

等离子体纳米生物传感器的发展及其在病原微生物检测中的研究进展

李雪萌 (广东医科大学基础医学院, 广东东莞 523808)



专家简介: 李雪萌, 博士, 教授, 硕士/博士生导师, 广东医科大学高层次人才引进人才, 曾任赫尔辛基大学(芬兰)医学院访问学者、中山大学生物医学工程学院特聘副研究员; 主要从事生物医学传感及医学检测的相关研究, 具体包括: (1) 新型生物医学传感器及微纳芯片检测, 尤其是在生物医学标志物及病原生物学检测中的应用研究; (2) 肠道菌群的分析及益生菌分离培养。主持省市级研究项目 4 项, 发表SCI 论文 12 篇, 其中以第一作者或通信作者在《Advanced Material》、《Analytical Chemistry》和《Sensors And Actuators B-Chemical》等期刊发表论文 8 篇; 授权专利 2 项, 申请专利 2 项。E-mail: lixuemeng@gdmu.edu.cn

摘要: 等离子体纳米生物传感器是一种基于金属纳米粒子的局域表面等离子体共振效应(LSPR)的光学生物传感器。该文介绍了等离子体纳米生物传感器的光学原理和常见检测体系, 重点关注了这类生物传感器在病原微生物检测中的应用, 讨论了这类生物传感器的优化策略, 并对未来发展与应用提出展望。

关键词: 等离子体; 生物传感器; 局域表面等离子体共振; 病原体; 病毒; 细菌

中图分类号: R 37; TP 212.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610 (2022) 03-0250-09

Development of plasmonic nanobiosensors and their advances in pathogen detection

LI Xue-meng (School of Basic Medical Science, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Plasmonic nanobiosensors are a kind of optical biosensor based on metal nanoparticles with the principle of localized surface plasmon resonance (LSPR). In this paper, we introduce the optical principle and detection system of the plasmonic biosensors and specially pay attention to the application of LSPR biosensors in the pathogen detection. The article discusses the possible optimization strategies for LSPR biosensors, and prospects the future development and application.

Key words: plasma; nanobiosensors; localized surface plasmon resonance; pathogen; virus; bacteria

自 1962 年首个生物传感器诞生以来,越来越多的研究者开发出了各式各样的生物传感器,并应用于医学、食品、环境以及农业等不同的领域^[1-4]。随着科学技术的发展,纳米技术被引入生物传感器中,构建了更灵敏、更稳定和更具生物相容性的纳米生物传感器。其中,等离子体纳米生物传感器是一种基于金属纳米粒子的局域表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)效应所构建的光学生物传感器^[5]。作为一种新型传感器,等离子体纳米生物传感器在医学、生物工程以及食品安全等领域展现出了广泛的应用性^[6-7]。在所有等离子体纳米粒子中,金纳米粒子(Au

nanoparticle, AuNP)和银纳米粒子(Ag nanoparticle, AgNP)已广泛用于LSPR生物传感中^[8]。因此,本文将从等离子体纳米生物传感器的光学原理、常见检测体系、基于AuNP和AgNP的LSPR生物传感器在不同病原体检测中的应用以及优化策略等方面展开介绍。

1 等离子体纳米生物传感器的LSPR光学原理

1857年,英国科学家Michael Faraday在两相系统中用溶解在二硫化碳中的磷和氯金酸水溶液制造出了一种红宝石色的“细颗粒悬浮液”,这种悬浮液的颜色与细颗粒对应的大块物的颜色(金黄色)完全不同^[9]。直到1908年,德国物理学家Gustav Mie解释产

收稿日期: 2022-06-07

基金项目: 广东医科大学高层次人才科研启动经费(4SG22187G), 2021年广东医科大学“冲补强”建设二级项目(4SG21279P), 广东省自然科学基金项目(2021A1515011403)

生这种“细颗粒悬浮液”光学改变的原因是由于样本中包含的AuNP对光进行了吸收和散射^[10]。当光的平面波入射到一个小金属粒子上时,电磁场会因为金属和周围环境之间的介电常数/折射率(refractive index, RI)的改变而遭受干扰。金属的特性是存在自由电子,这些自由电子能够与入射的振荡电磁场作协同振荡。当一定波长的光源入射到金属纳米粒子上时,如果入射光子频率与金属纳米粒子的整体振动频率相匹配,金属纳米粒子此时就会对光子能量产生很强的吸收作用,在光谱上表现出强共振吸收峰,从而产生LSPR现象^[11-14]。

LSPR峰的位置不仅与金属纳米粒子的种类、大小及形状有关,而且还受到周围介质的影响^[15]。不同的介质具有不同的RI,基于金属纳米粒子的LSPR传感器能够灵敏地检测出金属表面附近RI的变化并转换为光谱位移,当待检测物被LSPR传感器特异性识别并偶联后,会引起纳米等离子体的RI变化,进而引发LSPR峰位移^[16-18]。近年来,这种源于光与物质相互作用的纳米生物传感器已被广泛应用。一方面,LSPR传感器比传播型表面等离子体共振传感器更适合测量纳米结构周围短距离的变化^[19];另一方面,相比其他需要特定化学元素标记的传感检测方法,如酶联免疫吸附法(ELISA)、蛋白质印迹(Western Blot)、电化学法和化学发光法等,LSPR传感器具有高灵敏度、无标记和实时测量的优点,是一项拥有广阔前景的技术^[20-23]。

2 常见的等离子体纳米生物传感检测体系

等离子体纳米生物传感器通常由两个部分组成:信号识别系统与信号转换系统,其中信号识别系统是指针对待检测的生物分子的特异性识别体系。常见的特异性识别检测体系有:抗原-抗体检测体系、核酸检测体系、酶相关的检测体系;其中,酶相关的检测体系中的CRISPR/Cas检测体系近年来备受关注。

2.1 抗原-抗体检测体系

抗原-抗体检测体系是在生物领域中被广泛应用的检测体系,传统的分析手段是基于免疫测定的方法,包括ELISA、Western Blot等;但由于样本预处理流程的繁琐以及样品标记的复杂,这些方法仍然存在局限性^[24]。基于抗原-抗体检测体系的等离子体纳米生物传感器,在简化步骤的同时保证了极高的灵敏度^[25-28]。我们曾利用AuNP与荧光量子点偶联,通过抗体对肝癌标志物甲胎蛋白实现了快速的检测,检测限(LOD)

低至 $1.44\text{ }\mu\text{g/L}$ ^[29]。Vakili等^[30]将从羊布鲁菌和牛布鲁菌中提取出的脂多糖(LPS)作为抗原固定在AuNP的表面,用于检测人血清中抗布鲁菌抗体,阳性预测值高达100%;相比传统的标准试管凝集试验和ELISA,基于LSPR的检测策略能够出色地区分感染者和未感染者。此外,基于抗原-抗体检测体系的等离子体纳米生物传感器可通过将抗体或抗原物理或者化学吸附与纳米等离子体偶联,其成功应用需要开发稳固可靠的表面修饰方法,以确保其具备较高的选择性、灵敏性和可重复性^[31]。将抗体固定在AuNP上,再将AuNP涂覆到石英、ITO玻璃或聚苯乙烯等平面基底表面,能够使基于LSPR峰位移的免疫传感器具备更高的敏感性和选择性^[32-34]。Yuan等^[35]通过将人附睾分泌蛋白4(HE4)抗体偶联在AgNP上制成探针,并通过将探针固定于玻璃基底上用于检测人血清中的HE4,LOD为 4 pmol/L ;相比于ELISA方法(HE4的LOD为 15 pmol/L),LSPR生物传感器表现出了良好的分析性能。其次,基于抗原-抗体的LSPR传感检测系统也可以实现对细胞内特定物质的检测。Park等^[24]设计了一个可在细胞内外检测TGF- β 的AuNP-抗体偶联LSPR传感器,实现了在细胞内外高选择性检测低浓度TGF- β ,LOD低至皮摩尔的范围内。

2.2 核酸检测体系

在过去的30 a内,等离子体纳米生物传感器在核酸检测中的应用不断增长;相比繁琐的、需要高昂设备的传统PCR检测过程,基于纳米等离子体的传感策略在光学信号下就可实现对核酸的直观检测,能够满足实际应用中对快速性、准确性和灵敏性等检测要求。通过与核酸探针偶联到LSPR纳米粒子上,可以将精度和准确度都提高到单个分子的层面来检测目的DNA或RNA^[19, 36-37]。如:Li等^[38]构建出一种AuNP-DNA探针实现了对结肠癌K-ras基因点突变的可视化检测;Yoo等^[39]利用多焦点AuNP阵列芯片实现了对角膜营养不良相关基因BIGH3点突变的高灵敏性检测。此外,基于DNA的自组装等离子体生物传感器系统还可以准确检测存在于外泌体(由细胞释放的30~100 nm囊泡)中的微量miRNA,如miR-125b、miR-15a和miR-361^[40]。这表明基于LSPR的无标记光学生物传感器是一个诊断DNA突变相关疾病的优势平台。

除了常规利用DNA探针检测互补配对的DNA或RNA片段,核酸还可以通过其他构象识别多种不同的待检物,如工程化的寡核苷酸、适配体及DNAzymes等。

(1) 工程化的寡核苷酸, 如锁核酸 (locked nucleic acid, LNA)、肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA), 它们与互补 ssDNA 结合的亲和力都高于 DNA, 可以提高核酸的检测效率^[41]。LNA 类似于 RNA, AuNP-LNA/DNA 嵌合探针的构建能与靶 ssDNA 形成非常短的 (7 bp) 杂交双链体^[42]。而 PNA 是一种 DNA 类似物, 由于缺乏电荷排斥使 PNA 和 DNA/RNA 之间有着更强的结合能力, 因此, 短至 6 个核苷酸的 AuNP-PNA 探针就能够有效地与 ssDNA 靶标实现杂交, 这是 AuNP-DNA 探针无法做到的^[43]。(2) 适配体 (ssDNA 或 ssRNA) 能够通过折叠形成的二级结构与特定的靶标 (小分子、蛋白质或细胞等) 选择性结合, 亲和力可以与抗体的亲和力相媲美。Chen 等^[44] 构建了凝血酶与适配体结合的二价适配体, 通过控制凝血酶诱导的纤维蛋白原-AuNP 的聚集来检测 DNA。(3) DNAzymes 是具有催化活性的短合成寡核苷酸分子, 自发现以来已被功能化用于开发各种特殊的传感器^[45]。Yu 等^[46] 利用基于 DNAzyme 的等离子体纳米传感系统相结合, 实现了在一个简单、廉价和无培养的过程中对大肠杆菌进行选择性的检测。

2.3 酶相关的检测体系

酶是一类极为重要的生物催化剂, 酶对底物具有高度特异性和高度催化效率; 因此也被广泛应用于生物传感的信号识别系统^[47-49]。酶相关的 LSPR 传感系统, 除了酶-底物识别检测体系, 还有酶介导纳米粒子生长的 LSPR 传感器; 除此以外, CRISPR-Cas 系统近年来也备受关注, 其相关的 LSPR 传感器也多有报道。

酶-底物识别检测体系是在 LSPR 传感器中最常见的检测体系; 利用酶自身活性, 在识别的底物过程中实现 LSPR 信号的识别。Martín-Barreiro 等^[50] 利用 L-氨基酸氧化酶能催化 L-苯丙氨酸氧化脱氨生成过氧化氢的原理, 设计了一款检测 L-苯丙氨酸浓度的 LSPR 传感器。L-氨基酸氧化酶和 L-苯丙氨酸能够在 Au(III) 的存在下发生反应并形成 AuNP, 而产生的 LSPR 强度与样品中 L-苯丙氨酸的浓度相关; 针对人血浆样品中 L-苯丙氨酸的 LOD 低至 22 $\mu\text{mol/L}$ 。鉴于此, 可开发一种 L-苯丙氨酸快速测定的方法以助于诊断苯丙氨酸代谢障碍性疾病, 如苯丙酮尿症。也有研究者通过抑制酶的活性构建了显影的 LSPR 传感器。Lin 等^[51] 应用自组装技术将乙酰胆碱酯酶共价偶联在 AuNP 上, 利用乙酰胆碱酯酶本身会受到有机磷农药 (如对氧磷) 特异的毒性抑制的原理, 通过乙酰胆碱的抑制程度和光衰减之间的相关性评估溶液中对氧磷的含量, 结果显示了获得最大抑制变化时的 LOD 为 0.234 ppb。

酶还可以通过介导纳米离子的生长, 进一步构建 LSPR 传感器^[52]。Tang 等^[53] 开发了一种基于酶控制的原位生长的 AuNP 生物传感器以用于对脂肪酶灵敏、简单和廉价的测定。脂肪酶的生物催化水解与 AuNP 的生长相关, Tween 80 羧酸酯键通过脂肪酶水解作用能够控制 AuNP 的成核速率, 进而影响 LSPR 效应, 实现溶液从紫色到红色的可视化改变^[53]。

近年来, 规律成簇间隔短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (Cas) 因为特殊的核酸酶活性备受关注^[54-55]。CRISPR-Cas 系统中常见的 Cas 蛋白, 包括 Cas9、Cas12 和 Cas13^[56-57]。CRISPR-Cas9 系统具有出色的 DNA 识别能力, 却不具有反式裂解活性, 但凭借其 DNA 识别能力已有研究者开发出了生物传感器^[58-59]。如, Wang 等^[60] 将 Cas9 介导的检测技术与偶联 DNA 的 AuNP 相结合建立了一种新的比色生物传感体系, 并成功应用于对李斯特菌和非洲猪瘟病毒的检测, 仅 1 h 内就可获得数百份基因组样本。而 Cas12、Cas13 和 Cas14 除了实现靶标核酸的顺式切割, 还具备附带的切割活性, 常用于核酸检测^[57]。以 CRISPR-Cas12 为例, 其在 sgRNA 的引导下识别靶标 dsDNA 并形成 Cas12-crRNA-dsDNA 复合物, 从而实现靶标双链 DNA (dsDNA) 的顺式切割; 同时也激活了任意单链 DNA (ssDNA) 的反式切割活性; 这些动作能够触发可检测信号的形成, 进而被开发成生物传感器^[61-63]。如, Cheng 等^[64] 开发了一种基于 CRISPR-Cas12a 和 AuNP 探针的比色编码系统, 实现了肉眼下端粒酶活性的快速检测, 促进了端粒酶靶向药物的发现和筛选。将 Cas12a 系统与 AuNP 的光学特性相结合, 开发出多种针对病原体的 LSPR 检测平台, 如检测 SARS-CoV-2^[65]、食品样品中的沙门菌^[66]。与 Cas12a 不同, Cas13 蛋白靶向的是 RNA 而不是 DNA。Cas13 包含 4 种不同的亚型 (Cas13a ~ Cas13d)。其中最著名的是 Cas13a (C2c2)^[67]。利用 Cas13a 切割与 AuNP 结合的 ssRNA, 能够实现对鼻咽拭子中 SARS-CoV-2 的可视化检测^[68]。新兴研究已经发现了一种 II 类最小核酸内切酶 Cas14^[69]。Cas14 效应蛋白特异性结合并切割的底物是 ssDNA。在基于 CRISPR 的生物传感系统中, Cas14 的检测仍处于起步阶段^[70]。但鉴于它有更特异性的方式靶向 ssDNA, 将有望于在未来与纳米等离子体联合开发成新的传感系统, 实现对基因突变、传染疾病等快速灵敏的分析。

3 等离子体纳米生物传感器对不同病原体的检测

病原体引起的传染性疾病是威胁人类健康的主要因素,在应对突发病原体疫情时,快速准确地检测识别病原体对有效地管理和治疗传染性疾病至关重要。基于LSPR生物传感器具备高灵敏度、无标记和实时测量的优点,非常适用于病原体的检测需求。因此,LSPR生物传感器在病毒、细菌等多种病原体的检测中应用广泛。

3.1 针对病毒检测的等离子体纳米生物传感器

针对高传染高危害性的病毒需要以更快捷灵敏的手段来减少病毒的进一步传播,目前已出了多种的等离子体纳米生物传感器的相关报道,用于检测HIV、乙型肝炎病毒、流感病毒和登革病毒等^[71-72]。Lee等^[33]通过使用Au纳米点在氧化铟锡玻璃基板上制造出均匀的纳米图形,并用gp120单克隆抗体对纳米图形进行修饰可以实现对HIV蛋白gp120的捕获和检测,LOD为200 pg/L。Kim等^[73]通过在单层AuNP上固定双抗体制成LSPR芯片,对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)进行检测,该芯片能够在10~15 min内检测到低至100 pg/L的HBsAg。甲型流感病毒对鸟类、猪及人类都具有传染性,传播迅速,感染率高^[74]。近年来H1N1、H5N7、H9N2等多种亚型在世界各地仍然有广泛暴发^[75-76]。Takemura等^[77]开发出一种针对甲型流感病毒双信号的灵敏快速的检测方法。通过将AuNP、磁性纳米粒子和高导电性碳纳米管相结合,形成纳米复合材料与H1N1特异性抗体结合,以依赖病毒浓度的方式从纳米粒子上同时诱导出光学和电化学两种信号,电化学LOD为13.66 pg/L,而LSPR光学LOD低至2.16 pg/L^[74]。

自2003年起,各种新兴病毒在世界各地广泛流行,对公共安全和经济社会造成大量损失,如暴发于2014年的寨卡病毒(ZIKV)和正在流行的SARS-CoV-2等^[78-79]。ZIKV属于黄病毒科黄病毒属,是一种单链正义RNA病毒,能够造成严重的神经系统异常,如格林-巴利综合征和先天性神经系统畸形^[80]。Adegoke等^[81]通过将等离子体纳米产生的LSPR信号在3-巯基丙酸(3-MPA)功能化的四种不同等离子体纳米粒子中,即MPA-AgNPs、MPA-AuNPs、核/壳Au/AgNPs以及合金AuAgNPs,通过将等离子体产生的LSPR信号介导核酸分子探针的半导体量子点纳米晶体的荧光信号对ZIKV RNA进行检测;LOD最低可至1.7 copies/mL。SARS-CoV-2自2020年在全世界广泛暴发后,因其高度的传染性,快速检测需求日益增

加^[82],Huang等^[83]开发了一种基于LSPR的纳米等离子体阵列传感芯片,芯片的表面由SARS-CoV-2特异性抗体修饰,能够在15 min内检测低至370 vp/mL的SARS-CoV-2病毒颗粒。这些病毒检测平台能够在诊断疾病的最低浓度以下提供可靠的信息,有助于对病毒初期感染的快速和高灵敏识别。

3.2 针对细菌检测的等离子体纳米生物传感器

传统检测细菌的方法耗时、费力且成本高^[84]。基于扩增的分子检测可以在某些情况下提高灵敏度和选择性,但常需要增菌培养;而且复杂的过程等也会降低检测的效率^[46]。因此,开发快速、灵敏且具有成本效益的细菌检测对于防止潜在的传染至关重要。越来越多的研究表明等离子体纳米生物传感器对于细菌检测和区分具有显著的优势^[85]。如,霍乱弧菌O1群是烈性传染病霍乱的病原体。Faridfa等^[86]通过单克隆抗体标记的AuNP能够识别霍乱弧菌O1群并进行测定,LOD为10 CFU/mL。LPS是革兰阴性菌细胞壁上的一种重要结构与细菌的致病作用紧密相关^[87];Liu等^[88]利用多粘菌素B(polymyxin B, PMB)可以与LPS特异性结合的原理,将PMB偶联到AgNP上,从而能够高灵敏度地定量测定LPS浓度;检测范围为2.5~17.5 nmol/L,LOD低至2 nmol/L,优于传统的LPS检测,进一步实现对革兰阴性菌的检测。此外,源自微生物细菌的内毒素被人体摄入后可能会导致各种疾病,严重者甚至危及生命,因此在细菌检测中具有重要的意义。如,金黄色葡萄球菌产生的葡萄球菌肠毒素A(staphylococcal enterotoxin A, SEA)会导致严重的胃肠炎^[89]。Ben Haddada等^[90]通过将SEA抗体或SEA共价连接到AuNP上而成功对牛奶样品中的SEA进行了检测,LOD为5 μg/L。这为低浓度的生物毒素检测提供了一种快速、可靠的方案。还有研究者通过检测细菌自身产生的酶的催化活性实现对相应细菌的检测,如Santopolo等^[91]报道了一种快速检测超低浓度产脲酶细菌的新方法。这种方法是通过将尿素和能捕获细菌的磁珠添加到AuNP-牛血清白蛋白的溶液中,使产脲酶细胞分解生成NH₃而阻断纳米粒子的自组装。在肉眼下,通过AuNP悬浮液颜色的变化实现了对奇异变形杆菌(脲酶阳性菌)的检测,LOD低至10个细胞/mL^[91]。

3.3 其他

除了病毒和细菌,等离子体纳米LSPR生物传感器也被应用在了寄生虫病的诊断中。例如,Lednický等^[92]提出了一种AuNP-环氧树脂纳米复合型LSPR传

感器,以 20 bp 的蓝氏贾第鞭毛虫DNA 序列作为探针,可以实现低限为 5 nmol/L 无标记DNA 检测。这类传感器将有望于实现对蓝氏贾第鞭毛虫的特异、灵敏的检测。猪带绦虫幼虫可引起脑囊虫病(neurocysticercosis, NCC)。在检测单个活包囊或者低寄生虫负荷的NCC患者中,酶联免疫电转印(EITB)和ELISA 两种技术的检测敏感性较差,甚至会产生阴性结果^[93]。在基于AuNPs 的LSPR 生物传感器上借助免疫捕获技术能够对猪带绦虫抗原进行检测,检测范围从 0.1 mg/L~2 000.0 g/L, LOD 低于 0.1 mg/L,并且在 5 min 内可完成^[94]。该系统具备了快速响应的能力和良好的灵敏性,能够有效区分感染者和未感染者,为诊断NCC 提供了一种新的工具。

4 等离子体纳米生物传感器的优化策略

由于等离子体纳米生物传感器具备结构简单、设备要求低等特性,越来越多地被应用于现场检测(POCT)。因此,如何进一步提高检测效率和检测设备的便携性是等离子体纳米生物传感器优化的方向之一,如利用微流控芯片简化样品添加流程^[95]和利用小型设备代替专用检测设备^[83]等。针对临床实验中多指标检测的需求,研究人员利用LSPR 传感器搭建了高通量和多通道传感芯片。如,Yoo 等^[96]在单个纳米粒子阵列芯片上固定了 3 种针对嗜酸乳杆菌、鼠伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌的适配体,从而在一次检测中同时对这 3 种细菌进行识别,实现了对细菌的多通道传感检测。另外,Zopf 等^[97]在玻璃基底上的点阵列中使用AuNP 作为亚单层,其中每个点的AuNP 分别用不同的DNA 探针进行修饰,可以同时鉴定和检测多种病原微生物,如念珠菌、曲霉菌以及拟杆菌等。相比于传统利用光谱仪或酶标仪等实验室仪器检测输出信号,利用手机自带的光源与照相设备可以最大效率地提高检测设备的便携化;有研究者开发出一种智能手机APP 控制的手持传感设备,与偶联SARS-CoV-2 特异性抗体的LSPR 传感器相结合,能够在 15 min 内完成SARS-CoV-2 的检测;并通过APP 实时记录动态曲线,检测范围从 0~6.0×10⁶ vp/mL^[83]。Wang 等^[98]展示了一种基于智能手机的等离子体传感平台,通过简单的手机成像和颜色分析来测量无色液体的RI,并通过将等离子体共振波长与发色团的吸收峰波长相匹配来实现光吸收增强。利用该检测平台获得的灵敏度相比于酶标仪提高了 100 倍,LOD 相比与其他商品化试纸条提高了 30 倍。上述研究表明利用小型多功能化的

纳米系统和先进的光学检测方法的协同组合,开发高通量多通道的等离子体纳米生物传感器,可以进一步优化检测的灵活性、即时性和高效性。

基于AuNP 和AgNP 的LSPR 生物传感器在识别和检测分析物上表现出了优良的性能,但考虑到使用成本,一些非贵金属纳米材料如Cu、Al 等逐渐显现出这方面的优势^[99]。如,Valdez 等^[100]将金属纳米粒子(Cu、Ag 和 Au)与抗呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的多克隆抗体进行偶联,利用LSPR 位移实现对RSV 的检测。结果显示而AuNP 和AgNP 的LOD 分别 211 PFU 和 7 PFU,而与抗体偶联的CuNP 的LOD 低至 2.4 PFU,检测性能优于AuNP 和AgNP。这表明了抗体功能化的CuNP 在RSV 检测中更具优越性。此外, Kim 等^[101]以Cu 薄膜为外壳、以SiO₂ 纳米粒子为核心制成了具有等离子体特性的纳米粒子阵列芯片。由于LSPR 特性,该芯片显现出 67.8 nm/RIU 的灵敏度,并能够对海洋弧菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌等 7 种细菌的目标DNA 进行定量检测,其中以淋病奈瑟菌DNA 的LOD 为最低(10 fmol/L)^[101]。由非贵金属纳米材料开发的等离子体纳米光学传感器,可以有效地在保持LSPR 传感器的高灵敏度的同时,可以有效降低LSPR 传感器的成本,是等离子体纳米生物传感器另一条优化策略。

5 展望

随着新技术的发展,即时诊断、个性化诊疗等应用对生物传感器提出了更多的要求。等离子体纳米生物传感器的发展将是其应用扩展到实验室之外的任意场合,用作床旁护理传感器或可穿戴式传感器,并集成到现有的生物医疗体系当中。因此,如何提高等离子体纳米生物传感器的可复用性,以及如何研发将等离子体光热效应和LSPR 传感相结合的诊疗一体化装置都有待于进一步的探究。总之,基于等离子体纳米粒子光学特性的生物传感装置具有广阔的应用前景,相信将能为生命科学的研究和市场需求提供更好的服务。

参考文献:

- [1]MALHOTRA B D, SINGHAL R, CHAUBEY A, et al. Recent trends in biosensors[J]. Current Applied Physics, 2005, 5(2): 92-97.
- [2]NURUNNABI M, CHO K J, CHOI J S, et al. Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging[J]. Biomaterials, 2010, 31(20): 5436-5444.

- [3] HASAN A, NURUNNABI M, MORSHED M, et al. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 307519.
- [4] BHALLA N, JOLLY P, FORMISANO N, et al. Introduction to biosensors[J]. *Essays Biochem*, 2016, 60(1): 1-8.
- [5] ZHOU W, MA Y, YANG H, et al. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 381-386.
- [6] FONG K E, YUNG L Y. Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(24): 12043-12071.
- [7] WANG W, YOU Y, GUNASEKARAN S. LSPR-based colorimetric biosensing for food quality and safety[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 20(6): 5829-5855.
- [8] LI Y, SCHLUESENER H J, XU S. Gold nanoparticle-based biosensors[J]. *Gold Bulletin*, 2010, 43(1): 29-41.
- [9] THOMPSON D. Michael Faraday's recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology[J]. *Gold Bulletin*, 2007, 40(4): 267-269.
- [10] XIA Y. Optical sensing and biosensing based on non-spherical noble metal nanoparticles[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(11): 2813-2825.
- [11] CORONADO E A, ENCINA E R, STEFANI F D. Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale[J]. *Nanoscale*, 2011, 3(10): 4042-4059.
- [12] WANG Y, ZHOU J, LI J. Construction of plasmonic nanobiosensor-based devices for point-of-care testing[J]. *Small Methods*, 2017, 1(11): 1700197.
- [13] CSÁKI A, STRANIK O, FRITZSCHE W. Localized surface plasmon resonance based biosensing[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(3): 279-296.
- [14] JACKMAN J A, RAHIM FERHAN A, CHO N J. Nanoplasmonic sensors for biointerfacial science[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(12): 3615-3660.
- [15] NA H K, WI J S, SON H Y, et al. Discrimination of single nucleotide mismatches using a scalable, flexible, and transparent three-dimensional nanostructure-based plasmonic miRNA sensor with high sensitivity[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 113: 39-45.
- [16] DEY J, HAZRA B, CHANDRA M. Modulation of LSPR spectra and enhanced RI-sensitivity through symmetry breaking in hollow gold nanoprism[J]. *J Chem Phys*, 2019, 151(11): 114706.
- [17] ZHAO J, ZHANG X, YONZON C R, et al. Localized surface plasmon resonance biosensors[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2006, 1(2): 219-228.
- [18] ZANDIEH M, HOSSEINI S N, VOSSOUGH M, et al. Label-free and simple detection of endotoxins using a sensitive LSPR biosensor based on silver nanocolumns[J]. *Anal Biochem*, 2018, 548: 96-101.
- [19] MAYER K M, HAFNER J H. Localized surface plasmon resonance sensors[J]. *Chem Rev*, 2011, 111(6): 3828-3857.
- [20] JU H, YAN G, CHEN F, et al. Enzyme-linked immunoassay of α -1-fetoprotein in serum by differential pulse voltammetry[J]. *Electroanal*, 1999, 11(2): 124-128.
- [21] SU H, YUAN R, CHAI Y, et al. Ferrocenemonocarboxylic-HRP@Pt nanoparticles labeled RCA for multiple amplification of electro-immunosensing [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(11): 4601-4604.
- [22] WANG C, WU J, ZONG C, et al. Chemiluminescent immunoassay and its applications[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2012, 40(1): 3-10.
- [23] ZHOU J, WANG Y, ZHANG L, et al. Plasmonic biosensing based on non-noble-metal materials[J]. *Chinese Chem Lett*, 2018, 29(1): 54-60.
- [24] PARK J, LEE S, CHOI J, et al. Extra- and intracellular monitoring of TGF- β using single immunoplasmonic nanoprobe[J]. *ACS Sens*, 2021, 6(5): 1823-1830.
- [25] LAI T, HOU Q, YANG H, et al. Clinical application of a novel silver nanoparticles biosensor based on localized surface plasmon resonance for detecting the microalbuminuria[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(11): 787-792.
- [26] FARIDLI Z, MAHANI M, TORKZADEH-MAHHANI M, et al. Development of a localized surface plasmon resonance-based gold nanobiosensor for the determination of prolactin hormone in human serum[J]. *Anal Biochem*, 2016, 495: 32-36.
- [27] JEON J, UTHAMAN S, LEE J, et al. In-direct localized surface plasmon resonance (LSPR)-based nanosensors for highly sensitive and rapid detection of cortisol[J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2018, 266: 710-716.
- [28] SHAHBAZI N, ZARE-DORABEI R, NAGHHIB S M. Design of a ratiometric plasmonic biosensor for herceptin detection in HER2-Positive breast cancer[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8(2): 871-879.
- [29] LI X, WANG Y, FU Q, et al. Plasmon-emitter hybrid nanostructures of gold nanorod-quantum dots with regulated energy transfer as a universal nano-sensor for one-step biomarker detection[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(3): 444.
- [30] VAKILI S, SAMARE-NAJAF M, DEGHANIAN A, et al. Gold nanobiosensor based on the localized surface plasmon resonance is able to diagnose human brucellosis, introducing a rapid and affordable method[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2021, 16(1): 144.

- [31]ZHANG L, MAZOUZI Y, SALMAIN M, et al. Antibody-gold nanoparticle bioconjugates for biosensors: Synthesis, characterization and selected applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112370.
- [32]FREDERIX F, FRIEDT J M, CHOI K H, et al. Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(24): 6894-6900.
- [33]LEE J H, KIM B C, OH B K, et al. Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1[J]. *Nanomedicine*, 2013, 9(7): 1018-1026.
- [34]INCI F, TOKEL O, WANG S, et al. Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(6): 4733-4745.
- [35]YUAN J, DUAN R, YANG H, et al. Detection of serum human epididymis secretory protein 4 in patients with ovarian cancer using a label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 2921-2928.
- [36]DUAN R Q, YUAN J L, YANG H, et al. Detection of p53 gene mutation by using a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance[J]. *Neoplasma*, 2012, 59(3): 348-353.
- [37]HU Y, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Plasmonic nanobiosensor based on hairpin DNA for detection of trace oligonucleotides biomarker in cancers[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(4): 2459-2466.
- [38]LI J, CHU X, LIU Y, et al. A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(19): e168.
- [39]YOO S Y, KIM D K, PARK T J, et al. Detection of the most common corneal dystrophies caused by BIGH3 gene point mutations using a multispot gold-capped nanoparticle array chip[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(4): 1349-1357.
- [40]SONG S, LEE J U, JEON M J, et al. Detection of multiplex exosomal miRNAs for clinically accurate diagnosis of Alzheimer's disease using label-free plasmonic biosensor based on DNA-Assembled advanced plasmonic architecture[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 199: 113864.
- [41]NATSUME T, ISHIKAWA Y, DEDACHI K, et al. Effect of base mismatch on the electronic properties of DNA-DNA and LNA-DNA double strands: Density- functional theoretical calculations[J]. *Chem Phys Lett*, 2007, 446(1): 151-158.
- [42]MCKENZIE F, FAULDS K, GRAHAM D. Sequence-specific DNA detection using high-affinity LNA-functionalized gold nanoparticles[J]. *Small*, 2007, 3(11): 1866-1868.
- [43]CHAKRABARTI R, KLIBANOV A M. Nanocrystals modified with peptide nucleic acids (PNAs) for selective self-assembly and DNA detection[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(41): 12531-12540.
- [44]CHEN C K, SHANG Y C, Huang C C, et al. Using self-assembled aptamers and fibrinogen-conjugated gold nanoparticles to detect DNA based on controlled thrombin activity[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(8): 3464-3468.
- [45]LIU J, LU Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(22): 6642-6643.
- [46]YU F, LI Y, LI M, et al. DNAzyme-integrated plasmonic nanosensor for bacterial sample-to-answer detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89(Pt 2): 880-885.
- [47]ENDO T, IKEDA R, YANAGIDA Y, et al. Stimuli-responsive hydrogel-silver nanoparticles composite for development of localized surface plasmon resonance- based optical biosensor[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 611(2): 205-211.
- [48]ZHAO S S, BICHELBERGER M A, COLIN D Y, et al. Monitoring methotrexate in clinical samples from cancer patients during chemotherapy with a LSPR-based competitive sensor[J]. *Analyst*, 2012, 137(20): 4742-4750.
- [49]WANG F, LI Y, HAN Y, et al. Single-particle enzyme activity assay with spectral-resolved dark-field optical microscopy[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(9): 6329-6339.
- [50]MARTÍN-BARREIRO A, DE MARCOS S, GALBÁN J. Gold nanoparticle formation as an indicator of enzymatic methods: colorimetric L-phenylalanine determination[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(8): 2641-2649.
- [51]LIN T J, HUANG K T, LIU C Y. Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22(4): 513-518.
- [52]YAN J, WANG L, TANG L, et al. Enzyme-guided plasmonic biosensor based on dual-functional nanohybrid for sensitive detection of thrombin[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70: 404-410.
- [53]TANG Y, ZHANG W, LIU J, et al. A plasmonic nanosensor for lipase activity based on enzyme-controlled gold nanoparticles growth in situ[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(14): 6039-6044.
- [54]JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [55]PHAN Q A, TRUONG L B, MEDINA-CRUZ D, et al. CRISPR/Cas-powered nanobiosensors for diagnostics[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 197: 113732.
- [56]O'CONNELL M R, OAKES B L, STERNBER S H, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9[J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 263-266.
- [57]HABIMANA J D, HUANG R, MUHOZA B, et al. Mechanistic insights of CRISPR/Cas nucleases for

- programmable targeting and early-stage diagnosis: A review[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114033.
- [58]HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6): 427-437.
- [59]YANG W, RESTRPO-PÉREZ L, BENGTSON M, et al. Detection of CRISPR-dCas9 on DNA with Solid-State Nanopores[J]. *Nano Lett*, 2018, 18(10): 6469-6474.
- [60]WANG X, XIONG E, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497-2508.
- [61]YUAN C, TIAN T, SUN J, et al. Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(5): 4029-4037.
- [62]LI Y, MANSOUR H, WANG T, et al. Naked-eye detection of grapevine red-blotch viral infection using a plasmonic CRISPR Cas12a assay[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(18): 11510-11513.
- [63]WANG W, LIU J, WU L A, et al. Nicking enzyme-free strand displacement amplification-assisted CRISPR-Cas-based colorimetric detection of prostate-specific antigen in serum samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1195: 339479.
- [64]CHENG M, XIONG E, TIAN T, et al. A CRISPR-driven colorimetric code platform for highly accurate telomerase activity assay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112749.
- [65]ZHANG W S, PAN J, LI F, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(8): 4126-4133.
- [66]MA L, PENG L, YIN L, et al. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria[J]. *ACS Sens*, 2021, 6(8): 2920-2927.
- [67]NOURI R, TANG Z, DONG M, et al. CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 178: 113012.
- [68]LÓPEZ-VALLS M, ESCACALONA-NOGUERO C, RODRÍGUEZ-DÍAZ C, et al. CASCADE: Naked eye-detection of SARS-CoV-2 using Cas13a and gold nanoparticles[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1205: 339749.
- [69]HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [70]AQUINO-JARQUIN G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic[J]. *Nanomedicine*, 2019, 18: 428-431.
- [71]BASSO C R, TOZAYO C C, CRULHAS B P, et al. An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates[J]. *Virology*, 2018, 513: 85-90.
- [72]LATHIKA S, RAJ A, SEN A K. LSPR based on-chip detection of dengue NS1 antigen in whole blood[J]. *RSC Adv*, 2021, 11(53): 33770-33780.
- [73]KIM J, OH S Y, SHUKLA S, et al. Heteroassembled gold nanoparticles with sandwich-immunoassay LSPR chip format for rapid and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 107: 118-122.
- [74]TAKEMURA K, GANGANBOINA A B, KHORIS I M, et al. Plasmon nanocomposite-enhanced optical and electrochemical signals for sensitive virus detection[J]. *ACS Sens*, 2021, 6(7): 2605-2612.
- [75]BLACHERE F M, LINDSLEY W G, PEARCE T A, et al. Measurement of airborne influenza virus in a hospital emergency department[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(4): 438-440.
- [76]WU G, YAN S M. Mutation trend of hemagglutinin of influenza A virus: A review from a computational mutation viewpoint[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(5): 513-526.
- [77]SUZUKI Y. Sialobiology of influenza: Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 399-408.
- [78]BAUD D, GUBBER D J, SCHAUB B, et al. An update on Zika virus infection[J]. *Lancet*, 2017, 390(10107): 2099-2109.
- [79]WANG C, HORBY P W, HAYDEN F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 470-473.
- [80]ENFISSI A, CODRINGTON J, ROOSBAD J, et al. Zika virus genome from the Americas[J]. *The Lancet*, 2016, 387(10015): 227-228.
- [81]ADEGOKE O, MORITA M, KATO T, et al. Localized surface plasmon resonance-mediated fluorescence signals in plasmonic nanoparticle-quantum dot hybrids for ultrasensitive Zika virus RNA detection via hairpin hybridization assays[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 513-522.
- [82]HARRISON A G, LIN T, WANG P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and Pathogenesis[J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(12): 1100-1115.
- [83]HUANG L, DING L, ZHOU J, et al. One-step rapid quantification of SARS-CoV-2 virus particles via low-cost nanoplasmonic sensors in generic microplate reader and point-of-care device[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 171: 112685.
- [84]ZHANG X, SHEN J, MA H, et al. Optimized dendrimer-encapsulated gold nanoparticles and enhanced carbon nanotube nanoprobe for amplified electrochemical immunoassay of *E. coli* in dairy product based on enzymatically induced deposition of polyaniline[J]. *Biosens*

- Bioelectron, 2016, 80: 666-673.
- [85]ZHANG X, GENG P, LIU H, et al. Development of an electrochemical immunoassay for rapid detection of E.coli using anodic stripping voltammetry based on Cu@Au nanoparticles as antibody labels[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(7): 2155-2159.
- [86]FARIDFAR G, ZEINODDINI M, AKBARZEDEHKOIAHI S, et al. Immunodiagnostic of Vibrio cholerae O1 using localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor[J]. Int Microbiol, 2021, 24(1): 115-122.
- [87]GOODE A, YEH V, BONEV B B. Interactions of polymyxin B with lipopolysaccharide-containing membranes[J]. Faraday Discuss, 2021, 232: 317-329.
- [88]LIU T, GAO L, ZHAO J, et al. A polymyxin B-silver nanoparticle colloidal system and the application of lipopolysaccharide analysis[J]. Analyst, 2018, 143(5): 1053-1058.
- [89]HENNEKINNE J A, DE BUYSER M L, DRAGACCI S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 815-836.
- [90]BEN HADDADA M, HU D, SALMAIN M, et al. Gold nanoparticle-based localized surface plasmon immunosensor for staphylococcal enterotoxin A (SEA) detection[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(26): 6227-6234.
- [91]SANTOPOLO G, DOMÉNECH-SÁNCHEZ A, RUSSELL S M, et al. Ultrafast and ultrasensitive naked-eye detection of urease-positive bacteria with plasmonic nanosensors[J]. ACS Sens, 2019, 4(4): 961-967.
- [92]LEDNICKÝ T, BONYÁR A. Large scale fabrication of ordered gold nanoparticle-epoxy surface nanocomposites and their application as label-free plasmonic DNA biosensors[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(4): 4804- 4814.
- [93]GARCIA H H, NASH T E, DEL BRUTTO O H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(12): 1202-1215.
- [94]ARCAS A S, JARAMILLO L, COSTA N S, et al. Localized surface plasmon resonance-based biosensor on gold nanoparticles for Taenia solium detection[J]. Appl Opt, 2021, 60(26): 8137-8144.
- [95]ZHANG Y, TANG Y, HSIEH Y H, et al. Towards a high-throughput label-free detection system combining localized-surface plasmon resonance and microfluidics [J]. Lab Chip, 2012, 12(17): 3012-3015.
- [96]YOO S M, KIM D K, LEE S Y. Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species[J]. Talanta, 2015, 132: 112-117.
- [97]ZOPF D, PITTNER A, DATHE A, et al. Plasmonic nanosensor array for multiplexed DNA-based pathogen detection[J]. ACS Sens, 2019, 4(2): 335-343.
- [98]WANG X, CHANG T W, LIN G, et al. Self-referenced smartphone-based nanoplasmonic imaging platform for colorimetric biochemical sensing[J]. Anal Chem, 2017, 89(1): 611-615.
- [99]ZHANG L, LI X, WANG Y, et al. Plasmonic Al nanopyramid array sensor for monitoring the attaching and spreading of cells[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2019, 279: 503-508.
- [100]VALDEZ J, BAWAGE S, GOMEZ I, et al. Facile and rapid detection of respiratory syncytial virus using metallic nanoparticles[J]. J Nanobiotechnology, 2016, 14: 13.
- [101]KIM D K, YOO S M, PARK T J, et al. Plasmonic properties of the multispot copper-capped nanoparticle array chip and its application to optical biosensors for pathogen detection of multiplex DNAs[J]. Anal Chem, 2011, 83(16): 6215-6222.