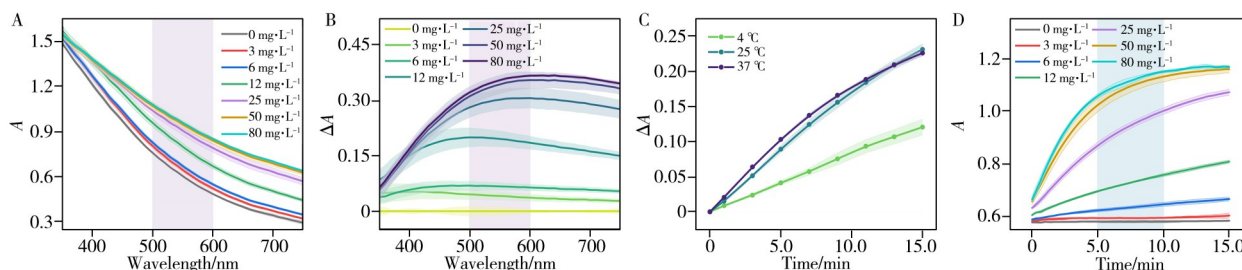


图2 检测波长(A~B),反应温度(C)及检测时间(D)选择

Fig. 2 Selection of detection wavelength(A~B), reaction temperature(C) and detection time(D)

2.1.2 反应温度与时间优化 将免疫胶乳与固定浓度抗原标准品混匀后,分别置于4、25、37 °C下孵育,并连续监测0~15 min内的吸光度变化。结果如图2C所示,反应温度对免疫复合物的形成速率及信号强度具有显著影响。4 °C条件下吸光度上升极为缓慢,15 min时信号仍处低位且未见平台趋势,反应动力学明显受限;25 °C时反应速率较4 °C明显提升,但信号强度仍低于37 °C;37 °C时吸光度上升最快、信号强度最高,7.5 min后反应增速减缓,抗原-抗体结合充分、动力学响应最佳。因此,本研究选择37 °C作为最佳反应温度,后续实验均在此温度下进行。

用制备的免疫胶乳对不同浓度的抗原标准品进行检测。将抗原标准品与反应体系混匀后,立即置于酶标仪中连续监测0~15 min内的吸光度变化。结果如图2D所示,吸光度随着反应时间的延长逐渐升高,特别是对于高浓度的抗原标准品,吸光度随时间显著增加后逐渐趋于平缓,即增速逐渐降低。反应时间太短时,抗原-抗体结合不充分,吸光度变化较小,灵敏度低,可能影响低浓度样本检测结果的准确性;反应时间过长时,抗原-抗体的反应趋于饱和,虽然低浓度抗原的检测更灵敏,但检测的线性下降,同时检测效率降低。综合考虑信号强度、线性响应及检测效率,选择5~10 min作为最佳反应时间。后续实验中确定检测时间为5 min。

2.2 免疫胶乳制备条件优化

2.2.1 微球粒径、活化剂用量及pH值优化 首先对胶乳微球粒径进行筛选(图3A),粒径较大的胶乳微球在相同条件下检测信号较高,但高浓度区信号变化不明显;粒径较小的胶乳微球检测范围相对较宽,但信号强度偏低。另外,实验中发现,208 nm胶乳微球的检测信号低于小粒径微球,这是由于208 nm胶乳微球尺寸较大,在相同质量浓度条件下,其颗粒数量和扩散速率均低于小粒径微球,从而在固定反应时间内形成的免疫聚集体相对较少。同时,208 nm的胶乳微球在初始状态下具有更高的散射背景信号,进一步降低了免疫反应所引起的相对信号变化。根据本体系对灵敏度和检测范围的需求,选取粒径为165 nm的胶乳微球用于后续实验。在此基础上,对活化剂用量进行了优化(图3B),随着活化剂用量增加,检测信号逐渐增强,当用量达到一定水平后信号变化趋于稳定;继续增加用量会导致微球过度活化,表面羧基大量转化为中性活性酯,使表面电荷显著降低,从而诱导微球发生自聚集,减少有效反应位点并降低胶乳分散稳定性,最终使检测信号降低。同时比较了不同pH值的偶联体系对免疫胶乳性能的影响(图3C),结果表明,在pH 7.0的HEPES体系中制备的免疫胶乳具有较高的检测信号,空白响应低且信号稳定性良好。这是因为体系pH值略高于抗体等电点,抗体呈负电性,可抑制其与微球的非特异性静电吸附及自身聚集,从而获得稳定的检测响应,故选定该体系作为偶联反应体系。

2.2.2 偶联时间及抗体用量的优化 进一步对偶联时间、抗体用量进行了优化。实验结果表明(图3D),免疫反应信号强度随偶联时间延长逐渐增加,并在2 h后趋于稳定,延长偶联时间对检测信号提升不明显,反而增加了制备周期。图3E显示了抗体用量优化结果,抗体用量对检测信号影响较为显

著,用量较低时检测信号偏低,随着抗体用量增加信号强度明显提高,当胶乳微球与抗体的质量比为 6:1 时,检测信号较强,线性较好,抗体用量过高(质量比 3:1)时,空白吸光度增大、稳定性降低,且检测信号快速趋于平台。结合抗体利用率及体系稳定性,选取胶乳微球与抗体的质量比为 6:1 的抗体用量作为免疫胶乳制备的抗体添加量。

2.2.3 PEG-6000 含量优化 对反应体系的 PEG-6000 含量进行了筛选(图 3F)。PEG-6000 作为促聚剂加入反应体系后,通过排斥体积效应提高抗原-抗体形成免疫复合物的概率,从而促进免疫胶乳颗粒间的交联聚集。实验中发现,适量 PEG-6000 的加入可促进免疫胶乳颗粒间的聚集反应,增强检测信号;当 PEG-6000 含量过高时,体系中可能出现非特异性聚集或分子扩散受限,导致空白吸光度增大和检测信号下降。最终选择 PEG 含量为 1%。通过上述条件筛选,形成了较为稳定且可重复的免疫胶乳制备工艺,为后续检测体系的建立和性能评价提供了可靠的实验基础。

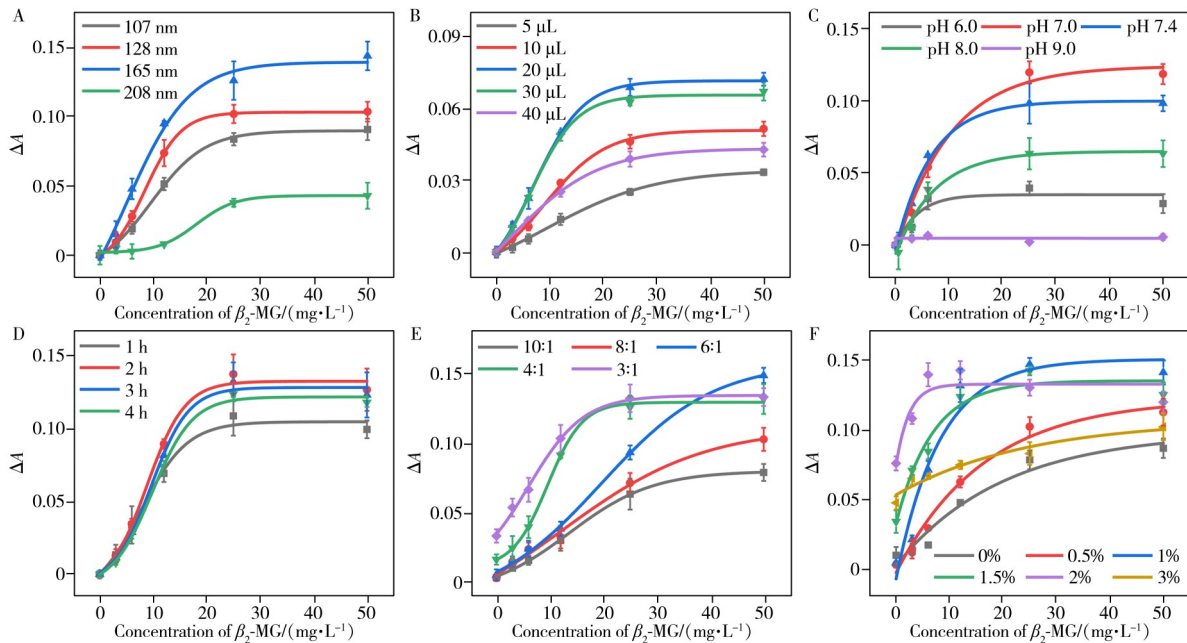


图 3 粒径(A)、活化剂用量(B)、偶联 pH 值(C)、偶联时间(D)、抗体用量(E)及 PEG-6000 含量(F)的优化
Fig. 3 Optimization of particle size (A), activator dosage (B), conjugation pH (C), conjugation time (D), antibody dosage (E) and PEG-6000 concentration (F)

2.3 不同状态胶乳微球的表征

不同状态下胶乳微球的 TEM 表征如图 4 所示。裸胶乳微球整体呈规则球形,颗粒边界清晰,分散性良好,粒径分布均一,表明原始胶乳体系具有良好的形貌稳定性。偶联抗体后的免疫胶乳仍保持良好的球形结构,分布相对均匀,未观察到明显的非特异性聚集现象,表明所制备的免疫胶乳溶液仍具有较好的稳定性。在与抗原标准品反应后的免疫胶乳中,胶乳颗粒出现明显聚集,形成较大团簇,引起体系吸光度增大,证明免疫识别反应有效发生,胶乳微球具备良好的免疫活性。

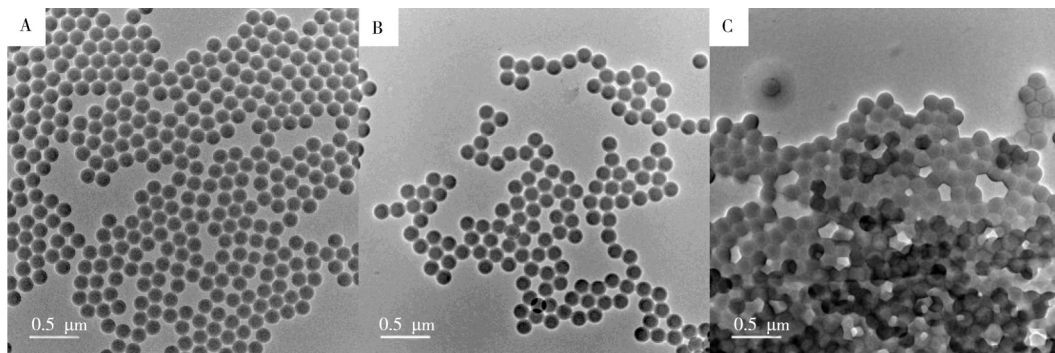


图 4 裸胶乳微球(A)、免疫胶乳(B)、与抗原反应后的免疫胶乳(C)的 TEM 表征
Fig. 4 TEM characterization of bare latex microspheres (A), immunolateral (B) and immunolateral after reaction with antigens (C)

胶乳微球的紫外-可见吸收光谱如图5A所示,裸胶乳微球在可见光区未表现出明显的分子特征吸收,其吸光度主要来源于颗粒对入射光的散射作用。与裸胶乳微球相比,免疫胶乳在250~300 nm波段出现一定程度的吸收增强,该波段与蛋白质分子的特征吸收区域(280 nm附近)相一致,证明抗体成功引入至胶乳微球表面。除上述波段外,两者在可见光区的光谱形态基本一致,表明抗体偶联过程未对胶乳微球在检测波段内的光学响应特性产生明显影响,有利于免疫比浊检测信号的稳定获取。

DLS粒径分布显示(图5B),裸胶乳微球平均粒径为166.28 nm,粒径分布较为集中;抗体偶联后,免疫胶乳的平均粒径增大至185.49 nm,粒径分布相较裸胶乳略有展宽,但仍呈单峰分布特征,未出现异常大颗粒信号。Zeta电位测定结果如图5C所示,裸胶乳微球的Zeta电位为-38.71 mV,体系具备良好的静电稳定性;偶联抗体后的免疫胶乳微球的Zeta电位升高至-16.33 mV,说明蛋白分子修饰对胶乳表面电荷分布产生影响。上述结果说明抗体成功偶联于胶乳微球表面并形成稳定的水合层结构,同时体系未发生明显的非特异性聚集,免疫胶乳微球整体分散状态良好。

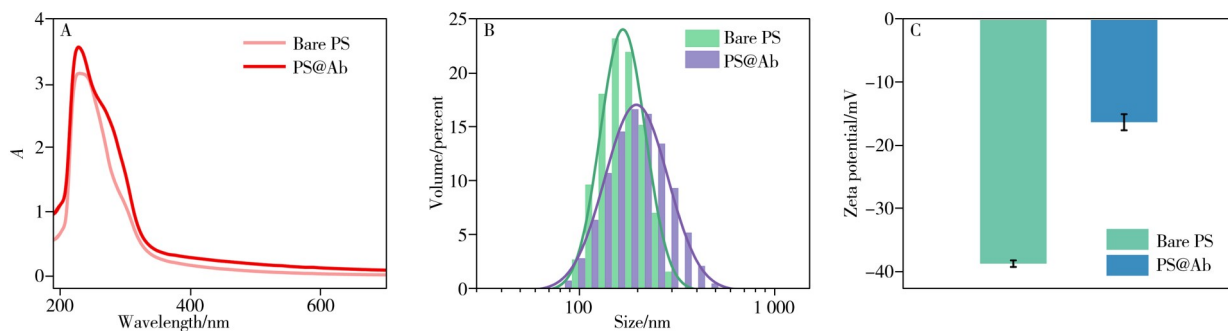


图5 免疫胶乳的紫外-可见吸收光谱(A)、DLS粒径分布(B)、Zeta电位(C)表征

Fig. 5 UV-Vis absorption spectra(A), DLS particle size distribution(B) and Zeta potential (C) characterizations of immunolatex

2.4 方法特异性

特异性验证如图6A所示。非目标物为40 mg/L CRP、500 ng/mL NGAL、10 g/L IgG、1 g/L ALB、100 mg/L RBP4及5 mg/L CysC,其在临床极端浓度条件下对检测信号影响较小,免疫胶乳试剂对 β_2 -MG具有较好的识别能力,能够满足免疫检测对特异性的基本要求。抗干扰性实验中,在固定 β_2 -MG浓度下加入干扰物:20 mmol/L Glu、30 mmol/L Urea、500 μ mol/L Cr、2 g/L Hb、340 μ mol/L Bil、10 mmol/L TG、1 mmol/L AA、100 μ g/mL AMX及100 ng/mL AML,各干扰物的干扰率均低于10%(图6B),表明该检测方法具有良好的抗干扰性能。批间稳定性结果如图6C所示,各批次在相同浓度水平下的检测结果整体分布较为集中,不同批次之间未观察到明显系统性偏差,变异系数(CV)为5.7%~9.9%。上述结果表明,制备的免疫胶乳试剂具有较好的稳定性和重复性,有利于规模化制备和实际应用。

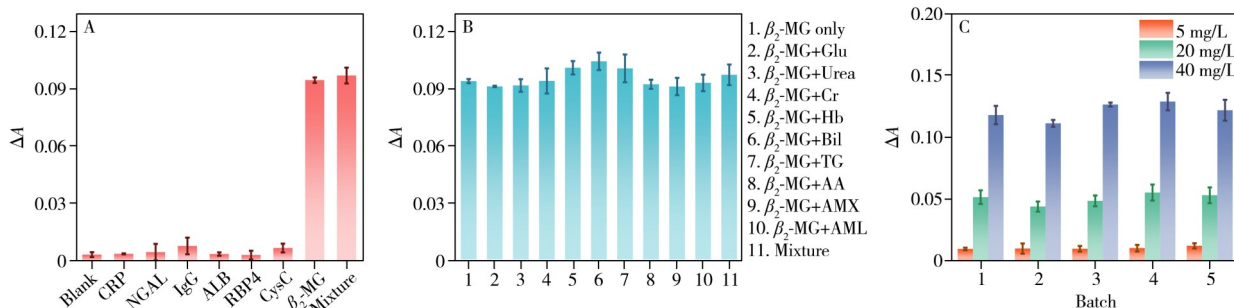


图6 β_2 -MG免疫胶乳的特异性(A)、抗干扰性(B)、批间差异性(C)

Fig. 6 Specificity(A), anti-interference(B) and batch-to-batch variability(C) of β_2 -MG immunolatex

2.5 标准曲线、检出限及加标回收率

以 β_2 -MG的质量浓度为横坐标,吸光度变化(ΔA)为纵坐标,用制备的免疫试剂建立 β_2 -MG的检测标准曲线,如图7所示。标准曲线的回归方程为 $y=0.0031x-0.0004$, $r^2=0.9920$ 。在所考察的浓度范围内,检测信号随 β_2 -MG浓度增加呈现连续、稳定的变化趋势,曲线拟合结果良好。该体系的线性检

测范围为0~60 mg/L。采用 $3\sigma/S$ 法计算(其中 σ 为空白吸光度标准偏差, S 为标准曲线斜率), 得到检出限(LOD)为0.85 mg/L, 体系具有良好的定量响应能力。结合糖尿病肾病患者相关标志物的临床参考水平可知, 本研究所建立的检测体系在灵敏度及检测范围方面满足临床检测的需求。

血清加标回收率结果见表1, 测得的回收率范围为93.5%~106%, 整体处于合理区间, 且不同加标水平之间未观察到明显的系统性偏差。该结果表明在当前检测条件下, 样本基质对免疫胶乳试剂检测结果的影响较小, 检测体系对 β_2 -MG的测定具有较好的准确性。同时, 各加标水平的重复测定结果波动较小, 说明该免疫胶乳试剂在实际检测过程中具有较好的稳定性和重复性。

表1 β_2 -MG加标回收率($n=5$)
Table 1 Spiked recoveries of β_2 -MG($n=5$)

Sample	Added/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Found/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%
1	5	5.08, 4.96, 4.75, 5.42, 5.46	103	5.9
2	10	9.92, 10.67, 10.13, 10.79, 9.21	101	6.3
3	30	27.42, 27.75, 28.08, 29.75, 28.08	93.5	3.2
4	50	51.83, 51.75, 52.08, 54.58, 53.71	106	2.4

2.6 β_2 -MG免疫比浊检测试剂可靠性验证

自制免疫胶乳试剂与商品试剂的检测结果如图8所示。图8A为两种试剂在0~60 mg/L β_2 -MG质量浓度范围内的检测结果对比。随着 β_2 -MG浓度的升高, 两种试剂的检测信号均呈现良好的线性增加趋势, 表明二者均具有稳定的浓度响应关系。相比商品试剂, 自制免疫胶乳试剂在各浓度水平下的检测信号整体更高, 对 β_2 -MG表现出更高的检测灵敏度, 检测信号的线性拟合效果更好; 同时各浓度点的误差较小, 说明自制试剂具有良好的重复性和检测稳定性。图8B为自制试剂与商品试剂检测结果的相关性分析。线性回归分析显示, 两种试剂检测结果之间具有良好的线性相关性($r^2=0.9884$), 表明自制试剂的检测结果与商品试剂之间具有较高的一致性, 验证了自制试剂在检测性能方面的可靠性。

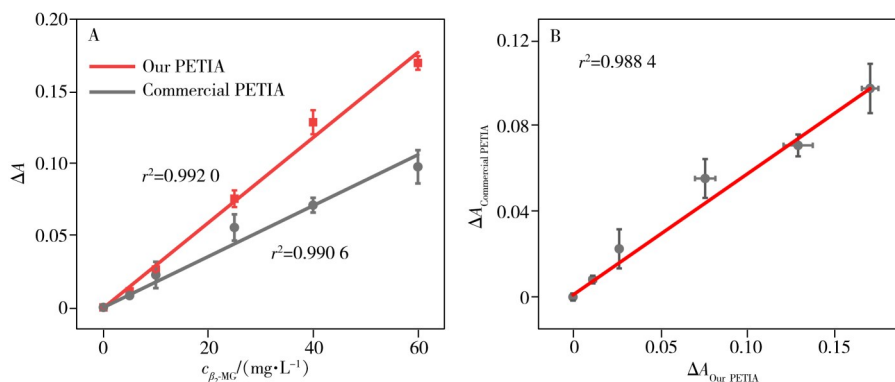


图8 自制试剂和商品试剂检测结果(A)及相关性分析(B)

Fig. 8 Test results of self-developed reagents and commodity reagents (A) and their correlation analysis (B)

2.7 智能手机免疫比浊检测体系可靠性验证

智能手机免疫比浊仪和酶标仪的检测结果如图9所示。智能手机免疫比浊仪检测结果的拟合系数 r^2 达到0.9968(图9A); 酶标仪测量结果的 r^2 达到0.9993(图9B)。在0~60 mg/L的检测范围内, 两种平台的响应信号均与 β_2 -MG质量浓度呈良好的线性关系, 其一致性分析结果显示, 二者检测结果的线性拟合系数 r^2 达到0.9935(图9C), 两种平台对自制 β_2 -MG免疫比浊试剂的检测具有较好的一致性与准确性。该结果验证了智能手机免疫比浊仪检测的可靠性。正常人体内血清中的 β_2 -MG水平小于3 mg/L, 在糖尿病肾病患者中, 血清 β_2 -MG浓度随肾损伤程度加重而逐步升高, 可达10 mg/L以上。智能手机免

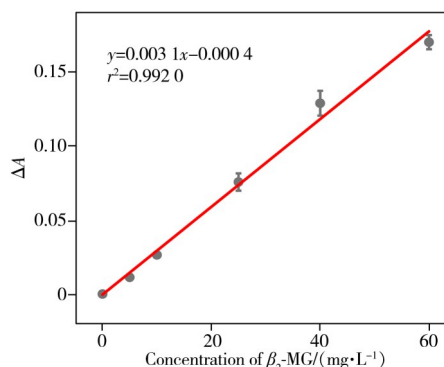


图7 自制试剂检测 β_2 -MG的标准曲线
Fig. 7 Standard curve for self-developed reagents detection of β_2 -MG

疫比浊仪可以检测到0~60 mg/L的 β_2 -MG水平, 覆盖临床相关浓度区间, 满足糖尿病肾病标志物检测需求。

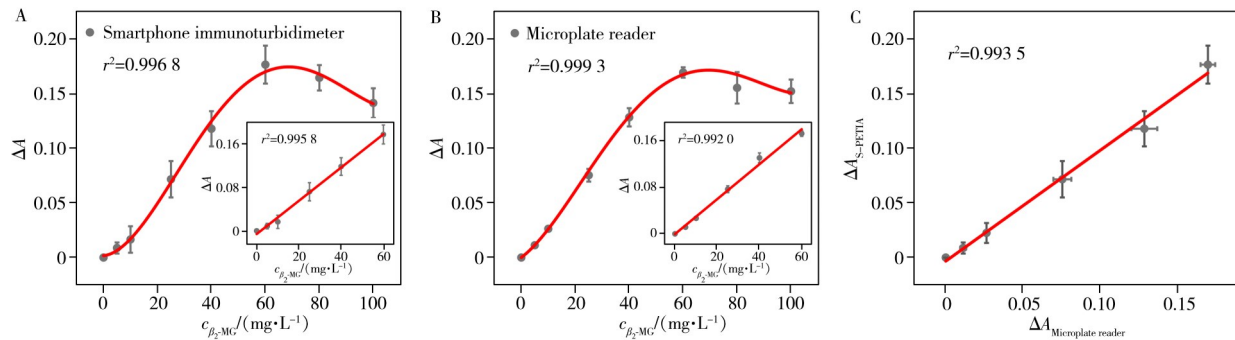


图9 智能手机免疫比浊仪(A)和酶标仪(B)检测结果及相关性分析(C)

Fig. 9 Test results of smartphone immunoturbidimeter(A) and microplate reader(B) and correlation analysis(C)

3 结论

本研究基于胶乳增强免疫比浊法, 结合智能手机检测平台, 成功实现了糖尿病肾病标志物 β_2 -MG的快速定量检测。实验结果表明, 自制胶乳增强免疫比浊试剂在0~60 mg/L范围内呈现良好的线性关系, 能够全面覆盖健康人群与糖尿病肾病患者血清中 β_2 -MG的浓度变化区间, 同时具备较高的检测准确性、良好的特异性, 以及批次间优良的稳定性与重复性。对比验证显示, 本研究制备的试剂与商品化试剂在检测结果上具有高度一致性, 并展现出更优的灵敏度; 智能手机免疫比浊仪与传统酶标仪的检测结果亦具有良好的相关性。该检测方法操作简便、响应快速、适用性广、成本低廉, 具备应用于基层医疗机构即时检测及家庭自我筛查的潜在价值。综上所述, 本研究为糖尿病肾病标志物 β_2 -MG的便携式快速检测提供了可靠的技术方案, 可为后续大规模临床样本验证及产品化应用转化提供重要的理论与实验支撑。

参考文献:

- [1] Thomas B. *Curr. Diabetes Rep.*, **2019**, 19(4): 18.
- [2] International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. [2026-01-16]. <https://diabetesatlas.org/>.
- [3] Zhao H S, Sun D, Wang S, Liu Y, Zhao X J, Tian W Q, Dou X H, Liu J L, Xu J Y, Peng L, Sun S R, Xia Y L, Xu X M, Wang C, Wang D, Zhao G H, Wang X, Weng H Z, Ding F Y, Xing P P, Zhang F Y, Liu S Y, Yan W J, Tao L. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 7846.
- [4] De Vries J K, Levin A, Loud F, Adler A, Mayer G, Pena M J. *Diabetes Obes. Metab.*, **2018**, 20(S3): 24-29.
- [5] Ay E, Marakoğlu K, Kizmaz M, Ünlü A. *J. Clin. Lab. Anal.*, **2016**, 30(6): 972-977.
- [6] Liu H, Feng J G, Tang L L. *Front. Physiol.*, **2022**, 13: 1020443.
- [7] Winchester J F, Salsberg J A, Levin N W. *Adv. Ren. Replace. Ther.*, **2003**, 10(4): 279-309.
- [8] Tramonti G, Cipollini I, Annichiarico C, Lorusso P, Panicucci E, Mariani G, Barsotti G. *J. Nephrol.*, **2012**, 25(6): 976-982.
- [9] Herrero-Morín J D, Málaga S, Fernández N, Rey C, Diéguez M A, Solís G, Concha A, Medina A. *Crit. Care*, **2007**, 11(3): R59.
- [10] Floege J, Bartsch A, Schulze M, Shaldon S, Koch K M, Smeby L C. *J. Lab. Clin. Med.*, **1991**, 118(2): 153-165.
- [11] Argyropoulos C P, Chen S S, Ng Y H, Roumelioti M E, Shaffi K, Singh P P, Tzamaloukas A H. *Front. Med.*, **2017**, 4: 73.
- [12] Inker L A, Tighiouart H, Coresh J, Foster M C, Anderson A H, Beck G J, Contreras G, Greene T, Karger A B, Kusek J W, Lash J, Lewis J, Schelling J R, Navaneethan S D, Sondheimer J, Shafi T, Levey A S. *Am. J. Kidney Dis.*, **2016**, 67(1): 40-48.
- [13] Shafi T, Michels W M, Levey A S, Inker L A, Dekker F W, Krediet R T, Hoekstra T, Schwartz G J, Eckfeldt J H, Coresh J. *Kidney Int.*, **2016**, 89(5): 1099-1110.
- [14] Le T N, Chen H Y, Lam X M, Wang C C, Chang H C. *Anal. Chem.*, **2023**, 95(32): 12080-12088.
- [15] Tugirimana P L, De Clercq D, Holderbeke A L, Kint J A, De Cooman L, Deprez P, Delanghe J R. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2011**, 23(2): 308-311.
- [16] Conde-Sánchez M, Roldán-Fontana E, Chueca-Porcuna N, Pardo S, Porrás-Gracia J. *Clin. Biochem.*, **2010**, 43(10/11): 921-925.

- [17] Seegmiller J C, Sviridov D, Larson T S, Borland T M, Hortin G L, Lieske J C. *Clin. Chem.*, **2009**, 55(11): 1991–1994.
- [18] Tugirimana P L, Holderbeke A L, Kint J A, Delanghe J R. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2009**, 47(11): 1417–1422.
- [19] Yamashita K, Takebayashi S, Murata W, Hirai N, Ito Y, Mitsui M, Saito M, Sato K, Terada M, Niizeki N, Suzuki A, Ogitani K, Fujikawa T, Komori M, Inoue N, Arai N, Maekawa M. *Diagnostics*, **2023**, 13(18): 2935.
- [20] Jindakaew J, Kaewsaneha C, Ratanatawanate C, Lebaz N, Suwannin P, Zine N, Opaprakasit P, Elaissari A. *Colloids Surf. A*, **2024**, 685: 133108.
- [21] Bargnoux A S, Barrot A, Fesler P, Kuster N, Badiou S, Dupuy A M, Ribstein J, Cristol J P. *Clin. Biochem.*, **2014**, 47(16/17): 250–253.
- [22] Makris K, Stefani D, Makri E, Panagou I, Lagiou M, Sarli A, Lelekis M, Kroupis C. *Clin. Biochem.*, **2015**, 48(18): 1291–1297.
- [23] Yang X, Shu W X, Wang Y Q, Gong Y, Gong C Y, Chen Q S, Tan X T, Peng G D, Fan X D, Rao Y J. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 131: 60–66.
- [24] Taron W, Phooplub K, Sanchimplee S, Piyanamvanich K, Jammongkan W, Techasen A, Phetcharaburanin J, Klanrit P, Namwat N, Khuntikeo N, Boonmars T, Sithithaworn P, Ouiganon S, Kanatharana P, Thavarungkul P, Buranachai C, Loilome W, Ngeontae W. *Sens. Actuators B*, **2021**, 348: 130705.
- [25] Liang M Q, Wang Z H, Liu Y, Dong C, Gong X J. *J. Instrum. Anal.* (梁美琪, 王子涵, 刘洋, 董川, 弓晓娟. 分析测试学报), **2024**, 43(1): 182–190.
- [26] Mesas Gómez M, Julián E, Armengou L, Pividori M I. *Talanta*, **2024**, 275: 126106.
- [27] Liu M Y, Li S P, Zhao J. *J. Instrum. Anal.* (刘美廷, 李绍平, 赵静. 分析测试学报), **2021**, 40(5): 777–784.
- [28] Lee K C, Lee K, Jung J, Lee S H, Kim D, Lee S A. *ACS Photonics*, **2021**, 8(5): 1307–1315.
- [29] Tamiya E, Osaki S, Nagai H. *Biosens. Bioelectron.*, **2024**, 252: 116083.
- [30] Dutta S. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2019**, 110: 393–400.
- [31] Wang T T, Guo K, Hu X M, Liang J, Li X D, Zhang Z F, Xie J. *Chemosensors*, **2020**, 8(1): 10.
- [32] Zhao L, Dong B Y, Li W, Zhang H F, Zheng Y S, Tang C, Hu B, Yuan S F. *IEEE Sens. J.*, **2021**, 21(4): 4451–4461.
- [33] Zhou P. *Rapid Detection Technology for Acute Myocardial Infarction Markers Based on Smartphone Immunoturbidimetry*. Shanxi: Taiyuan University of Technology (周鹏. 基于智能手机免疫比浊法的急性心肌梗死标志物快速检测技术. 山西: 太原理工大学), **2022**.

(责任编辑: 盛文彦)