

胶体金免疫层析法快速检测尿液中可替宁

Rapid detection of cotinine in urines by colloidal gold immunochromatography

董俊敏^{1,4}, 刘 龙^{2,4},
郝晓花^{1,4}, 张 曼^{3,4,5}

(1. 首都医科大学 附属北京世纪坛医院 药物 I 期临床试验研究室, 北京 100038; 2. 首都医科大学 附属北京世纪坛医院 体检中心, 北京 100038; 3. 首都医科大学 附属北京世纪坛医院 临床检验医学中心, 北京 100038; 4. 北京大学 第九临床医学院, 北京 100038; 5. 北京市泌尿细胞分子诊断重点实验室, 北京 100038)

DONG Jun-min^{1,4}, LIU Long^{2,4},
HAO Xiao-hua^{1,4}, ZHANG Man^{3,4,5}

(1. Phase I Clinical Trial Center, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Medical Examination Center, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 3. Clinical Laboratory Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 4. Peking University Ninth School of Clinical Medicine, Beijing 100038, China; 5. Beijing Key Laboratory of Urinary Cellular Molecular Diagnostics, Beijing 100038, China)

基金项目: 首都医科大学附属北京世纪坛医院
青年基金资助项目 (2023-q07);
首都医科大学附属北京世纪坛医院
实验室开放课题专项基金资助项目
(2020-KF16)

作者简介: 董俊敏 (1994-), 女, 助理研究员,
主要从事药物临床试验与质量管理
工作

通信作者: 张曼, 主任医师, 教授

Tel: (010)63926389

E-mail: zhangman@bjsjth.cn

摘要:目的 建立尿液中可替宁的胶体金免疫层析快速检测方法。方法 制备金标抗体探针, 对 pH 值和抗体标记量 (COT-Mab) 进行优化。然后优化检测 (T) 线可替宁抗体 (COT-BSA) 的包被浓度、对照 (C) 线羊抗鼠免疫球蛋白 (IgG) 的包被浓度, 组装胶体金免疫层析试纸, 最后评价试纸条的敏感性。**结果** 本研究建立的胶体金免疫层析试纸条最优条件是: pH 值为 6.5、COT-Mab 浓度为 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、COT-BSA 浓度为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、羊抗鼠 IgG 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其视觉检测限和截断值分别为 0.01 和 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 15 分钟内, 该试纸条能够对尿液中的可替宁进行定性分析。**结论** 该方法具有良好的特异性和准确性, 操作方便, 重现性极佳。可用于药物临床试验期间吸烟者和非吸烟者的现场检测和快速的初步筛查。

关键词: 可替宁; 胶体金免疫层析法; 尿液; 定性检测

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.24.012

中图分类号: R969 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)24-3524-06

Abstract: **Objective** To establish a colloidal gold immunochromatographic method for the rapid detection of cotinine in urines. **Methods** To prepare the colloidal gold-labeled antibody probe, optimization of the pH value and the amount of antibody labeling (COT-Mab) was carried out. Following this, the coating concentrations of the cotinine antibody (COT-BSA) for the test (T) line and the sheep anti-mouse immunoglobulin G (IgG) for the control (C) line were also optimized. Subsequently, a colloidal gold immunochromatographic strip was assembled. Finally, the sensitivity of the strip was evaluated. **Results** The optimal conditions established for the colloidal gold immunochromatographic strip were as followings, pH value of 6.5, COT-Mab concentration of $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, COT-BSA concentration of $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and sheep anti-mouse IgG concentration of $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The visual detection limit and the cut-off value were 0.01 and $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Within 15 minutes, this method enabled qualitative analysis of cotinine in urines. **Conclusion** The method has good specificity and accuracy, as well as convenient operation and excellent reproducibility, which can be used for on-site detection and rapid initial screening of smokers and non-smokers during drug clinical trials.

Key words: cotinine; colloidal gold immunochromatographic assay; urine; qualitative detection

烟草是导致死亡的主要原因之一,每年有超过800万人死于直接或间接吸烟^[1]。香烟烟雾中的多环芳烃等成分可以影响药物代谢、干扰临床疗效,因此,药物临床试验中精准评估参与者吸烟状况对控制试验质量至关重要^[2]。目前,吸烟行为的评估多依赖于参与者的自我报告,存在准确性不足的局限^[3],亟需通过体液中生物标志物实现简单可靠的定性二分法。尼古丁作为烟草主要成瘾物质,其代谢产物可替宁半衰期长达18~22 h,能反映3~4 d内的烟草暴露情况。可替宁主要存在于血液中,并在代谢过程中通过尿液排出^[4],已成为临床诊断、预防医学和其他领域评估烟草暴露水平和频率的首选生物标志物^[5]。

目前,已经建立了几种检测可替宁的仪器方法,如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[6]、液质联用法(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)^[7]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[8]、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[9]。这些方法虽具备高灵敏度和准确定量优势,且部分小型化设备可以用于现场侦检,但仍需专业操作人员及配套实验室条件,难以适配临床研究中大规模参与者吸烟状况的快速定性筛查需求。相比之下,免疫测定技术中,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[10]虽在操作流程和成本控制上不具备显著优势,但免疫层析技术,尤其胶体金免疫层析法作为典型的即时检测(point-of-care testing, POCT)方法,兼具操作简单、检测快速、成本可控、无需复杂设备等突出特点^[11]。本研究基于胶体金免疫层析法建立尿液中可替宁的快速检测方法,可以用肉眼快速估计检测到的信号,为药物临床试验中吸烟者和非吸烟者的快速初步筛查提供理论依据。

材料与方法

1 材料

试剂 氯金酸(HAuCl_4),规格:每瓶10 g,纯度:基于痕量金属的纯度 $\geq 99.99\%$,批号:20210226,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司生产;羊抗小鼠免疫球蛋白G(immunoglobulin, IgG),规格:100 mg,含量:以抗体计 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:20210616,洛阳佰奥通实验材料中心生产;磷酸盐缓冲液干粉,规格:每包2 L,纯度:100%,批号:No. 5130021,杭州索莱尔博奥

生物技术有限公司生产;磷酸氢二钠,规格:每瓶500 g,纯度:99%,批号:20201112、磷酸二氢钠,规格:每瓶500 g,纯度:99%,批号:20200207,均由国药集团化学试剂有限公司生产;胎牛血清,规格:每瓶500 mL,纯度:FBS级别,批号:EZ3416D317,苏州依科赛生物科技股份有限公司生产;人工尿液,规格:500 mL,批号:20200521 北京索莱宝科技有限公司生产。

仪器 HM3235 三维划膜喷金仪,上海金标生物科技有限公司产品;1-14 小型台式高速离心机,德国sigma 有限公司产品;DHG-9123A 烘箱,上海齐欣科学仪器有限公司产品;ZQ2002 微电脑自动斩切机,上海金标生物科技有限公司产品;ER-660E除湿机,广东多乐信电器有限公司产品;创伍特900封口机,温州博时包装机械有限公司产品。

2 实验方法

2.1 胶体金的制备

胶体金颗粒是使用柠檬酸三钠还原法合成得到^[12]。将0.01%氯金酸溶液50 mL(w/v)持续搅拌加热至沸腾,然后立即加入1%柠檬酸三钠(w/v)溶液2.0 mL,继续煮沸15 min,在此过程中,溶液的颜色变为酒红色。酒红色液体代表胶体金溶液。在室温下冷却后,终产物在4℃下储存以备使用。通过紫外分光光度计扫描确定胶体金的最大吸收峰,透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)检测胶体金颗粒的粒径和分散性。

2.2 金标抗体探针的制备

胶体金免疫层析试纸是一种利用免疫试剂与靶标之间的竞争性反应来快速定位目标物的方法。胶体金-单克隆抗体(colloidal gold-monoclonal antibody, CG-Mab)偶联物作为识别元素,在试纸条的功能中扮演了至关重要的角色。文献表明,pH值和Mab浓度会影响CG-Mab偶联物的合成^[13]。在此,用 K_2CO_3 溶液来调节不同的pH值(6.5、7.4、8.5),用含有0或200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可替宁溶液对试纸条进行评估(下同)。同时用不同浓度的可替宁单克隆抗体(cotinine monoclonal antibody, COT-Mab)(10.00、20.00、30.00和40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)来合成CG-Mab偶联物。合成步骤如下^[14]:在磁力搅拌下,用0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液2 mL的pH值。滴加纯化的COT-Mab(0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)并搅拌30 min,以确保充分混合。沉淀10 min后,加入10%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液(w/v),使最终质量分数达到1%,并堵塞任何游离

的胶体金颗粒。温育 30 min 后,将混合物以 12 000 rpm 下离心 30 min。用悬浮缓冲液洗涤该产物 3 次后于 4 ℃ 下储存。

2.3 胶体金免疫层析试纸条的制备

完整的胶体金免疫层析试纸条由 5 个部分组成:聚氯乙烯(polyvinyl chloride,PVC)背板、吸收垫、硝化纤维(nitrocellulose,NC)膜、金标垫和样品垫,见图 1。首先将 NC 膜附着在 PVC 背板的中间,使用划膜仪将 COT-BSA 和羊抗鼠 IgG 作为测试(test,T)线 and 对照(control,C)线以 4 mm 的间隙喷涂到 NC 膜上,将膜在 37 ℃ 下干燥 24 h。然后将金标垫和吸水纸与 NC 膜重叠,在 PVC 背板的端部重叠 1~2 mm。金标垫放置在 T 线端附近,吸水纸放置在 C 线端附近。接下来将样品垫与金标垫重叠 1~2 mm,并粘附到 PVC 背板上。最后使用条切割器将组装好的 PVC 背板切成 4.0 mm×60.0 mm 的试纸条,在 37℃ 的干燥箱中干燥 2 h,并密封储存。

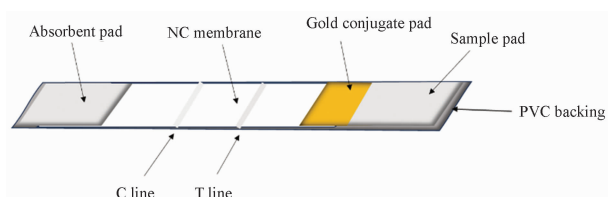


图 1 胶体金免疫层析试纸条示意图

Figure 1 Schematic diagram of colloidal gold immunochromatographic test strip

NC: Nitrocellulose; PVC: Polyvinyl chloride; C: Control; T: Test.

2.4 实验程序

将胶体金免疫探针 1 μL 涂布在金标垫上,并将其干燥储存以备使用。在进行测试时,向样品垫滴加待测样品溶液 60 μL 或不同浓度的可替宁标准溶液。待 15 min 后,通过肉眼观察试纸条上的结果,见图 2。

胶体金免疫层析试纸条的原理是基于靶分子与 CG-Mab 固定的抗原之间的竞争反应。可替宁作为小分子半抗原,虽自身无免疫原性,但在免疫制备抗体过程中已通过化学偶联方式与载体蛋白 BSA 结合形成完全抗原,刺激机体免疫系统产生能够特异性识别可替宁分子独特化学结构的抗体。如果试验溶液中不含可替宁,CG-Mab 会和 T 线上的固定抗原结合,形成可见的红色条带。同时,过量的金标抗体与固定在 C 线上的羊抗鼠 IgG 抗体结合,形成另一条可见的红色条带。当 T 线的颜色强度等于或比 C 线深时,结果为阴性。相反,如果试验溶液中存在可替宁,它会与金标抗体的抗原结合位点发生特异性相互作用

(包括氢键、疏水作用、范德华力等非共价键结合),形成可替宁-金标抗体免疫复合物,T 线的颜色变浅或不出现,而免疫复合物或过量的金标抗体与 C 线上的第二抗体结合,形成可见的红色条带。在这种情况下,T 线的颜色看起来较浅(比 C 线颜色浅)或保持无色,表明结果为阳性,见图 2。如果 C 线没有变红,则认为测试无效。

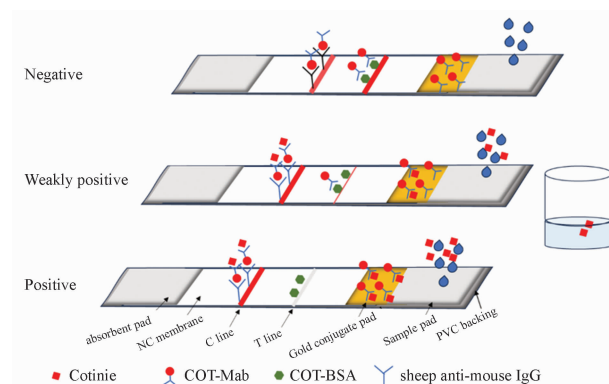


图 2 免疫层析试纸条阴性、弱阳性和阳性检测结果的示意图

Figure 2 Schematic illustration in negative, weakly positive, and positive sample

2.5 试纸条的优化

T 线最佳包被浓度的确定 将浓度为 0.100、0.125 和 0.167 mg·mL⁻¹的可替宁-牛血清白蛋白偶联物(cotinine-bovine serum albumin conjugate,COT-BSA)蛋白涂覆在 T 线位置。C 线涂有过量的羊抗鼠 IgG。将含有可替宁的阳性样品溶液加入样品垫中,以确定 T 线 COT-BSA 蛋白的最佳包被浓度。

C 线最佳包被浓度的确定 将测定的最佳浓度的 COT-BSA 蛋白涂在 T 线上,将不同比例稀释的羊抗鼠 IgG 抗体(浓度为 0.5、1.0 和 1.5 mg·mL⁻¹)涂在 C 线上。将含有可替宁的阳性样品加入样品垫中,以确定羊抗鼠 IgG 抗体在 C 线上的最佳包被浓度。

2.6 试纸条评价——灵敏度测试

在进行定性检测时,通过测量试纸条的截断值和最小可检测限(visual limit of detection, vLOD)来确定胶体金免疫层析试纸条的灵敏度。将可替宁用人工尿液稀释至终浓度为 0、0.010、0.025、0.100、0.200、0.500 和 1.000 μg·mL⁻¹,得到一系列可替宁标准溶液。将 60 μL 每种溶液涂在优化好的胶体金免疫层析试纸条的样品垫上。对于定性测定,结果是通过目视获得的,随着可替宁浓度的增加,T 线的颜色强度逐渐降低。在一定浓度下,T 线完全消失,表明该浓度为试纸条的最低检测限。

结 果

1 胶体金的鉴别

CG 的最大吸收峰出现在 $400 \sim 600 \text{ nm}$ 的波长处 ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$)。TEM 表征表明,胶体金颗粒均匀分散,没有聚集,平均粒径约为 20 nm 。

2 试纸条的优化

2.1 最佳 pH 值和抗体浓度的确定

在与胶体金结合之前,使用棋盘滴定法确定最佳 pH 值和抗体浓度,以获得最佳性能。结果显示,随着 pH 值的增加,T 线的颜色强度逐渐加深。当 pH 值为 6.5 时,达到了最佳的着色效果,见图 3A。

当 COT - Mab 浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,T 线和 C 线均显示出较弱的颜色强度。在 30 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下,试纸条的判断阈值提高。而当浓度为 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,不含可替宁的试纸条 T 线和 C 线均表现出更强的颜色强度,同时含可替宁的试纸条的检测敏感性得到增强,因此抗体浓度最终选为 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,见图 3B。

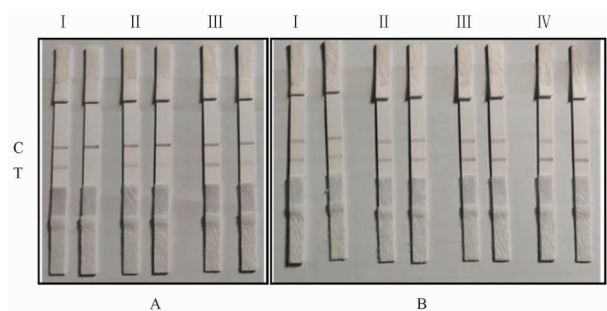


图 3 胶体金免疫层析试纸条 pH 值和抗体浓度的优化

Figure 3 Optimization pH and antibody concentration of the colloidal gold immunochromatography strip.

A: Different pH values for the reaction system; A I: 6.5; A II: 7.4; A III: 8.5; B: The dosage of the COT - Mab used for the reaction system; B I: $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; B II: $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; B III: $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; B IV: $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.2 T 线和 C 线最佳包被浓度的确定

为提高胶体金免疫层析试纸条的性能,我们对 T 线和 C 线的最佳包被浓度进行了优化。最佳浓度的确认是根据阳性和阴性样本之间的明确区别以及涂层抗原的最低消耗量。在 T 线上喷洒不同浓度的 COT - BSA ($0.100, 0.125, 0.167 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。当包被抗原浓度为 $0.167 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,可以在 T 线观察到明显的红线。当包被抗原浓度为 0.100 和 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

时,T 线的颜色强度较弱。另外,在 $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的包被抗原浓度下,阳性和阴性样本的颜色强度存在显著差异。相较于阴性样本,阳性样本在 T 线上显示的颜色强度较低,说明在 $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包被抗原的条件下能够实现更高的检测灵敏度。因此,我们选定 $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度来构建试纸条上的 T 线,见图 4A。

同时,我们也对 C 线上羊抗鼠 IgG ($0.50, 1.00$ 和 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的浓度进行了优化。当羊抗鼠 IgG 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,试纸条显示出最优的灵敏度和显色效果。综上,我们开发的胶体金免疫层析试纸条最优条件是: pH 值为 6.5、COT - Mab 浓度为 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、COT - BSA 浓度为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、羊抗鼠 IgG 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,见图 4B。

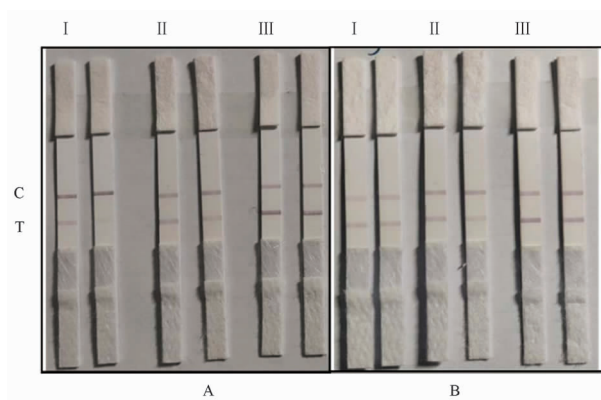


图 4 胶体金免疫层析试纸条包被浓度的优化

Figure 4 Optimization of coating concentrations of the colloidal gold immunochromatography strip

A: Strips sprayed with COT - BSA of T lines at different concentrations; I: $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; II: $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; III: $0.167 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. B: Strips sprayed with goat anti - mouse IgG of C lines at different concentrations; I: $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; II: $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; (3) $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3 试纸条评价——灵敏度测试

人工尿液样本中的视觉检测限 (visual limit of detection, vLOD) 为 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着可替宁浓度的增加,T 线的颜色强度逐渐减弱。当可替宁浓度达到 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,T 线的颜色完全消失,表明该试纸条的截断值为 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此,当可替宁浓度大于 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,检测样品被视为阳性 (+);当可替宁的浓度在 0.01 至 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时,检测样品被认为是弱阳性 (±),当可替宁浓度低于 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,检测样品则被认为是阴性 (-),见图 5。

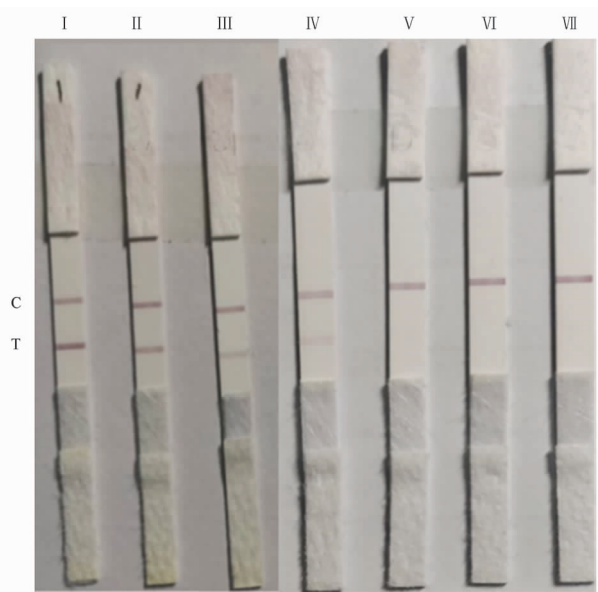


图5 可替宁的检测限

Figure 5 Limit of detection of cotinine

I : 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; II : 0.010 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; III : 0.025 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; IV : 0.100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; V : 0.200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; VI : 0.500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; VII : 1.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

讨 论

自国家食品药品监督管理总局启动药物临床试验数据自查核查工作以来,对临床试验的质量管控与数据真实性要求不断提高,烟草暴露筛查已成为众多药物临床试验的关键筛选指标,尤其对尼古丁易干扰药理学、药效学的抗凝药、抗心律失常药等而言^[15],精准筛查受试者烟草暴露状态是保障试验数据可靠的关键。目前,临床试验中仍普遍通过受试者问卷填写或口头陈述等形式自我报告吸烟史、吸烟状态等信息,可能会导致评估吸烟状况的结果不准确。尼古丁作为烟草中诱导成瘾的核心活性成分,进入人体后会在肝脏细胞色素氧化酶的催化作用下快速代谢,其主要代谢产物可替宁具有显著的理化稳定性,半衰期长,使其能够有效规避尼古丁短期代谢带来的检测窗口期局限,精准反映受试者近3~4 d内的累计烟草暴露情况。约70%~80%的可替宁会以原型或结合态形式通过尿液排出体外。尿液样品采集方便,对受试者侵害性小,是研究中非常理想的生物样品^[16]。

本研究针对药物临床试验中烟草暴露快速定性筛查的现实需求,成功构建了基于胶体金免疫层析技术检测尿液可替宁的试纸条。从检测性能来看,本方法的视觉检测下限达0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,截断值为

0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,显著优于临床烟草暴露判定关键阈值。文献确立尿液可替宁浓度 $\geq 0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为区分吸烟者与非吸烟者的核心阈值^[17-18],本试纸条vLOD较该阈值低5倍,表明其具备更高的灵敏度,可以有效捕获低浓度可替宁样本。从技术设计来看,通过优化NC膜上T线(0.10 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ COT-BSA)与C线(1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 羊抗鼠IgG)的包被浓度,结合胶体金标记的可替宁单克隆抗体探针,形成了高效的竞争抑制免疫反应体系,整个检测过程无需复杂前处理,仅需滴加尿液样本即可在15 min内获得结果,满足药物临床试验中“现场快速筛查”的需求。与近年来国外研究相比也有一定的优势,KONZIWI等开发的可替宁侧流免疫分析试纸,检测15 min,肉眼观察检出限仅达0.15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[19],而本试纸条的vLOD较其低15倍,在保障检测效率的同时,进一步提升了对低浓度样本的检出能力。从应用前景来看,该试纸条不仅可以直接用于药物临床试验中的吸烟状态初筛,还可以拓展至戒烟干预效果评估、职业人群烟草暴露监测、青少年吸烟行为筛查等领域,尤其在基层医疗机构、社区卫生服务中心等缺乏大型仪器的场景中具有广阔推广价值。

但本研究仍存在一定局限性。与ELISA法相比^[10],该试纸条仅能通过肉眼观察T线颜色深浅实现烟草暴露状态的定性判定(如阳性/阴性),无法直接提供尿液中可替宁的定量数值。同时该试纸条尚未开展在复杂尿液样本中干扰物质的抗干扰研究,无法充分证实其在各类人群及环境中的适用性与稳定性。未来研究可以进一步优化抗体标记工艺与反应体系,提升对复杂尿液样本中干扰物质的抗干扰能力;同时可开发多指标联合检测试纸条,将可替宁与其他烟草暴露生物标志物结合,进一步提高检测准确性;此外,通过规模化生产降低成本,推动产品的商品化转化,有望为烟草相关研究与临床实践提供更便捷、高效的检测工具。

综上,本研究建立了一种灵敏度高、操作简便、成本可控的可替宁快速检测方法,为药物临床试验中烟草暴露的精准评估提供了新的技术方案,也为烟草危害防控领域的现场筛查技术发展提供了参考。

参考文献:

- [1] CHEN Q, ZHANG C, ZHONG F, *et al.* Global burden of disease related to tobacco products and trends projected: 1990–2021[J/OL]. *Addict Behav*, 2025, 69: 108391. 2025–05–24 [2025–11–01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40414139/>.
- [2] SOLEIMANI F, DOBARADARAN S, DE-LA-TORRE G E,

- et al.* Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review [J/OL]. *Sci Total Environ*, 2022, 813: 152667. 2021 - 12 - 25 [2025 - 11 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34963586/>.
- [3] HEO H C, BYUN Y S, SOHN S H, *et al.* Validity assessment of self - reported smoking status in firefighters using the urine cotinine test [J/OL]. *Ann Occup Environ Med*, 2020, 32: e2. 2020 - 01 - 02 [2025 - 11 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32082584/>.
- [4] KIM J, LEE S. Daily cigarette consumption and urine cotinine level between dual users of electronic and conventional cigarettes, and cigarette - only users [J]. *J Psychoactive Drugs*, 2020, 52 (1): 20—26.
- [5] ANIC G M, ROSTRON B L, HAMMAD H T. Changes in biomarkers of tobacco exposure among cigarette smokers transitioning to ENDS use: The population assessment of tobacco and health study, 2013 - 2015 [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19 (3): 1462.
- [6] SHAIK F B, NAGAJOTHI G, SWARNALATHA K, *et al.* Quantification of nicotine and cotinine in plasma, saliva, and urine by HPLC method in chewing tobacco users [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019, 20 (12): 3617—3623.
- [7] 杨明岐, 袁悦, 任建伟, 等. 同位素稀释 - 亲水作用色谱串联质谱快速测定尿液中 8 - 羟基脱氧鸟苷和可替宁的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51 (1): 74—80.
- [8] 陆强. 人群尿液可替宁快速检测方法的建立及初步应用 [D]. 江苏 南京: 东南大学, 2021.
- [9] 朱敏琦, 于进, 王毅超. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定尿中可替宁. *中国卫生检验杂志*. 2021, 31 (17): 2070—2072.
- [10] 雷雅静, 周丽芳, 王安行, 等. 替宁单克隆抗体的制备及其在免疫学检测中的应用 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49 (6): 765—771.
- [11] 刘畅, 杨琳燕, 王艺霞, 等. 免疫层析技术研究及应用 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42 (2): 117—121.
- [12] WANG P, XU X, LIU L, *et al.* A colloidal gold immunochromatography for the detection of flumioxazin residues in fruits [J]. *J Food Sci*, 2022, 87 (10): 4538—4545.
- [13] GUO L, WU X, CUI G, *et al.* Colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of carbadox and cyadox in chicken breast [J]. *ACS Omega*, 2020, 5 (3): 1422—1429.
- [14] WANG Z, WU X, LIU L, *et al.* An immunochromatographic strip sensor for sildenafil and its analogues [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7 (41): 6383—6389.
- [15] 张冬林, 邓春玲, 朱瑜, 等. 药物 I 期临床试验中烟碱筛查高阳性率的分析 [J]. *中国新药与临床杂志*. 2017, 36 (12): 708—711.
- [16] 周睿, 胡江玲, 汪生, 等. 生物样本中可替宁检测技术的研究进展 [J]. *安徽医学*. 2023, 44 (12): 1525—1530.
- [17] PACI E, PIGINI D, BAULEO L, *et al.* Urinary cotinine concentration and self - reported smoking status in 1075 subjects living in central Italy [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15 (4): 804.
- [18] AL - SALEH I, COSKUN S, AL - ROUQI R, *et al.* Oxidative stress and DNA damage status in couples undergoing *in vitro* fertilization treatment [J]. *Reprod Fertil*, 2021, 2 (2): 117—139.
- [19] KONZI W S, TUNAKHUN P, NGERNPIMAI S, *et al.* Development in competitive immunoassay of a point - of - care testing for cotinine (COT) detection in urine [J]. *Anal Methods*, 2024, 16 (26): 4387—4394.

(收稿日期 2025 - 11 - 01)

· 科学文摘 ·

基于结构引导设计的合成胆汁酸可抑制艰难梭菌 TcdB 毒素

引自: MILETIC S, ICHO S, LI Z, *et al.* Structure - guided design of a synthetic bile acid that inhibits *Clostridioides difficile* TcdB toxin. *Nat Microbiol*, 2025, 10 (12): 3215—3228.

肠道胆汁酸是一类宿主与微生物代谢产物, 可直接抑制艰难梭菌的主要毒力因子——毒素 B (toxin B, TcdB), 该毒素是导致感染性腹泻和结肠炎的关键物质。然而, 其抑制机制尚不明确。本研究通过冷冻电镜技术, 分别以 2.9 Å 和 3.3 Å 分辨率解析了 TcdB 与抑制性胆汁酸胆酸(甲酯)及牛磺鹅去氧胆酸结合的结构。这些结构显示, 胆汁酸能将 TcdB 的 C 末端 CROP 结构域锁定在一种构象中, 通过变构效应掩盖其两个受体结合位点, 从而阻止靶细胞识别。基于结构引导, 本研究合成了肠道限制性胆汁酸衍生物, 旨在规避肠道内的胆汁酸重吸收转运蛋白。其中一种衍生物 sBA - 2 在口服给药后能保留在肠道内, 并保护小鼠免受毒素诱导的艰难梭菌疾病病理损伤。综上: 本研究揭示了胆汁酸及其类似物抑制 TcdB 的结构基础, 为开发口服给药的抗艰难梭菌疗法奠定了基础。