

# 第 1 章 生物纳米传感体系在体外检测与诊断中的应用研究

## 1.1 引言

随着人们生活方式和生活环境的显著变化,癌症等重大疾病已成为威胁人们生命健康的新问题。而体外检测与诊断(*in vitro* detection and diagnostics)是疾病预防、治疗和治疗后康复情况追踪的主要手段和重要前提<sup>[1]</sup>。为满足体外检测与诊断的需求,需要发展特异、灵敏的分析传感方法。此外,还应尽可能缩短检测时间、降低检测成本、简化操作,以期实现个体化诊疗。因而亟须发展新的检测技术和传感方法平台来应对这一挑战。

近年来,随着纳米技术的蓬勃发展,利用纳米材料及其相关器件进行疾病分析检测和诊断已成为科学界一个十分活跃的研究领域,引起了科学界的广泛关注<sup>[2~33]</sup>。利用这些新近发展的方法平台,可以对诸如金属离子、生物小分子、核酸、蛋白质、多糖,甚至于细胞、细菌和病毒等多种目标物进行分析检测,极大地推进了生物纳米传感研究的发展。

鉴于该领域所涵盖内容的广度,本章将选取部分典型纳米材料为代表,以材料的种类为主线来讨论纳米材料在体外检测与疾病诊断中的应用。同时将以附注的形式穿插介绍一些知识点,以辅助阐明相关内容。下面先对生物纳米传感体系做一概述,然后依照不同纳米材料来展开讨论,最后将简要探讨该领域面临的一些挑战及未来的发展方向。

如图 1-1 所示,一个典型的生物纳米传感体系由“目标识别部件”、“信号转导部件”和“生物/纳米界面”三部分组成。如前文所述,用于检测和诊断的传感体系,衡量其性能优劣的两个最关键指标是选择性和灵敏度,选择性和灵敏度越高,则该传感体系的性能越好。

传感体系的高选择性,主要取决于生物识别相互作用的特异性。而可用于生物识别的特异相互作用,除了天然的抗原/抗体、给体/受体、酶/底物、核酸碱基配对等相互作用外,还有分子印迹聚合物/目标分子、功能化核酸/目标分子(参阅附注一)等相互作用。在目标识别部位引入纳米功能材料,有可能会影响生物识别相互作用的特异性从而降低传感体系的选择性。若能巧妙引入纳米材料而不影响生物识别相互作用,如在纳米材料表面引入多个识别基团,则可藉其所形成的多价作用(multivalent interaction)增强识别能力,提高传感体系的选择性<sup>[34,35]</sup>。此外,临

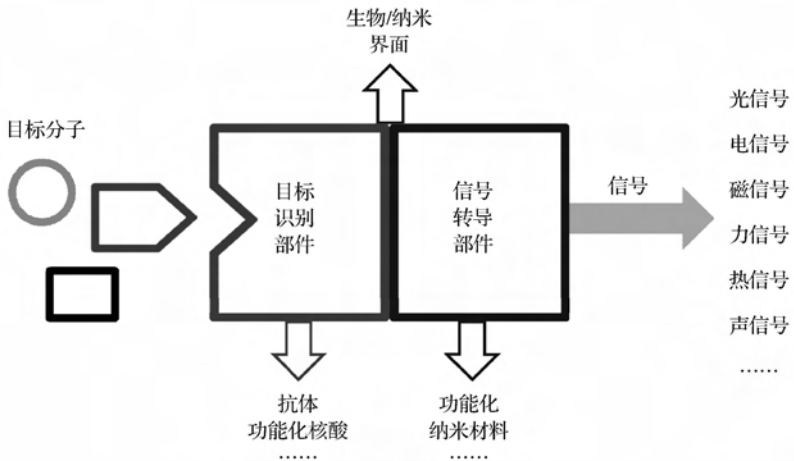


图 1-1 生物纳米传感体系示意图

床中所遇到实际样品(如血样、尿样、呼吸气体等)的成分复杂,其所含混合成分有可能对待测目标物的检测造成干扰。此时如果利用纳米材料(如磁性纳米颗粒)或者器件(如微纳芯片)的分离富集功能,则能有效消除干扰,提高传感体系的选择性能<sup>[28]</sup>。近期研究表明,一些纳米材料自身有类酶的催化功能,即纳米酶(nanozymes)<sup>[36~39]</sup>。纳米酶有望用作新型的识别元素,构建性能优异、成本低廉的生物传感体系。

### 附注一：功能化核酸作为新型生物识别元素

功能化核酸(functional nucleic acid)是指利用体外进化技术而筛选出来具有识别或催化功能的寡聚核苷酸片段<sup>[40]</sup>。功能化核酸包括核酸适配体(aptamer)<sup>[41,42]</sup>和核酸酶(DNAzyme and RNAzyme)<sup>[43]</sup>。核酸适配体是针对特定目标物而筛选出来的功能化 DNA 或 RNA 片段。与抗体类似,核酸适配体对其目标物有高的亲和力和特异的识别能力。核酸适配体的目标物可以小到无机离子、有机物,大到蛋白质、细胞。核酸酶是筛选出来具有催化功能的寡聚核苷酸,其可催化的反应范围很广,包括对核酸底物的剪切反应、DNA 连接反应、磷酸化反应、卟啉金属化反应等。

如图 1-2 所示,核酸适配体和核酸酶能分别取代传统生物识别元素(即抗体和酶)来构筑新型的生物传感体系。与抗体和酶相比较,功能化核酸具有易于合成、稳定性好、易于化学修饰、适用范围广等优点,已被成功地用于制备各类生物传感体系<sup>[44]</sup>。

对于给定的目标物和与之对应的识别分子,其传感体系的灵敏度很大程度上

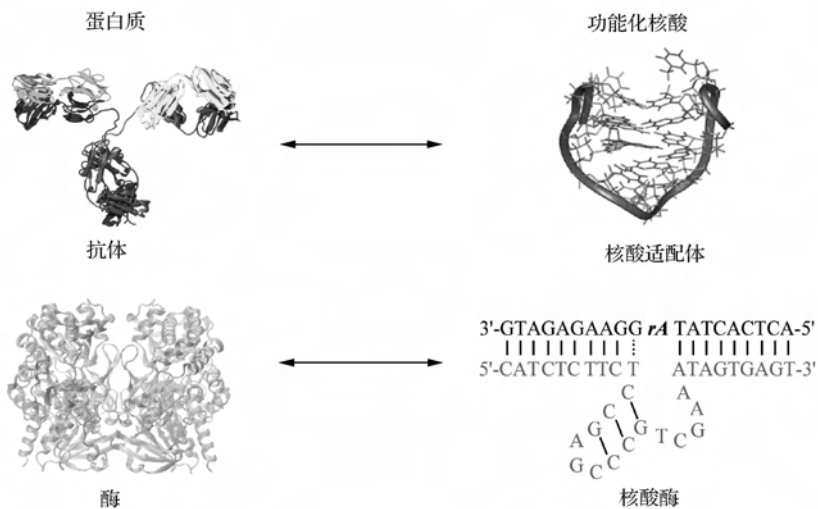


图 1-2 基于蛋白质和功能化核酸的生物识别元素

取决于信号转导部件的性能。利用新型功能纳米材料优异的光学、电学、磁学等性能,可极大提高生物传感体系的灵敏度,实现低浓度(低丰度)目标物的准确检测。例如,利用半导体量子点进行肿瘤标志物——癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的测定,其检测限可达 50 fmol/L,该检测限较之有机荧光染料分子(检测限为 500 nmol/L)降低了 4 个数量级<sup>[45]</sup>。对于一具体传感体系,其灵敏度不仅与信号转导部件的性能有关,还与目标识别部件的性能有关。若生物识别的亲合力很弱,一方面需要较大量的目标分子才能产生识别作用;另一方面干扰物会产生较强的背景信号,因而往往会导致比较差的灵敏度。因此,在设计生物纳米检测与诊断方法平台时,需要兼顾目标识别部件和信号转导部件,才能得到高选择性、高灵敏度的传感体系。

欲进一步提高检测灵敏度,还可以引入放大策略(amplification protocol)。常采用的放大策略有两种:一种是在目标识别元件部分实现放大,即对目标物的直接或者间接放大。例如,对于目标物是 DNA 的体系,可以通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的扩增来实现放大。另一种是在信号转导部件部分实现放大,即输出信号的放大。例如,用拉曼活性的有机小分子做探针,检测到的散射信号会比较弱。若引入金、银等纳米结构材料,则能极大增强探针分子的拉曼散射信号,提高传感体系的检测灵敏度<sup>[2]</sup>。此外,如有需要还可以将这两种放大策略联合使用,以获得更高的灵敏度<sup>[46]</sup>。

在构筑生物纳米传感体系时,还需要设计合理的生物/纳米界面。当生物分子和纳米结构材料相互作用时,应避免生物分子在纳米材料表面的非特异性吸附。例如,在金纳米颗粒表面引入聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)或者牛血清白

蛋白(bovine serum albumin, BSA),能有效消除生物样品中各种复杂成分的干扰。此外,需要优化设计,选取适合的反应条件和实验工艺,以防止生物分子活性降低(甚至于变性而完全失活)。例如,在生物分子和纳米材料之间引入适当长度的连接片段(linker),则既可以保持生物分子的活性,又不影响传感信号的传导。同时,还要考虑生物分子对纳米材料的影响。例如,在量子点表面标记识别分子时,如果设计不当则有可能会破坏其配体保护层而影响其光学性能。

由此可见,欲构筑高性能的生物纳米传感体系,需要选取有高选择性的目标识别部件和有高灵敏度的信号转导部件,同时需要合理设计生物/纳米界面。通过下文具体例子的论述,读者将会领悟到在实际研究中怎样运用这些基本的原则来构筑生物纳米传感体系,实现对目标物的检测和诊断。

## 1.2 金属纳米材料

金属纳米材料是迄今为止被研究最多的纳米材料之一。诸如金、银等贵金属纳米材料具有独特的光化学、电化学和催化等性质。这些独特的性质不仅与纳米颗粒的化学组成相关,而且与纳米颗粒的大小、形状、周围介质、温度和粒子间的距离等因素有关;此外,金属纳米材料合成简单易行,稳定性好;其高的比表面积可用于连接传感所需的各类识别分子和配体。因而金属纳米材料已被广泛用于构筑各类生物纳米传感体系<sup>[12,27,47~62]</sup>。

### 1.2.1 比色法

金、银等贵金属纳米颗粒具有强的表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)效应<sup>[50]</sup>。此效应与贵金属纳米颗粒的间距、大小等密切相关。例如,当贵金属纳米颗粒从分散状态变为聚集状态(或者反之)时,其表面等离子体共振吸收峰会发生明显地移动。据此,引入适当的生物识别元素来调控贵金属纳米颗粒的“分散/聚集”状态,就能构建比色传感器(colorimetric sensor)。基于比色法的传感体系其优点在于:其一,由于贵金属纳米颗粒的表面等离子体共振谱的消光系数非常大,因而检测灵敏度高;其二,因无需使用特殊的仪器设备而使得实验成本大大降低。

#### 1. 金纳米比色法

##### 1) 核酸作为生物识别元素

Mirkin 小组<sup>[3,34]</sup>独创性地应用含巯基的 DNA 修饰金纳米颗粒作为比色探针,开金纳米颗粒比色传感器研究之先河。早在 1996 年, Mirkin 等与 Alivisatos 等<sup>[34,63]</sup>在同期《自然》杂志上分别撰文,报道了用 DNA 来修饰金纳米颗粒并利用

碱基配对进行自组装的工作。Mirkin 等发现,伴随着 13 nm 的金纳米颗粒由分散状态组装形成聚集体,溶液的颜色由红色变为蓝色。这一工作奠定了金纳米用于比色传感的基础。翌年,Mirkin 小组<sup>[3]</sup>即发展了基于 DNA 修饰的金纳米组装来进行目标 DNA 检测的传感体系。如图 1-3 所示,若无目标分子存在,DNA 修饰的金纳米颗粒处于分散状态,此时溶液呈红色;若加入完全互补的目标 DNA,其会和金纳米颗粒上的 DNA 链杂交形成双链,拉近金纳米颗粒的距离,使得溶液变为蓝色。此比色过程可以用紫外-可见吸收光谱监测,也可以通过在硅胶基底上点样来监测。这样,就可通过金纳米颗粒颜色的变化来快速、灵敏地测定目标 DNA 分子。利用该方法检测目标 DNA 的检测限在条件未优化的情况下就已经达到了 $\sim 10$  fmol。

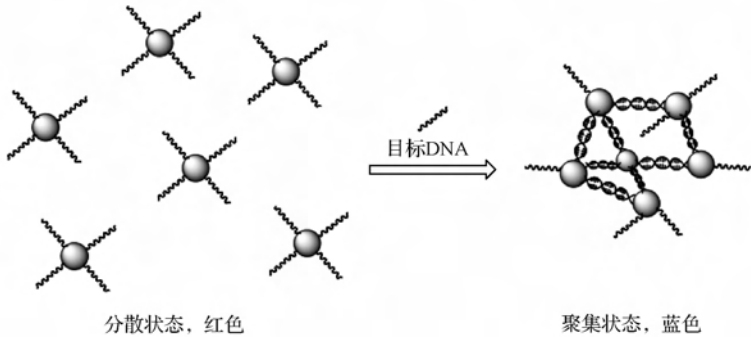


图 1-3 基于 DNA 修饰的金纳米组装来进行目标 DNA 检测的传感体系示意图<sup>[3]</sup>

尽管这种基于两种金纳米颗粒“头尾相连”(head-to-tail alignment)方式的比色方法已显示出很好的灵敏度,但其选择性还不够好,不能有效区分单碱基错配(single-base mismatch)(参阅附注二)的情形<sup>[3]</sup>,即某一 DNA 链与完全互补的 DNA 链相比,如果只有一个碱基不匹配、多一个碱基或者少一个碱基时,这样的错配很难被区分出来。为此,通过进一步优化生物/纳米界面(即 DNA 与金纳米的连接方式),他们发展了基于两种金纳米颗粒“尾尾相连”(tail-to-tail alignment)方式的比色方法(图 1-4)<sup>[64]</sup>。此“尾尾相连”方式的关键在于分别使用 3'端和 5'端含末端巯基的 DNA 探针链来修饰金纳米颗粒。由此得到的两种金纳米颗粒在有完全互补的目标 DNA 存在时,会与其以“尾尾相连”的方式配对形成自组装。在这种情况下,目标 DNA 的每一个碱基都参与了配对,因而有最好的热稳定性(在 52℃ 时仍以双链结构存在)。若目标 DNA 含有一个不匹配碱基、多一个碱基或者少一个碱基时,则参与配对的碱基数目少一个,所以在温度达到 52℃ 时其自组装会被破坏。据此,只要控制温度在 52℃,使用该方法即可实现对完全互补的目标 DNA 的高选择性检测<sup>[64]</sup>。所建立的比色方法,随后被广泛用于各种疾病相关基因突变的诊断。例如,利用此方法 Murphy 等<sup>[65]</sup>成功实现了囊性纤维化(cystic fibrosis)疾病相关的 V232D 单碱基突变的检测,灵敏度达到皮摩尔级。

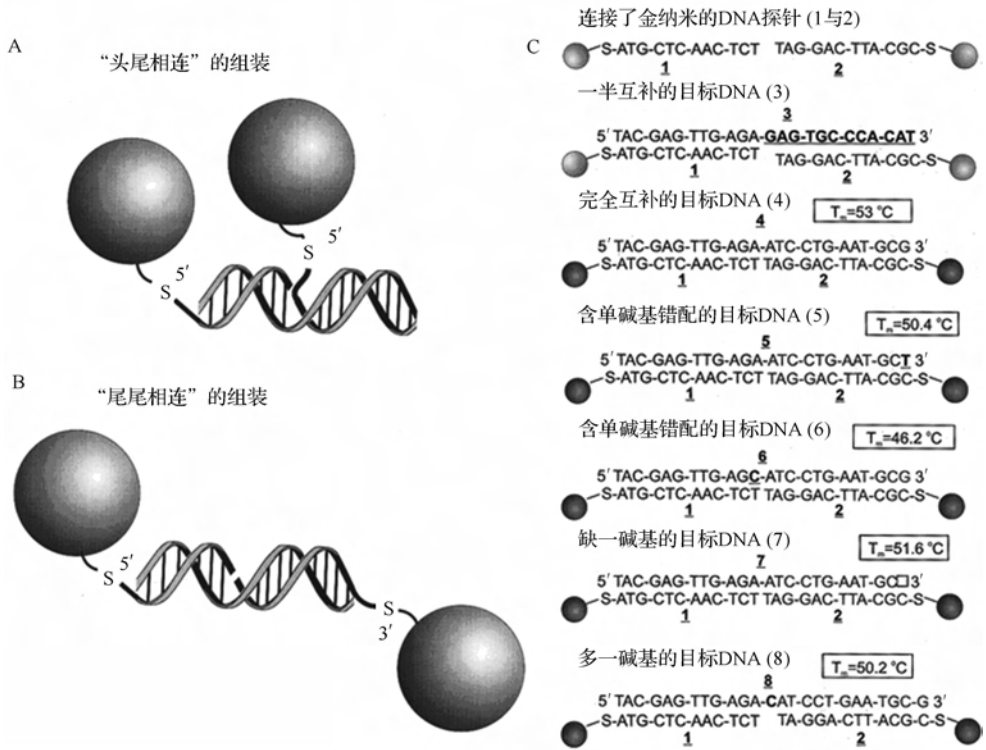


图 1-4 两种金纳米颗粒“尾尾相连”的组装方式提高了比色方法的选择性<sup>[64]</sup>

A. “头尾相连”的组装方式; B. “尾尾相连”的组装方式; C. 探针 DNA 与目标 DNA 的序列 (同时列出了互补与几类错配的序列)

### 附注二：单碱基错配 (single base mismatch) 与疾病诊断

在研究人膀胱癌时发现,原癌基因(proto-oncogene)与致癌基因(oncogene)的差别极其细微,仅是 H-ras 基因可读框(reading frame)第 12 位编码子发生了 G/T 的单碱基突变(图 1-5)<sup>[66]</sup>。此项研究及随后的大量研究工作表明人类许多疾病与基因的单碱基突变相关,因而对单碱基错配的检测显得尤为重要。尽管基因测序可以准确诊断出有无单碱基错配,但发展至今,其操作仍然比较复杂、成本较高,不易于推广。因而人们发展了多种生物传感体系来进行单碱基错配的检测。

表 1-1 列出了单碱基错配的一些类型<sup>[67]</sup>。除互补碱基被非互补碱基取代外,某些核酸的损伤也会产生碱基错配,如 dUG 为脱氧尿嘧啶(deoxy-uracil); OH-T 为 5,6-羟基胸腺嘧啶(5,6-hydroxy thymine); Ab 为缺碱基位点(abasic site); Aox 为 8-氧化-腺嘌呤(8-oxo-adenine)。

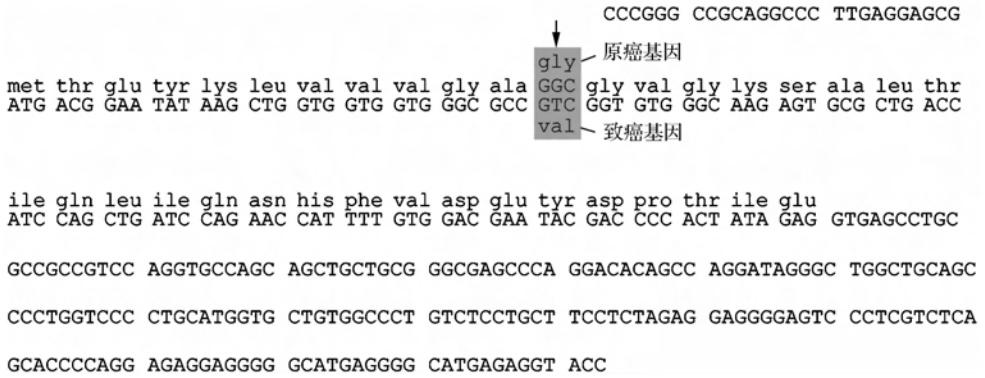


图 1-5 单碱基的突变激活了人膀胱癌致癌基因 H-ras<sup>[66]</sup>

表 1-1 碱基错配的一些类型<sup>[67]</sup>

类型	序列	类型	序列
TA/WC	AGTACAGTCATCGCG TCATGTACAGTAGCGC	AA	AGTACAGTCATCGCG TCATGACAGTAGCGC
CA	AGTACAGTCATCGCG TCATGTCAATAGCGC	WT	ATGGGCTCCGGTTC TACCCGGAGGCCAAG
GA	AGTACAGTCATCGCG TCATGTAAGTAGCG	248	ATGGGCTCCGGTTC TACCCGGAGACCAAG
TT	ACTACAGTCATCGCG TCATGTCGTAGCGCC	249	ATGGGCTCCGGTTC TACCCGAGGCCAAG
GT	AGTACAGTCATCGCG TCATGTTAGTAGCGC	dUG	AGTACAGTCATCGCG TCATGTUAGTAGCGC
CT	AGTACAGTCATCGCG TCATGTCATTAGCGC	OH-T	AGTACAGTCATCGCG TCATGRCAGTAGCGC
CC	AGTACAGTCATCGCG TCATGTCACTAGCGC	Ab	AGTACAGTCATCGCG TCAT TCAGTAGCGC
GG	AGTACAGTCATCGCG TCATGTGAGTAGCGC	Aox	AGTACAGTCATCGCG TCATGTCOGTAGCGC

图 1-4 所述的方法,虽可以实现目标 DNA 的高选择性检测,但由于完全互补链和某些单碱基错配链的熔解温度(melting temperature,  $T_m$ )差别很小,因此检测时需要非常精确地控制温度。此外,对于不同的目标 DNA,其熔解温度不同,需要重新优化条件才能确定熔解温度以完成检测。为克服这些缺点, Yu 等<sup>[68,69]</sup>发展了连接酶(ligase)辅助金纳米颗粒比色检测方法(图 1-6)。如图 1-6 所示,当目标

DNA 与探针 DNA 链完全互补时,通过目标 DNA 的模板作用,可以将连接有两探针 DNA 的金纳米颗粒组装在一起;进一步加入连接酶,即可催化将两探针 DNA 共价连接在一起;进一步加热至 75℃,使目标 DNA 解离,两探针 DNA 已被共价连接在一起,故金纳米颗粒仍然组装在一起,所得溶液颜色呈现蓝色。反之,若目标 DNA 含有单碱基错配,尽管可以将连接有两探针 DNA 的金纳米颗粒组装在一起,但连接酶无法将两者共价连接起来;这样加热后组装的金纳米颗粒会解离,因而溶液会呈现红色。此比色方法,除不需要精确控制反应温度、可操作性提高外,加热变性这一步骤还可以减小非特异性吸附,进一步提高了选择性。

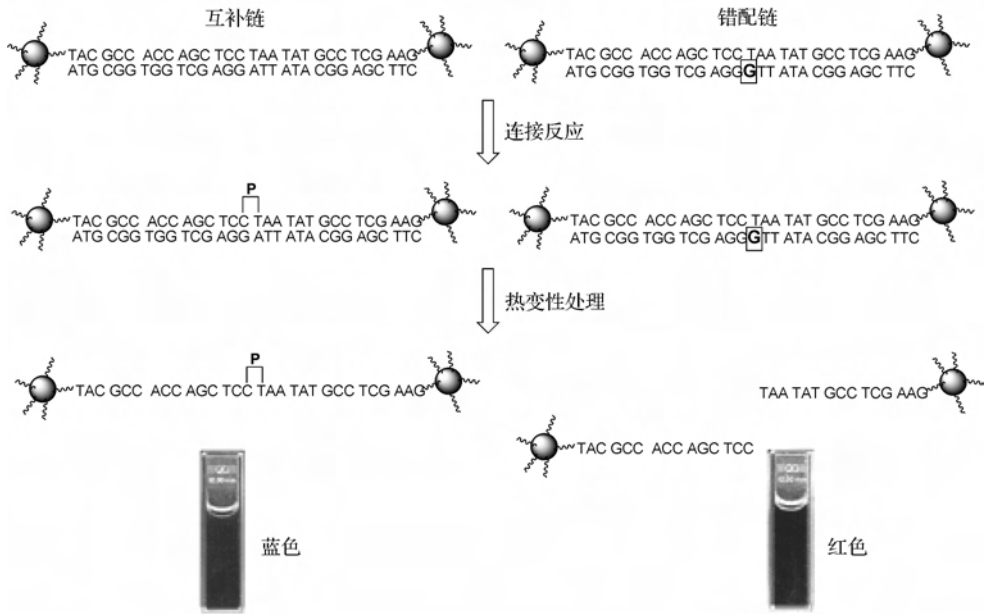


图 1-6 连接酶辅助金纳米颗粒比色检测单碱基错配原理图<sup>[55]</sup>

为进一步提高金纳米颗粒比色检测的灵敏度,研究者又发展了银染放大的方法<sup>[70]</sup>。如图 1-7 所示,与上述比色方法略有不同,此方法是将一条探针链作为捕获链(capture strand)修饰在固体基底上,当加入完全互补的目标 DNA 和修饰了另一半探针链的金纳米颗粒时,即可形成三明治结构而实现比色检测。相对于有机荧光团标记的 DNA 探针,仅基于金纳米颗粒的比色方法虽有较好的选择性,但灵敏度提高不显著。如果进一步使用银染放大(即在金纳米颗粒催化下,银离子被对苯二酚还原为金属银,包裹在金纳米颗粒表面产生增强信号),则其检测灵敏度可比相应的荧光团标记法高 2 个数量级<sup>[70]</sup>。

将“抗原/抗体”生物识别作用引入上述银染增强金纳米颗粒比色检测体系,可以实现蛋白质的超灵敏检测<sup>[46]</sup>。图 1-8 给出了以前列腺特异性抗原(prostate

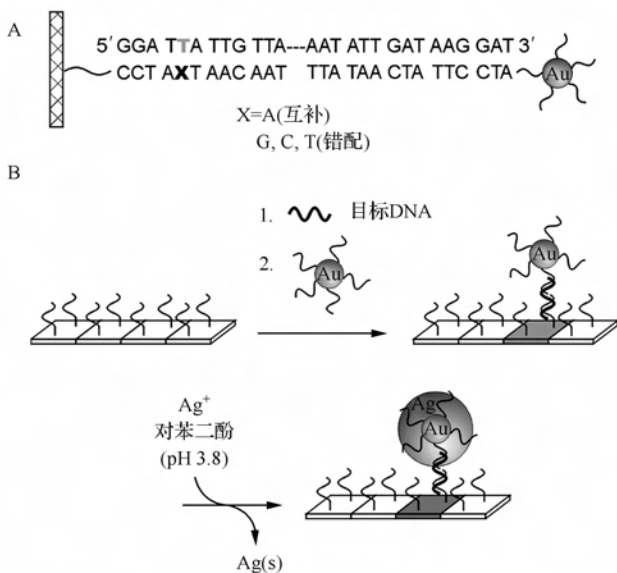


图 1-7 通过银染放大来增强金纳米颗粒比色检测的灵敏度<sup>[70]</sup>

A. 探针 DNA 与目标 DNA 的序列及其杂交形成的三明治结构; B. 检测原理图

specific antigen, PSA) 为目标物, 利用此“条形码”技术进行蛋白质检测的流程图。纳米复合探针由组装在金纳米上的抗体和条形码 DNA (barcode DNA) 构成。当用修饰了抗体的磁微球捕获了目标蛋白质——前列腺特异性抗原后, 加入纳米复合探针, 即可形成三明治结构。通过磁场将此三明治结构产物从反应液中分离。通过纯水洗涤所分离的产物即可释放修饰在金纳米颗粒上的条形码 DNA, 通过对条形码 DNA 量的分析即可得到待测目标蛋白质的含量。由于每个前列腺特异性抗原分子可以通过抗体结合多个 DNA 修饰的金纳米颗粒, 且每个金纳米颗粒上都含有大量的条形码 DNA, 因而, 采用这种双重放大策略检测条形码 DNA 来分析目标蛋白质含量可以将检测信号放大几个数量级。该文所报道的前列腺特异性抗原检测限达到了  $3 \times 10^{-17}$  mol/L。基于此项技术, Mirkin 等开发了相关的仪器, 并已初步商品化。

研究人员进一步探索研究了此高灵敏“条形码”技术在临床诊断上的应用<sup>[71]</sup>。对于临床血清样品, 实验证明“条形码”技术对前列腺特异性抗原的检测灵敏度可达 330 fg/mL; 而免疫分析方法的检测灵敏度为 0.1 ng/mL。两者相比, “条形码”技术的灵敏度提高了约 300 倍。研究人员选取了 18 例已实施根治性前列腺切除术 (radical prostatectomy) 的前列腺癌患者, 跟踪其进行手术后血液中前列腺特异性抗原含量, 以研究前列腺特异性抗原含量与前列腺癌复发的关联性 (参阅附注

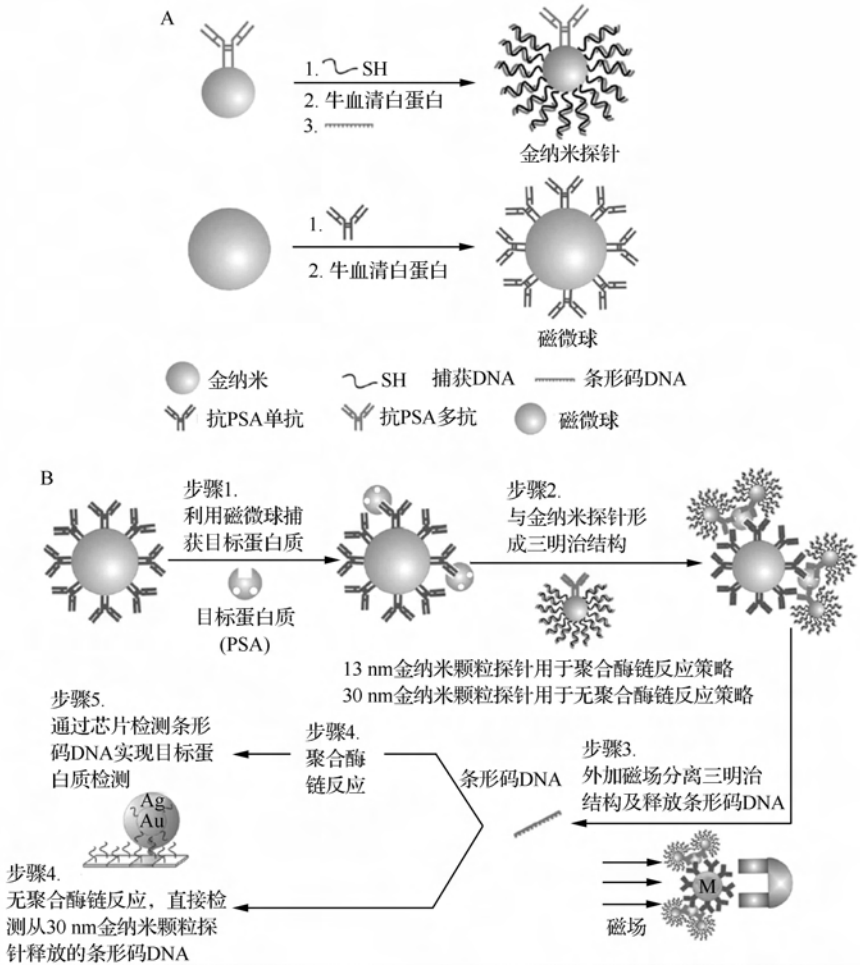


图 1-8 利用“条形码”技术进行高灵敏蛋白质检测<sup>[46]</sup>

A. 金纳米颗粒探针及捕获用磁微球制备示意图; B. 检测流程图

三)<sup>[71]</sup>。此临床前预试验 (clinical pilot study) 结果表明, 免疫分析方法因灵敏度不够高, 无法给出两者的关联性。而“条形码”技术有很好的灵敏度, 能够实现手术后体内前列腺特异性抗原含量的跟踪测定 (图 1-9)。实验结果表明, 当体内前列腺特异性抗原持续低于 5 pg/mL 时 (1~9 号患者), 可基本判定已无患病迹象。对于 10 号患者和 11 号患者, 观察到了前列腺特异性抗原浓度的升高, 并成功预测到病情的复发。对于部分患者 (如 12 号患者), 未能成功预测病情。研究者推测, 如果能在手术后一年内就开始跟踪检测, 且间隔时间较短的话, 对于这部分患者仍有望及早预测病情的复发。

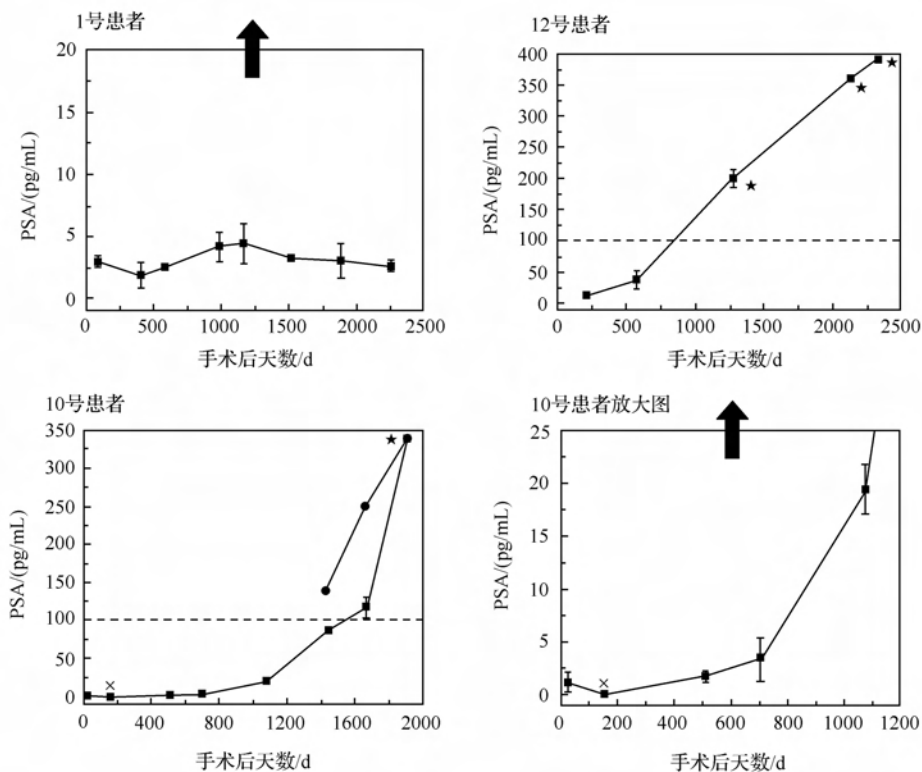


图 1-9 对 18 例前列腺癌患者,在实施了根治性前列腺切除手术后,利用“条形码”技术跟踪其血液中前列腺特异性抗原的含量(其中 3 例的临床数据)<sup>[71]</sup>

图中虚线为免疫分析方法的检测限

### 附注三：前列腺特异性抗原是一个好的生物标志物吗？

生物标志物(biomarker),一般是指存在于生物体液(如血液、唾液)或者组织中可用来诊断疾病状态的生物分子<sup>[72]</sup>。好的生物标志物,一般应该具有高敏感性、好的特异性且能够被客观准确检测。

前列腺特异性抗原作为前列腺癌的特异性标志物,已被广泛应用到前列腺癌的早期筛查与诊断及手术后的跟踪复查中。在学术界,前列腺特异性抗原也得到了研究人员的极大关注。研究中通常选其作为肿瘤生物标志物的模型,来建立各种分析检测方法。迄今,已有数以千计的论文发表。尽管如此,前列腺特异性抗原作为前列腺癌的生物标志物,仍存在许多问题<sup>[73]</sup>。首先,顾名思义,前列腺特异性抗原对于前列腺有特异性,而对前列腺癌并没有特异性。其他任何能导致前列腺特异性抗原升高的因素(如前列腺炎)都会给出假阳性结果。其次,即使通过前列腺特异性抗原筛查发现肿瘤,但并不是所有的肿瘤都会发展为癌症,威胁患者生

命。如果对良性前列腺肿瘤患者实施治疗,反倒会引发一些其他不良后果(如失禁等)。因而,早期筛查还很容易造成过度诊断(overdiagnosis)。可见,前列腺特异性抗原不是一个完美的生物标志物。

为此,研究人员也在努力寻找前列腺癌的生物标志物<sup>[74]</sup>。如图 1-10 所示,近期一些研究表明肌氨酸(sarcosine)与前列腺癌有密切的关联,有望用做新型的生物标志物<sup>[75]</sup>。然而,可以确定的是:任何新的生物标志物,只有其各项指标均超过前列腺特异性抗原,才能有望取代前列腺特异性抗原用于临床诊断。

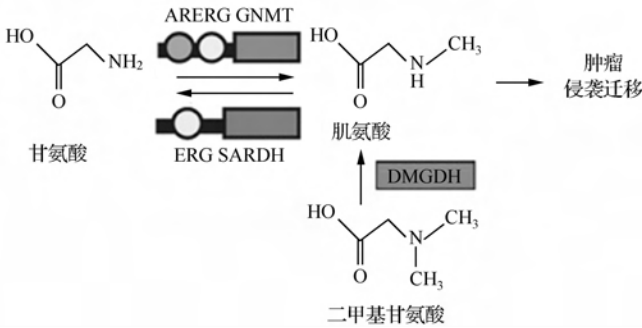


图 1-10 肌氨酸代谢途径及其与前列腺癌的潜在关联<sup>[75]</sup>

这里再次回到生物/纳米界面的设计和优化。与最初设计的纳米探针不同(图 1-8A),上述临床诊断中使用的金纳米颗粒探针采用了改进的设计,提高了探针的灵敏度和稳定性(图 1-11)<sup>[76]</sup>。使用图 1-8A 方法制备探针时,抗体直接吸附在金

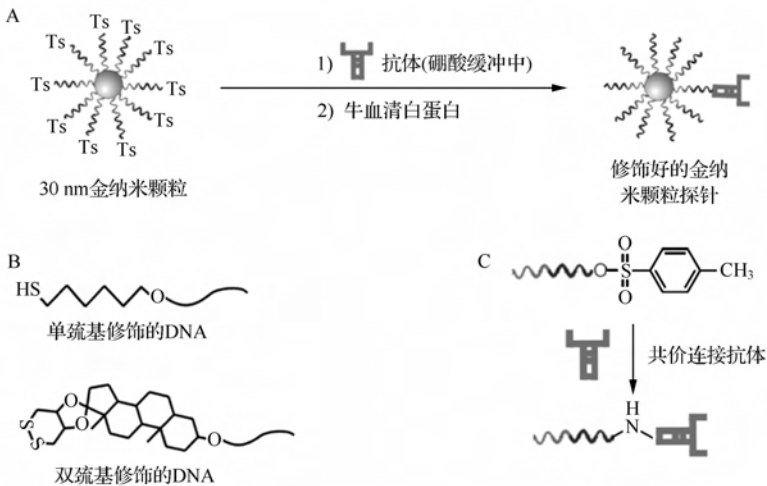


图 1-11 优化生物/纳米界面,设计制备性能更好的纳米探针<sup>[71,76]</sup>

A. 用“条形码”DNA 外端所连接的对甲苯磺酰基共价标记抗体的示意图;B. 修饰 DNA 的单巯基与双巯基结构图;C. 用对甲苯磺酰基标记抗体的反应。Ts 为对甲苯磺酰基(*p*-toluenesulfonyl)

纳米颗粒表面,占据了“条形码”DNA 的部分吸附位点。因而金纳米颗粒所吸附“条形码”DNA 的量有所减少,同时也降低了探针的稳定性。在图 1-11A 的设计中,先是用“条形码”DNA 修饰金纳米颗粒,之后在“条形码”DNA 另一端修饰所需抗体(通过对甲苯磺酰基与抗体的氨基共价交联)。这样,“条形码”DNA 的吸附量能最大化。此外,DNA 与金纳米颗粒表面是通过双巯基而非单巯基连接,因而增强了探针的稳定性<sup>[76,77]</sup>。

除利用巯基来连接 DNA 与金纳米颗粒外,Fan 等<sup>[78]</sup>还利用连续的腺嘌呤碱基(polyA)与金纳米颗粒之间强的吸附力发展了连接 DNA 与金纳米颗粒的新方法。其核心设计在于,将 DNA 探针链分为含连续的腺嘌呤碱基和识别碱基双嵌段(图 1-12)。前者将 DNA 固定在金纳米颗粒表面,后者则参与目标 DNA 识别与检测。这种方法可以免去巯基修饰,而且可以精确调控金纳米颗粒表面 DNA 探针分子组装的密度、取向和构型,为快速制备高效的 DNA 金纳米颗粒探针提供了新的思路方法。

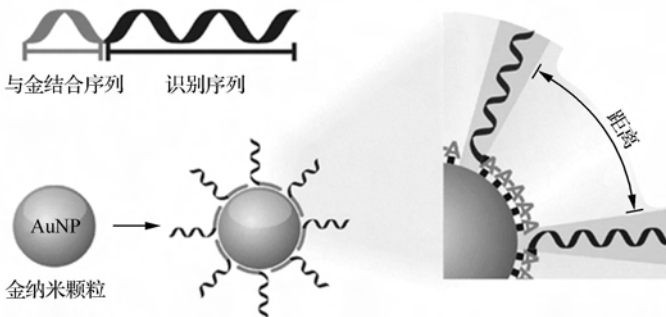


图 1-12 利用连续的腺嘌呤碱基与金纳米颗粒之间强的吸附力制备纳米探针<sup>[78]</sup>

除上述核酸双链互补识别作用外,研究者后来陆续在金纳米颗粒的比色分析中引入了其他各种生物识别作用(如功能化核酸与其目标物、抗原/抗体等),进一步拓展了金纳米颗粒比色方法的应用范围<sup>[44,54,79~87]</sup>。

利用功能化核酸,Lu 研究组<sup>[44]</sup>发展了一系列金纳米颗粒比色传感体系,实现了对多种目标分子的灵敏特异性检测。如图 1-13 所示,将腺苷的核酸适配体引入金纳米颗粒的组装体系,形成预组装体。此时,金纳米颗粒由于处于聚集状态而呈现蓝色。有目标分子腺苷存在时,腺苷和其核酸适配体特异作用形成复合结构。因为两者的作用强于核酸适配体与其部分互补核酸链的作用,故能将此部分互补核酸链及其所连接的金纳米颗粒竞争下来,破坏预组装体结构,使得金纳米颗粒重新分散而出现红色。基于此由蓝色变红色的比色效应即可实现腺苷的检测。该方法有很好的灵敏度和选择性,可以检测低至 0.3 mmol/L 的腺苷,并且鸟苷、尿苷、胞苷等都不会对测定造成干扰。此方法还有很好的普适性,如将腺苷的核酸适配体换成其他物质(如可卡因)的核酸适配体,即可实现其他目标物的比色检测<sup>[44]</sup>。

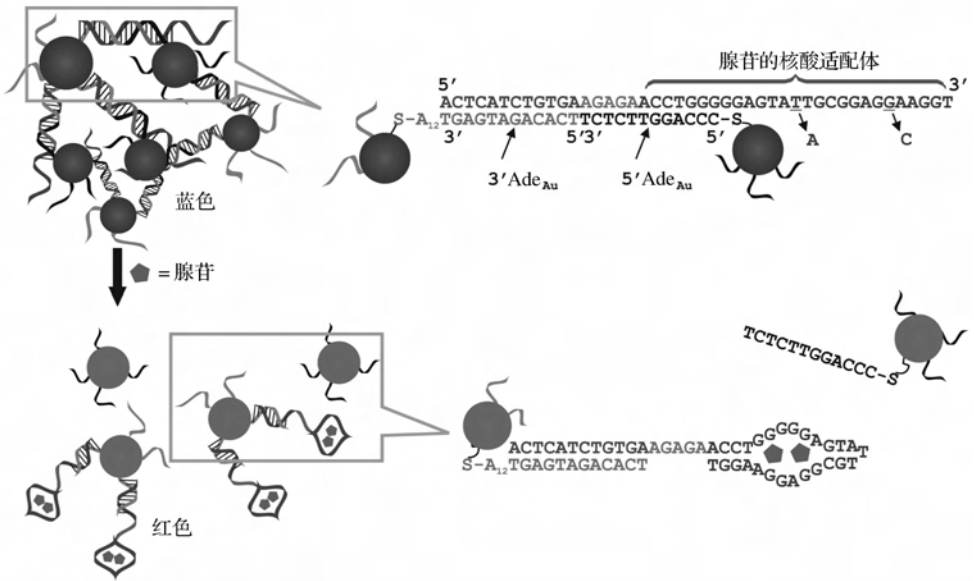


图 1-13 基于对腺苷有特异性识别的核酸适配体和金纳米颗粒比色检测腺苷原理图<sup>[88]</sup>

此比色方法也适用于核酸酶体系<sup>[80,89]</sup>。如图 1-14 所示,将对铅离子具有特异性识别能力的核酸酶的底物链(substrate strand)两端延长,使得其可以与连接了互补核酸序列的金纳米颗粒探针配对组装。核酸酶(DNAzyme)、底物链和金纳米颗粒探针三者形成预组装体,此时溶液呈蓝色。当铅离子存在时,底物链会被切断,此时金纳米颗粒聚集体会因为杂交链稳定性的降低而重新分散,溶液变为红色。由此可实现铅离子的比色法检测。该方法还可以在三氧化二铝薄板上对铅离子进行高选择性的检测<sup>[80]</sup>。若选用对铜离子特异的连接型核酸酶,则能通过金纳米颗粒探针由红色到蓝色(即由分散到聚集)的变化实现铜离子的比色检测<sup>[89]</sup>。

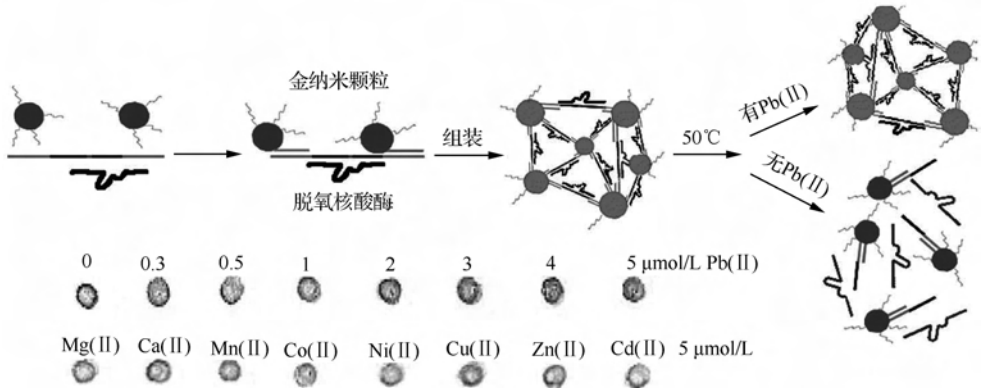


图 1-14 基于对铅离子有特异性响应的脱氧核酸酶和金纳米颗粒比色检测铅离子原理图<sup>[80]</sup>

金纳米颗粒探针可以作为“种子”，催化氯金酸在其表面的还原反应，使得金纳米颗粒长大，产生增强的光学信号。因而，采用类似于银染放大的策略，通过进一步调控金纳米颗粒尺寸的增长可以实现对目标物的高灵敏检测。图 1-15 给出了此放大策略的一个检测应用实例<sup>[90]</sup>。通过凝血酶核酸适配体能与凝血酶形成“三明治”的结构，可以依次将凝血酶和金纳米颗粒探针组装在基底上。组装了的金纳米颗粒作为催化剂，催化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 还原氯金酸的反应，调控金纳米颗粒的生长而增强检测信号。此方法对凝血酶的检测限可至 2 nmol/L。

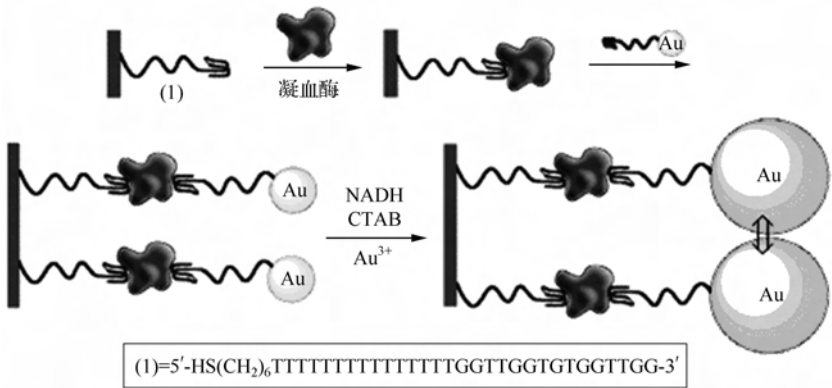


图 1-15 通过凝血酶核酸适配体修饰的金纳米颗粒探针的催化生长，放大其光学检测信号，实现凝血酶的灵敏检测<sup>[90]</sup>

NADH 为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide); CTAB 为十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide)

除功能化核酸外，许多识别体系也能导致核酸组装或者解离。故利用类似的思路，可以针对许多目标物设计各自的检测体系<sup>[85,91~93]</sup>。例如，利用汞离子与胸腺嘧啶的特异性结合作用，可制备比色传感器用于环境中的汞离子监测等<sup>[85,92]</sup>。

上述所有的方法使用的金纳米颗粒探针，表面都共价连接了巯基修饰的核酸。基于这类探针的比色方法可称为“标记法”(labelled method)。若用作识别元素的核酸无需和金纳米颗粒共价连接在一起，则可发展“免标记”(label-free method)的比色测定方法(参阅附注四)<sup>[79,83,94~99]</sup>。

Rothberg 小组<sup>[94]</sup>研究发现，单链 DNA(ssDNA)和双链 DNA(dsDNA)在纳米金颗粒表面具有不同的吸附性质。他们发现，当单链 DNA(或不完全互补双链 DNA)吸附在金纳米颗粒的表面时，可以对金纳米颗粒起到稳定化的作用，使其在一定的盐浓度时不发生聚集，金纳米颗粒溶液为粉红色；而双链 DNA 不能够很好地吸附在金纳米颗粒表面，因此在一定盐浓度时，金纳米颗粒将被诱导聚集，溶液

变为蓝色(图 1-16)。利用这一差别,可以通过杂交反应来方便地比色测定目标 DNA。实验发现,此免标记的金纳米颗粒比色方法很灵敏,可以实现 DNA 和 RNA 单碱基错配的检测<sup>[95,96]</sup>。

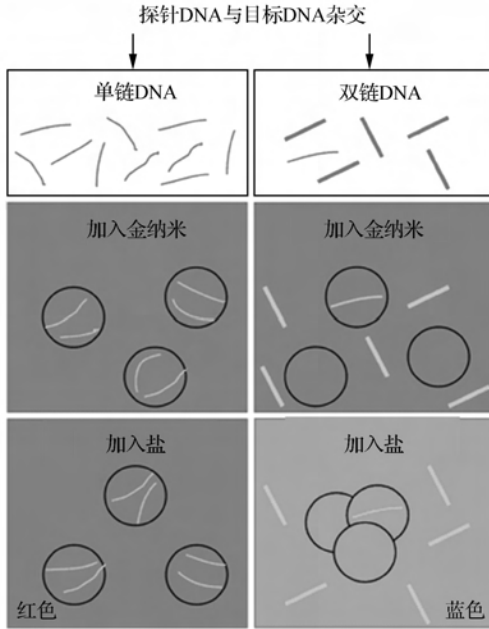


图 1-16 金纳米颗粒用于免标记比色测定核酸的原理图<sup>[94]</sup>

基于相同的原理,研究者利用功能化核酸作为识别元素,发展了系列免标记金纳米颗粒比色传感体系,实现了金属离子、生物小分子、蛋白质等的检测(图 1-17)<sup>[79,83,96~99]</sup>。

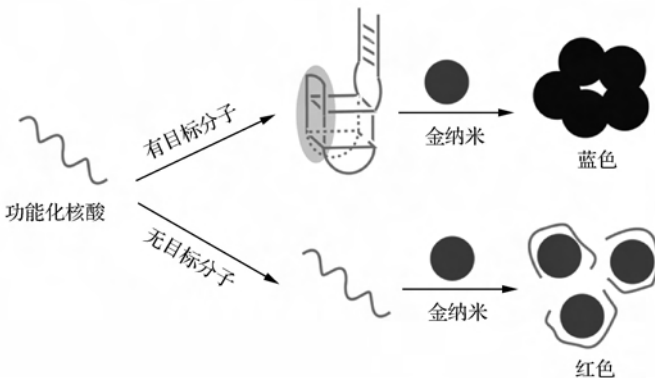


图 1-17 基于功能化核酸和金纳米颗粒免标记比色检测方法原理图

例如, Dong 与 Wang 研究组<sup>[98]</sup>报道了利用未经修饰的金纳米颗粒和核酸适配体免标记比色测定蛋白质的普适方法(图 1-17)。未结合目标分子的凝血酶核酸适配体能与金纳米颗粒作用, 保护其在一定盐浓度下不发生聚集。此时金纳米颗粒溶液呈现红色。而当检测目标凝血酶存在时, 凝血酶与其核酸适配体作用形成“四极子/双螺旋”(G-quadruplex/duplex)复合结构。这种结构不能与金纳米颗粒很好地发生作用, 使得金纳米颗粒失去保护而被盐诱导聚集, 溶液变为蓝色。通过溶液颜色由红到蓝的变化, 即可实现凝血酶的比色检测。该方法有很好的选择性和高的灵敏度。检测不受其他蛋白质的干扰, 对凝血酶的检测限为 0.83 nmol/L。

Dong 与 Wang 研究组<sup>[79]</sup>进一步利用对于铅离子有特异性的核酸酶, 设计了免标记金纳米颗粒比色传感体系以检测有害重金属铅离子。无铅离子存在时, 核酸酶与其底物形成的复合物无法保护金纳米颗粒, 故能被盐诱导聚集, 溶液呈现蓝色; 而有铅离子存在时, 催化核酸酶剪切其底物, 所释放的单链 DNA 能保护金纳米颗粒不被盐诱导聚集, 溶液呈现红色(图 1-18)。基于金纳米颗粒的不同颜色, 能够简捷地判断有无铅离子的存在。

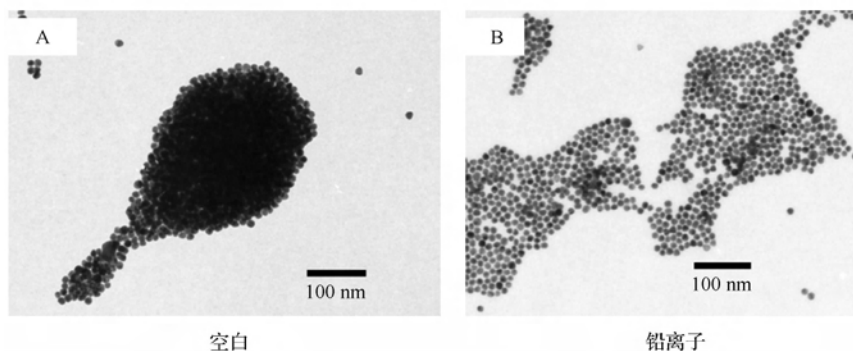


图 1-18 不含铅离子(A)及含 50  $\mu\text{mol/L}$  铅离子(B)的样品先与铅离子特异的核酸酶及底物的双链复合物反应, 接着加入 200  $\mu\text{L}$  金纳米颗粒, 再加入 20  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L 氯化钠后所得的透射电子显微镜照片<sup>[79]</sup>

#### 附注四: 金纳米颗粒比色传感方法: 标记与免标记的比较

以  $\text{UO}_2^{2+}$  特异的核酸酶检测  $\text{UO}_2^{2+}$  为例, Lu 研究小组<sup>[100]</sup>系统地研究了金纳米颗粒标记或免标记比色法各自的优缺点(表 1-2)。可以看出两种方法各有所长, 可根据具体的需要来选合适的方法(图 1-19)。标记法的探针制备过程相对繁琐, 但是检测过程简便; 而免标记法的探针制备比较简单, 但是检测操作相对复杂。

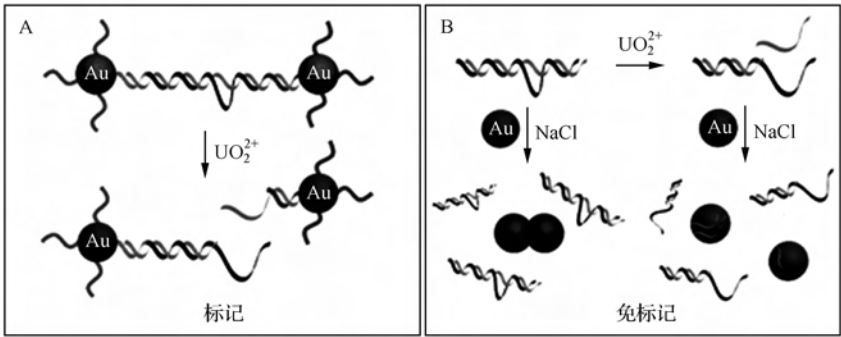


图 1-19 基于  $UO_2^{2+}$  特异的核酸酶:用金纳米颗粒标记(A)与免标记(B)比色方法测定  $UO_2^{2+}$  [100]

表 1-2 金纳米颗粒标记与免标记比色方法比较 [100]

性能	标记	免标记
检测范围	50 nmol/L 至 2 $\mu$ mol/L	1~700 nmol/L
线性范围	50~500 nmol/L	1~100 nmol/L
检测限	50 nmol/L	1 nmol/L
饱和浓度	2 $\mu$ mol/L	700 nmol/L
偏差	饱和浓度有约 10% 偏差	饱和浓度有约 10% 偏差
测量时间	30 min	6 min
测量温度	室温	室温
测量步骤	1 步	3 步
终止反应	不需要	可能需要
比色信号	红色变蓝色	蓝色变红色
类型	信号增强(turn on)	信号猝灭(turn off)
金纳米探针稳定性	好	较好

## 2) 其他生物识别元素

上述的比色检测体系,其生物识别元素是核酸(及功能化核酸)。其他诸如“抗原/抗体”、“受体/配体”、“酶/底物”等特异性识别作用也可以用于构筑高选择性金纳米颗粒比色传感体系 [101~111]。

基于“抗原/抗体”的生物识别作用,研究人员发展了“三明治”型比色检测方法,用于 H5N1 病毒的测定 [101]。在此检测方法中,使用了单链抗体(single-chain fragment variable antibody, scFv)作为识别元素。与完整抗体比较,单链抗体在保持高亲和力的同时,其体积更小,并且具有能够在细菌细胞中表达纯化等优点。如图 1-20 所示,通过所建立的比色方法能够实现低至 0.1  $\mu$ g/mL 试样的检测,表明此方法有好的灵敏度。

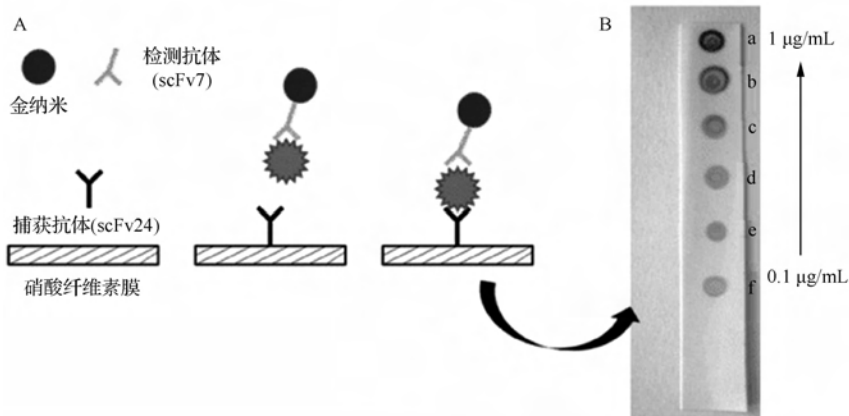


图 1-20 基于“抗原/抗体”的生物识别作用,构筑“三明治”型比色检测体系<sup>[101]</sup>

A. 测定流程图; B. 对 H5N1 流感病毒比色测定的结果

de la Rica 等<sup>[104]</sup>发展了新型的比色型酶联免疫法,用于生物标志物的超灵敏检测(图 1-21)。研究者发现,高浓度过氧化氢( $>120 \mu\text{mol/L}$ )可以还原氯金酸生成红色球形的金纳米颗粒;若用过氧化氢酶来降低过氧化氢浓度( $<120 \mu\text{mol/L}$ ),则还原得到不规则的金纳米颗粒,其溶液呈现蓝色。因而用过氧化氢酶替代传统的辣根过氧化物酶,即可精确调控过氧化氢还原氯金酸的反应(及金纳米颗粒对应的

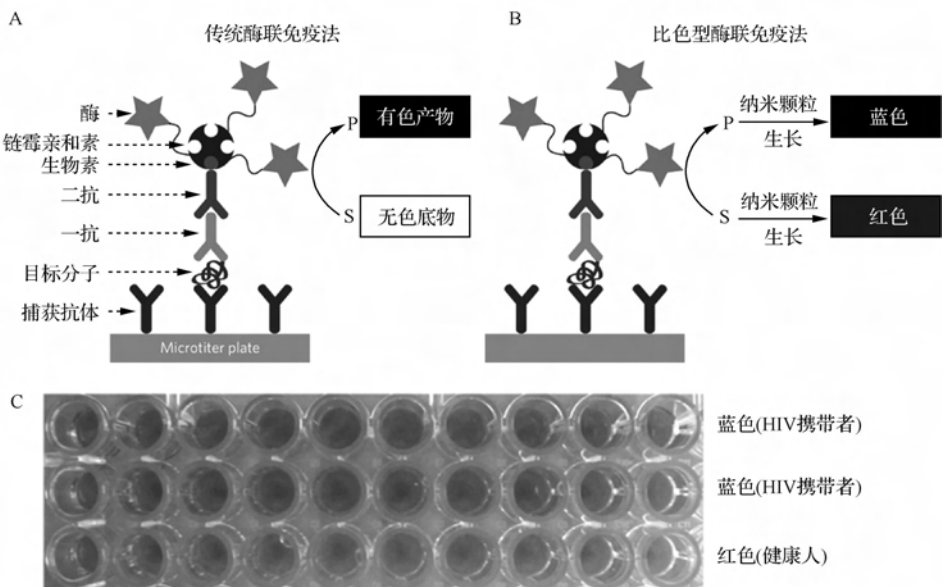


图 1-21 金纳米颗粒比色型酶联免疫吸附测试方法用于肉眼检测疾病的生物标志物<sup>[104]</sup>

A. 传统酶联免疫法示意图; B. 比色型酶联免疫法示意图; C. 用比色型酶联免疫法对临床血清样品的测定结果

颜色变化),实现目标分子的比色检测。该比色方法,对全血中前列腺特异抗原和一型人类免疫缺陷病毒衣壳抗原(HIV-1 capsid antigen)p24 加标样品的检测限均可达  $1 \times 10^{-18}$  g/mL。为进一步验证此方法的临床诊断前景,研究人员还测试了 30 名志愿者的血清样品(10 名健康人,20 名为 HIV 病毒携带者)。用临床现行的标准方法(基于核酸定量),有 10 名 HIV 病毒携带者因其血清中病毒少于 50 拷贝而无法确诊。而使用比色型酶联免疫法,则能给出准确诊断结果,显示了该法极高灵敏度的优势。更为重要的是,此比色方法无需任何测量仪器,仅用肉眼即可做出准确诊断(图 1-21)。这为发展低成本疾病诊断方法和器件提供了可能。

基于氰尿酸衍生物 [1-(2-mercaptoethyl)-1, 3, 5-triazinane-2, 4, 6-trione, MTT] 与三聚氰胺的氢键识别作用, Lu 研究小组<sup>[112]</sup> 发展了一种比色检测三聚氰胺的方法(图 1-22)。当使用氰尿酸衍生物修饰的金纳米颗粒作为探针时,三聚氰胺分子与其通过两个  $\text{NH} \cdots \text{O}$  氢键和一个  $\text{NH} \cdots \text{N}$  氢键作用形成稳定的自组装结

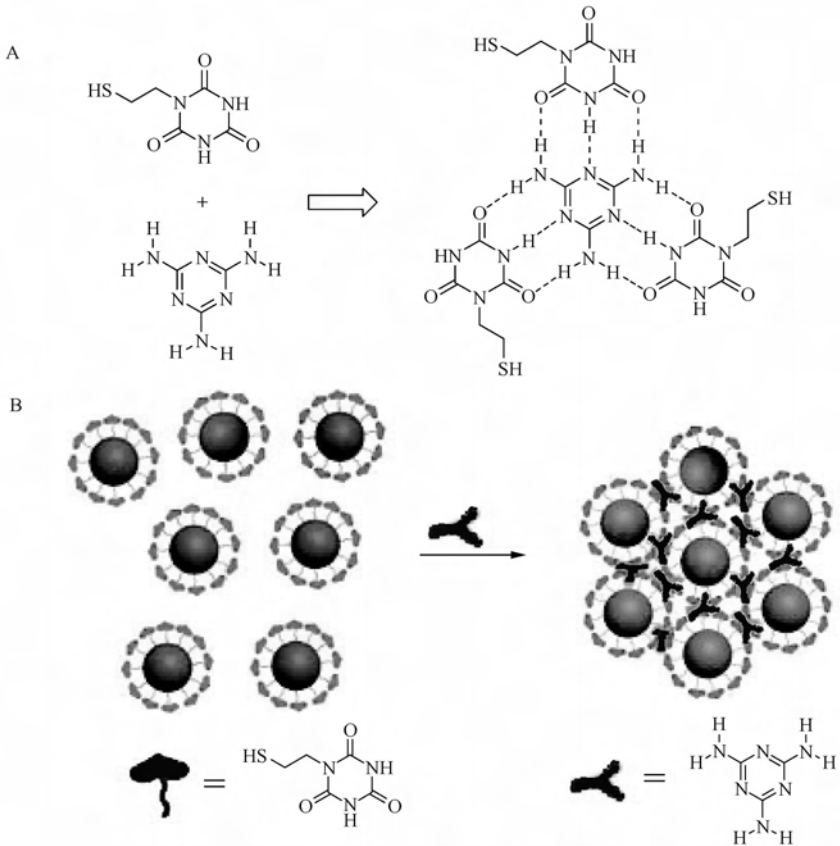


图 1-22 金纳米颗粒比色检测三聚氰胺<sup>[112]</sup>

A. 氰尿酸衍生物与三聚氰胺的氢键识别作用; B. 比色检测原理图

构,诱导金纳米颗粒在溶液中发生聚集,使溶液的颜色由红色变为蓝色,产生比色信号。该检测方法还可以用于对市售牛奶和婴幼儿配方奶粉中的三聚氰胺进行检测。

利用共聚物的双功能特性,Zhang 等<sup>[113]</sup>成功设计了葡萄糖的金纳米颗粒比色传感体系(图 1-23)。所用聚合物其骨架为热敏性的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(即 PNIPAAm),其受热时会收缩;此外还含有硼酸基团,能特异识别葡萄糖。用此聚合物修饰的金纳米颗粒探针,在无目标分子葡萄糖存在时,聚合物保护层受热收缩,并由亲水性变为疏水性,导致金纳米颗粒聚集而呈现蓝色;而当葡萄糖和硼酸结合后,即使受热,聚合物保护层仍然呈亲水性,金纳米能很好分散而呈现红色。此方法可抗高浓度蛋白质(如牛血清白蛋白)等的干扰,研究人员还利用该方法成功检测了尿样中葡萄糖的含量。

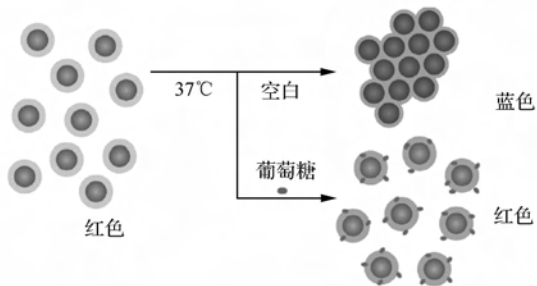


图 1-23 聚合物修饰金纳米颗粒探针比色检测葡萄糖<sup>[113]</sup>

Wang 等<sup>[109]</sup>则利用激酶与其多肽底物的相互作用,实现了对激酶活性的高灵敏比色法检测及激酶抑制剂的比色法筛选。如图 1-24 所示,当修饰在金纳米颗粒表面的多肽底物被激酶磷酸化时,共价连接在三磷酸腺苷上的生物素分子一起被转移到多肽底物上,此时加入亲和素修饰的金纳米颗粒,两者交联而引起纳米颗粒

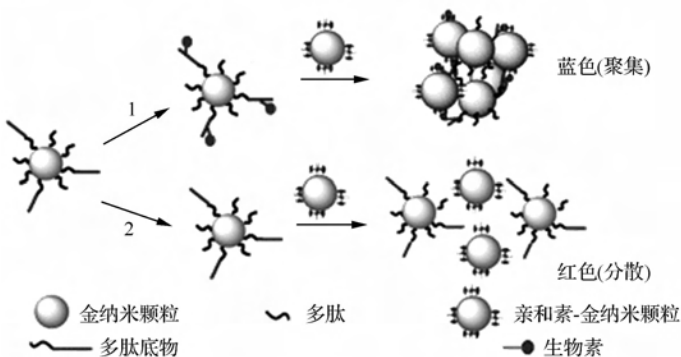


图 1-24 多肽修饰金纳米颗粒探针比色检测激酶及用于激酶抑制剂筛选<sup>[109]</sup>

聚集,使溶液呈现蓝色(步骤 1)。而当有抑制剂存在时,磷酸化反应被抑制,两种纳米颗粒间无交联作用,故纳米颗粒仍为分散状态,溶液呈现红色(步骤 2)。此法有望用于肿瘤相关激酶的诊断检测。

## 2. 银纳米比色法

在体外检测与诊断研究领域,银纳米颗粒也占有一席之地<sup>[10,114~123]</sup>。当粒径相同时,相比于金纳米颗粒而言,银纳米颗粒具有更大的消光系数。故原则上银纳米颗粒的比色分析会更为灵敏<sup>[116,122]</sup>。然而,和金纳米颗粒比色法相比较,人们对银纳米颗粒比色法的关注还不多。这主要是因为银纳米颗粒容易被氧化且银纳米颗粒表面较难修饰所需的识别分子。为此,研究人员发展了一些新的修饰策略,以拓展银纳米颗粒比色法的应用范围<sup>[116,117]</sup>。

例如,Liu 等<sup>[117]</sup>在银纳米颗粒表面修饰了一层二氧化硅(图 1-25)。一方面,可以保护银纳米颗粒不被氧化,增加了其稳定性;另一方面,二氧化硅层的外面含有氨基官能团,能够共价连接 DNA 分子,用于目标核酸的检测。此方法有一定普适性,除了 DNA 外,还可以连接其他类型的识别分子,用于各类目标分子的诊断检测。

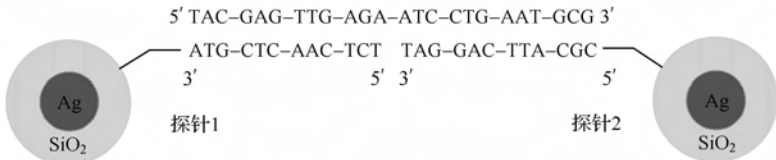


图 1-25 二氧化硅保护银纳米颗粒并修饰用于核酸比色测定<sup>[117]</sup>

如上所述,Mirkin 研究小组<sup>[76]</sup>已证明,较之于单齿的巯基,多齿的巯基能够增强与金纳米颗粒的作用,提高金纳米颗粒探针的稳定性。他们将此策略推广应用于银纳米颗粒表面的修饰,发展了制备稳定银纳米颗粒探针的新方法(图 1-26)<sup>[116]</sup>。他们通过用与核酸链共价相连接的“三联的环状二硫键”基团对银纳米

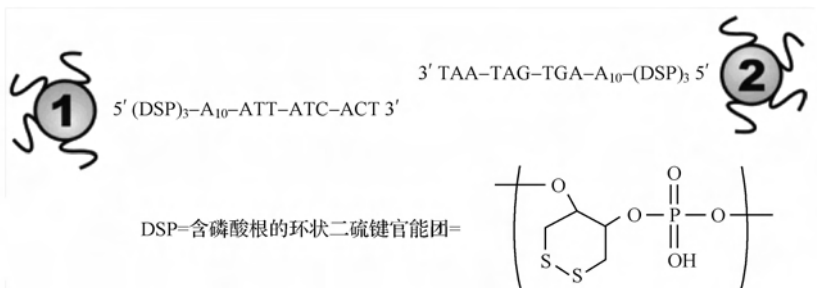


图 1-26 二氧化硅保护银纳米颗粒并修饰用于核酸比色测定<sup>[116]</sup>

颗粒的表面进行修饰,30 min 内即可得到化学性质极稳定的银纳米颗粒探针。此种探针能用于目标核酸的比色分析,极大地拓展了银纳米颗粒在比色检测等领域的应用范围。

Yoosaf 等<sup>[118]</sup>发展了用银纳米颗粒作为探针比色测定铅离子的方法(图 1-27)。此银纳米颗粒用鞣酸衍生物作保护剂。通过鞣酸衍生物与铅离子的氢键桥联作用,将银纳米颗粒拉近聚集,导致银纳米颗粒从黄色变为红色,实现比色测定。实验结果表明,此方法对于铅离子的测定有好的选择性。

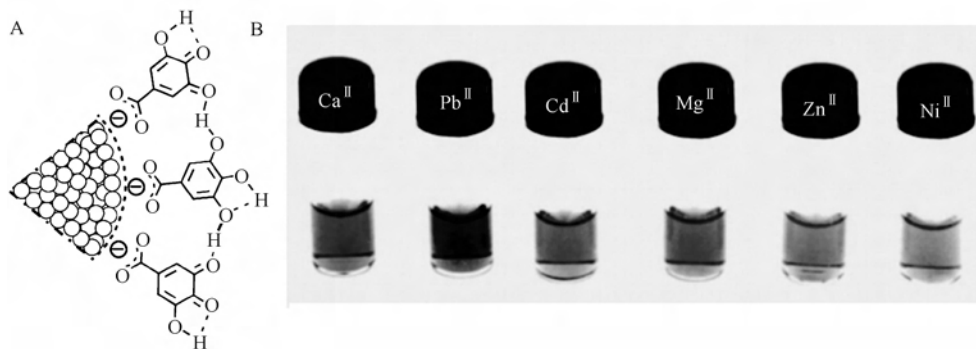


图 1-27 鞣酸衍生物保护银纳米颗粒(A)及其用于比色测定铅离子(B)<sup>[118]</sup>

与金纳米颗粒比色方法类似,银纳米颗粒也可以用于建立免标记比色测定方法<sup>[122,124,125]</sup>。Wang 研究小组<sup>[122]</sup>首次利用免标记银纳米颗粒探针发展了一种操作简便且灵敏度好、选择性高、基于酶反应的比色检测方法(图 1-28)。磷酸化和去磷酸化作用在细胞水平的调控、细胞内信号传递和生物医学研究等方面有着十分重要的意义,研究者因此选择与磷酸化和去磷酸化作用相关的两种酶通过银纳米颗粒的比色行为来监测磷酸化和去磷酸化作用。其一为催化三磷酸腺苷去磷酸化的牛小肠碱性磷酸酶,其二为催化其多肽底物磷酸化的牛心蛋白激酶 A。如图 1-28 所示,在不含酶的情况下,未反应的底物三磷酸腺苷能有效地保护银纳米颗粒不被盐诱导聚集,故银纳米颗粒探针溶液呈亮黄色;当酶催化三磷酸腺苷反应后,其产物(牛小肠碱性磷酸酶的产物为腺苷,牛心蛋白激酶 A 的产物为二磷酸腺苷)无法有效地保护银纳米颗粒,故银纳米颗粒探针溶液会被盐诱导聚集而呈红棕色。借助于此银纳米颗粒探针的颜色变化能够灵敏、选择性地监测磷酸化和去磷酸化作用,也就方便快捷地实现了酶的银纳米颗粒比色检测。此法对牛小肠碱性磷酸酶的检测限为 1 unit/mL,对牛心蛋白激酶 A 的检测限为 0.022 unit/mL。尤为重要的是,该方法还可用于酶活性抑制的分析和复杂生物样品中酶含量的检测。

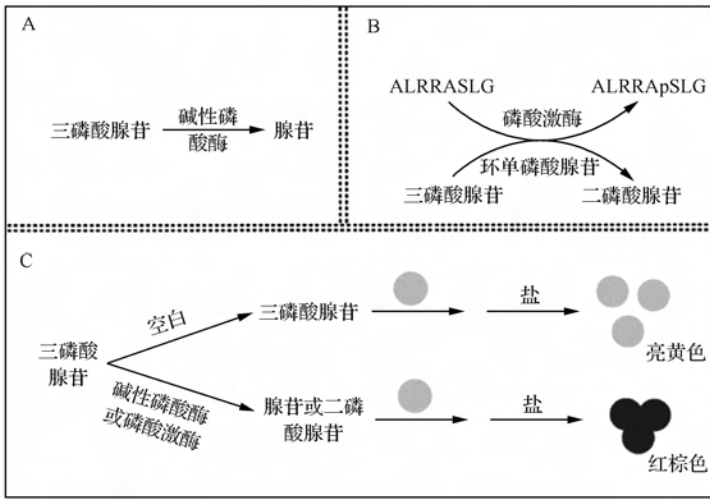


图 1-28 基于银纳米颗粒的酶比色分析示意图<sup>[122]</sup>

A. 碱性磷酸酶的催化反应; B. 磷酸激酶的催化反应; C. 银纳米颗粒免疫标记比色检测原理图

基于柯楠因(coralyn)能够介导单链寡聚腺嘌呤核苷酸组装成双链结构的原理, Yang 研究小组<sup>[124]</sup>提出了用银纳米颗粒免疫标记比色检测柯楠因的方法(图 1-29)。此法不仅可以实现小分子柯楠因的快速灵敏检测,而且有望用于药物的监测和筛选。基于类似的思路, Miao 等<sup>[125]</sup>发展了免疫标记比色测定胰蛋白酶的方法,该方法对胰蛋白酶的检测限达 2 ng/mL。

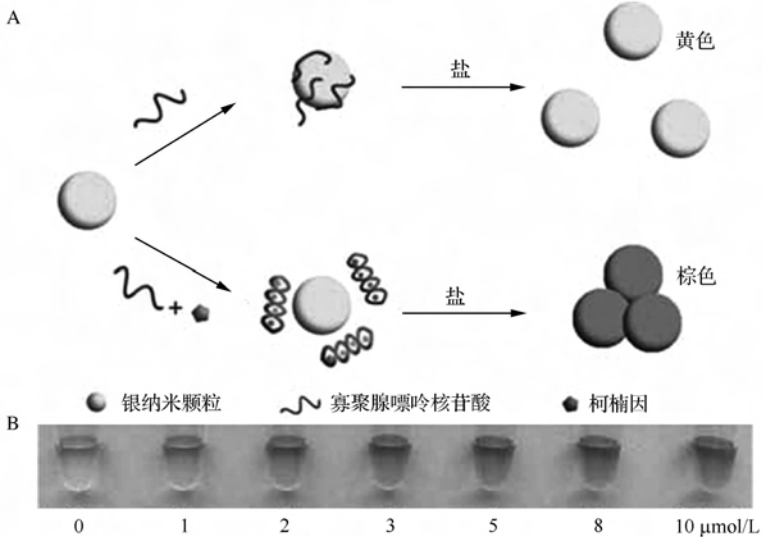


图 1-29 基于银纳米颗粒免疫标记比色检测小分子柯楠因<sup>[124]</sup>

A. 银纳米颗粒免疫标记比色检测原理图; B. 对柯楠因免疫标记比色检测结果



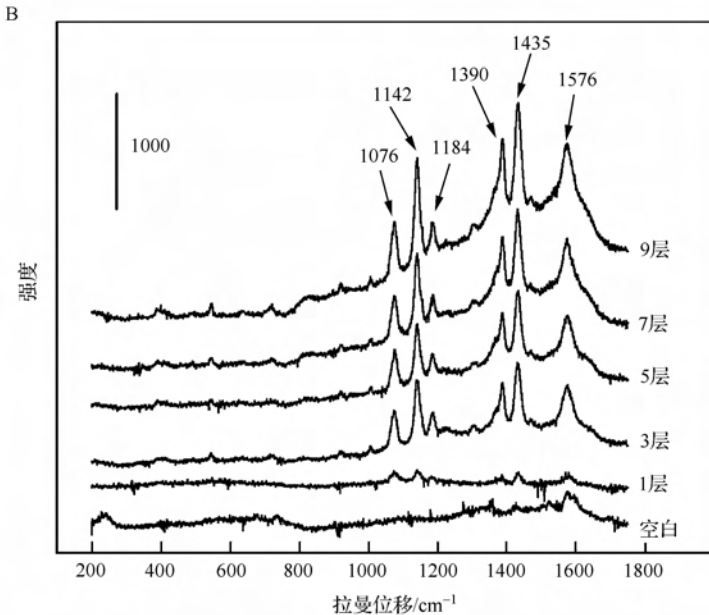
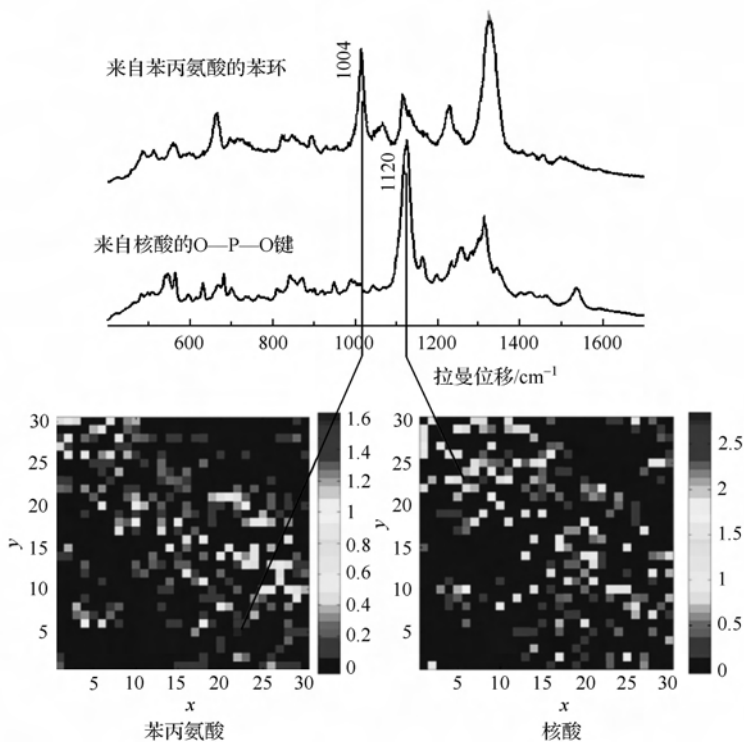
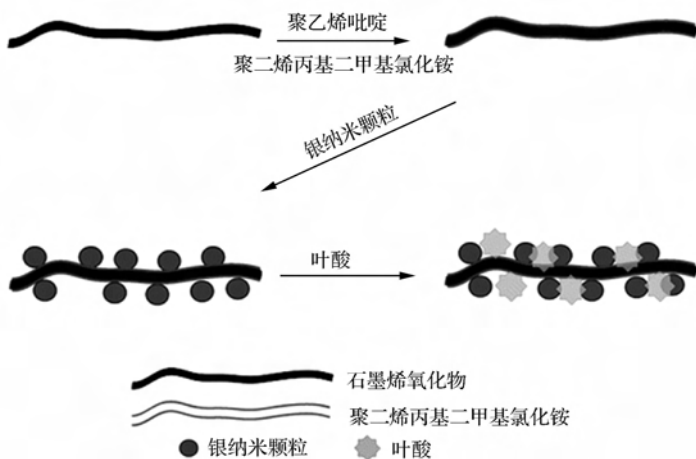


图 1-30 “聚苯乙烯磺酸钠/银纳米颗粒”多层膜(A)及其 SERS 响应(B)<sup>[121]</sup>

利用免标记表面增强拉曼散射光谱法,人们已经实现了对有机小分子、生物小分子、核酸、蛋白质、磷脂、多糖、细胞、细胞内组分、细菌等的检测<sup>[146~148,150~156]</sup>。

Kneipp 等<sup>[151]</sup>将 60 nm 的金纳米颗粒与细胞混合孵育后,利用进入细胞后金纳米颗粒产生的团聚体测定了活细胞内核酸、苯丙氨酸、酪氨酸等组分。如图 1-31 所示,可以分别通过 O—P—O 键( $1120\text{ cm}^{-1}$ )与苯环( $1004\text{ cm}^{-1}$ )来确定核酸与苯丙氨酸在活细胞内的分布情况。可以看出两者并未重合,提示核酸主要在细胞核内而苯丙氨酸则在细胞质中。但因为 SERS 信号与金纳米颗粒团聚体直接相关,团聚体在细胞内不均匀的分布会影响测量结果的准确性。

Ren 等<sup>[147]</sup>用纳米颗粒形成的膜作为 SERS 增强基底,研究了混合磷脂膜中各磷脂组分的分布情况。通过 SERS 成像,发现对于由二肉豆蔻酰基卵磷脂(dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC)和二肉豆蔻酰磷脂酰甘油钠盐(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt, DMPG)组成的混合磷脂膜,在低于相变温度(transformation temperature)时,带负电荷的 DMPG 会形成聚集体。Ren 等<sup>[148]</sup>进一步在石墨烯氧化物上利用聚二烯丙基二甲基氯化铵[poly(diallyldimethyl ammonium chloride), PDDA]和聚乙烯吡啶[poly(vinylpyridine), PVP]组装银纳米颗粒,制备了新型 SERS 增强基底,实现了叶酸的测定(图 1-32)。利用此方法,对稀释血清中叶酸的检测范围为  $9\sim 180\text{ nmol/L}$ ,检测限为  $9\text{ nmol/L}$ 。该方法有望用于药物小分子的检测与监测。

图 1-31 用 SERS 测定细胞内苯丙氨酸和核酸的分布<sup>[151]</sup>图 1-32 用石墨烯氧化物及银纳米颗粒制备新型 SERS 基底用于叶酸测定<sup>[148]</sup>

Tian 与 Wang 研究小组<sup>[146]</sup>提出了“壳层隔绝纳米颗粒增强拉曼光谱”(shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, SHINERS)新方法。此种金纳米颗粒@氧化物的核壳结构设计,其金纳米颗粒核用来增强目标物的拉曼信号,而其氧化物壳则能有效保护金纳米颗粒核不被污染。利用所建立的方法,研究人员以酵母细胞为模型,研究了细胞壁的组分。实验结果表明酵母细胞壁的主要成分为甘露糖蛋白,与文献结果一致,验证了此方法的可靠性。此方法还可用于橘子皮上残留农药的测定(图 1-33)。

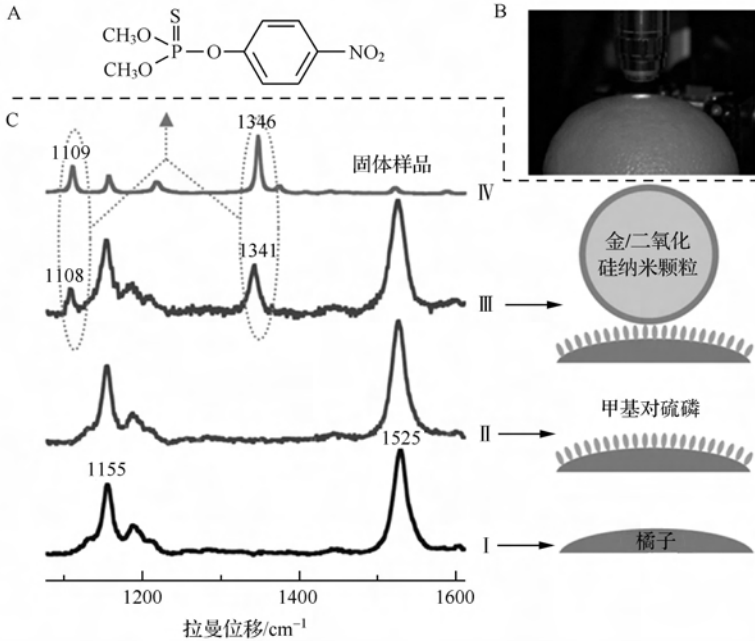


图 1-33 壳层隔绝纳米颗粒增强拉曼光谱方法用于水果农药残留的测定<sup>[146]</sup>

A. 农药对硫磷分子式; B. 检测示意图; C. 对橘子皮上残留对硫磷的检测结果

免标记表面增强拉曼散射光谱法也可用于临床相关细菌、真菌等的快速诊断<sup>[152,155]</sup>。Jarvis 等<sup>[152]</sup>用银纳米颗粒的聚集体作为 SERS 增强基底,首次测定了尿路感染患者临床样品中细菌的种类(图 1-34)。该方法简单快速,在 8 min 内可完成 50 张图谱的采集。通过对所得指纹图谱的数学统计分析(即辨别函数分析与层次聚类分析的多元统计分析),可以准确诊断出患者所携带细菌的种类。

Liu 等<sup>[155]</sup>发展了捕获和用免标记表面增强拉曼散射光谱检测细菌的新方法。如图 1-35 所示,组装在氧化铝模板上的银纳米颗粒阵列作为基底可以增强拉曼信号。其上修饰的万古霉素(vancomycin)涂层,则能有效地捕获细菌(较之于无万古霉素涂层,有涂层的基底捕获效率提高了约 1000 倍)。因此,使用此方法可以直接从血样富集捕获细菌,免除了耗时的细菌培养步骤,极大加快了临床诊断的速度。

研究进一步发现,在该 SERS 增强基底上的万古霉素敏感菌与万古霉素抗性菌有着明显不同的响应。对于万古霉素敏感的肠球菌,与基底接触后会导致肠球菌破裂,其分泌物与 SERS 基底作用而产生信号;对于万古霉素有抗性的肠球菌,与基底接触后仍保持完整,无分泌物释放,也就无对应的信号。此方法,不仅能用于临床诊断和环境监测,也有望用于细菌抗药性的研究。

免标记表面增强拉曼光谱法,其灵敏度主要取决于基底的性能和待检测物在基底上的浓度。而提高灵敏度的一个有效方法就是在基底上大量富集待检测目标物。除了上述用万古霉素富集捕获细菌外<sup>[155]</sup>,研究人员还发展了新的界面富集方

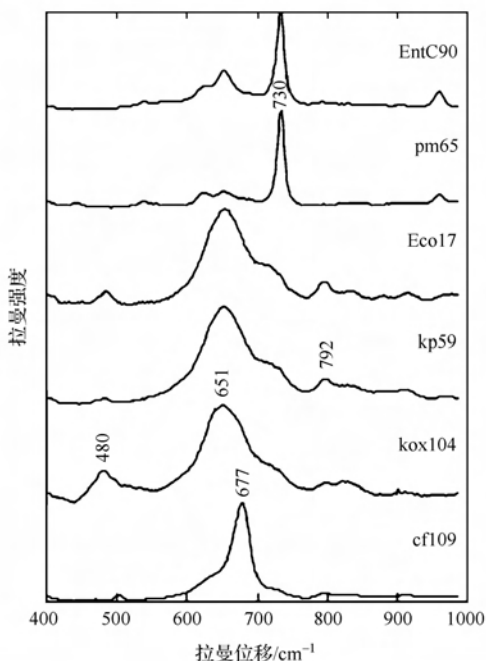
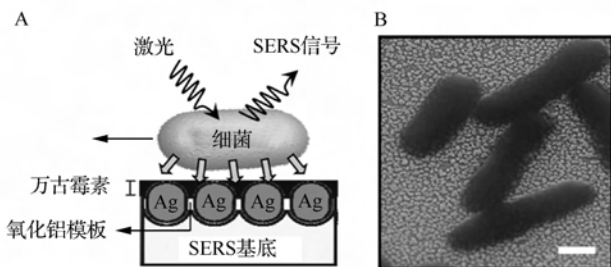


图 1-34 以银纳米颗粒聚集体为基底的 SERS 临床诊断的尿路感染患者所携带细菌的种类<sup>[152]</sup>

EntC90 为 *Enterococcus* spp. (肠球菌); pm65 为 *P. mirabilis* (奇异变形杆菌); Eco17 为 *E. coli* (大肠杆菌); kp59 为 *K. pneumoniae* (克雷伯氏肺炎菌); kox108 为 *K. oxytoca* (产酸克雷伯菌); cf109 为 *C. freundii* (弗氏柠檬酸菌)



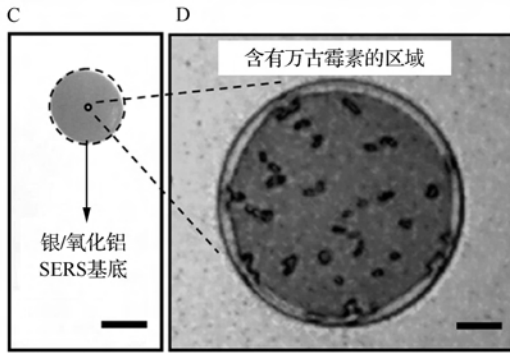


图 1-35 万古霉素功能化银纳米颗粒阵列型 SERS 基底用于捕获和免标记 SERS 检测细菌<sup>[155]</sup>

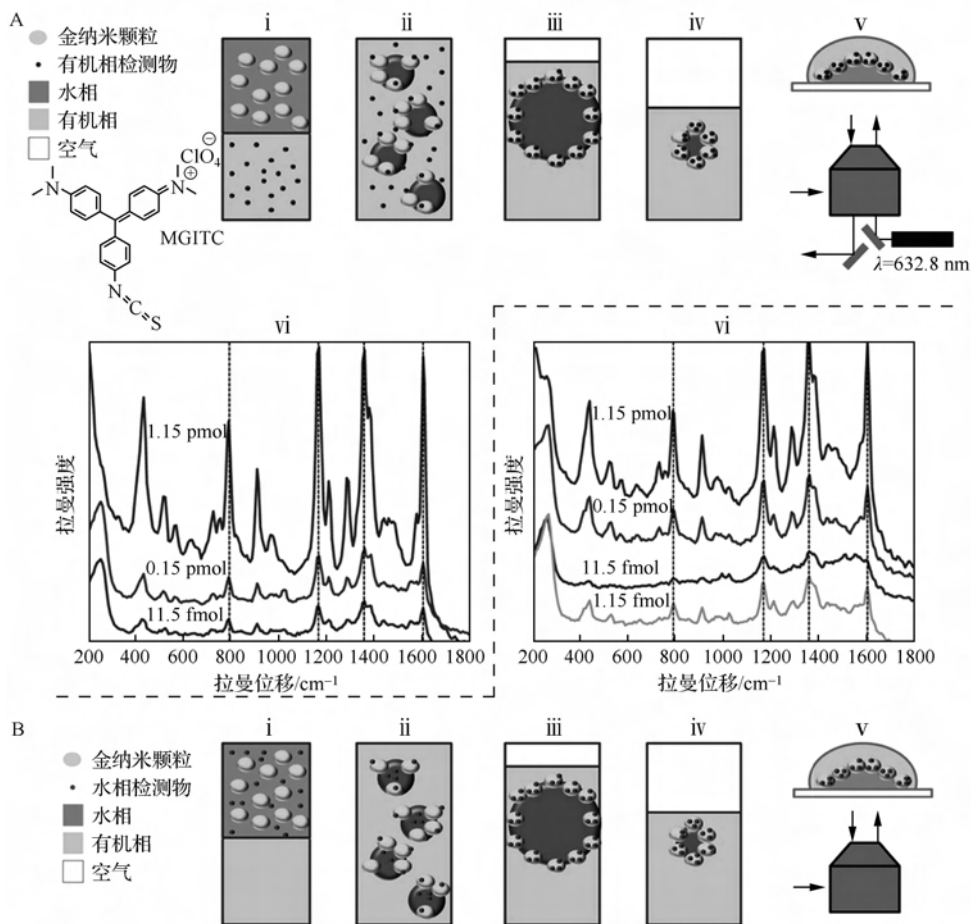
A. 检测原理图; B. 细菌在万古霉素功能化基底上的扫描电子显微镜照片; C. 万古霉素功能化基底的光学照片; D. 细菌在万古霉素功能化基底上的光学照片

法来进一步提高检测灵敏度<sup>[156~158]</sup>。例如, Cecchini 等<sup>[157]</sup>利用金纳米颗粒在液/液界面(或液/气界面)的自组装来富集痕量物质, 实现其高灵敏的检测。如图 1-36A 所示, 对于有机相的目标物[此处以异硫氰基孔雀石绿(malachite green isothiocyanate, MGITC)为模型目标物], 当其与水相的金纳米颗粒混合时, 可形成富集了金纳米颗粒和 MGITC 的微乳液滴。然后除去水溶液, 则相当于进一步浓缩了微乳液滴。将浓缩后的微乳液滴转移到载玻片上即可进行高灵敏的 SERS 测量。对于溶解在有机相的 MGITC, 其检测限可达 10 fmol。若检测物溶解在水中, 可以利用相同的方法实现检测(图 1-36B)。并且对于溶解在水相的 MGITC, 其灵敏度更好, 检测限可达 1.2 fmol。该方法还可以实现多个目标分子的同时检测。更为重要的是, 除了用液/液界面来测量液体中的物质, 还可以利用液/气界面来富集空气中的痕量物质, 以对其进行高灵敏的检测。在 10~25 s 内, 研究人员即可通过该富集方法分别检测到 4-甲氧基苯硫醇(4-methoxy- $\alpha$ -toluenethiol, MATT)和苯胺。

如上所述, 免标记表面增强拉曼光谱法已经成功用于各类物质的分析检测, 显示了其在体外检测和诊断中的应用前景。但仍然存在问题: 其一, 尽管可以通过富集等方式提高灵敏度, 但因为测量信号来自待测物本身, 对于一些拉曼信号很弱或者没有拉曼信号的目标物, 很难实现测量; 其二, 对于复杂的实际样品(如临床样品), 可以通过捕获或者结合巧妙的数据处理给出准确的诊断结果, 但是其操作复杂, 普适性不强; 其三, 由于信号的强度取决于待测物与强度基底的相互作用, 而实际测量中很难精确控制两者的相互作用, 因而会引起信号波动, 影响测量的重现性。因而, 更多的研究工作集中在标记表面增强拉曼光谱法, 通过设计制备高效的 SERS 探针来实现目标物的检测。

## 2. 标记表面增强拉曼散射光谱法

下面将结合具体的例子, 来阐述如何制备高效的 SERS 探针并讨论其在体外

图 1-36 界面自组装富集方法高灵敏度检测痕量物质<sup>[157]</sup>

A. 有机相中痕量物质检测的流程图及测量结果; B. 水相中痕量物质检测的流程图及测量结果。

MGITC 为异硫氰基孔雀石绿(malachite green isothiocyanate)

检测与疾病诊断等方面的应用。

Mirkin 研究小组<sup>[120]</sup>在其比色法的基础上发展了用 SERS 测定目标核酸的方法。如图 1-37 所示,通过将拉曼报告分子标记的核酸链修饰在 13 nm 金纳米颗粒表面,得到了 SERS 探针。当有目标核酸存在时,其与捕获链及 SERS 探针三者形成“三明治”复合结构,然后进一步通过银染增强信号,即可通过拉曼报告分子的拉曼信号强度来确定目标核酸的量,该检测方法的检测限可达 20 fmol/L。若不同的 SERS 探针连接不同的拉曼报告分子及 DNA 探针链,则能根据拉曼报告分子的指纹谱图实现多元检测(图 1-38)<sup>[120]</sup>。若探针不含拉曼报告分子,仅用比色信号则无法实现多元检测。

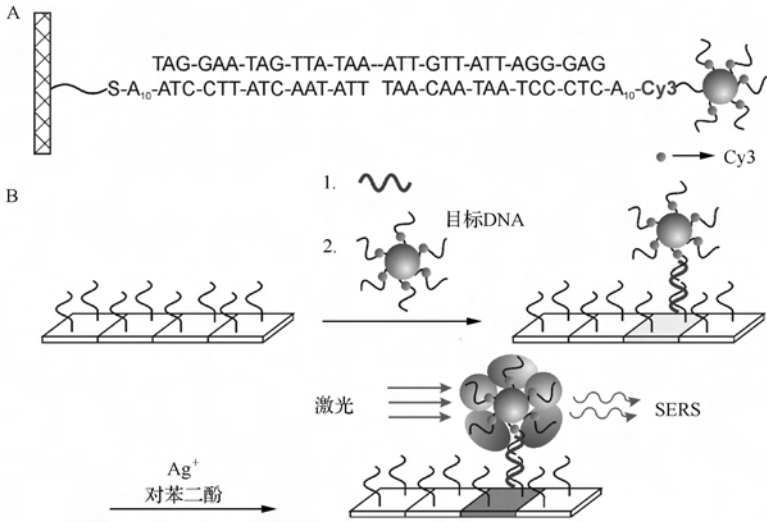


图 1-37 用共价连接了拉曼报告分子的核酸链修饰金纳米颗粒制备 SERS 探针,用于目标核酸检测<sup>[120]</sup>

A. 探针 DNA 与目标 DNA 的序列及其杂交形成的“三明治”结构; B. 检测原理图

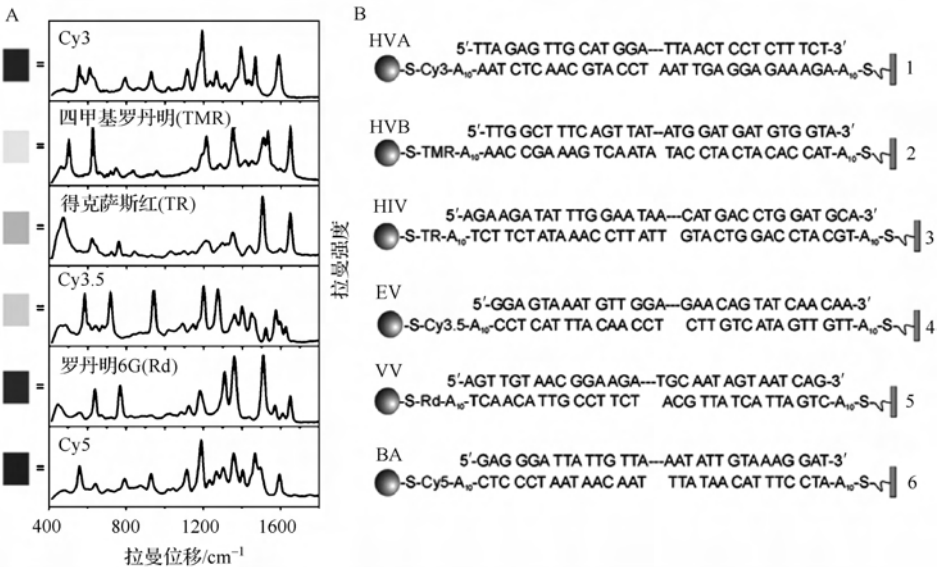


图 1-38 用不同拉曼报告分子修饰金纳米颗粒制备 SERS 探针,用于多元检测<sup>[120]</sup>

A. 不同拉曼报告分子的光谱图; B. 探针 DNA 与目标 DNA 的序列及其杂交形成的“三明治”结构。Cy3 为花菁类染料 Cy3; TMR 为四甲基罗丹明(tetramethyl rhodamine); TR 为得克萨斯红(Texas red); Cy3.5 为花菁类染料 Cy3.5; Rd 为罗丹明 6G(rhodamine 6G); Cy5 为花菁类染料 Cy5; HVA 为甲肝病毒 Vall7 多聚蛋白基因; HVB 为乙肝病毒表面抗原基因; HIV 为人类免疫缺陷病毒基因; EV 为埃博拉病毒基因; VV 为天花病毒基因; BA 为炭疽杆菌保护抗原基因

值得注意的是,上述报道中使用了 13 nm 金纳米颗粒来制备 SERS 探针。由于金颗粒尺寸较小,对报告分子的拉曼信号无明显增强;只有经进一步银染放大,才能够得到检测信号。为更进一步优化探针性能,研究者采用具有更好拉曼增强效果的纳米颗粒(如采用更大粒径的纳米颗粒或者一些独特结构的颗粒)来制备新型探针<sup>[140,159~161]</sup>。

如图 1-39 所示,Lim 等<sup>[160]</sup>发展了制备高度均一、重现性好的 SERS 探针的新方法。以共价连接拉曼报告分子并核酸修饰的金纳米颗粒为种子,在 1% 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 存在的情况下,利用盐酸羟胺还原氯金酸,能在此 20 nm 的金纳米核上生长出一层约 11 nm 厚的壳层。所形成的核壳之间间距约为 1 nm,且有部分位点以纳米桥结构连接在了一起。通过精确调控报告分子在核酸共价修饰的位置,可将报告分子恰好置于此 1 nm 的纳米间隙中,从而产生强的拉曼信号。如图 1-39B 所示,与团聚体探针相比较,此新型 SERS 探针的信号要强约 100 倍。如果引入不同的报告分子,利用此方法还可以制备有不同指纹图谱的探针,用于多元检测。

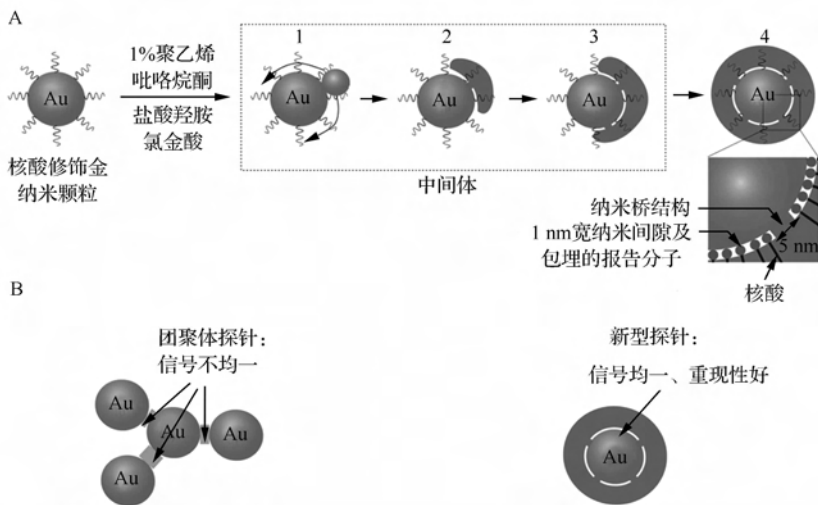


图 1-39 在 1 nm 宽的纳米间隙中修饰拉曼报告分子来制备高度均一、重现性好的 SERS 探针<sup>[160]</sup>

A. 新型 SERS 探针制备流程图; B. 新型 SERS 探针与团聚体 SERS 探针的比较

Fabris 等<sup>[162]</sup>则利用银纳米颗粒发展了核酸的 SERS 检测方法。不同于传统的核酸检测体系,他们采用了肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 来捕获待测样品中的目标核酸。如图 1-40 所示,肽核酸不带电荷,故若无目标核酸存在,固定有肽核酸的基底不会吸附荷正电的银纳米颗粒,也就不会产生表面增强拉曼散射光谱信号;当有目标核酸存在时,肽核酸能与目标核酸杂交产生荷负电的表面,此时就能够吸附荷正电的银纳米颗粒,进而加入拉曼活性报告分子(这里为罗丹明 6G)来

记录表面增强拉曼散射光谱信号。此种检测模式具有一定的普适性,而且有望和核酸阵列技术联用以实现核酸的高通量分析。

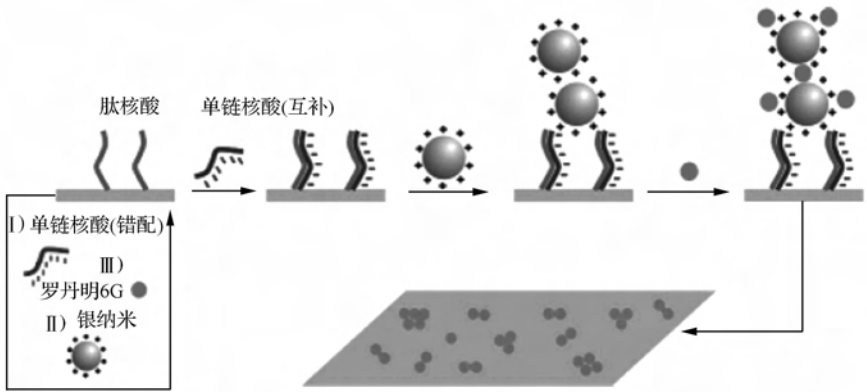


图 1-40 基于肽核酸进行核酸表面增强拉曼散射光谱检测的示意图<sup>[162]</sup>

除基于核酸杂交的生物识别作用外,其他的各种特异识别作用也可用来构建 SERS 检测和诊断方法。例如,Wang 与 Dong 研究小组<sup>[163]</sup>利用凝血酶核酸适配体对其特异的识别作用,发展了凝血酶的 SERS 检测方法。基于如图 1-41 所示的“核酸适配体/凝血酶/核酸适配体-SERS 探针”的“三明治”结构设计,能实现凝血酶的高灵敏度,其检测限可达 0.5 nmol/L。该方法有很好的选择性,所用核酸适配体能特异识别  $\alpha$  型凝血酶,而  $\beta$  型与  $\gamma$  型凝血酶均无干扰。Wang 等<sup>[164]</sup>则进一步利用修饰了抗体的金纳米棒作为捕获基底,用修饰了凝血酶核酸适配体的金纳米颗粒作为探针,进一步降低了对凝血酶的检测限。在凝血酶存在时所形成的“三明治”结构,有着大的电磁场增强效应,故能够提供更高的灵敏度,可实现对低至 220 pmol/L 凝血酶的特异检测。而且此方法还可用于人血清中凝血酶的测定,为推广应用于临床诊断提供了可能。

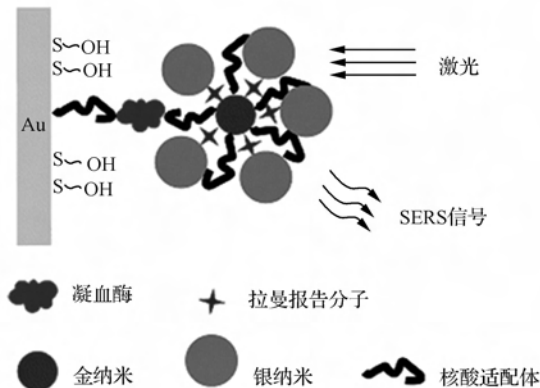


图 1-41 基于核酸适配体特异识别作用,用表面增强拉曼散射光谱方法检测凝血酶<sup>[163]</sup>

基于铅离子特异核酸酶的剪切作用,研究人员构筑了用 SERS 方法检测铅离子的传感体系<sup>[165]</sup>。如图 1-42 所示,铅离子特异核酸酶与其底物形成的杂交双链结构固定在了金基底上,然后进一步通过与底物链杂交引入拉曼报告分子标记的金纳米颗粒探针,以产生强的拉曼信号。当有铅离子存在时,底物链被切断,释放金纳米颗粒探针,导致拉曼信号减弱。此检测体系可以实现对约 20 nmol/L 铅离子的灵敏检测。并且其他二价金属离子的存在对铅离子检测干扰很小,表明该方法有好的选择性。

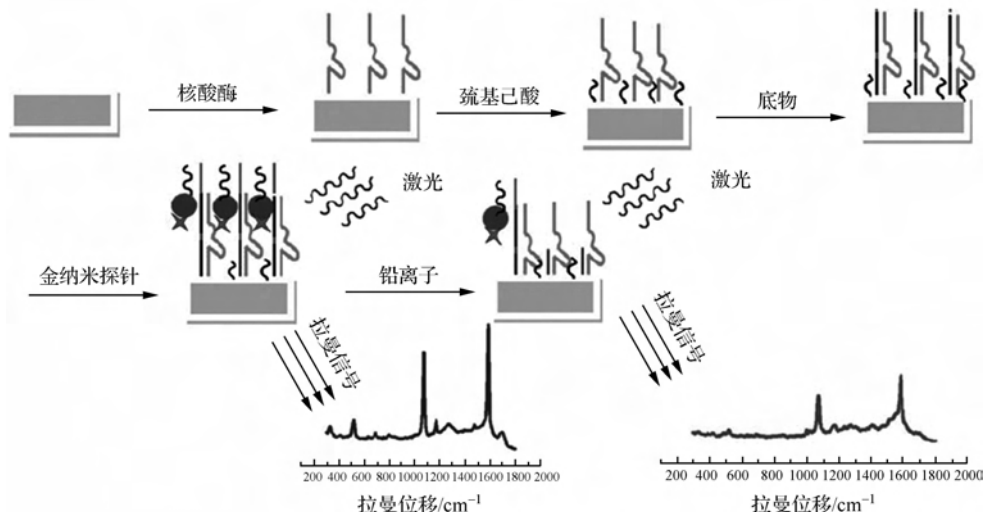


图 1-42 基于铅离子特异核酸酶的剪切作用,用表面增强拉曼散射光谱方法检测铅离子<sup>[165]</sup>

标记表面增强拉曼散射光谱检测方法也被广泛用于免疫诊断与检测。在其最初的设计中,Grubisha 等<sup>[166]</sup>将拉曼报告分子和抗体共同修饰在 30 nm 金纳米颗粒表面来制备 SERS 探针(图 1-43A)。此种设计,缺陷在于拉曼报告分子和抗体为竞争关系,会互相影响与金纳米颗粒表面的作用;且由于抗体取代了部分拉曼报告分子的位点,降低了灵敏度。在改进的设计中,研究人员先用拉曼报告分子修饰金纳米颗粒表面,然后在此报告分子单层的外端连接抗体(图 1-43B)<sup>[166]</sup>。这样便能制备灵敏度更高、稳定性更好的 SERS 探针。用改进后的 SERS 探针,采用“三明治”的检测模式,实现了对前列腺特异性抗原的高灵敏检测,其检测限可达 1 pg/mL。研究者进一步指出,可选用更大粒径的金纳米颗粒(如 50 nm 或者 60 nm 的金纳米颗粒)或者选择与激发激光波长共振的报告分子来进一步增强 SERS 探针的检测灵敏度,以实现对单个抗原的检测<sup>[2,131,166]</sup>。

Nie 研究小组<sup>[2,131]</sup>在其早期工作的基础上,发展了一种制备高效 SERS 探针的方法(图 1-44)<sup>[167]</sup>。如图 1-44 所示,首先在 60 nm 金纳米颗粒表面连接拉曼

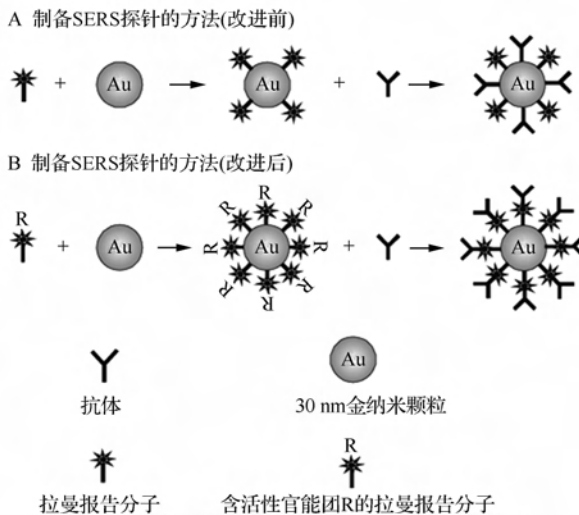


图 1-43 改进 SERS 探针制备方法,用于免疫诊断与检测<sup>[166]</sup>

A. 拉曼报告分子和抗体同时连接在金纳米颗粒表面来制备 SERS 探针;B. 拉曼报告分子连接在金纳米颗粒表面,而抗体连接在拉曼报告分子来制备 SERS 探针

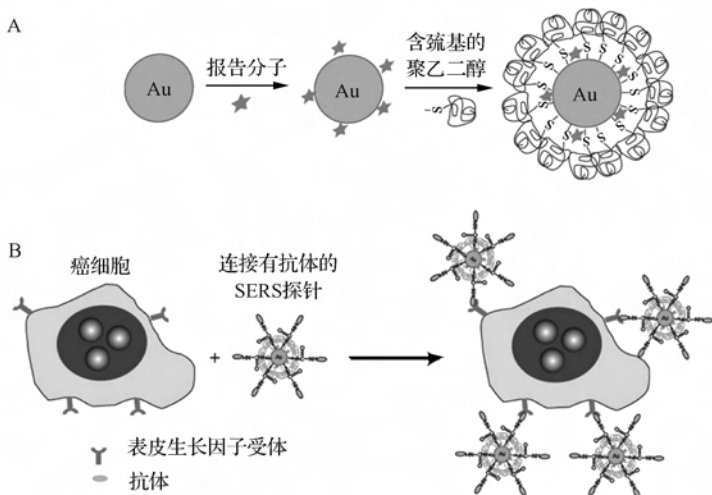


图 1-44 将 60 nm 金纳米颗粒表面用聚乙二醇等修饰以制备高效 SERS 探针,用于生物检测与体内诊断<sup>[167]</sup>

A. SERS 探针制备流程图;B. 肿瘤细胞检测示意图

报告分子,然后利用巯基与金的作用在金纳米颗粒表面连接聚乙二醇和末端含羧基的聚乙二醇。连接上的聚乙二醇层一方面可以提高探针的稳定性,另一方

面其末端羧基可以进一步共价连接生物识别分子(如抗体等)。用这种方法,可以制得均一、稳定、水溶性好、SERS 信号强的高效探针。研究者证明此 SERS 探针不仅可用于癌细胞的灵敏检测,还可用于小鼠体内肿瘤的特异性靶向成像与诊断。

采用与 Nie 研究小组类似的设计<sup>[131]</sup>, Gambhir 研究小组<sup>[168]</sup>发展了可用于多元检测的高效 SERS 探针(图 1-45)。与图 1-44 所示方法不同, Gambhir 研究小组是用二氧化硅层来包埋拉曼报告分子和连接生物识别分子的。图 1-45A 给出了 10 种探针的示意图,将这 10 种探针注射到小鼠体内后,可以根据探针的图谱特征进行准确归属(图 1-45B)。而若将 5 种探针通过尾静脉一起注射到小鼠体内,能在肝脏部位同时定量检测并准确区分 5 种探针。这些研究意味着,针对某一疾病(如癌症)的多个生物标志物,将来有可能利用 SERS 多元成像来实现疾病更加准确的检测和诊断。

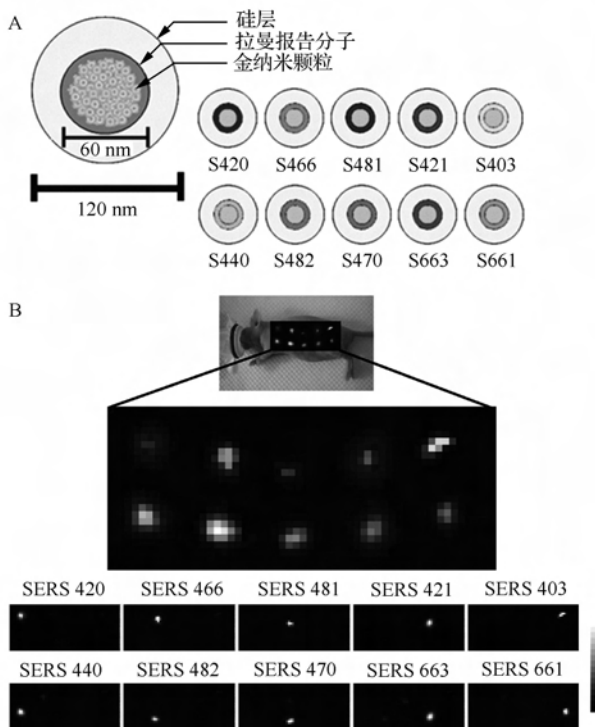


图 1-45 将 60 nm 金纳米颗粒用拉曼报告分子标记并用二氧化硅包裹来制备高效 SERS 探针,用于多元检测与体内诊断<sup>[168]</sup>

A. SERS 探针结构示意图; B. SERS 探针用于小鼠活体多元成像

除上述利用成像等方法进行肿瘤诊断外,研究人员也在探索其他的诊断策略。

例如,通过测定循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)(参阅附注五),人们希望可以实现肿瘤的体外早期诊断、治疗疗效的快速评估及治疗后复发的监测等。在此方面,研究人员已用 SERS 检测方法做了有益的探索。例如,Sha 等<sup>[169]</sup>发展了一种快速检测缓冲溶液及人全血样品中循环肿瘤细胞的方法(图 1-46)。以 SKBR3 肿瘤细胞为模型,将 SKBR3 肿瘤细胞加到全血中可得待检测样品。先用修饰有上皮细胞黏附分子抗体的磁微球来捕获 SKBR3 肿瘤细胞,然后再利用修饰有人表皮生长因子受体 2 抗体的 SERS 探针来进行检测。该方法有很好的选择性和灵敏度,能够检测到的最低浓度可至 10 个细胞/mL。

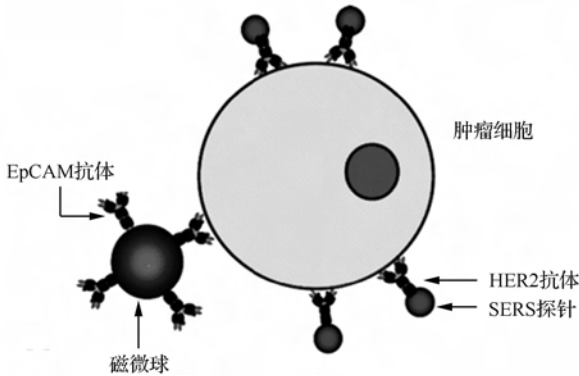


图 1-46 用磁微球来捕获循环肿瘤细胞,进而用 SERS 探针进行检测<sup>[169]</sup>

EpCAM 为上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule);HER2 为人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2)

### 附注五：循环肿瘤细胞捕获与检测：大海捞针？

临床实践中,通常是用活组织切片检查(biopsy)来诊断癌症、评估治疗效果及监测治疗后复发等。但这种方法属于损伤性检测,会给患者带来很大的痛苦,且检测周期长、价格昂贵。为此,研究人员提出“液相活检”(liquid biopsy)的概念,即通过检测游离在血液中的循环肿瘤细胞等来进行癌症早期诊断、确诊及监测<sup>[170]</sup>。

如表 1-3 所示,循环肿瘤细胞在血液中含量极少,1 mL 血液一般仅含几个到几十个(癌症晚期患者的循环肿瘤细胞含量会增多),因而极难被准确检测,被喻为是“大海捞针”<sup>[171,172]</sup>。为此,研究者一方面开发各类富集捕获方法平台来有效地分离循环肿瘤细胞;另一方面,也在发展各类新型的检测探针以实现其高灵敏、高选择性检测。

表 1-3 每毫升新鲜血液中细胞数目<sup>[171]</sup>

细胞种类	每毫升新鲜血液中细胞的数目	
	平均值	范围
红细胞	5 000 000 000	$4.4 \times 10^9 \sim 5.9 \times 10^9$
白细胞	7 000 000	$3.9 \times 10^6 \sim 10.6 \times 10^6$
血小板	295 000 000	$150 \times 10^6 \sim 440 \times 10^6$
总计	5 302 000 000	
循环肿瘤细胞	未见报道	0 到 >1000
白细胞分类		
淋巴细胞	2 400 000	$1.2 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^6$
单核细胞	300 000	$0 \sim 0.5 \times 10^6$
颗粒白细胞	4 000 000	$1.4 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^6$

图 1-47 给出了用表面增强拉曼散射光谱检测碱性磷酸酶的例子<sup>[173]</sup>。碱性磷酸酶本身没有拉曼活性,其底物 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸钠也没有拉曼活性,但是对应的酶反应产物 5-溴-4-氯-3-吡啶二聚体有拉曼活性。这样,可以通过产物的表面增强拉曼散射光谱来实现碱性磷酸酶的检测。实验中研究人员选用粒径为 54 nm 的金纳米颗粒作为表面增强拉曼散射光谱的增强基底。在优化的实验条件下,可以实现碱性磷酸酶的超灵敏检测,检测限可达  $4 \times 10^{-15}$  mol/L。此方法还可以拓展至其他酶反应体系,测定其浓度与活性<sup>[174]</sup>。

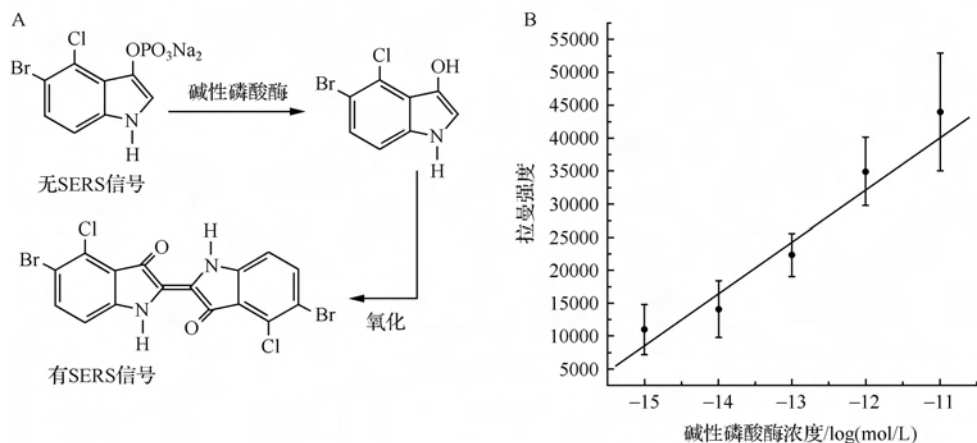


图 1-47 通过酶催化反应,将无 SERS 活性的底物转化为有 SERS 活性的产物来测定酶的浓度与活性<sup>[173]</sup>

A. 检测原理图; B. 碱性磷酸酶浓度与拉曼强度关系图

Wang 与 Dong 研究小组<sup>[175]</sup>用亮绿(brilliant green)作为拉曼报告分子,将其吸附在银纳米颗粒上制备了 SERS 探针并用于活细胞成像。如图 1-48 所示,细胞内探针的 SERS 信号并不均一,表明银纳米颗粒探针在细胞内的分布是不均一的。研究者认为这与银纳米颗粒探针进入细胞的方式有关。具体来说,在银纳米颗粒探针经由内吞作用进入细胞时,会被包含在内含体内,而细胞内内含体分布是不均匀的,也就导致了银纳米颗粒探针及其 SERS 信号的不均一分布。值得一提的是,所用的银纳米颗粒有较好的生物相容性,对于细胞的活性无明显影响。

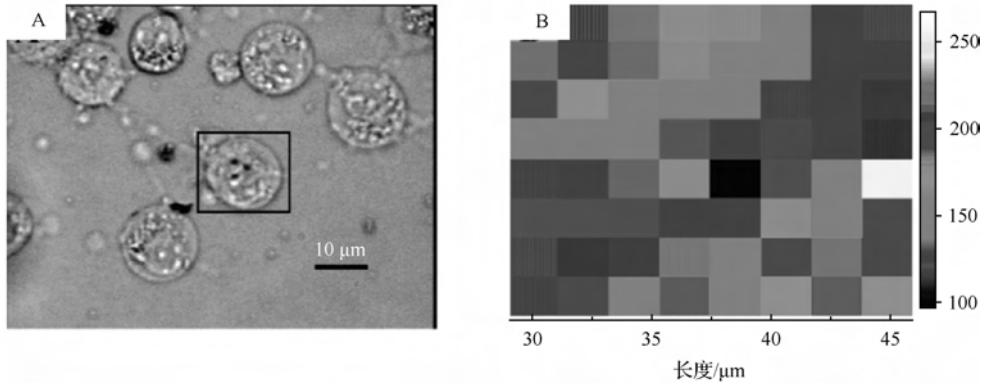
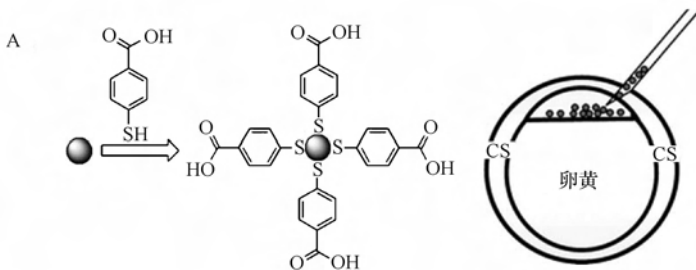


图 1-48 亮绿修饰的银纳米颗粒用于活细胞成像<sup>[175]</sup>

A. 人肾胚胎 HEK-293 细胞的光学照片;B. 用  $1614\text{ cm}^{-1}$  处拉曼位移对 A 中方框内的单细胞进行拉曼成像

Wang 等<sup>[176]</sup>制备了对巯基苯甲酸修饰的金纳米颗粒 SERS 探针,并研究了其在活体成像中的应用。研究人员将所制备的 SERS 探针注入还在单细胞状态的斑马鱼(zebrafish)受精卵内,然后通过测量不同时间探针的 SERS 信号来跟踪斑马鱼胚胎的发育过程[注:注射位点是细胞区域(cell region)而非储备营养物质的卵黄(yolk)](图 1-49)。研究者证实所制备的 SERS 探针有很好的生物相容性,在将其注入斑马鱼受精卵后,并不影响胚胎的正常发育。对 SERS 探针的跟踪发现,金纳米颗粒探针会随着细胞的分裂而进入不同的器官和组织中(如脑、口、咽喉、耳泡、尾等),但不进入卵黄管(yolk tube)中<sup>[176]</sup>。



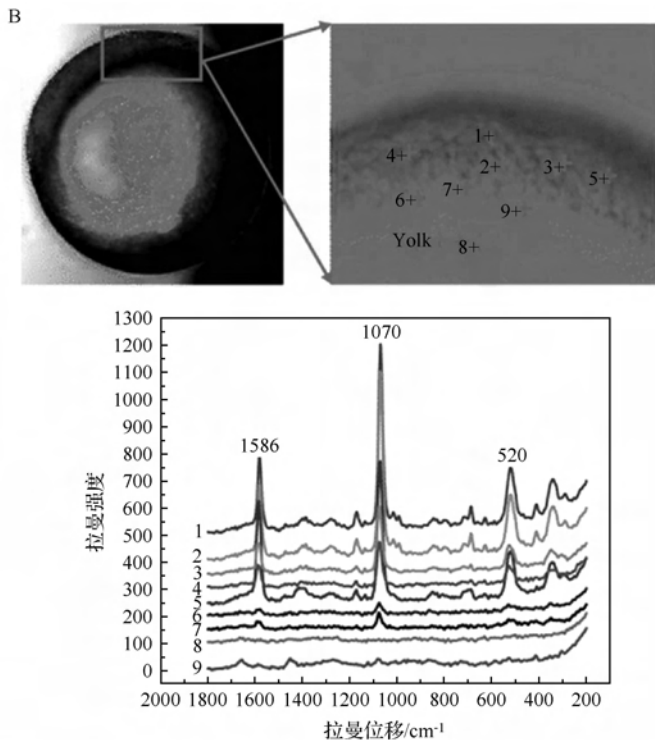


图 1-49 用对巯基苯甲酸修饰的金纳米颗粒作为 SERS 探针,通过活体成像来跟踪斑马鱼胚胎的发育<sup>[176]</sup>

A. SERS 探针制备及将 SERS 探针注射入斑马鱼受精卵内的示意图;B. 斑马鱼胚胎的光学照片及拉曼光谱图

Graham 研究小组<sup>[139]</sup>报道了将 SERS 探针用于细胞三维多元成像的方法。如图 1-50 所示,可以通过测细胞自身的拉曼信号(如蛋白质、氨基酸、磷脂、核酸等)来重构细胞的三维轮廓;而测量源自纳米颗粒探针的 SERS 信号则可以确定探针的位置和种类(此研究中总计使用了 4 种纳米颗粒探针)。将两者组合,即可确定细胞内探针的分布情况(图 1-50C)。从图 1-50 可以清楚看到纳米颗粒探针是分布在细胞内部的。与透射电子显微镜的三维成像技术相比较,尽管前者有更好的分辨率,但是会损坏样品,无法用于活体成像;而 Graham 研究小组报道的方法,因为是基于样品和探针的拉曼信号(或 SERS 信号),为无损方法,因此其在生物体系中的应用具有很好的前景。

### 3. 针尖增强拉曼散射光谱法

针尖增强拉曼散射光谱,即利用金属等极细微的针尖(如原子力显微镜的针尖)与样品接触而增强其拉曼光谱的谱学方法。自 Zenobi 等发现针尖增强拉曼散

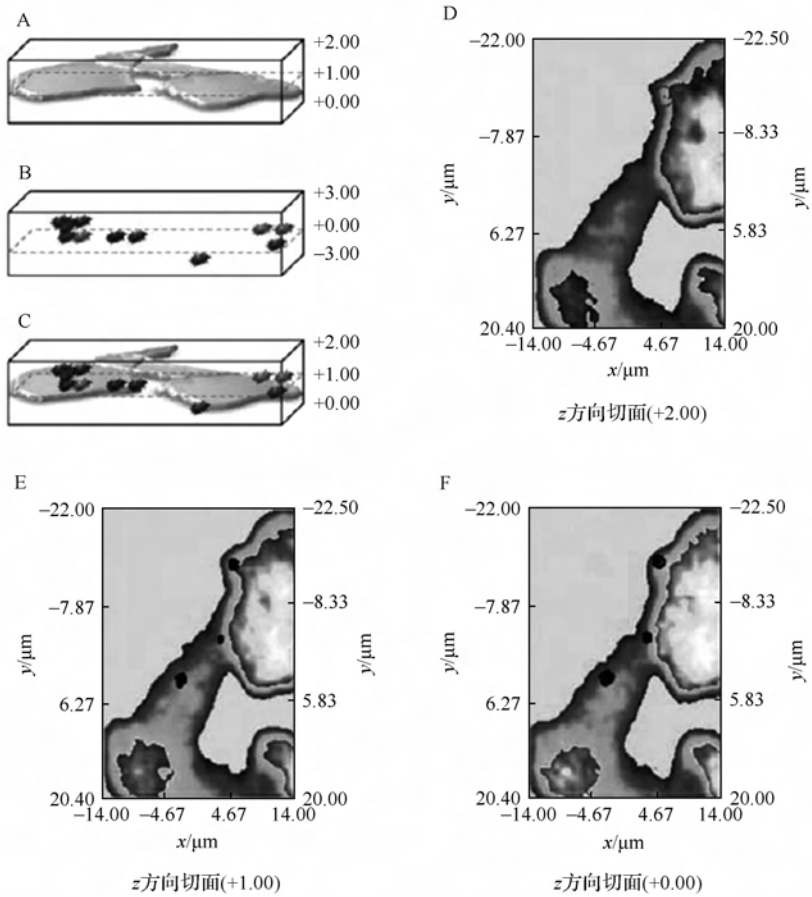


图 1-50 SERS 探针用于细胞三维多元成像<sup>[139]</sup>

- A. 利用细胞自身的拉曼信号确定细胞轮廓; B. 利用 SERS 探针的信号定位探针的空间位置; C. 将 A 与 B 叠加可得 SERS 探针在细胞的三维分布情况; D~F.  $z$  方向不同切面的拉曼成像图

射光谱 (tip-enhanced Raman spectroscopy, TERS) 以来<sup>[177]</sup>, TERS 因其极高的空间分辨率和检测灵敏度得到了研究人员的广泛青睐<sup>[136, 178~182]</sup>。

Zhang 等<sup>[179]</sup>首次观察到了亮甲酚蓝 (brilliant cresyl blue, BCB) 的单分子 TERS 光谱。当银针尖与金基底接近至 1 nm 时, 两者之间能产生极大的增强电场。此时若金基底上吸附有拉曼活性的分子 (如亮甲酚蓝), 则能够获得其增强的拉曼光谱。研究者通过一系列对比实验确证, 他们能获得单个亮甲酚蓝分子的增强拉曼光谱 (图 1-51)。Liu 等<sup>[136]</sup>在扫描隧道显微镜的金针尖和金基底之间通过 4, 4'-联吡啶桥连作用形成分子结 (junction), 进而同时测量了所形成单个分子结的电学及对应的 TERS 光谱性质。这为深入研究电子在分子内部的传递过程提

供了新思路。Zhang 等<sup>[181]</sup>则证明 TERS 技术不但能获得单个分子的光谱信息,而且能对单个分子进行超高分辨成像。以吡啶衍生物为模型,研究人员成功获得了其亚纳米分辨的单分子拉曼图像。所得图像分辨率可达 0.5 nm,因而可以有效地识别吡啶分子内部结构和研究分子在表面上的吸附构型。

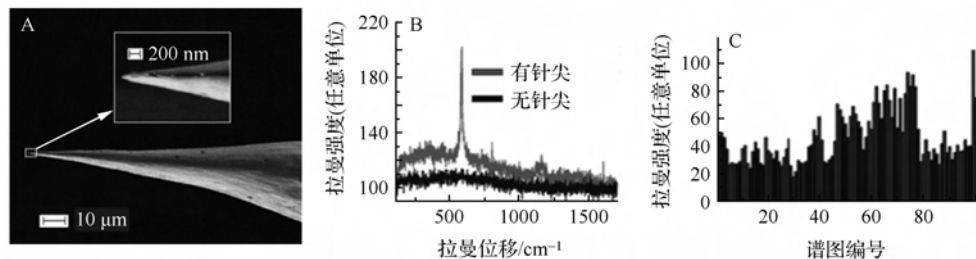


图 1-51 用银针尖作 TERS 探针来测定亮甲酚蓝的单分子拉曼光谱<sup>[179]</sup>

A. 银针尖的扫描电子显微镜照片;B. 有/无针尖增强时亮甲酚蓝的拉曼光谱图;C. 不同谱图间拉曼强度的分布图

除用模型分子来验证 TERS 的高分辨率和高灵敏度外,研究人员也研究了 TERS 在生物检测与诊断方面的应用<sup>[183~186]</sup>。例如,Alexander 等<sup>[186]</sup>利用抗体修饰的金纳米颗粒标记细胞膜表面,然后利用 TERS 进行成像检测。研究发现,可通过抗体  $1485\text{ cm}^{-1}$  等峰来确定金纳米颗粒的位置(图 1-52)。若无抗体标记,则金纳米颗粒会被胞吞进入细胞内;这种情况下无 TERS 增强效果,也就检测不到对应的 TERS 信号<sup>[186]</sup>。该工作为研究细胞或者组织表面的生物分子相互作用提供了可能。

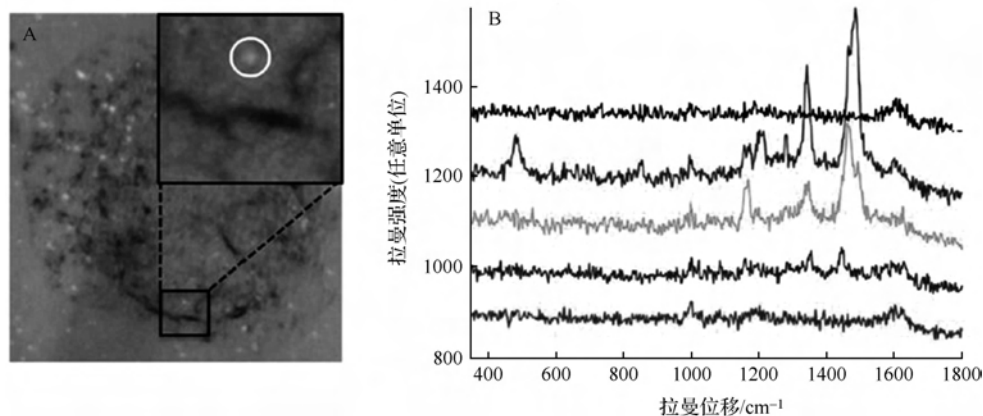


图 1-52 TERS 方法检测结合在细胞膜表面上的抗体修饰了的金纳米颗粒<sup>[186]</sup>

A. 结合金纳米颗粒探针后的细胞明场照片;B. 不同金纳米颗粒的拉曼光谱(金纳米颗粒选自 A 中方框内区域)

研究者还用 TERS 光谱方法来表征不同病毒株。Hermann 等<sup>[184]</sup>选取了大小不同的两张病毒株进行了 TERS 测量。禽痘病毒 (avipoxvirus, APV) 大小为 350 nm, 腺病毒伴随病毒 (adeno-associated virus, AAV) 大小为 26 nm。如图 1-53 所示, 对于每一种病毒株, 其不同病毒颗粒 (如病毒颗粒 1、2、3) 之间的 TERS 光谱 (即峰的强度和位置) 均存在着波动。相对于腺病毒伴随病毒而言, 禽痘病毒不同病毒颗粒之间的波动更大。研究者认为, 在用 TERS 方法检测诊断病毒株时, 对于腺病毒伴随病毒等较小的病毒颗粒, 几次测量即可获得用于归属的特征性图谱; 而对于禽痘病毒等较大的病毒颗粒, 需要多次 (或者成像) 测量才能获得足够准确的特征性图谱用于鉴别病毒的种类。

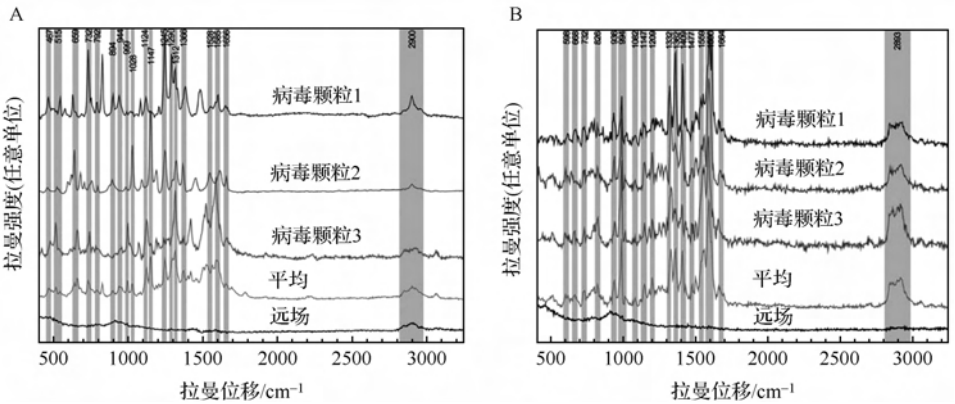


图 1-53 TERS 方法测定不同病毒株<sup>[184]</sup>

A. 禽痘病毒; B. 腺病毒伴随病毒

Deckert 研究小组<sup>[183]</sup>发展了利用原子力显微镜结合 TERS 测定被疟疾感染红细胞内的疟色素 (hemozoin) 的方法。如图 1-54 所示, 被疟疾感染的红细胞经固定切片后, 可用原子力显微镜进行成像, 获得其相貌信息。在高分辨的原子力显微镜图像中, 能够清楚观察到疟色素的单晶 (图 1-54C)。对此单晶进行针尖增强拉曼散射 (TERS) 测量, 可得到其特征拉曼图谱 (图 1-54D)。上述结果表明, 结合原子力显微镜和 TERS 方法各自的优势, 可获得单细胞内纳米尺度的分子信息。研究者还预测, 此联用方法有望用于药物检测及筛选等。

### 1.2.3 荧光法

金属纳米材料也被广泛用于各类目标分子的荧光测量与检测<sup>[187~196]</sup>。荧光法大致可以分为两类: 一类是基于金属纳米材料自身的荧光性质来进行检测与诊断; 另一类则是利用金属纳米材料来增强 (或者猝灭) 其他荧光团 (如有机染料分子、量子点等) 荧光的现象实现目标物测量与检测。

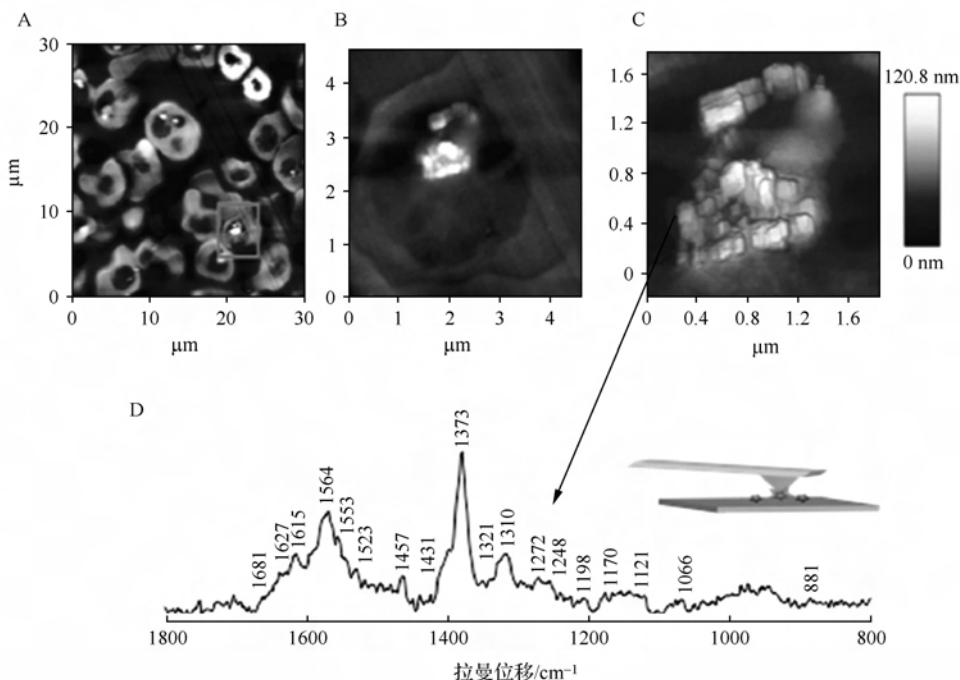


图 1-54 原子力显微镜结合 TERS 来测定被疟疾感染红细胞内的疟色素<sup>[183]</sup>

A~C. 被疟疾感染红细胞的原子力显微镜图像;B 为(A)中方框内的放大图;C 为 B 中疟色素单晶的放大图;

D. C 中疟色素单晶的拉曼光谱

## 1. 荧光金属纳米团簇

绝大多数有荧光性质的金属纳米材料,尺寸一般为 1~2 nm(或者更小)。这类材料统称为金属纳米团簇(metal nanocluster),已被广泛应用于生物分析与检测、催化、能源、电子器件等领域<sup>[187~203]</sup>。限于篇幅,这部分将重点阐述荧光金属纳米团簇(fluorescent metal nanocluster)在体外检测与疾病诊断中的应用研究。荧光金属纳米团簇,按其材料可以分为金纳米团簇、银纳米团簇、铜纳米团簇等;按其保护试剂可以分为核酸保护的金属纳米团簇、蛋白质保护的金属纳米团簇、其他配体保护的金属纳米团簇等。下面将按照材料分类来进行讨论。

### 1) 金纳米团簇

荧光金纳米团簇,可以用小分子、氨基酸、聚合物、枝状高分子、核酸、多肽、蛋白质,甚至细胞等做保护试剂来合成<sup>[204~220]</sup>。荧光金纳米团簇已被广泛用于有毒金属离子检测、小分子检测、蛋白质检测、生物成像等研究领域。

研究人员已用荧光金纳米团簇实现了金属离子(如汞离子、铜离子等)的检测<sup>[204,213,221~224]</sup>。例如,Ying 研究小组<sup>[221]</sup>报道了用牛血清白蛋白稳定的荧光金纳

米团簇来检测有害金属汞离子的方法。Wei 等<sup>[213]</sup> 则利用溶菌酶保护的荧光金纳米团簇实现了汞离子的高灵敏、高选择性快速检测。因所用荧光金纳米团簇表面 Au<sup>+</sup> 与 Hg<sup>2+</sup> 有着特异的金属亲和作用,故汞离子能选择性猝灭金纳米团簇的荧光。利用这种荧光信号的变化,即可实现汞离子检测(图 1-55)。所建立方法的检测灵敏度可达 10 nmol/L,能满足美国环保署(U. S. Environmental Protection Agency)对饮用水中汞离子含量的检测要求。该方法还有很好的选择性,常见的二价金属离子(如 Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 等)对检测无明显干扰。基于同样的方法,Lin 等进一步实现了对甲基汞的检测<sup>[223]</sup>。Guo 研究小组用其所制备的荧光金纳米团簇实现了铜离子的检测<sup>[222,224]</sup>。

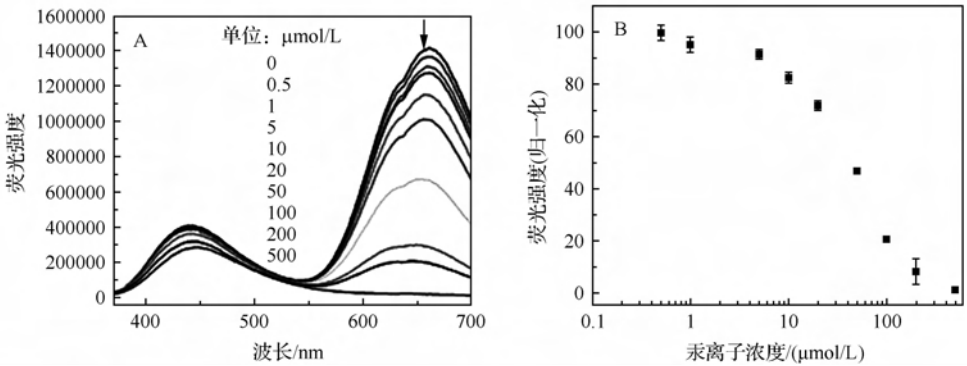
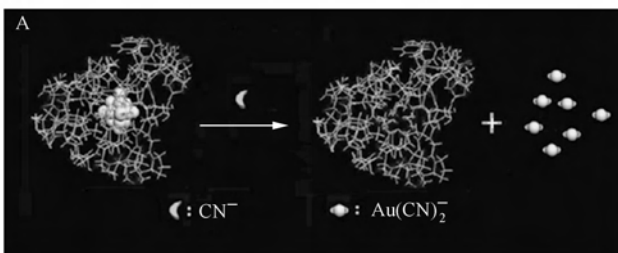


图 1-55 溶菌酶保护的荧光金纳米团簇用于汞离子检测<sup>[213]</sup>

A. 加入不同浓度汞离子时金纳米团簇的荧光光谱变化图;B. 汞离子浓度响应曲线

Lu 研究小组<sup>[225]</sup> 利用氰离子对荧光金纳米团簇的刻蚀作用,发展了一种检测水样中氰离子的方法。如图 1-56 所示,氰离子能够将牛血清白蛋白稳定的荧光金纳米团簇降解为氰离子-金的络合物,进而猝灭金纳米团簇的荧光。该方法有很好的选择性,实验表明多种阴离子和阳离子均对氰离子的检测无明显干扰。其检测限可达 200 nmol/L,是世界卫生组织对饮用水中氰离子含量检测要求的 1/14。研究者还取不同水样(如去离子水、地下水、池塘水、自来水、湖水等)进行氰离子加标,验证了此方法在实际检测中的可行性。



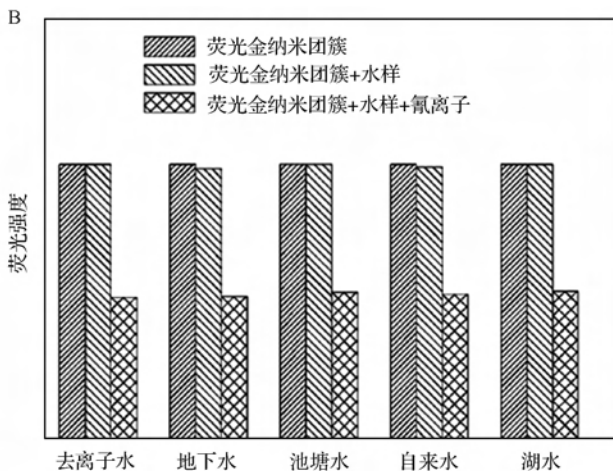


图 1-56 牛血清白蛋白稳定的荧光金纳米团簇用于水样中氰离子检测<sup>[225]</sup>

A. 氰离子检测原理图; B. 水样中氰离子的检测

Zhang 研究小组<sup>[215]</sup>制备了辣根过氧化物酶保护的荧光金纳米团簇(图 1-57)。

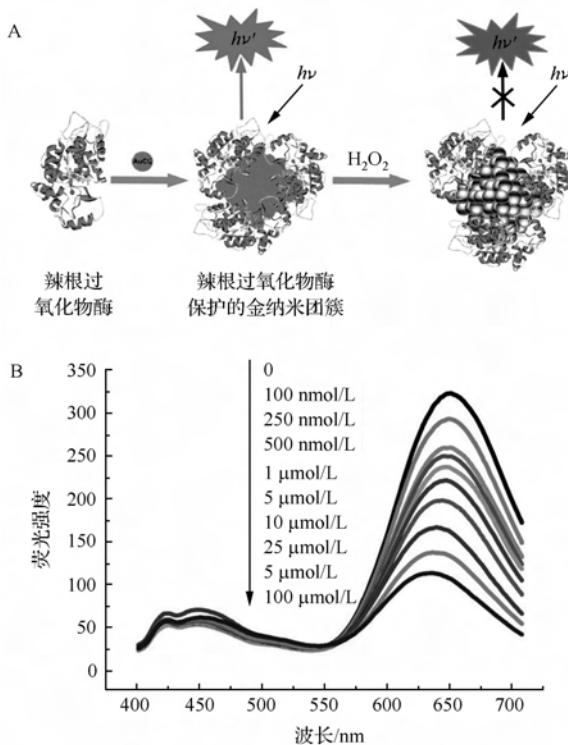


图 1-57 辣根过氧化物酶保护的荧光金纳米团簇用于双氧水检测<sup>[215]</sup>

A. 检测原理图; B. 加入不同浓度过氧化氢时金纳米团簇的荧光光谱变化图

他们认为在形成金纳米团簇后,辣根过氧化物酶仍保持着其催化活性。当加入双氧水时,辣根过氧化物酶催化过氧化氢氧化保护金纳米团簇的巯基官能团,进而诱导金纳米团簇的聚集,导致其荧光猝灭。基于此原理,他们发展了双氧水的荧光检测方法。与此类似,Wang 等<sup>[218]</sup>利用蛋白酶(protease)对荧光金纳米团簇上起保护作用蛋白质(如溶菌酶、转铁蛋白等)的降解作用,发展了测定蛋白酶的方法。

Yan 研究小组<sup>[226]</sup>用胰蛋白酶做保护剂合成了荧光金纳米团簇。他们发现,该金纳米团簇能与半胱胺(cysteamine)保护的金纳米颗粒通过静电作用组装在一起,两者之间发生能量转移而猝灭金纳米团簇的荧光。而当带有负电荷的肝素(heparin)存在时,由于其能竞争金纳米团簇与半胱胺保护的金纳米颗粒的作用而破坏这种组装,从而使金纳米团簇的荧光恢复。基于此现象,即可实现对肝素的荧光检测(图 1-58)。此外,研究者还进一步用叶酸修饰金纳米团簇来制备可用于肿瘤成像的功能化探针。实验证明叶酸修饰的金纳米团簇探针有很好的生物相容性。以植入了人宫颈癌肿瘤(HeLa tumor)的小鼠为模型,用此探针可以实现肿瘤的特异性荧光成像。

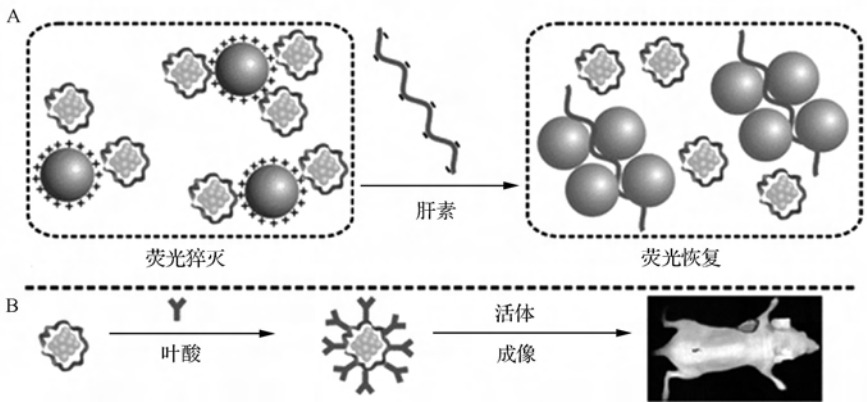


图 1-58 胰蛋白酶保护的荧光金纳米团簇用于肝素的检测和活体成像<sup>[226]</sup>

A. 肝素检测原理图; B. 叶酸修饰的荧光金纳米团簇用于小鼠活体成像流程图

Sun 等<sup>[214]</sup>利用去铁铁蛋白(apoferritin)合成了发荧光的“成对金纳米团簇”(paired gold nanocluster)。研究者认为所形成的金纳米团簇结合在铁蛋白重链的铁氧化酶活性位点上。在酸性条件下,铁蛋白会解离成单体。比较单体所含金纳米团簇的荧光与“成对金纳米团簇”的荧光,发现后者的发射光谱红移且强度更高。这表明铁蛋白内所含的“成对金纳米团簇”间存在着某种相互作用。细胞毒性试验证明此“成对金纳米团簇”有很好的生物相容性。此外,铁蛋白依然保持了其生物活性,能与铁蛋白受体特异结合,进行靶向定位。研究者进一步用小鼠模型证明,此“成对金纳米团簇”可用于小动物全身成像,且能够特异地靶向识别小鼠肾脏组

织(图 1-59)。

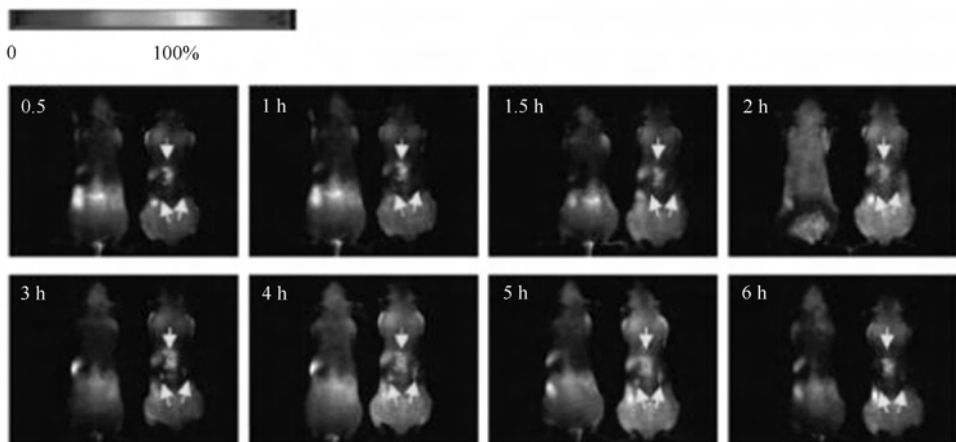


图 1-59 去铁铁蛋白保护的荧光“成对金纳米团簇”用于小动物成像<sup>[214]</sup>

Wang 等<sup>[227]</sup>制备了抗体药物赫赛汀(herceptin)修饰、并用牛血清白蛋白保护的  
金纳米团簇(图 1-60)。研究者利用赫赛汀的靶向性,特异地识别高表达人表皮  
生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)的肿瘤细胞并  
诱导其凋亡。与单独的赫赛汀相比,结合在金纳米团簇上的赫赛汀显示了更好的  
肿瘤细胞杀伤能力。这为肿瘤的检测与治疗提供了新的思路。

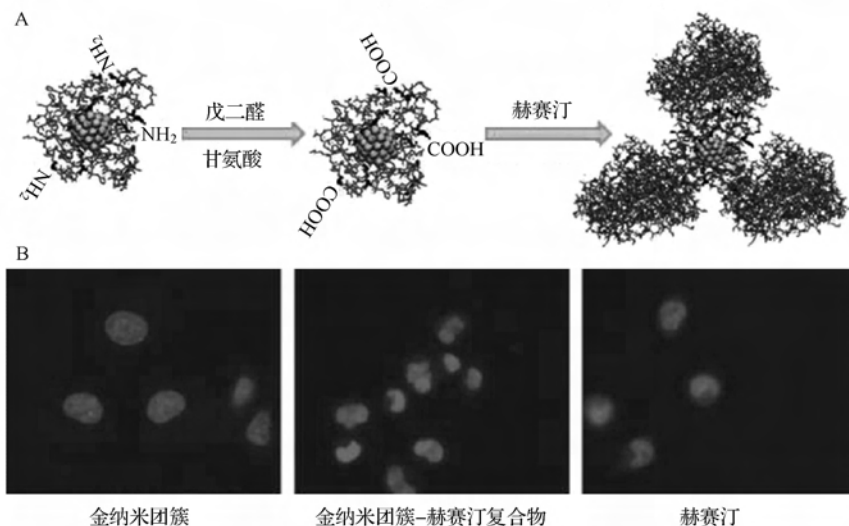


图 1-60 用抗体药物赫赛汀修饰牛血清白蛋白保护的  
金纳米团簇(A),并用于靶向识别肿瘤  
细胞和诱导肿瘤细胞凋亡(B)<sup>[227]</sup>

Shang 等<sup>[228]</sup>合成了硫辛酸(lipoic acid)保护的荧光金纳米团簇,并将其作为温度敏感探针,用荧光寿命成像技术来测量细胞温度。如图 1-61 所示,随着温度的升高,金纳米团簇的荧光寿命减少。研究者进一步实验证明,此方法还可以探测细胞不同部位温度的差异,表明此方法有望用于亚细胞器温度变化的研究。

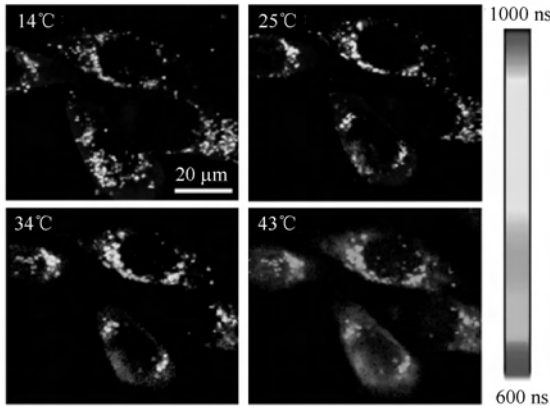


图 1-61 硫辛酸保护的金纳米团簇用作温度敏感探针,用荧光寿命成像技术测量细胞温度<sup>[228]</sup>

Wang 研究小组<sup>[220]</sup>发现,在肿瘤细胞(如人肝癌 HepG2 细胞、白血病 K562 细胞等)内可以通过原位还原氯金酸得到发荧光的金纳米团簇(图 1-62)。而正常细胞(如人胚胎肝细胞 L02)内则无荧光金纳米团簇形成。造成肿瘤细胞和正常细胞这种区别的一个可能的机理是:较之于正常细胞,肿瘤细胞内一些活性氧物种(如双氧水等)含量更高,而其可以作为还原剂将氯金酸还原成零价金;此外,肿瘤细胞内高含量的对苯二酚、双氧水等还可作为金纳米团簇的保护剂,有利于生成稳定的金纳米团簇。基于此现象,研究者进一步在肿瘤旁皮下注射氯金酸,经孵育之后在肿瘤内观测到了原位形成金纳米团簇的荧光。这一金纳米团簇原位生长方法为活体生物检测与成像提供了全新的方法和思路。

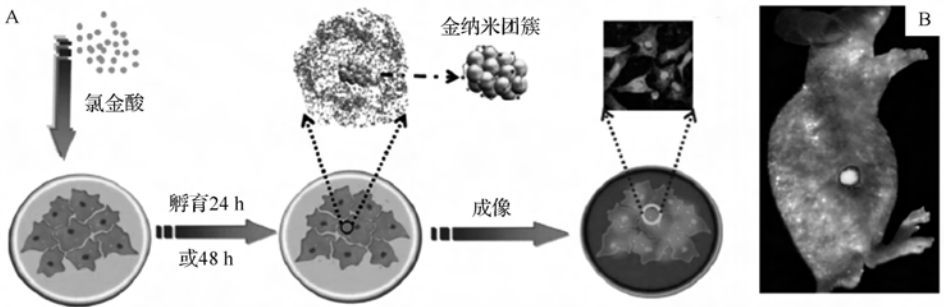


图 1-62 肿瘤细胞内原位合成荧光金纳米团簇(A)及在植入小鼠体内的肿瘤内原位合成荧光金纳米团簇(B)用于肿瘤成像<sup>[220]</sup>

## 2) 银纳米团簇

与金纳米团簇类似,小分子、聚合物、枝状高分子、核酸、多肽、蛋白质等也可用作保护试剂来合成银纳米团簇<sup>[229~240]</sup>。与其他保护试剂相比,用核酸合成银纳米团簇是目前最为活跃的研究领域,已有数篇相关的综述文献总结了迄今为止的研究进展<sup>[188,190,191,193,194,196,236]</sup>。荧光银纳米团簇已被作为探针,用于分析和检测诸如有毒金属离子、生物活性小分子、核酸、蛋白质、癌细胞等<sup>[238,241~255]</sup>。此外,研究者也初步探索了荧光银纳米团簇在分子逻辑与生物计算方面的潜在应用(参阅附注六)<sup>[256~259]</sup>。

### 附注六: 生物逻辑与计算——智能型检测与诊断

与我们熟知的计算机类似,生物体系也能储存和处理大量的信息。事实上,在生物体内存在着许多精巧复杂的生物逻辑与计算(biological logic and computing)体系,如乳糖操纵子(lac operon)等。研究人员也一直在尝试用生物分子在分子和纳米尺度上构建人工的生物逻辑与计算体系,并已取得了显著进展<sup>[24,260~275]</sup>。迄今,研究人员已经发展了诸如可用于数字信息处理的逻辑门元件、能自供给能量的逻辑传感体系、生物安全密码锁体系等。若元件和体系的输入信号是待检测的目标物,则即可建立智能型的检测与诊断方法。与前述的生物传感体系类似(图1-1),这些元件和体系的输出信号可以是光、电、磁、力、热、声等。荧光银纳米团簇也被用于构筑生物逻辑与计算的元件和体系<sup>[256~259]</sup>。例如,Wang与Dong研究小组用钾离子与氢离子作为输入信号,银纳米团簇的荧光作为输出信号,构建了NOT、NOR、AND等逻辑门(图1-63)<sup>[256]</sup>。

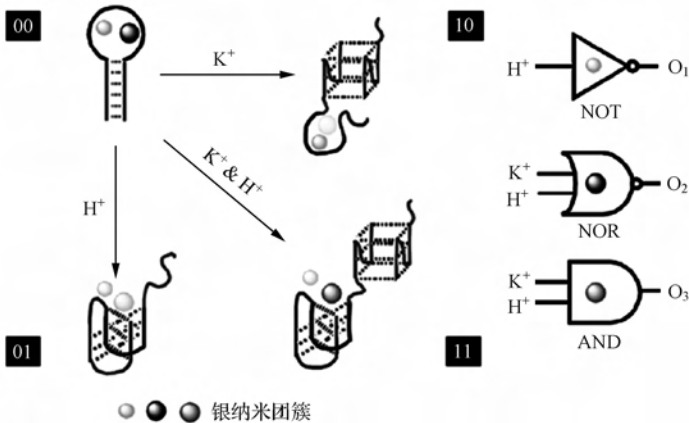


图 1-63 用荧光银纳米团簇构筑逻辑门元件<sup>[256]</sup>

目前,绝大多数生物逻辑与计算体系是在体外(如缓冲溶液中)完成的。若能

在细胞内,甚至于活体内实现生物逻辑与计算过程,必将极大推动其在检测、诊断、实时监测等领域的应用<sup>[272~274]</sup>。

Wang 研究小组<sup>[241]</sup>用富含胞嘧啶的寡聚核苷酸作保护剂合成了荧光银纳米团簇,并用其实现了汞离子的高灵敏度、高选择性检测。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子对汞离子测定无明显干扰。其线性响应范围为 5 nmol/L 到 1.5  $\mu\text{mol/L}$  之间,检测限为 5 nmol/L。

基于巯基化合物对寡聚核苷酸保护银纳米团簇荧光的猝灭现象,Wang 研究小组<sup>[244]</sup>还发展了检测生物巯基(如半胱氨酸、同型半胱氨酸、谷胱甘肽等)的方法。其他氨基酸则对银纳米团簇荧光无猝灭作用。利用该方法可以实现对半胱氨酸、同型半胱氨酸、谷胱甘肽的荧光检测,其检测限可达 4.0 nmol/L、0.2  $\mu\text{mol/L}$ 、4.0 nmol/L。该方法还可用于人血浆加标样的检测。

基于一些药物分子能猝灭寡聚核苷酸保护银纳米团簇荧光的现象,Wang 研究小组<sup>[246]</sup>报道了用寡聚核苷酸保护银纳米团簇作为荧光探针研究药物-核酸相互作用的方法。研究者选取了三种药物进行试验,即插入剂类药物道诺霉素(daunorubicin)、奎纳克林(quinacrine)以及非插入剂类药物双苯甲酰亚胺型细胞核染料(bisbenzimidazole H 332588)。如图 1-64 所示,当药物分子与银纳米团簇探针相互作用时,会猝灭其荧光。若有小牛胸腺 DNA 存在,则会将药物分子从银纳米团簇探针上竞争下来,从而使得探针荧光恢复。通过分析该银纳米团簇的荧光变化,一方面能够实现药物分子高灵敏度检测(检测限达 10 nmol/L);另一方面,还能获得药物与核酸相互作用的结合常数及结合位点处碱基的长度(binding site sizes)。

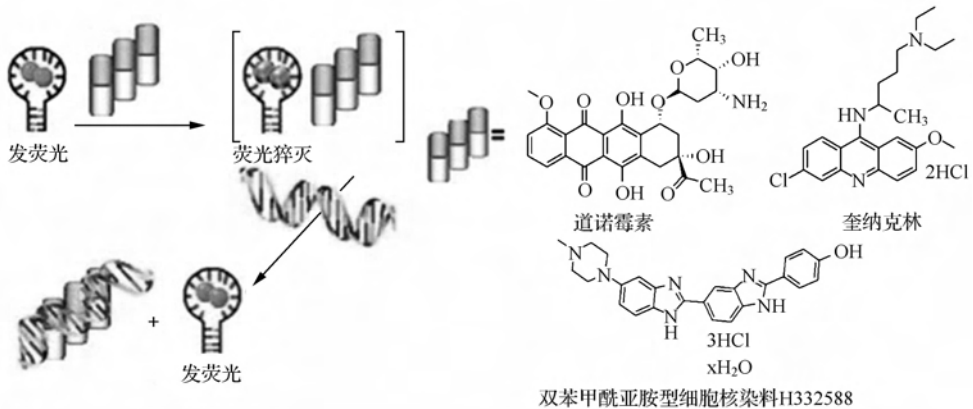


图 1-64 用银纳米团簇荧光探针研究药物与核酸的相互作用<sup>[246]</sup>

Wang 研究小组<sup>[242]</sup>进一步建立了利用核酸稳定荧光银纳米团簇检测目标核酸的方法。如图 1-65 所示,使用专门设计的含胞嘧啶碱基环结构的寡聚核苷酸链作为探针链,当目标核酸与其完全互补时,杂交所形成的双链能作为模板合成发光

的银纳米团簇;反之,若目标核酸含有单碱基的错配,则杂交所形成的双链模板无法合成得到发荧光的银纳米团簇。这样根据有无形成银纳米荧光团簇,即可实现目标核酸的高灵敏、高选择性检测。研究者利用该方法成功实现了对镰状细胞性贫血基因突变的检测。该方法有普适性,研究者还以炭疽致死因子(anthrax lethal factor)相关基因为模型,实现了对与之相关的几种单碱基错配的检测。此项研究为后续的各类检测工作奠定了基础。

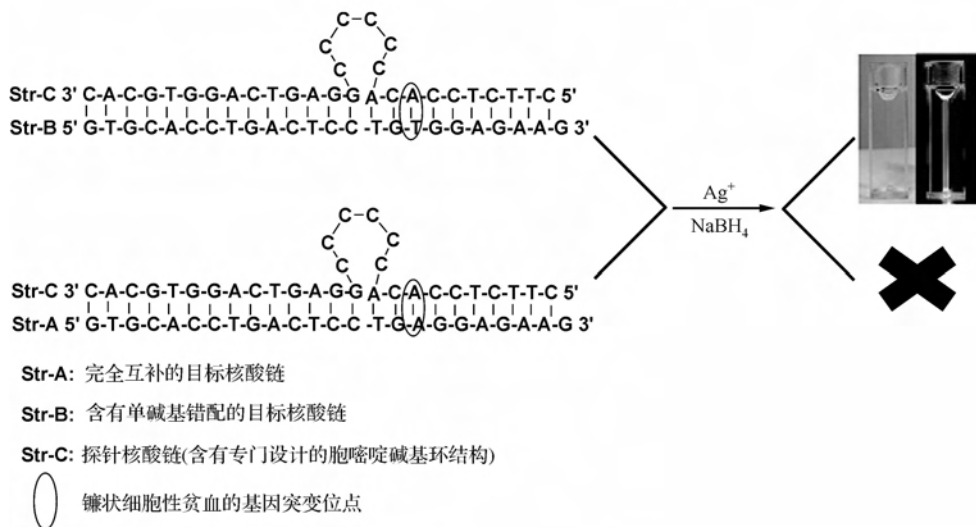


图 1-65 用含胞嘧啶碱基环结构的寡聚核苷酸链作为探针链,依据其与目标核酸杂交所形成双链能否导向合成荧光银纳米团簇来检测镰状细胞性贫血相关基因有无单碱基突变<sup>[242]</sup>

上述例子中,利用了目标核酸链与探针核酸链形成互补双链这一生物识别作用来进行检测。与前述比色法类似,若进一步用功能化核酸作为生物识别元素,则待测目标物可以拓展至核酸以外的物质<sup>[247,249,276]</sup>。例如,Zhu 研究小组<sup>[249]</sup>设计并优化了含核酸适配体序列和银纳米团簇序列复合结构的寡聚核苷酸来导向合成荧光银纳米团簇并用于肿瘤细胞的选择性荧光成像(图 1-66)。研究者选取了针对核仁蛋白(nucleolin)的核酸适配体 AS1411,进而设计了“核酸适配体-T<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>”的复合结构序列。如图 1-66 所示,用此复合结构的寡聚核苷酸合成的银纳米团簇能够特异识别癌细胞(如人乳腺癌细胞株)并进行成像。通过 z 轴的逐层扫描成像,可观察到部分银纳米团簇存在于细胞核区域。研究者推断,这可能与核仁蛋白介导的内吞作用及其胞内转移功能有关。研究还发现,在形成纳米团簇后,核酸适配体 AS1411 还保持了其抑制肿瘤细胞增殖的能力,能有效地抑制人乳腺癌细胞株(MCF-7)的增殖。这种设计探针的方法具有普适性,可以用其他功能化核酸取代核酸适配体 AS1411 来合成可识别特定目标的银纳米团簇。研究者的初步结果证明,识别急性淋巴细胞白血病细胞的核酸适配体 Sgc8c 与识别黏蛋白(mucin)的核酸

适配体 MUC1 均可连接银纳米团簇序列后用来导向合成荧光银纳米团簇。

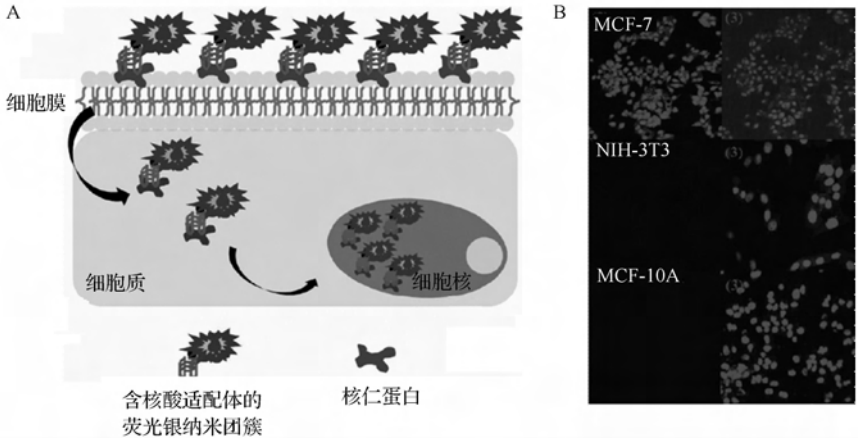


图 1-66 用含核酸适配体序列和银纳米团簇序列复合结构的寡聚核苷酸导向合成荧光银纳米团簇用作细胞成像<sup>[249]</sup>

A. 核酸适配体修饰银纳米团簇用于癌细胞成像原理图; B. 不同细胞株的共聚焦荧光显微镜图像。MCF-7 为人乳腺癌细胞株; NIH-3T3 为小鼠胚胎成纤维细胞株; MCF-10A 为人正常乳腺上皮细胞株

Wang 研究小组<sup>[253]</sup>巧妙利用核酸保护的荧光银纳米团簇与“四极子/血红素”复合物(G-quadruplex/hemin complex)之间的光诱导电子转移现象(photoinduced electron transfer, PET),发展了利用荧光方法测定多种目标物的普适检测模式(图 1-67)。如图 1-67A 所示,研究者用同时含有银纳米团簇序列和四极子序列的复合结构核酸导向合成了荧光银纳米团簇。若仅有钾离子存在,虽能够形成四极子构象,但此四极子并不影响银纳米团簇的荧光;而当再加入血红素时,血红素会与四极子结合而靠近银纳米团簇,此时由于两者间的光诱导电子转移而导致银纳米团簇荧光的降低。基于此独特的光诱导电子转移效应,若在导向合成荧光银纳米团簇的核酸链中引入生物识别核酸序列(如功能化核酸序列等),即可实现各类目标物的检测。图 1-67C 给出了检测目标核酸的原理图。探针核酸链预先形成发卡(hairpin)结构,此时四极子序列由于被发卡结构锁定而无法与血红素作用,故银纳米团簇有强的荧光。若加入目标核酸,则其与互补链杂交形成双链结构,同时释放四极子序列;此时形成的四极子构象可以结合血红素进而导致银纳米团簇的荧光降低。通过这种荧光强度的变化即可快速、灵敏、高选择性地测定目标核酸。如图 1-67D 所示,若在发卡结构部分引入的是功能化核酸(如三磷酸腺苷的核酸适配体),则有目标物三磷酸腺苷时,发卡结构打开释放四极子;而四极子进一步与血红素结合而猝灭银纳米团簇的荧光。原则上,在发卡结构部分连接任何需要的功能化核酸,即可实现对待测目标物的分析检测。而且,因为可通过调控核酸序列来调控银纳米团簇的荧光发射峰位置,此方法有望用于多元检测。

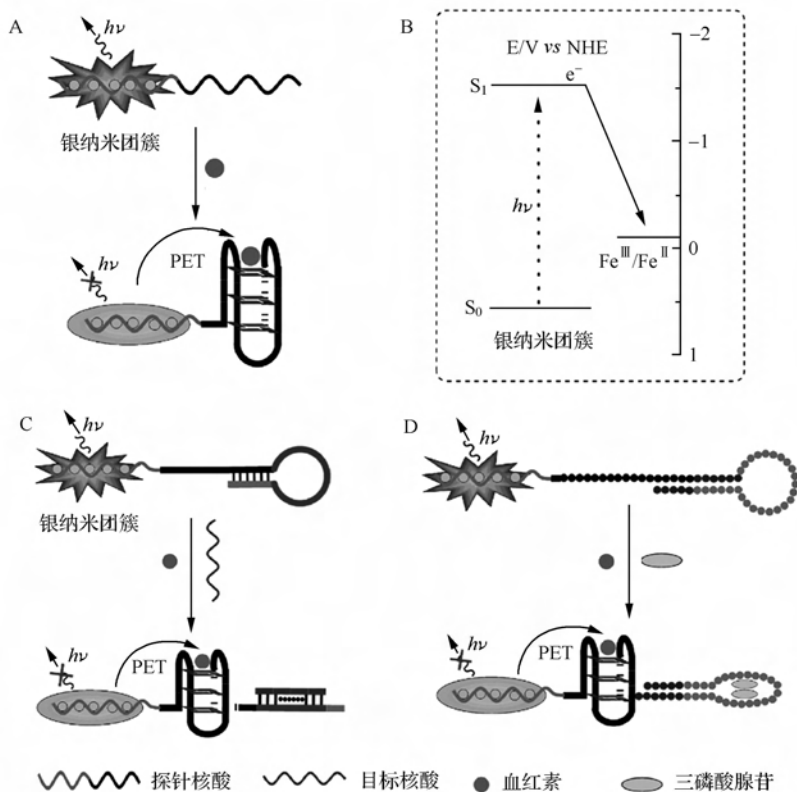


图 1-67 基于核酸保护的荧光银纳米团簇与“四极子/血红素”复合物之间的光诱导电子转移现象,构建一普适性荧光分析方法测定各种目标物(如核酸、生物小分子等)<sup>[253]</sup>

A. 银纳米团簇与“四极子/血红素”复合物之间的光诱导电子转移现象;B. 银纳米团簇能级图及“四极子/血红素”复合物中  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  的氧化还原电位;C. 目标核酸检测原理图;D. 三磷酸腺苷检测原理图。PET 为光诱导电子转移;NHE 为标准氢电极电势

Martinez 与 Werner 研究小组<sup>[243]</sup> 则基于其发现的“鸟嘌呤临近效应”(guanine proximity)增强核酸保护银纳米团簇的荧光的新现象,设计了能检测目标核酸的新传感体系(图 1-68)。图 1-68A 给出了“鸟嘌呤临近效应”的示意图。当用特定银纳米团簇探针链合成纳米团簇时,所得团簇仅发射出微弱绿色荧光。此时,若加入富含鸟嘌呤“悬挑”(overhang)序列的互补链,其与银纳米团簇探针链杂交形成双链结构,使得富含鸟嘌呤“悬挑”序列靠近银纳米团簇而极大增强其荧光。在图 1-68A 所给出的例子中,在形成杂交双链后,“鸟嘌呤临近效应”使得银纳米团簇可发射出增强了 500 倍的红色荧光。利用此荧光增强现象,研究者进一步发展了核酸的检测方法。如图 1-68B 所示,当有目标核酸存在时,其能够拉近银纳米团簇探针和含鸟嘌呤碱基的探针链,从而产生强的荧光信号。利用此方法,他们成

成功地检测了含有人的原癌基因 *Braf* 的核酸序列。与经典的分子信标方法相比较,此方法省去了标记步骤,方便快捷,且有更好的荧光增强效果。若在此设计中引入功能化核酸序列,则能用于其他目标物的检测,下面将给出两个具体的例子<sup>[247,248]</sup>。

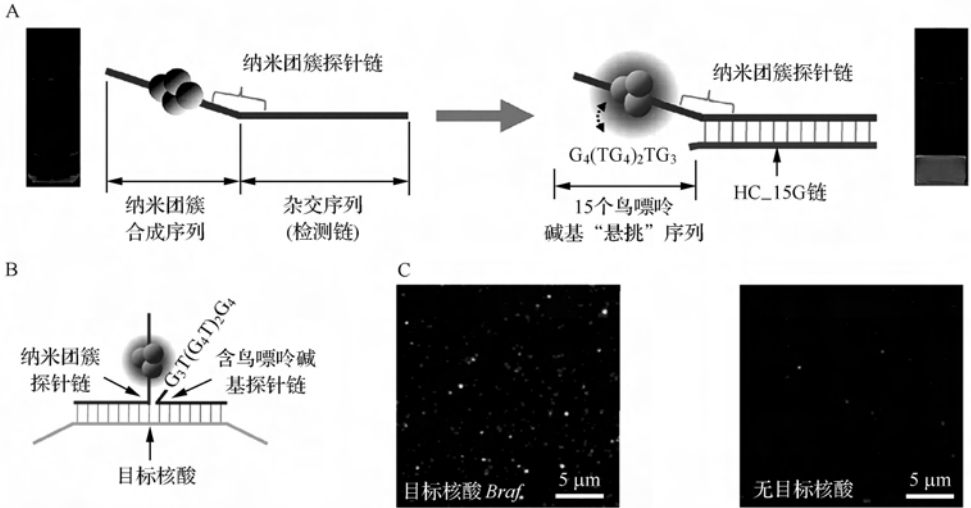


图 1-68 基于“鸟嘌呤临近效应”增强核酸保护银纳米团簇的荧光现象,设计传感体系来检测目标核酸<sup>[243]</sup>

A. “鸟嘌呤临近效应”原理图;B. “鸟嘌呤临近效应”用于目标核酸检测原理图;C. 单个银纳米团簇荧光图 (左:有目标核酸存在;右:无目标核酸存在)

Martinez 与 Werner 研究小组<sup>[247]</sup>在其上述工作的基础上,将凝血酶的核酸适配体引入银纳米团簇探针链,实现了对凝血酶的荧光检测。如图 1-69 所示,用同时含有两种序列(即识别凝血酶的核酸适配体序列和导向合成银纳米团簇的核酸序列)的复合寡聚核苷酸链来导向合成荧光银纳米团簇探针时,由于凝血酶核酸适配体序列所富含的鸟嘌呤碱基的“鸟嘌呤临近效应”,所得银纳米团簇有强的荧光。而当加入目标蛋白质凝血酶时,凝血酶与其核酸适配体作用而使得核酸适配体中的鸟嘌呤碱基远离银纳米团簇,进而导致荧光的降低。利用此荧光信号的改变,可以实现凝血酶的高灵敏度、高选择性检测。牛血清白蛋白、链霉亲和素昔、血小板衍生生长因子等对检测无干扰。其检测范围为 1~1500 nmol/L,检测限为 1 nmol/L。

同样基于“鸟嘌呤临近效应”,Yang 等<sup>[248]</sup>发展了快速检测微小核糖核酸(mi-croRNA)的方法(图 1-70)。图 1-70A 中是研究者给出的检测原理图。所合成的银纳米团簇探针有很强的荧光,而当与探针链互补的 microRNA 存在并与之杂交形成双链结构后,荧光则被猝灭。本章节作者通过 IDT 的 unfold 工具计算发现, Yang 等使用的探针链,在室温下主要是以发卡结构存在(图 1-70B)。此时,3'端的



作者<sup>[238]</sup>首次发展了蛋白质保护荧光银纳米团簇的制备方法并将其用于汞离子检测(图 1-71)。与 Xie 等<sup>[212]</sup>的方法不同,Guo 等首先将牛血清白蛋白用盐酸胍变性并用三(2-羧乙基)膦[tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP]还原其所含的 17 对二硫键。然后利用还原所得半胱氨酸巯基与银的相互作用来制备高稳定性、高荧光强度的银纳米团簇。进而基于汞离子对所得银纳米团簇荧光的猝灭作用,发展了快速、灵敏、高选择性检测汞离子的方法。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等二价金属离子对汞离子测定无明显干扰(注: $\text{Cu}^{2+}$  会有干扰,但可以通过加入屏蔽试剂吡啶-2,6-二羧酸来消除  $\text{Cu}^{2+}$  的干扰)。其线性响应范围在 10 nmol/L 到 5  $\mu\text{mol/L}$  之间,检测限为 10 nmol/L。

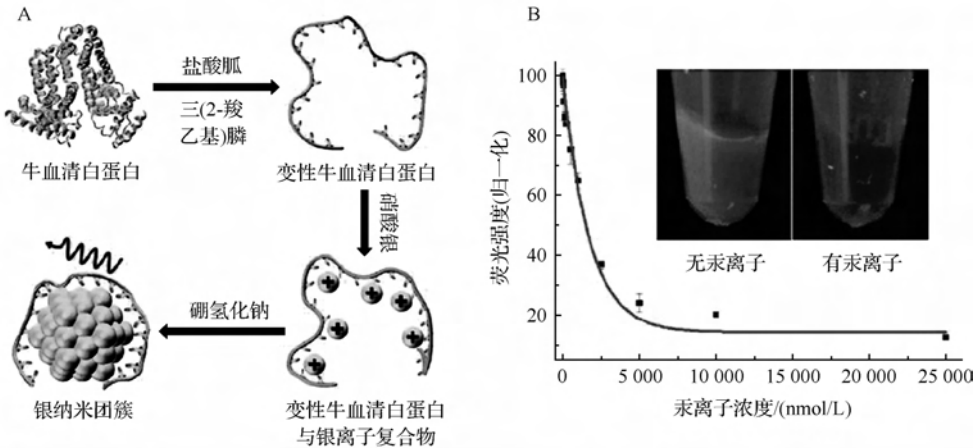


图 1-71 变性牛血清白蛋白保护的荧光银纳米团簇用作探针测定汞离子<sup>[238]</sup>

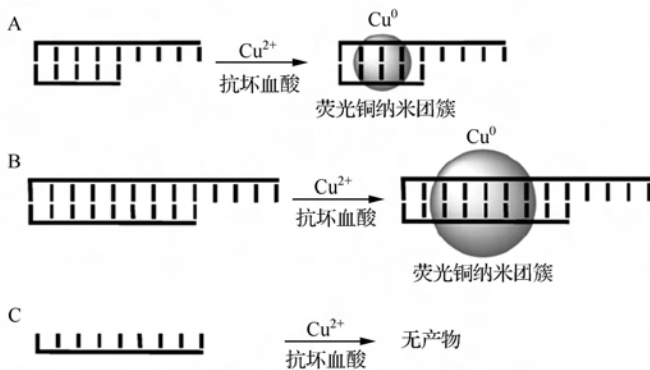
A. 荧光银纳米团簇合成流程图; B. 对汞离子检测的响应曲线及荧光照片

### 3) 其他金属纳米团簇

除金、银纳米团簇外,人们还开发合成了一些其他金属的纳米团簇(如铜、铂、合金等),并成功用于金属离子、生物小分子、核酸、酶等的分析与检测<sup>[278~286]</sup>。

Rotaru 等<sup>[278]</sup>发现,双链核酸能够导向合成有荧光发射的铜纳米团簇,而单链核酸则无此功能(图 1-72)。更进一步研究还发现所得铜纳米团簇的荧光性能与所用双链核酸的长度有关,即长度越长荧光越强。基于单双链核酸在导向合成铜纳米团簇时的差别,研究者还提出了检测目标核酸的方法。

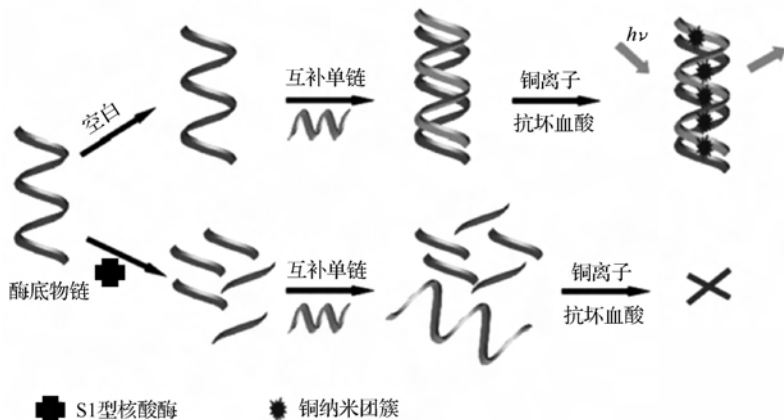
基于上述原理,Zhou 等<sup>[280]</sup>在形成核酸双链的其中一条单链中引入核酸适配体序列,发展了荧光测定三磷酸腺苷的方法。当三磷酸腺苷与含有其核酸适配体序列的单链作用形成复合物后,会阻碍对应互补链与其杂交,故此时无法形成荧光铜纳米团簇。若无三磷酸腺苷存在,则杂交形成的双链能导向合成荧光铜纳米团簇。基于此荧光强弱的不同,即可实现三磷酸腺苷的检测。所建立的方法有很好

图 1-72 核酸导向合成荧光铜纳米团簇<sup>[278]</sup>

A、B. 控制核酸双链部分的长度可调控荧光铜纳米团簇的尺寸；C. 单链核酸无法形成荧光铜纳米团簇

的选择性,可用于稀释血清中加标样的检测。此方法还具有普适性,用其他目标物的核酸适配体(如可卡因的核酸适配体)取代三磷酸腺苷的核酸适配体序列,即可发展用于对应目标物的荧光检测体系。

Chen 等<sup>[282]</sup>则利用铅离子对双链核酸保护的铜纳米团簇荧光的选择性猝灭现象,成功构建了用于铅离子检测的生物传感方法。所建立的方法有好的灵敏度和选择性,其线性响应范围为 5~100 nmol/L,检测限为 5 nmol/L。该方法还能用于实际样品(如人尿样和河水样)中铅离子的检测。Hu 等<sup>[284]</sup>发现,生物巯基(如谷胱甘肽、半胱氨酸、同型半胱氨酸)也能有选择性地猝灭双链核酸保护的铜纳米团簇的荧光。据此,研究者发展了免标记检测生物巯基的方法,并证明该方法可用于血样中生物巯基的测定。S1 型核酸酶能降解单链核酸底物,据此酶反应和上述单双链核酸导向形成荧光铜纳米团簇能力的区别,Yu 研究小组发展了免标记测定核酸酶的方法(图 1-73)<sup>[283]</sup>。

图 1-73 核酸导向合成荧光铜纳米团簇用于核酸酶检测<sup>[283]</sup>

Wang 研究小组发现,若采用如图 1-74 所示的设计,则当核酸杂交双链中间位置有错配时,所得铜纳米团簇的荧光会更强。基于此荧光强弱的差异,可以实现目标核酸的单碱基错配检测。研究者进一步系统地考察了各种碱基配对类型(错配与互补)对铜纳米团簇荧光的影响,发现,所合成铜纳米团簇的荧光强度按如下顺序依次减弱:AT>TA>AA>CA>GA>AG>AC>GT>TG>TC>CT>TT>CG>GG>GC>CC。这意味着较之于其他碱基,腺嘌呤碱基更加有助于合成具有强荧光的铜纳米团簇。这为将来设计新型探针提供了新的思路。

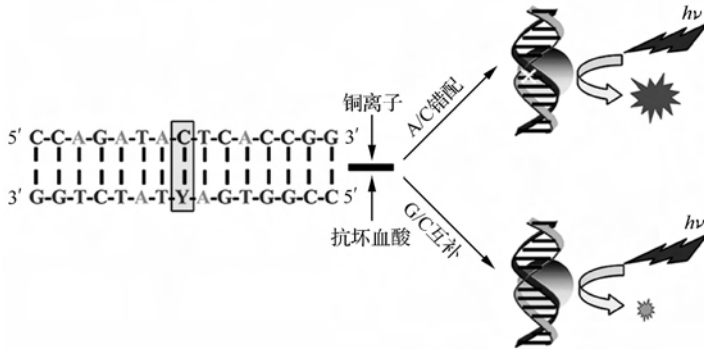


图 1-74 核酸导向合成荧光铜纳米团簇用于单碱基错配检测<sup>[281]</sup>

Tanaka 等<sup>[285]</sup>以枝状高分子聚酰胺-胺(polyamidoamine, PMAMA)做保护剂和模板合成了荧光铂纳米团簇(图 1-75)。经电喷雾电离-质谱表征,所合成的铂纳米团簇为 Pt<sub>5</sub> 结构。说明铂纳米团簇尺寸远小于半导体量子点等纳米荧光探针,更适合于生物标记等。细胞毒性试验表明,此荧光铂纳米团簇有很好的生物相容性。对所合成的铂纳米团簇进行表面羧基化并进一步通过蛋白质 A 连接抗体后可用于癌细胞成像(图 1-75)。肿瘤细胞(人宫颈癌肿瘤 HeLa 细胞)会高表达细胞趋化因子受体,而正常细胞(如仓鼠卵巢 CHP-K1 细胞)表面几乎无细胞趋化因子受体。故用连接了细胞趋化因子受体的抗体的铂纳米团簇能实现对肿瘤细胞的特异性成像。而 Zhou 与其合作者<sup>[286]</sup>合成了金银合金的荧光纳米团簇,研究发现此合金纳米团簇的荧光在有铝离子存在时会进一步增强,据此发展了灵敏、快速检测铝离子的新方法。

## 2. 金属纳米猝灭(或增强)荧光

金属纳米材料,除了自身可用作新型荧光探针材料外,还能猝灭(或者增强)其他发光物质(如有机荧光分子、荧光聚合物、荧光蛋白质、量子点等)的荧光<sup>[285,287~301]</sup>。

对于一给定的分析检测体系,其性能不只与输出检测信号的绝对强弱有关,更

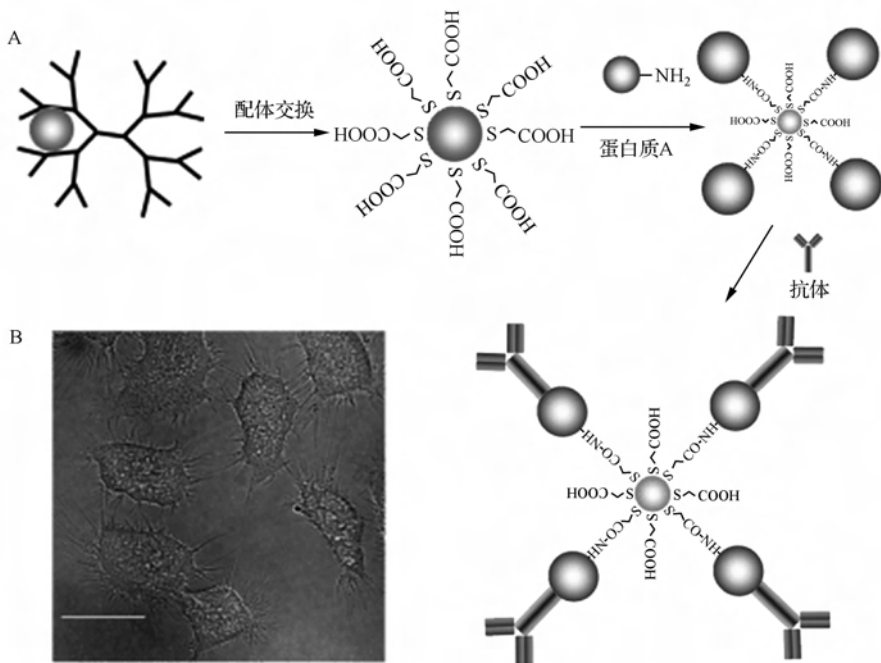


图 1-75 枝状高分子聚酰胺-胺保护的荧光铂纳米团簇用于肿瘤细胞成像<sup>[285]</sup>

A. 荧光铂纳米团簇制备及抗体标记流程图; B. 铂纳米团簇用于人宫颈癌肿瘤 HeLa 细胞荧光成像

与输出信号的“信噪比”(signal to noise ratio)相关。因而可以从两个方面来提高检测灵敏度：一是保持检测信号强度不变化而降低背景信号；二是在不改变背景信号的情况下增强(放大)检测信号。由此可见，如果在基于荧光的传感体系引入金属纳米材料，使其产生适合的猝灭或者增强现象，则能极大地提高信噪比而提高检测灵敏度。下面先讨论金属纳米材料猝灭荧光的现象及其在检测与诊断领域的应用研究。

### 1) 金属纳米猝灭荧光

一般而言，当金属纳米颗粒靠近荧光团时，会通过非辐射能量转移(nonradiative energy transfer)等途径有效猝灭荧光团的荧光。因而，可以用金属纳米颗粒来取代传统分子信标中的猝灭基团，构建新的传感体系<sup>[287~290,300]</sup>。Dubertret 等<sup>[287]</sup>率先发展了此类传感体系。如图 1-76 所示，当分子信标形成发卡结构时，连接在末端的金纳米颗粒由于靠近荧光团而猝灭其荧光。当有目标核酸存在时，其与分子信标杂交形成双链而使金纳米颗粒与荧光团分开，此时荧光团恢复了信号。由于金纳米颗粒高效的猝灭效果提高了信噪比，此新型分子信标的灵敏度较传统分子信标提高了约 100 倍。

Mirkin 研究小组<sup>[291]</sup>利用金纳米颗粒对荧光的猝灭性质设计了一种被称作



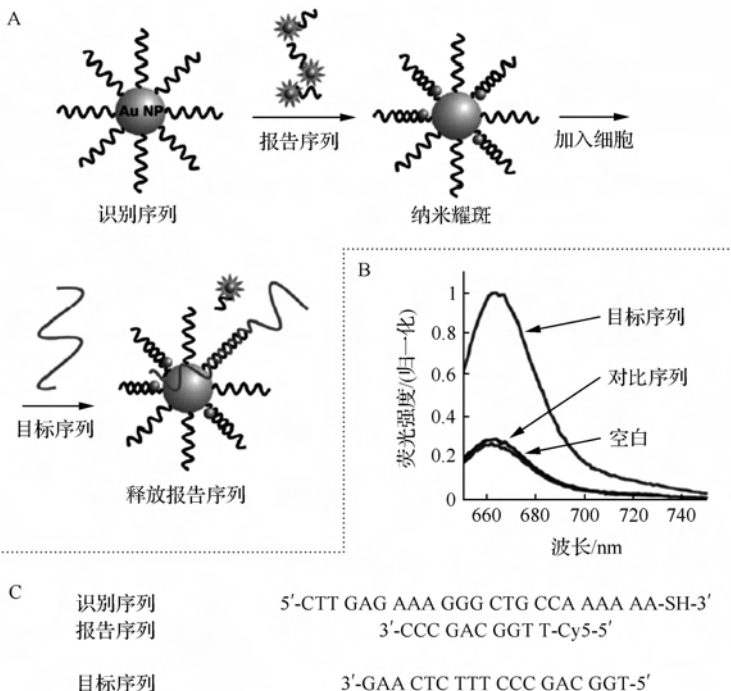


图 1-77 基于金纳米颗粒对荧光淬灭的现象设计“纳米耀斑”(nano-flare)来检测活细胞内的 RNA<sup>[291]</sup>

A. “纳米耀斑”用于细胞 RNA 检测原理图; B. “纳米耀斑”在有(或无)目标物存在时的荧光光谱; C. 所用核酸的序列

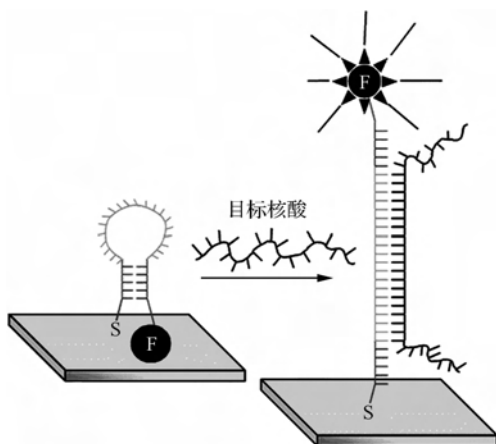


图 1-78 在金基底上固定分子信标来检测目标核酸<sup>[290]</sup>

Rothberg 研究小组<sup>[302]</sup>在其比色检测方法的基础上(图 1-16),进一步在探针核酸序列末端连接荧光分子,建立了基于金纳米颗粒猝灭探针核酸序列荧光的检

测方法(图 1-79)。该方法因为探针核酸序列无需共价连接到金纳米颗粒表面,可以认为是“免标记”方法。如图 1-79 所示,探针核酸序列与互补目标核酸形成双链后,由于与金纳米颗粒作用很弱,故探针核酸序列的荧光不被金纳米颗粒猝灭;而若存在碱基错配,则探针核酸序列会与金纳米颗粒作用而导致其荧光猝灭。与比色方法不同(图 1-16),由于可以选择不同发射波长的荧光团来标记探针核酸序列,故此方法可实现多元检测(参阅附注七)。

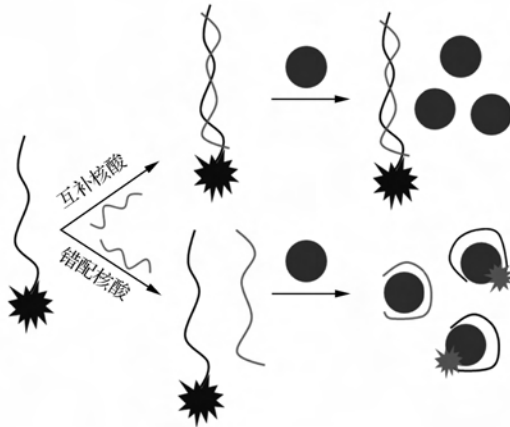


图 1-79 基于金纳米颗粒猝灭探针核酸序列的荧光来检测目标核酸<sup>[302]</sup>

上述荧光猝灭检测,都是基于核酸杂交技术。与比色检测方法类似,若用连接有荧光团的功能化核酸作为识别元素,则能够实现对对应目标物的荧光检测<sup>[298,300,303,304]</sup>。例如,Wu 与其合作者将金纳米颗粒猝灭荧光性质与核酸酶剪切反应相结合,发展了一种检测细胞内铀离子的方法<sup>[304]</sup>。如图 1-80 所示,在金纳米颗粒表面连接了对铀离子特异的核酸酶及其底物链。此时共价连接在底物链上的荧光团被猝灭(为进一步降低荧光信号,研究者还在底物链的另一端连接了有机猝灭基团)。当此金纳米颗粒-核酸酶复合体系被胞吞进入细胞后,细胞内的铀离子使底物链被剪切断而释放出连接有荧光团的核酸片段。此时,游离的荧光团能发射出荧光,从而实现了对细胞内铀离子的检测。

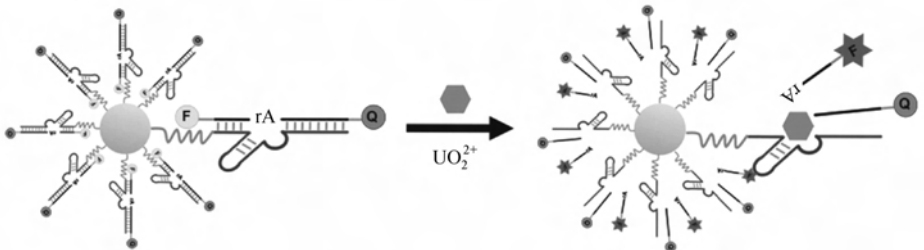


图 1-80 基于金纳米颗粒猝灭核酸酶荧光来检测细胞内的铀离子<sup>[304]</sup>

同样,此荧光猝灭的检测方法也适用于基于“抗原/抗体”等生物识别作用的传感体系<sup>[305,306]</sup>。如图 1-81 所示,Mayilo 等<sup>[305]</sup>设计了“三明治”类型的检测平台。当没有目标蛋白质存在时,连接有荧光团的检测抗体处于游离状态,能发射出强的荧光;而当有目标蛋白质心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T,是与心肌梗死相关的生物标志物)存在时,金纳米颗粒-捕获抗体、目标蛋白质、荧光团-检测抗体三者形成“三明治”结构,使得荧光团接近金纳米颗粒而荧光被猝灭。该方法有极高的灵敏度,其检测限可达 0.02 nmol/L。

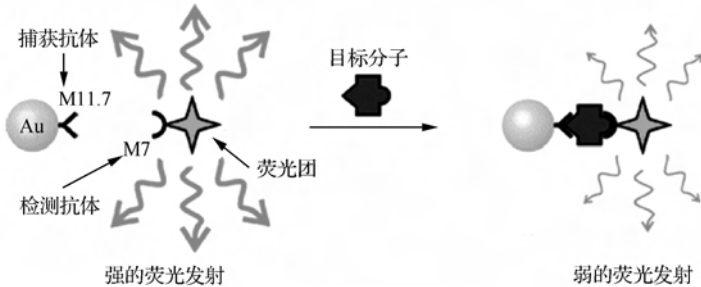
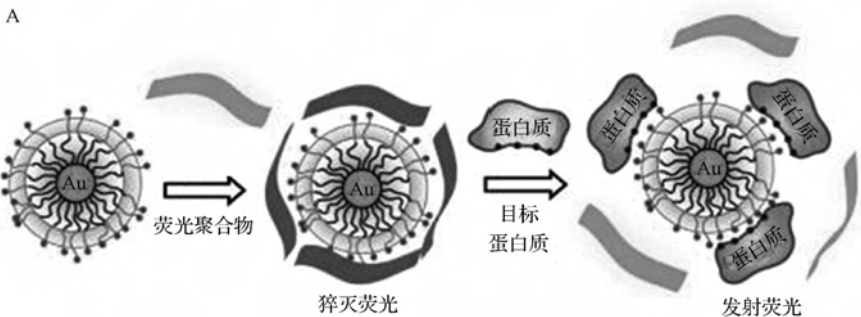


图 1-81 基于金纳米颗粒猝灭检测抗体的荧光来检测目标蛋白质<sup>[305]</sup>

Rotello 研究小组<sup>[58,293,294,307,308]</sup>利用表面带正电荷的金纳米颗粒能猝灭带负电荷荧光聚合物或荧光蛋白质荧光的现象,发展了系列基于“竞争取代法”的传感体系来检测各类目标物(如蛋白质、肿瘤细胞、细菌等)。与大多数基于“一对一”生物识别作用的传感体系不同,Rotello 研究小组发展的这类传感体系是基于“化学鼻”(chemical nose)原理,即用多个不同传感元件来构建传感阵列,如图 1-82 所示,这是选用了 6 种表面带正电荷的金纳米颗粒来猝灭荧光聚合物或荧光蛋白质的荧光,当待测物与传感阵列的每个传感元件作用时会给出不同的响应(即荧光探针分子被目标物从金纳米颗粒表面竞争下来而使其荧光有不同程度的恢复),从而产生与待测物对应的特异指纹图案(fingerprint pattern),这样即可通过所得指纹图案来鉴别目标检测物。例如,利用上述阵列技术,并结合线性判别分析(linear discriminate analysis, LDA)算法,对含 52 种未知蛋白质的样品,研究者正确鉴定出



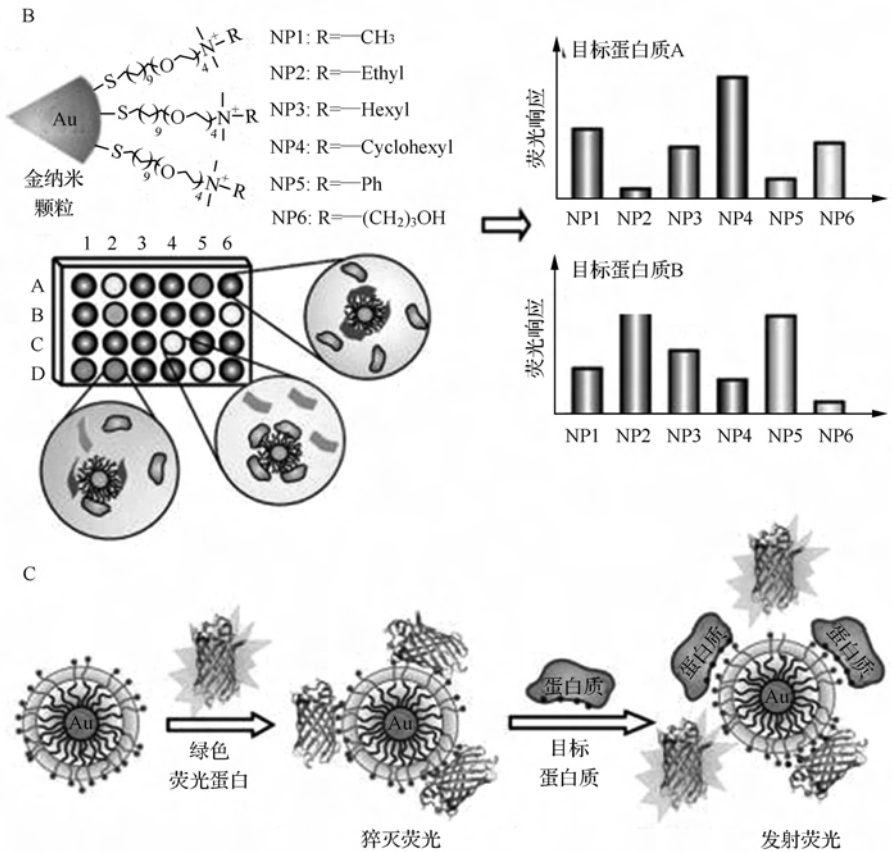


图 1-82 基于金纳米颗粒阵列猝灭荧光聚合物(或荧光蛋白质)的荧光来检测目标蛋白质<sup>[58]</sup>

A. 金纳米颗粒猝灭荧光聚合物荧光检测蛋白质原理图; B. 阵列金纳米颗粒猝灭荧光聚合物荧光检测蛋白质原理图; C. 金纳米颗粒猝灭荧光蛋白质荧光检测蛋白质原理图

了其中的 48 种, 准确率高达 94.2%<sup>[293]</sup>。除定性外, 此方法还能准确定量测定蛋白质的浓度, 误差在 ±5% 内。研究者还证明此方法可用于血样中目标蛋白质的鉴别与定量检测<sup>[294]</sup>。

### 附注七: 多元检测与成像

多元检测与成像, 顾名思义, 即同时(平行)对几种目标分析物进行检测或者成像<sup>[20, 309]</sup>。图 1-83 总结了多元检测与成像的几种模式。

第一种模式, 即直接检测来自目标分析物自身的特征信号(图 1-83A), 如可以利用表面增强拉曼散射光谱来同时检测和鉴别多种细菌<sup>[310]</sup>。这种模式因为利用的是目标分析物自身的信号, 故无需任何标记, 检测经济易行。其缺点也很明显, 许多目标分析物之间的特征信号区分不明显且强度很弱, 不易实现多元分析。

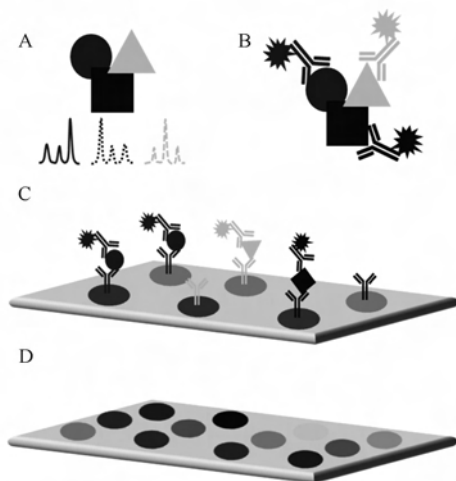


图 1-83 常见多元检测与成像的模式

A. 直接检测;B. 间接标记;C. 阵列模式;D. 电子鼻模式

第二种模式,是对于共存的目标分析物通过间接标记来进行检测与成像(图 1-83B),即首先对与目标物相对应的识别元素(如抗体)进行标记(如染料分子、拉曼探针等),然后再用标记后的抗体来进行识别和分析。由于抗体的特异性及与之连接标记信号的特异性,即可实现多元检测与成像。例如,Sun 等<sup>[311]</sup>利用标记有两种拉曼活性探针的抗体成功地识别了组织的基质(stroma)、上皮(epithelium)和内腔(lumen)。在生物成像方面,一些染料分子可以特异地染细胞核、细胞膜等,即可实现多元成像。对于这种模式,要求识别分子有很好的特异性,且不同探针分子之间的信号无重叠。

第三种为阵列模式,适用于一系列样品中多个目标分析物的同时检测(图 1-83C)。例如,对样品 1,含有圆形和三角形两种目标物,故阵列的第一、第二抗体能识别并给出对应的检测信号;对于样品 2,含有圆形和正方形两种目标物,则阵列中的第一、第三抗体能识别后给出对应的检测信号。这要求不同检测抗体连接的信号分子是不同的(若检测信号是相同的,则需要引入编码技术来做进一步区分)。

第四种即为文中已经讨论过的电子鼻模式(图 1-82)(图 1-83D)。

为实现有效地多元分析,一般需要:第一,不同识别分子与目标物之间亲和力和相当;第二,信号分子的强度相当;第三,信号分子特征明显且易于区分。

利用其发展的上述检测技术,Rotello 研究小组<sup>[308]</sup>还成功地区分了正常细胞、非转移性癌细胞和转移性癌细胞(即人正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A、非转移性人乳腺癌细胞株 MCF-7、转移性人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231)。该方法快速、准确,有望用于癌症的早期诊断等。

### 2) 金属纳米增强荧光

由于近场增强(local field enhancement)等效应,当荧光团(如有机荧光分子、量子点、上转换稀土荧光颗粒等)以合适距离靠近金、银、铜等金属纳米材料时,其荧光能被增强<sup>[299, 312~326]</sup>。

与金属猝灭荧光检测方法类似,只要引入适当的生物识别体系,就能构建基于金属增强荧光(metal enhanced fluorescence)现象的传感体系来实现各类目标物的分析与检测。迄今为止,研究人员已经发展了检测核酸、蛋白质、细胞、细菌等的方法<sup>[316, 317, 319, 320, 324, 327, 328]</sup>。例如,Lakowicz 研究小组发现“岛状”的银膜能有效地增强染料分子的荧光,并基于此现象发展了“三明治”型免疫分析体系来测定肌红蛋白<sup>[319]</sup>。如图 1-84 所示,与玻璃基底相比较,罗丹明红-X(rhodamine red-X)的荧光在“岛状”银膜被显著增强。此方法对肌红蛋白的检测范围为 10~1000 ng/mL。

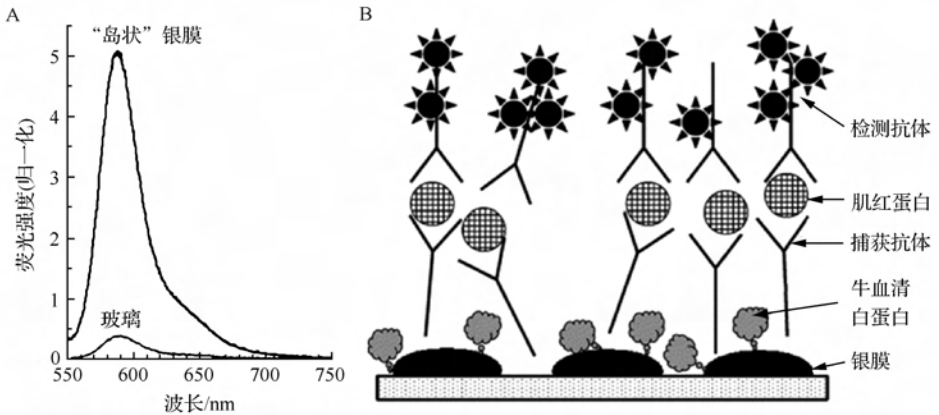


图 1-84 基于“岛状”银膜增强染料分子荧光来检测肌红蛋白<sup>[319]</sup>

A. “岛状”银膜对染料分子荧光的增强;B. 基于“三明治”结构的检测原理图

Dai 研究小组<sup>[299]</sup>则基于“岛状”金膜能增强红外染料分子荧光的现象发展了高灵敏检测蛋白质的方法。如图 1-85 所示,利用金种子生长法,可以得到大面积、高质量的“岛状”金膜。此“岛状”金膜能够极大增强近红外荧光染料 Cy5 与 IR800 的荧光。对连接在免疫球蛋白上的两种染料,其增强因子可分别达 3 倍和 17 倍。研究者进而以癌胚抗原为模型蛋白质,用连接了 IR800 的检测抗体实现了癌胚抗原的高灵敏度检测(图 1-85C)。使用此“岛状”金膜的增强基底,对癌胚抗原的检测限可达 5 fmol/L。较之于用玻璃基底,其灵敏度提高了 3 个数量级。研究者还在小鼠体内植入了 LS174T 肿瘤,然后抽取其血样来检验血液中癌胚抗原的含量。利用该荧光增强的方法,研究人员成功地定量检测到了血样中的癌胚抗原。通过定量分析发现,血样中癌胚抗原的含量与肿瘤大小呈正相关。这表明该方法有望用于实际临床样品的测定。

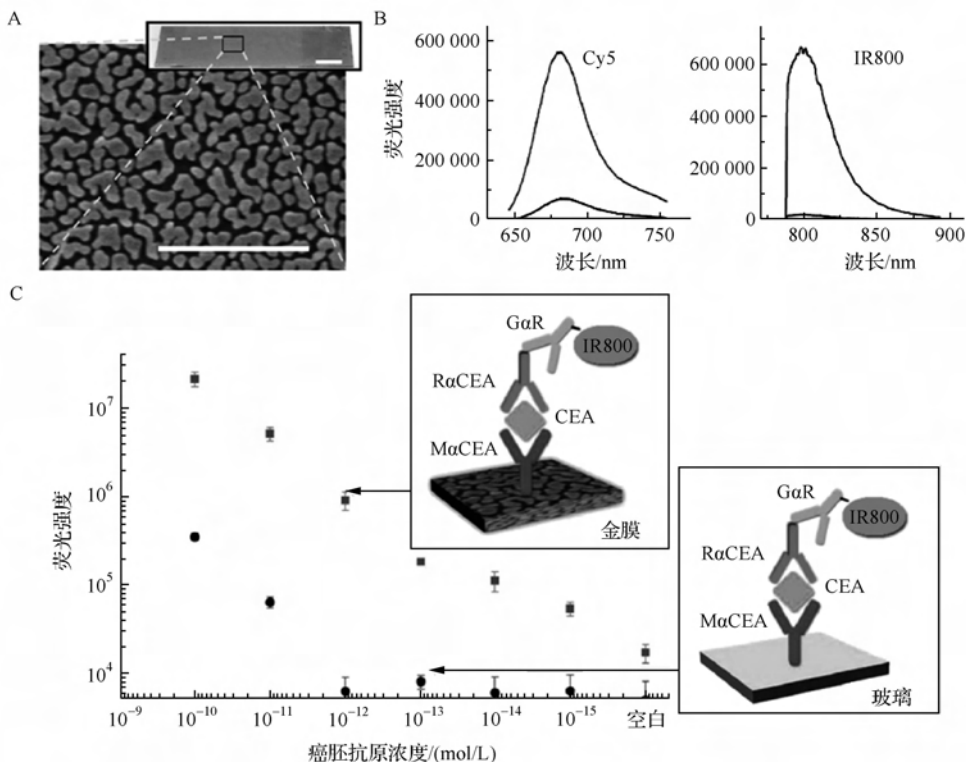


图 1-85 基于“岛状”金膜增强近红外染料分子荧光来检测目标蛋白质<sup>[299]</sup>

A. “岛状”金膜的扫描电子显微镜照片; B. “岛状”金膜对近红外染料分子荧光的增强; C. 基于“三明治”结构的检测原理图。Cy5 为花菁类染料 Cy5; IR800 为近红外荧光染料 IR800; CEA 为癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen); MaCEA 为癌胚抗原的捕获抗体; RaCEA 为癌胚抗原的检测抗体; GαR 为抗检测抗体的二抗

基于银@二氧化硅核壳结构纳米颗粒可以增强染料分子荧光的现象, Hu 等<sup>[324]</sup>发展了检测朊病毒蛋白质的新方法(图 1-86)。系统的研究表明, 荧光增强效果与二氧化硅壳层厚度(即染料分子与银纳米核距离)有关, 当二氧化硅壳层为 15 nm 时, 获得的增强效果最好(图 1-86)。利用此结构优化的核壳纳米颗粒, 并结合对朊病毒蛋白具有特异识别作用的核酸适配体, 研究人员构建了三明治结构的检测平台。如图 1-86 所示, 该检测平台有很好的选择性, 诸如酶、血清白蛋白、糖、氨基酸等均对朊病毒蛋白的检测无明显干扰, 其线性响应范围为 0~300 pmol/L。

尽管金属增强荧光的现象得到了人们的广泛研究, 并基于此现象构建了各类目标物的分析与检测方法, 但相关研究仍然有很大的发展空间<sup>[318, 325]</sup>。正如 Hu 等及其他研究者所指出的, 金属增强荧光现象强烈依赖于染料分子与金属纳米材料(结构)的距离及纳米材料的形貌、结构等因素<sup>[324, 325]</sup>。因而欲得到高效的增强, 必须要能准确控制这些因素。这一方面要求从理论上进一步研究哪些情形会有增

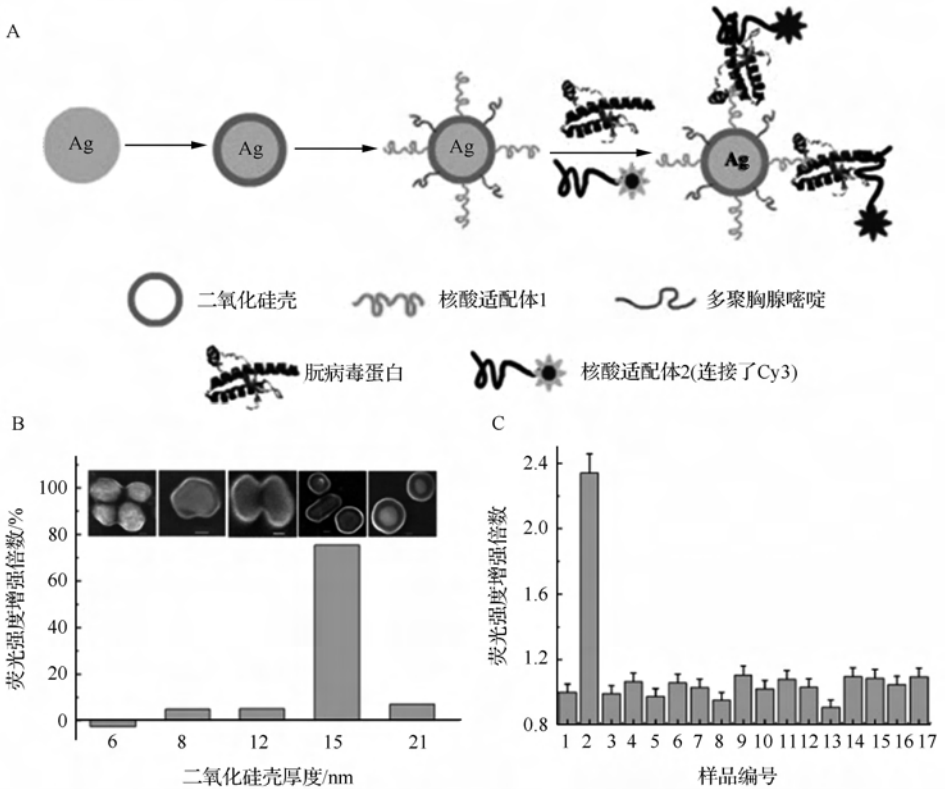


图 1-86 基于银@二氧化硅核壳结构纳米颗粒可以增强染料分子荧光的原理来检测朊病毒蛋白<sup>[324]</sup>

A. 检测原理图; B. 二氧化硅壳厚度对荧光增强效果的影响; C. 检测方法的选择性测试。C 中, 1 为空白; 2 为 0.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  朊病毒蛋白质; 3~6 分别为 100  $\text{mg}/\text{mL}$  的纤维素酶、凝血酶、牛血清白蛋白、人血清白蛋白; 7~9 分别为 0.88  $\text{mg}/\text{mL}$  的乳糖、蔗糖、葡萄糖; 10~17 分别为 0.05  $\text{mol}/\text{L}$  的苯丙氨酸、丙氨酸、色氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、赖氨酸、亮氨酸

强效果; 另一方面需要发展更加可控的合成方法来制备高质量、大批量的增强基底(或者纳米颗粒)。

### 1.2.4 其他方法

金属纳米材料也被广泛用于构筑其他类型的检测与诊断体系。这里仅选一些代表性的例子进行讨论。

金属纳米材料可用于构筑新型电化学传感器<sup>[49, 329~332]</sup>。例如, Dong 研究小组<sup>[49]</sup>首次利用溶胶-凝胶三维网络结构, 通过在溶胶-凝胶里面先后固定金纳米颗粒和辣根过氧化物酶制备了第三代辣根过氧化物酶生物传感器(图 1-87)。所制

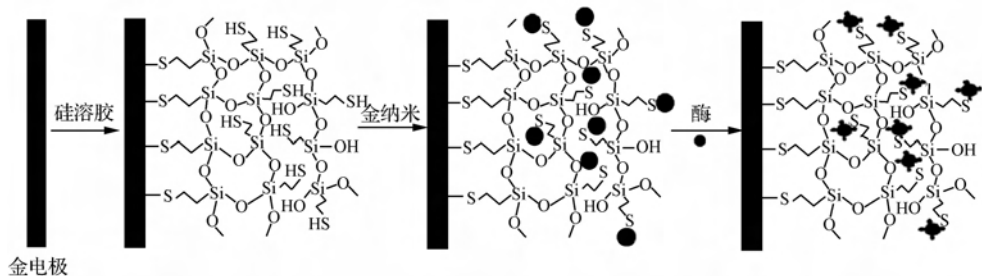


图 1-87 用金纳米颗粒和硅溶胶-凝胶来制备第三代辣根过氧化物酶生物传感器<sup>[49]</sup>

备的传感器能实现辣根过氧化物酶的直接电催化,可用于过氧化氢的快速灵敏检测。该传感方法对过氧化氢检测的线性响应范围为  $5 \mu\text{mol/L}$  至  $10 \text{mmol/L}$ ,检测限为  $2 \mu\text{mol/L}$ 。

Das 及合作者<sup>[330]</sup>将金纳米颗粒引入免疫传感体系,发展了高灵敏检测目标蛋白质的方法。如图 1-88 所示,在基于“三明治”结构的检测体系中,标记了抗体的金纳米颗粒作为检测探针能将对硝基苯酚催化还原为对氨基苯酚,而对氨基苯酚在电极表面被氧化为对醌亚胺后,会被硼氢化钠化学还原回到对氨基苯酚。由于对氨基苯酚是可再生的,故该方法可产生催化放大的电化学信号检测目标蛋白质。研究人员以免疫球蛋白和前列腺特异抗原为模型蛋白质,检验了该检测方法的可行性。实验结果表明,该方法对免疫球蛋白的检测范围为  $1 \text{fg/mL}$  至  $10 \mu\text{g/mL}$ ,检测限为  $1 \text{fg/mL}$ ;而对前列腺特异抗原的检测范围为  $1 \text{fg/mL}$  至  $10 \text{ng/mL}$ ,检测限为  $1 \text{fg/mL}$ 。

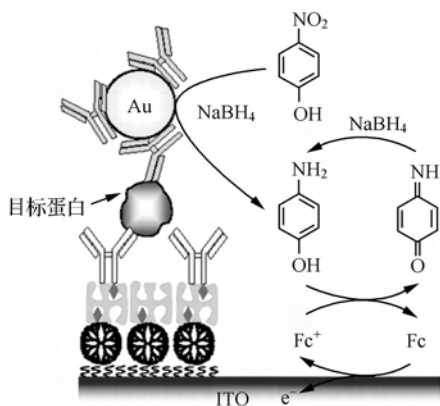


图 1-88 基于金纳米颗粒催化反应构筑的免疫电化学传感器,用于前列腺特异抗原等目标蛋白质检测<sup>[330]</sup>

ITO 为锡锡氧化物电极;Fc 为二茂铁(ferrocene)

Kelley 研究小组<sup>[332]</sup>用钼纳米微电极实现了核酸的灵敏、快速电化学检测。如图 1-89 所示,研究者在微电极阵列上通过电沉积方法制备了钼纳米微电极。在此钼纳米微电极上修饰捕获核酸链后,进而可以与目标核酸链结合并杂交形成双链结构。然后利用六氨合钼和铁氰化钾的催化循环即可实现目标核酸的电化学检测(图 1-89A)。研究者发现,通过精确调控电沉积的实验条件,可控制所得钼纳米电极的结构(如球形、花状、枝状等)。如图 1-89B、图 1-89C 所示,三种钼纳米结构电极有着不同的检测限和检测范围。其中,枝状结构电极的灵敏度最好,可达 10 amol/L;花状电极次之,可达 10 fmol/L;球形电极则为 100 fmol/L。枝状结构电极的检测范围为 10~100 amol/L;花状电极的检测范围为 100 amol/L 到 10 fmol/L;球形电极的检测范围为 10 fmol/L 到 10 pmol/L。而若将三种电极组合使用,检测范围可达 6 个数量级。通过单独或者组合使用,即可以满足不同的检测需求。

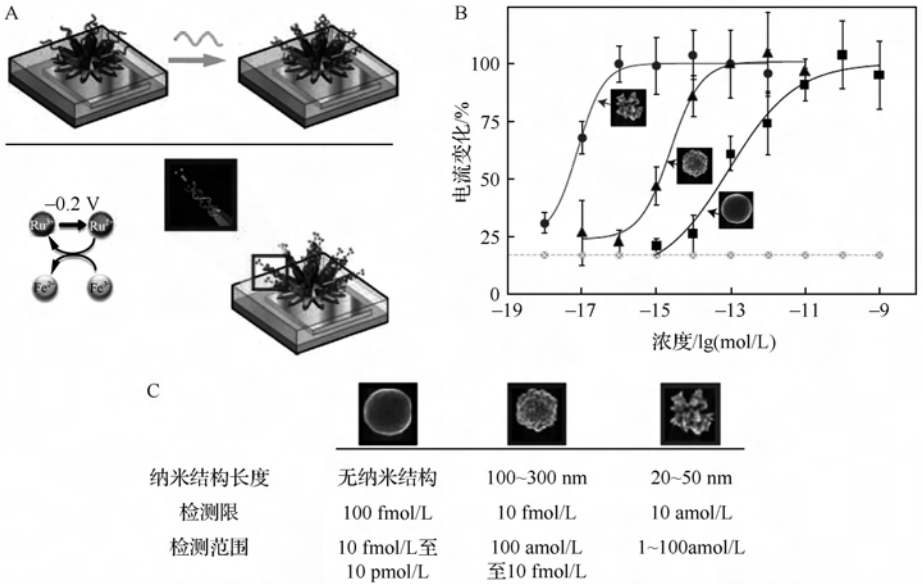


图 1-89 结构可控钼纳米微电极进行高灵敏核酸检测<sup>[332]</sup>

A. 检测原理图;B. 不同纳米结构钼微电极用于目标核酸检测;C. 不同纳米结构钼微电极传感性能比较

在上述工作基础上, Kelley 研究小组<sup>[333]</sup>用核酸适配体代替捕获核酸链,并引入可中和核酸适配体负电荷的“核酸-正电荷短肽”互补链,由此建立了高灵敏检测小分子和蛋白质的普适方法(图 1-90)。如图 1-90A 所示,若用核酸适配体链作为捕获链,则其在结合目标小分子或一些蛋白质前后,本身电性变化比较微小,不易被检测。为此,研究者引入“核酸-正电荷短肽”互补链,使其与核酸适配体链杂交而中和其负电荷(图 1-90B)。此时,整个体系呈电中性。当有小分子或蛋白质等

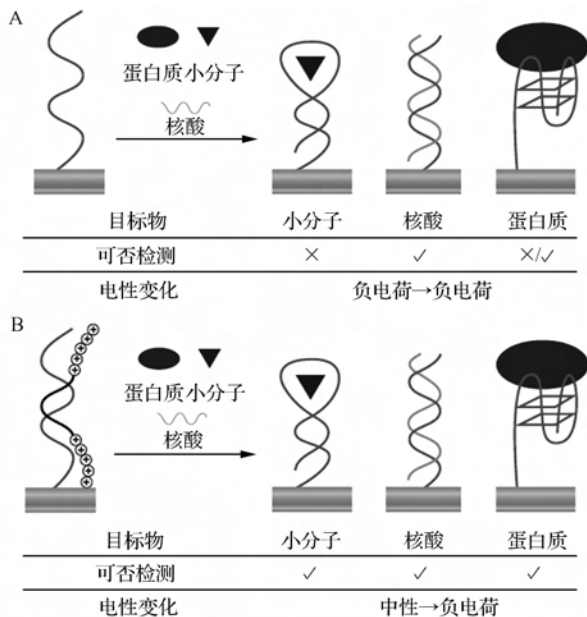


图 1-90 在钯纳米微电极上通过取代“核酸-正电荷短肽”中和链来高灵敏地检测目标物<sup>[333]</sup>

A. 用核酸(或者功能化核酸)作探针的检测平台; B. 用“核酸-正电荷短肽”中和链作探针的检测平台

目标物与核酸适配体作用时,能将“核酸-正电荷短肽”互补链竞争下来,而余下带负电荷的核酸适配体。由于目标物结合前后有明显的电性改变,故能获得高灵敏的检测信号。利用此改进的方法,研究者成功地检测了三磷酸腺苷、可卡因、凝血酶、核酸等目标分子。

金属纳米材料也被用来增强电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)和构筑电化学发光传感器<sup>[334~346]</sup>。Wang 与 Dong 研究小组<sup>[334~337, 339~343]</sup>发展了系列基于金、铂等纳米材料的增强电化学发光传感体系,并将其成功用于生物小分子、蛋白质等的检测,如 Fang 等<sup>[343]</sup>发展了基于核酸适配体特异识别及金纳米颗粒放大电化学发光的凝血酶检测方法。如图 1-91 所示,在经巯基硅烷处理的钢锡氧化

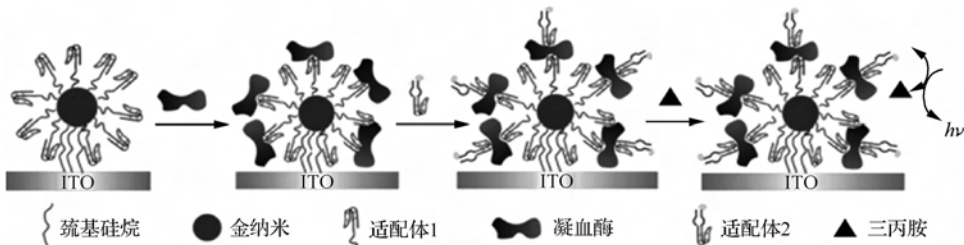


图 1-91 基于核酸适配体识别及金纳米颗粒放大的电化学发光方法检测凝血酶<sup>[343]</sup>

ITO 为钢锡氧化物电极

物电极上,可以通过 Au—S 键组装金纳米颗粒,进而将末端含巯基的核酸适配体通过 Au—S 键组装在金纳米颗粒上。当有凝血酶存在时,其能与标记有电化学发光试剂的核酸适配体 2 以及金纳米颗粒三者之间形成三明治结构,从而实现凝血酶的高灵敏度、高选择性电化学发光检测。此传感体系仅对  $\alpha$  型凝血酶有响应, $\beta$  型与  $\gamma$  型凝血酶均对其测定无干扰。该传感体系对  $\alpha$  型凝血酶检测的响应范围为 56~900 nmol/L,检测限为 10 nmol/L。

除可利用金属纳米材料的催化、放大等性能来构建电化学传感体系外,还可以利用其自身作标记来进行电化学检测<sup>[347~351]</sup>。例如,利用金属纳米颗粒作标记,进而将此金属纳米颗粒溶解为对应的金属离子,然后通过阳极溶出伏安法(anodic stripping voltammetry, ASV)等检测溶解的金属离子来间接测定目标物的含量。

在图 1-92 的例子中,Dequaire 等<sup>[347]</sup>发展了基于金纳米颗粒标记的电化学免疫检测蛋白质的方法。当标记有金纳米颗粒的抗体与捕获抗体及检测物三者形成“三明治”结构后,用化学方法将金纳米颗粒溶解,然后用阳极溶出伏安法测定溶解所得金离子的量,即可定量目标蛋白质的量。由于单个金纳米颗粒能释放大量金离子(如 18 nm 金纳米颗粒含约  $1.7 \times 10^5$  个金原子),故此方法的灵敏度很高。利用所建立的方法,研究者实现了对最低 3 pmol/L(0.5 ng/mL)免疫球蛋白的电化学检测。

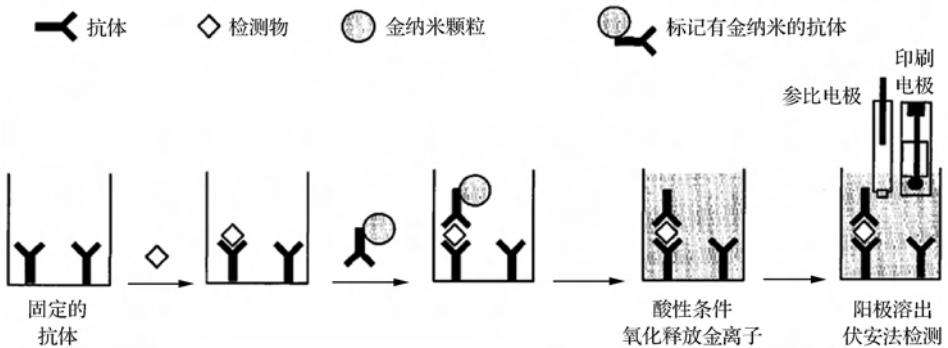


图 1-92 基于金纳米颗粒标记的电化学免疫方法检测蛋白质<sup>[347]</sup>

对上述检测体系,若利用金纳米颗粒的催化,在其表面生长银、铜等金属壳层(而检测释放的银、铜离子信号),则可以进一步放大信号,提高检测灵敏度。例如, Pretsch, Wang 及 Bakker 三个研究组<sup>[348]</sup>合作证明,若采用在金纳米颗粒表面生长银壳层放大策略,可以实现对 12.5 pmol 免疫球蛋白的检测。Shen 等采用在金纳米颗粒表面生长铜壳层的放大策略,实现了对乙肝表面抗原的高灵敏度检测,其线性响应范围为 1~300 ng/mL,检测限达 0.4 ng/mL<sup>[350]</sup>。原则上,若同时用几种金属纳米颗粒作标记,还能实现多元检测。

利用金属纳米材料自身的电导性质,研究人员建立了电学检测核酸的方法<sup>[9,58,352]</sup>。如图 1-93 所示, Park 及合作者<sup>[9]</sup>报道了在微电极阵列上电学检测核酸的方法。在距离  $20\ \mu\text{m}$  的两个微电极之间,先固定捕获核酸,然后将其与目标核酸、连接有金纳米颗粒的检测核酸组装成“三明治”结构。此时,因每个金纳米颗粒距离较远,故两微电极之间的电导性能较差。若通过金纳米颗粒催化在其表面沉积一银壳层,则由于银壳层会生长连接成纳米线而极大增强两微电极之间的电导性能。利用此方法,研究者实现了对浓度仅为  $500\ \text{fmol/L}$  核酸的灵敏检测。此方法有极好的选择性,完全互补和单碱基错配的电导信号可差  $10^5$  倍(完全互补链的检测信号为  $500\ \Omega$ ,单碱基错配链的检测信号为  $200\ \text{M}\Omega$ )。此外,由于此方法采用的是微电极技术,故易集成化和微型化<sup>[352]</sup>。

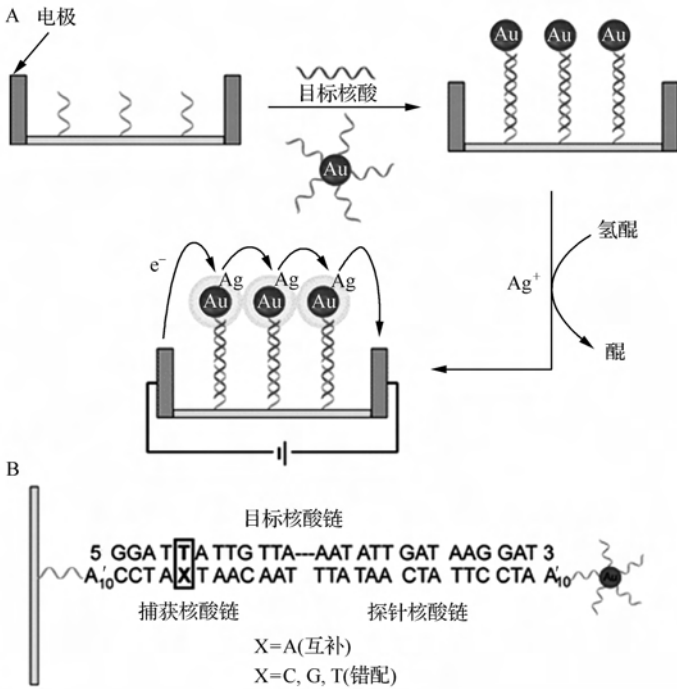


图 1-93 通过捕获核酸、探针核酸和目标核酸的“三明治”结构组装及银染增强来进行高灵敏、高选择性核酸电学检测<sup>[58]</sup>

A. 检测流程图; B. 捕获核酸、探针核酸和目标核酸序列及三者杂交所形成的“三明治”组装结构

### 1.3 其他纳米材料

在上文中,我们详细讨论了以金属纳米材料作为“纳米传感部件”的各类生物纳米传感体系(图 1-1),并结合具体的例子,力图阐明如何通过仔细选取适合的

“生物识别部件”、“纳米传感部件”及设计对应的“生物/纳米界面”来设计和构建有高灵敏度、高选择性的生物传感方法与平台,以用于各类目标物的检测与诊断。

显而易见,除金属纳米材料外,其他各类功能纳米材料也都可用作“纳米传感部件”来设计和构建生物纳米传感体系。鉴于篇幅限制,这里将不展开讨论,仅针对每一类材料,选取较有代表性的例子进行简要阐述。

### 1.3.1 碳纳米材料

碳纳米材料,包含富勒烯、碳纳米管、石墨烯及其氧化物、碳量子点及各自的掺杂材料等。这些材料已经被广泛用于体外检测与诊断。

#### 1. 比色法

与金属纳米材料类似,碳纳米管材料也被用于比色检测目标分子。Huang 及合作者<sup>[353]</sup>利用碳纳米管的光学性质,发展了比色检测人血清白蛋白的方法。如图 1-94 所示,研究者采用了“三明治”结构的设计,成功检测了人血清白蛋白。该方法的线性响应范围为  $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-1}$  mg/mL,检测限为  $3 \times 10^{-5}$  mg/mL。当有  $2 \times 10^{-3}$  mg/mL 人血清白蛋白存在时,用肉眼即可观察到检测体系的颜色变化。

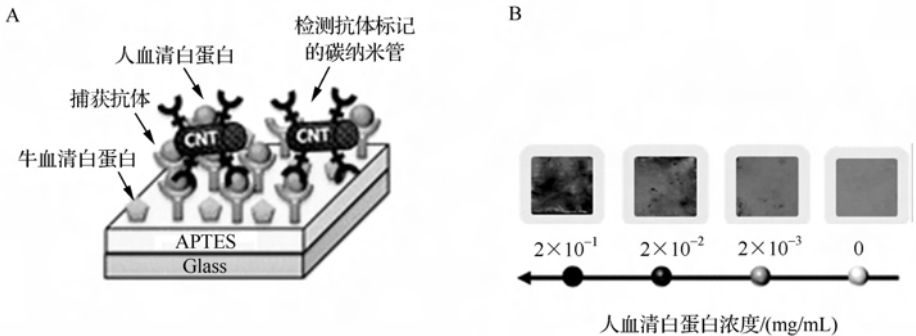


图 1-94 碳纳米管用于比色测定人血清白蛋白<sup>[353]</sup>

A. 检测原理图; B. 不同浓度人血清白蛋白的比色响应。CNT 为碳纳米管(carbon nanotube); Glass 为玻璃基底; APTES 为(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷[(3-aminopropyl)triethoxysilane]

#### 2. 表面增强拉曼散射光谱法

单壁碳纳米管是理想的一维纳米材料,具有独特的电学和光学性质。与有机染料分子的拉曼散射光谱相比较,单壁碳纳米管的拉曼散射光谱有着强度高、光谱简单、信号稳定、生物相容性好等特点<sup>[354,355]</sup>。Heller 等<sup>[354]</sup>利用单壁碳纳米管自身的拉曼散射信号,利用成像方法研究了其在活细胞内的分布情况。尽管与有机

染料分子相比较,单壁碳纳米管自身的拉曼散射信号要强很多,但仍然无法满足高灵敏度生物分析与检测的要求。为进一步提高其灵敏度,Chen 等<sup>[355]</sup>发展了单壁碳纳米管的表面增强拉曼散射光谱方法,并进一步构建了可用于蛋白质高灵敏检测的传感体系。如图 1-95B 所示,单壁碳纳米管的拉曼散射信号能被金基底极大地增强。基于此,研究者以人血清白蛋白为模型检测物,构建了如图 1-95A 所示的检测方法。利用所建立的方法,研究者实现了对人血清白蛋白的高灵敏度、高选择性检测。此方法对人血清白蛋白的检测响应范围为 1 fmol/L 到 10 nmol/L,检测限为 1 fmol/L,而染料分子标记的荧光方法的检测限为 1 pmol/L,即此表面增强拉曼散射光谱方法比荧光方法的灵敏度提高了 1000 倍。研究者还利用<sup>12</sup>C 单壁碳纳米管与<sup>13</sup>C 单壁碳纳米管拉曼信号的不同,成功构建了阵列式多元检测平台(图 1-95C)。

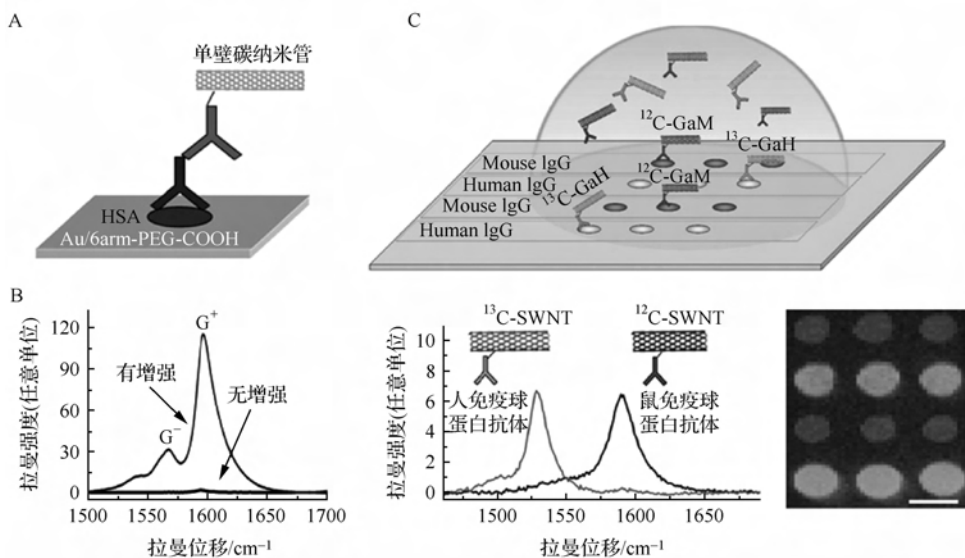


图 1-95 基于单壁碳纳米管的表面增强拉曼散射光谱,构建多元免疫传感方法,用于目标蛋白质检测<sup>[355]</sup>

A. 检测原理图;B. 金基底对单壁碳纳米管拉曼光谱的增强现象;C. 阵列式多元检测平台及对人免疫球蛋白与鼠免疫球蛋白的同时检测。HSA 为人血清白蛋白(human serum albumin);Au/6arm-PEG-COOH 末端有羧基的六臂聚乙二醇;Mouse IgG 为鼠免疫球蛋白;Human IgG 为人免疫球蛋白;<sup>12</sup>C-GaM 为<sup>12</sup>C 单壁碳纳米管标记的山羊抗鼠免疫球蛋白;<sup>13</sup>C-GaH 为<sup>13</sup>C 单壁碳纳米管标记的山羊抗人免疫球蛋白;<sup>12</sup>C-SWNT 为<sup>12</sup>C 单壁碳纳米管;<sup>13</sup>C-SWNT 为<sup>13</sup>C 单壁碳纳米管

### 3. 荧光法

与金属纳米材料类似,一方面可以利用碳纳米材料自身特有的荧光(如单壁碳

纳米管、石墨烯、碳量子点等)来进行检测;另一方面,也可以利用碳纳米材料对其他物质荧光(如有机染料分子、荧光金属团簇等)的猝灭现象来进行检测<sup>[356~362]</sup>。下面通过几个具体例子对这两类检测模式进行说明。

第一类模式如 Welsher 等<sup>[363]</sup>利用可发射近红外荧光的半导体型单壁碳纳米管作为探针,实现了肿瘤细胞的特异识别与成像。因为生物样品在近红外区的背景荧光很低,故选用荧光发射波长位于近红外区域的探针能有效降低背景干扰,提高检测灵敏度。研究者用修饰了赫赛汀的单壁碳纳米管来识别 HER2 阳性的肿瘤细胞。如图 1-96 所示,HER2 阳性的人乳腺导管癌 BT-474 细胞能结合单壁碳纳米管探针;而 HER2 阴性的人乳腺癌 MCF-7 细胞则无法结合单壁碳纳米管探针。这样即可通过发射近红外荧光的半导体型单壁碳纳米管实现肿瘤细胞的特异性识别与荧光成像。

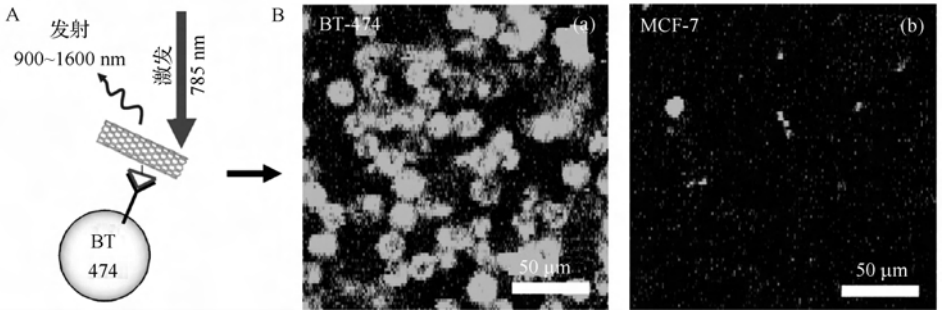


图 1-96 用发射近红外荧光的单壁碳纳米管作探针选择性检测肿瘤细胞<sup>[363]</sup>

A. 检测原理图;B. 对癌细胞的特异检测。BT-474 为人乳腺导管癌细胞株;MCF-7 为人乳腺癌细胞株

第二类检测模式的基本设计原理出自于碳纳米管、石墨烯等多种碳纳米材料都能猝灭染料分子的荧光。基于此现象,研究人员已经发展了许多传感体系<sup>[356,358,359]</sup>。图 1-97 给出了基于石墨烯(或石墨烯氧化物)猝灭染料分子荧光的现象进行检测的原理图。当标记有染料分子的核酸探针(或者功能化核酸探针)与石墨烯作用时,染料分子的荧光被猝灭。若有目标物存在,则目标物能与核酸探针作用形成复合物,减弱核酸探针与石墨烯的作用而将核酸探针从石墨烯表面剥离。此时染料分子的荧光恢复。基于此原理,Lu 等<sup>[356]</sup>利用核酸和核酸适配体作为探针,发展了检测核酸和凝血酶的荧光方法。若用不同染料分子标记多个核酸探针分子,则可实现多元检测。

#### 4. 其他方法

碳纳米材料还具有优异的电化学和电学性能。研究人员充分利用碳材料的这些性能,开发了系列传感体系<sup>[364,365]</sup>。例如,可直接用碳纳米管作为微电极或用石

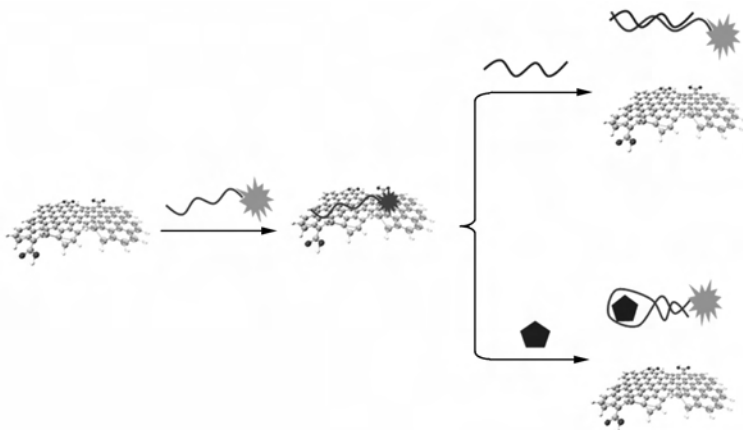


图 1-97 基于石墨烯(或石墨烯氧化物)对染料分子荧光猝灭的现象,用核酸及功能化核酸作为识别元素构建荧光传感器对多种目标物进行检测

石墨烯(或石墨烯氧化物)作为修饰电极,来进行电化学分析与检测<sup>[366,367]</sup>。Singhal 等<sup>[366]</sup>用直径为 50~200 nm 的多壁碳纳米管作为微电极探针,发展了无损探测细胞内微环境及细胞器的方法。Dong 研究小组<sup>[367]</sup>则利用化学还原的石墨烯氧化物(chemically reduced graphene oxide, rGO)制备了修饰电极,并进行了小分子及核酸的电化学检测。研究表明,此 rGO 修饰玻碳电极的电化学性能远好于石墨修饰的玻碳电极及未修饰的玻碳电极,能很好地区分 4 种核酸碱基的电化学信号(图 1-98)。此外, rGO 修饰玻碳电极不仅能够区分单双链核酸,而且可以检测单碱基错配。

碳纳米材料也能用来增强其他物质的电化学性能,如可利用碳纳米材料能增强电化学发光的现象构筑电化学发光传感器<sup>[368,369]</sup>。Wei 及合作者<sup>[369]</sup>用碳纳米管、三(2,2'-联吡啶)钉和全氟磺酸 Nafion 膜来修饰玻碳电极制备了固态电化学发光传感器。利用此传感器可以实现核酸的免标记检测。研究者进一步证明该传感器能有效地区分 p53 基因相关序列的单碱基错配。

人们也发展了多种基于碳纳米材料优异电化学性能的分析检测方法检测生物小分子、核酸、蛋白质、细胞等<sup>[11,370~372]</sup>。Kong 等研究发现,单壁碳纳米管对 NO<sub>2</sub> 气体和 NH<sub>3</sub> 气体有响应。前者能导致单壁碳纳米管电导的增加,而后者则导致电导的减小。Besteman 等<sup>[11]</sup>则报道了用葡萄糖氧化酶修饰的半导体型单壁碳纳米管电学检测葡萄糖的方法(图 1-99)。当加入葡萄糖时,由于酶催化反应导致该传感器的电导增加。利用所建立的检测方法,可以快速、实时、较灵敏地监测葡萄糖。Liu 及合作者<sup>[371]</sup>则利用核酸适配体修饰的单壁碳纳米管实现了凝血酶的免标记、实时电学检测。利用该方法,研究者可以检测到 2.6 amol/L 的凝血酶。

Yoon 研究组<sup>[373]</sup>则利用石墨烯修饰的图案化金建立了分离、捕获循环肿瘤细

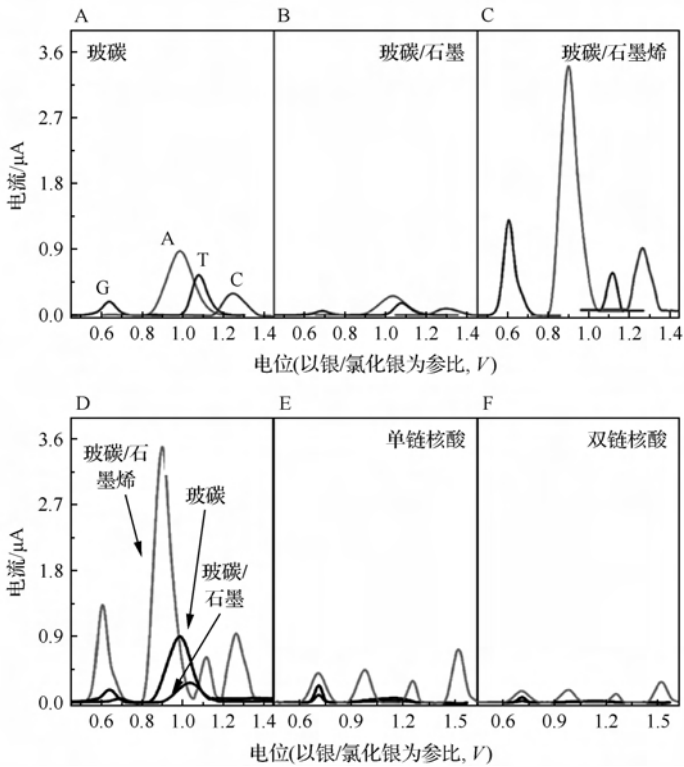


图 1-98 用化学还原的石墨烯氧化物修饰的玻碳电极来检测核酸碱基和单双链核酸<sup>[367]</sup>  
 A、C. 用不同电极测定 A、G、T、C 四种碱基的纯品;D. 用不同电极测定 A、G、T、C 四种碱基的混合样品;E、F. 用不同电极测定单双链核酸

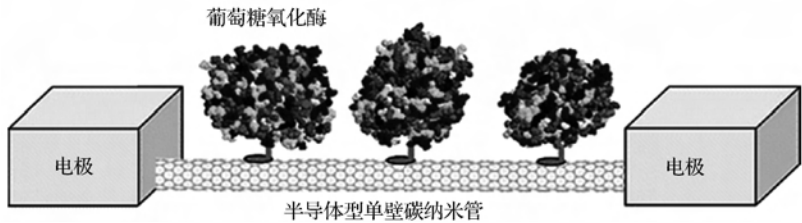


图 1-99 用葡萄糖氧化酶修饰的半导体型单壁碳纳米管电化学检测葡萄糖<sup>[11]</sup>

胞的方法。如图 1-100 所示,研究者在微流控芯片的通道中设计了“四菱形”的图案化金阵列。然后在金阵列上修饰了石墨烯,再在石墨烯上连接捕获抗体(即上皮细胞黏附分子 EpCAM 的抗体)来捕获循环肿瘤细胞。此微流控芯片具有很高的捕获效率。例如,对仅含有 3~5 个细胞的 1 mL 加标样品,其捕获效率可达 (73±32.4)%。除此以外,此微流控芯片的特异性也非常好。如图 1-100C 所示,

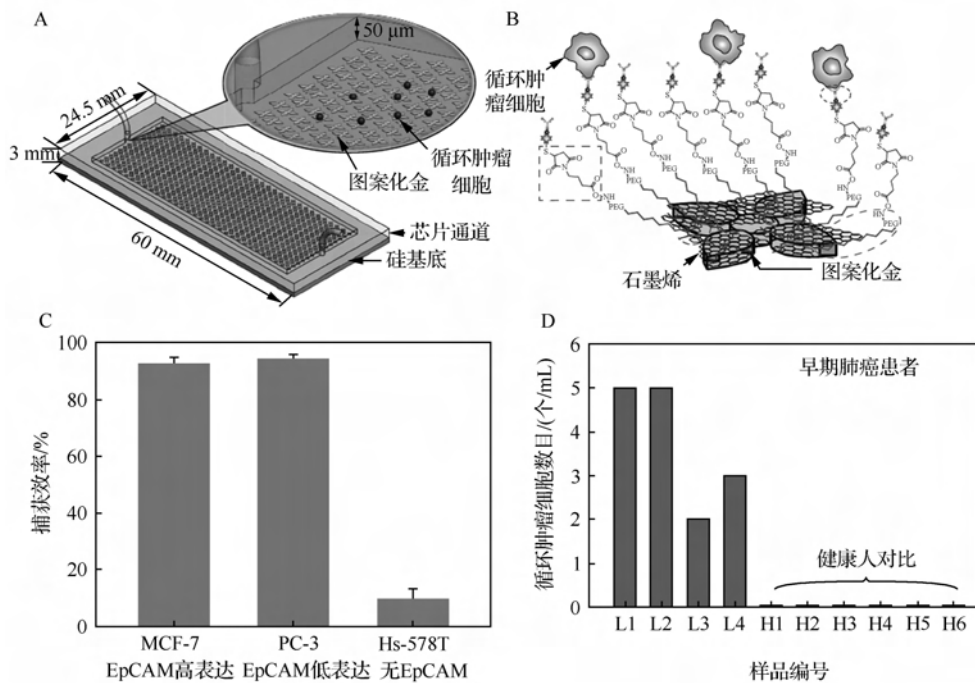


图 1-100 用石墨烯修饰的图案化金分离、捕获循环肿瘤细胞<sup>[373]</sup>

A. 微流控芯片结构图; B. 石墨烯修饰的图案化金及捕获循环肿瘤细胞原理图; C. 不同细胞株的捕获效率; D. 临床样品测定, L1~L4 为早期肺癌患者样品, H1~H6 为健康对照组。MCF-7 为人乳腺癌细胞株; PC-3 为人前列腺癌细胞株; Hs-578T 为人乳腺癌细胞株

只要肿瘤细胞表面有 EpCAM 表达, 即能被有效捕获。研究者对癌症患者(包括早期肺癌患者、转移性乳腺癌患者、转移性胰腺癌患者)及健康人的临床血样进行了检测诊断。结果显示, 所有癌症患者的血样中均有循环肿瘤细胞存在, 最高可到 23 个/mL; 而健康对照组则检测不到循环肿瘤细胞。无论是早期癌症患者还是晚期癌症患者, 其体内的循环肿瘤细胞均可用此基于石墨烯的微流控芯片进行诊断检测。这为癌症早期诊断和治疗后康复情况追踪提供了可能。

### 1.3.2 量子点

自 Nie 研究小组和 Alivisatos 研究小组<sup>[4,5]</sup>报道量子点用于生物成像研究以来, 量子点由于其优异的光学性能, 已被广泛用于生物检测、成像与诊断领域<sup>[5,13,17,374,375]</sup>。

#### 1. 荧光法

与染料分子荧光相比较, 量子点具有荧光量子产率高、稳定性好、吸收光谱宽、

发射光谱窄、可通过调控量子点尺寸和组分等精确调控发射波长等优点(图 1-101)<sup>[376]</sup>。显而易见,对于基于有机染料分子荧光的检测与诊断方法,均可尝试用量子点取代染料分子来提高传感体系的性能(如灵敏度、选择性等)。迄今为止,研究人员已成功用量子点取代染料分子建立了各类检测与诊断方法<sup>[376]</sup>。下面仅举两个例子做一简要讨论。

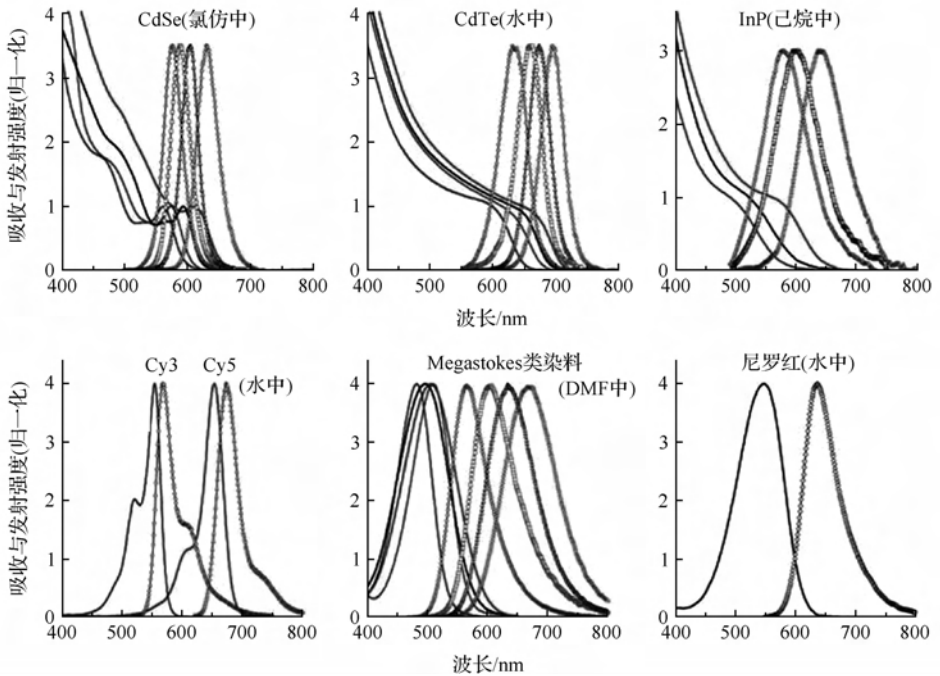


图 1-101 几种代表性量子点与有机染料分子的光学性质比较<sup>[376]</sup>

Cy3 为花菁类染料 Cy3; Cy5 为花菁类染料 Cy5; Megastokes 类染料是指激发和发射波长相差 30 nm 以上的染料分子; DMF 为二甲基甲酰胺(dimethylformamide)

如量子点可以用来构建基于荧光共振能量转移的传感体系<sup>[19,377~379]</sup>。Zhang 等<sup>[19]</sup>报道了基于单个量子点的荧光共振能量转移现象的核酸传感器。如图 1-102 所示,在此纳米组装传感体系中,量子点起着双重作用:第一,量子点是荧光共振能量转移的供体;第二,量子点能富集目标核酸,提高检测灵敏度。此外,由于未结合的探针核酸无荧光发射,故检测无需分离步骤,简化了操作。该方法有好的选择性和灵敏度。用该方法能实现对含原癌基因 *Kras* 序列核酸单碱基错配的检测。其检测限可达 4.8 fmol/L,该检测限为基于有机荧光染料分子的分子信标方法(检测限为 480 fmol/L)的百分之一。

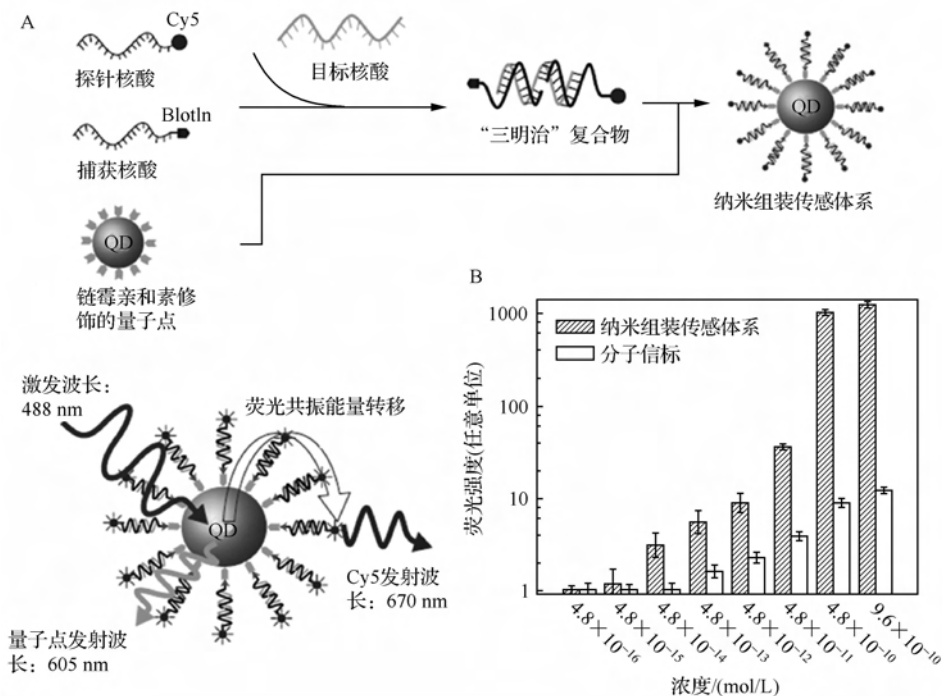


图 1-102 基于量子点与染料分子的荧光共振能量转移现象来测定核酸<sup>[19]</sup>

A. 基于量子点的纳米组装传感体系制备流程图及检测原理; B. 分子信标与纳米组装传感体系性能比较 (即逐一比较对不同浓度目标核酸的响应)。Cy5 为花菁类染料 Cy5; biotin 为生物素

较之于有机染料分子,不同量子点可以用单一波长激发,且发射光谱窄,更适于多元检测<sup>[380~382]</sup>。例如,基于“捕获抗体/毒素/检测抗体”“三明治”结构,Goldman 及合作者<sup>[380]</sup>用 4 种量子点(发射波长分别为 510 nm、555 nm、590 nm、610 nm)实现了 4 种毒素的多元检测(图 1-103)。

## 2. 其他方法

研究人员还利用量子点的电化学和电化学发光等性质,发展了新型的传感方法<sup>[383~385]</sup>。如图 1-104 所示,Wang 等<sup>[383]</sup>巧妙利用量子点所含的金属元素作标记,发展了基于阳极溶出伏安法多元检测核酸的传感体系。由于单个量子点含有大量的金属元素(如 ZnS 量子点含有 Zn 元素),故能产生放大信号,提高检测灵敏度。该方法的检测限为 270 pmol/L。若将多个量子点包埋在聚苯乙烯微球中用作探针,则能够进一步提高灵敏度,此时检测限可达 2.7 pmol/L。此外,Han 研究小组<sup>[385]</sup>利用量子点电化学发光的性质发展了高灵敏免疫传感方法。研究者采用了双重放大的策略,即用石墨烯和金纳米颗粒来增强捕获效率,用二氧化硅小球包

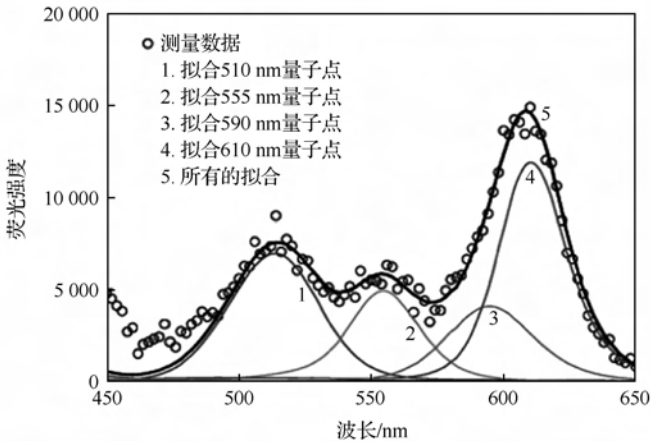


图 1-103 用量子点多元检测毒素<sup>[380]</sup>

510 nm、555 nm、590 nm、610 nm 四种量子点分别对应于霍乱毒素(cholera toxin)、蓖麻毒素(ricin)、类志贺氏菌毒素(Shiga-like toxin)、葡萄球菌肠毒素 B(staphylococcal enterotoxin B)

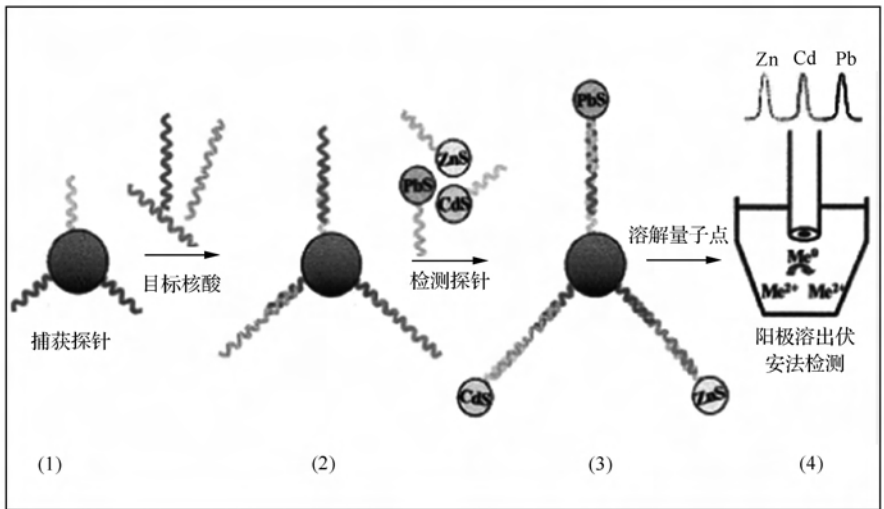


图 1-104 用量子点作标记,基于阳极溶出伏安法多元检测核酸<sup>[383]</sup>

埋量子点来增强探针信号。与未放大的方法比较,此双重放大策略的灵敏度提高了 16.8 倍。

### 1.3.3 磁性纳米材料

磁性纳米材料在生命分析化学和生物医学研究领域有着极广泛的应用<sup>[28,346,386~397]</sup>。例如,选用适合的磁性纳米材料作造影试剂,可以进行肿瘤的检测

与诊断<sup>[392]</sup>。此外,由于该类材料自身的磁性,在分析检测中常被用来分离、富集(捕获)待测样品<sup>[388]</sup>。利用磁珠的分离捕获能力并结合酶催化反应,Rissin 及合作者<sup>[388]</sup>发展了超高灵敏度检测血样中蛋白质的新技术(图 1-105)。如图 1-105A 所示,由于检测对象是小体积(如 100  $\mu\text{L}$ )、低浓度(如 50 amol/L)的蛋白质,待测蛋白质的量小于磁珠的数目,故在磁珠上形成三明治免疫结构时,每个磁珠将仅结合一个或者不结合目标蛋白质及其对应的检测抗体(检测时,将给出相当于 0 或者 1 的信号)。此外,如图 1-105C 所示,光纤表面小池(well)的体积很小,约为 50 fL。每一个小池大小与磁珠相匹配,每一个小池只能装入一个磁珠。且小池的体积很小,故酶催化反应所得产物的浓度就会相对较高,便于检测。当把磁珠封入光纤小池中后,连接在磁珠表面的酶将无荧光底物转化为发荧光产物,进而进行荧光检测,获得如图 1-105D 所示的亮斑信号。对于传统检测方法,目标物的浓度一般与信号强弱相关;而此处目标物浓度与亮斑的个数相关,故研究者将此方法称作“数字式单分子酶联免疫法”。该方法的响应范围为 350 zmol/L 到 7 fmol/L,检测限为 220 zmol/L。检测灵敏度较传统酶联免疫法提高了 4 个数量级。初步临床试验数据表明,该方法能用于前列腺癌患者手术后康复情况的跟踪。

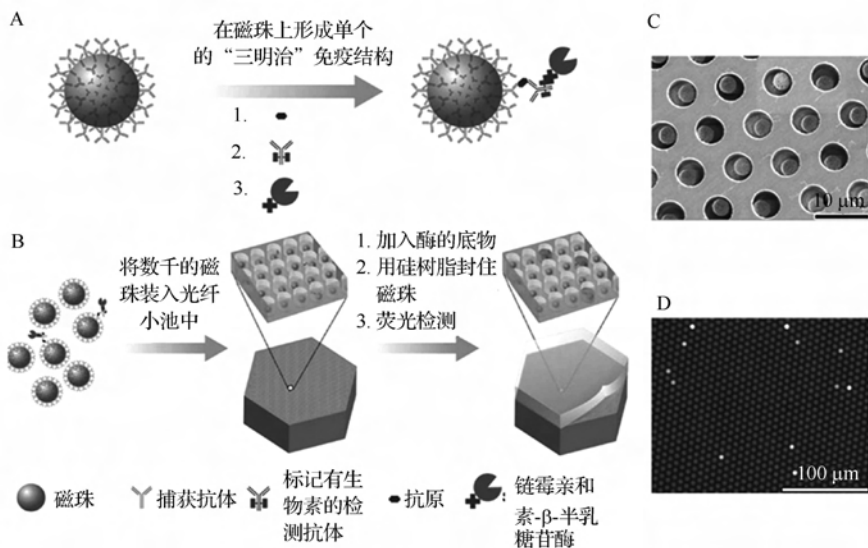


图 1-105 用“数字式单分子酶联免疫法”超高灵敏度检测蛋白质<sup>[388]</sup>

A. 单个抗原被磁珠捕获,进而结合检测抗体形成“三明治”免疫结构;B. “裸”磁珠和含“三明治”免疫结构的磁珠被一同装入光纤的检测阵列中,然后通过荧光成像进行检测;C. 装入了磁珠的检测阵列的扫描电子显微镜照片;D. 检测阵列上的代表性荧光检测信号

磁性材料本身还可用作信号转导元件,利用其磁学信号来实现目标物的检测<sup>[386,394,397,398]</sup>。例如,Osterfeld 等<sup>[398]</sup>用磁性纳米颗粒作为探针,建立了基于巨磁

阻效应(giant magnetoresistance, GMR)多元检测蛋白质的方法。如图 1-106 所示,当待测目标蛋白质存在时,形成的“三明治”结构能将磁性纳米颗粒探针拉近巨磁阻传感器,由于磁性纳米颗粒的磁场引起磁阻传感器电阻的急剧变化而产生检测信号。该方法快速、灵敏,可在约 0.5 h 内检测到 1 pg/mL 目标蛋白质。研究者还利用阵列技术,实现了包括癌胚抗原在内的 7 种蛋白质的平行检测。

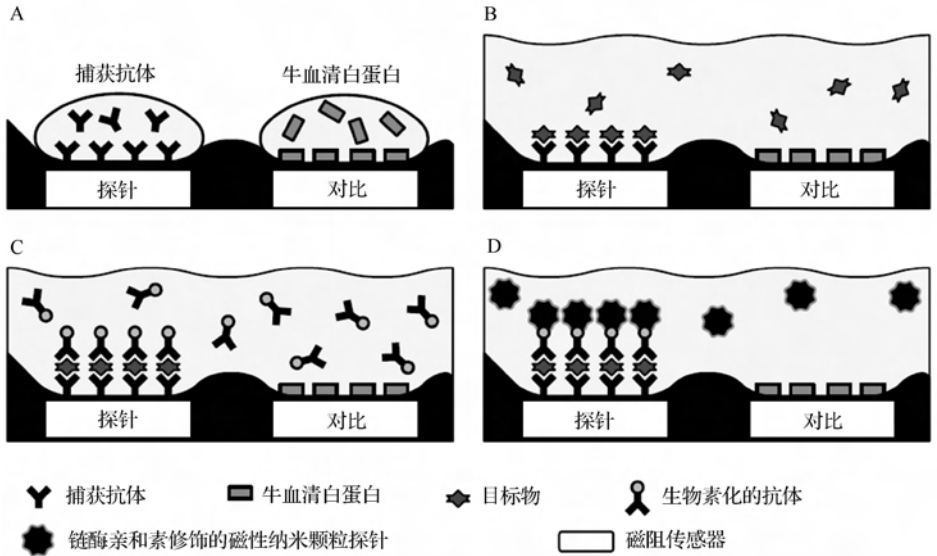


图 1-106 用磁性纳米颗粒作探针,基于巨磁阻效应检测蛋白质<sup>[398]</sup>

A. 在磁阻传感器上修饰捕获抗体;B. 样品中的待检测物与捕获抗体结合;C. 加入检测抗体,并形成“三明治”结构;D. 在检测抗体上结合磁性探针后即可检测

除上面讨论的几类纳米材料外,其他如硅、二氧化硅、稀土、聚合物、生物纳米材料及复合纳米材料等在检测与诊断中的应用研究也受到了研究人员的密切关注<sup>[7,399~407]</sup>,限于篇幅这里不再一一赘述。

## 1.4 结 语

上文中,围绕生物纳米传感体系的基本原理及构建方法,结合具体的例子阐述了纳米材料在体外检测与疾病诊断领域的应用研究。然而,除极少数传感体系已用于临床检测与诊断外,绝大多数的研究还停留在实验室阶段。欲推动该领域的进一步发展,需着力应对以下几个方面的挑战。

首先是来自纳米材料自身的挑战。现有方法虽然可以制备各种各样的纳米材料,但不同批次、不同实验室制备的同一纳米材料通常存在差异(batch-to-batch and lab-to-lab variability)。为此需要发展更加有效的合成方法,以制备高质量、高

纯度、性质均一的纳米材料。用于生物检测时,通常需要将纳米材料和生物分子连接在一起制备捕获探针或者检测探针。然而在多数情况下,并不能精确控制纳米材料和生物分子的连接方式及两者的配比,且连接后会降低生物分子(及纳米材料)的活性和稳定性。这需要更深入研究“生物/纳米”界面,并进一步发展在分子和纳米尺度水平上调控生物分子与纳米材料相互作用的方法以制备有确定化学计量结构的高稳定性纳米材料探针。同时还需要考虑纳米材料的生物与健康效应。此外,还需要建立行业标准以规范纳米材料的制备、表征、储存、应用、回收等。

其次,临床样品一般都比较复杂,若直接用于检测则会有比较严重的非特异性吸附和背景干扰,因而一般需要有样品预处理过程。但传统的样品预处理步骤操作复杂且耗时较长。故需要结合纳米材料的特点及微纳加工技术的优势来发展高效的样品预处理方法和平台。例如,将微流控芯片技术与纳米传感体系有机结合,则可以实现复杂生物样品的高效分离富集,提高分析检测的效率<sup>[394,397,408]</sup>。

再次,一些重大疾病仍然难以做到早期诊断和快速确诊。例如,对于肿瘤一般需要耗时长的侵入性活检才能确诊。再如,对于结核病,一般需要耗时数天的细菌培养才能确诊。因而需要着力发展能满足这类临床需求的高灵敏高选择性检测与诊断方法<sup>[394,397,408]</sup>。

目前,绝大多数的临床检测与诊断是在医院由经过专业培训的医护人员在专业仪器上完成的。然而,在一些经济条件较差地区或者特殊场所(如重大灾害现场、战场等),需要易于操作、快速、便携、低成本的“现场即时检测”(point-of-care)仪器<sup>[409~411]</sup>。这类“现场即时检测”仪器同样适用于对一些疾病的长期监测,如用血糖仪来监测糖尿病等<sup>[412,413]</sup>。

同时,随着科技的进步和人们生活方式的改变,疾病的检测与诊断模式也在随之改变。例如,借助于发达的通信、网络 and 智能电器(如智能手机)等,可发展远程诊疗技术,实现医院和家庭(医生与患者)的真正互动。

可以预期的是,经过研究人员、医护人员和患者的共同努力,新型的生物纳米传感与检测方法技术必能成功推广应用于临床检测与诊断<sup>[388]</sup>。

## 致谢

感谢国家自然科学基金(21190040)、国家重点基础研究发展计划(2010CB933600)、江苏省自然科学基金(BK20130561, Bk20140593)、青年千人计划、江苏高校优势学科建设工程资助项目的资助。

部分内容引自魏辉博士论文《某些纳米材料:合成、自组装及其分析应用》(中国科学院,2008)。

## 参 考 文 献

- [1] Giljohann D A, Mirkin C A. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*, 2009, 462:461-464.
- [2] Nie S M, Emery S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, 1997, 275:1102-1106.
- [3] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 1997, 277:1078-1081.
- [4] Chan W C W, Nie S M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281:2016-2018.
- [5] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281:2013-2016.
- [6] Kneipp K, Kneipp H, Itzkan I, et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chemical Reviews*, 1999, 99:2957-2976.
- [7] Cui Y, Wei Q Q, Park H K, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 2001, 293:1289-1292.
- [8] Niemeyer C M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, 40:4128-4158.
- [9] Park S J, Taton T A, Mirkin C A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 2002, 295:1503-1506.
- [10] Haes A J, Van Duyne R P. A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124:10596-10604.
- [11] Besteman K, Lee J O, Wiertz F G M, et al. Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors. *Nano Letters*, 2003, 3:727-730.
- [12] Daniel M C, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2004, 104:293-346.
- [13] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology*, 2004, 22:47-52.
- [14] Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004, 43:6042-6108.
- [15] Sonnichsen C, Reinhard B M, Liphardt J, et al. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nature Biotechnology*, 2005, 23:741-745.
- [16] Rosi N L, Mirkin C A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 2005, 105:1547-1562.
- [17] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307:538-544.
- [18] El-Sayed I H, Huang X H, El-Sayed M A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Letters*, 2005, 5:829-834.
- [19] Zhang C Y, Yeh H C, Kuroki M T, et al. Single-quantum-dot-based DNA nanosensor. *Nature Materials*, 2005, 4:826-831.
- [20] Bake K D, Walt D R. Multiplexed Spectroscopic Detections. *Annual Review of Analytical Chemistry*,

- 2008, 1:515-547.
- [21] Stiles P L, Dieringer J A, Shah N C, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2008, 1:601-626.
- [22] Guo S J, Dong S J. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28:96-109.
- [23] Zrazhevskiy P, Sena M, Gao X H. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39:4326-4354.
- [24] Zhou M, Dong S J. Bioelectrochemical interface engineering; Toward the fabrication of electrochemical biosensors, biofuel cells, and self-powered logic biosensors. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44: 1232-1243.
- [25] Guo S J, Dong S J. Graphene nanosheet; Synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40:2644-2672.
- [26] Guo S J, Wang E K. Functional Micro/Nanostructures; Simple Synthesis and Application in Sensors, Fuel Cells, and Gene Delivery. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44:491-500.
- [27] Guo S J, Wang E K. Noble metal nanomaterials; Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors. *Nano Today*, 2011, 6:240-264.
- [28] Beveridge J S, Stephens J R, Williams M E. The Use of Magnetic Nanoparticles in Analytical Chemistry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2011, 4:251-273.
- [29] Perfezou M, Turner A, Merkoci A. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41:2606-2622.
- [30] Chi X Q, Huang D T, Zhao Z H, et al. Nanoprobes for *in vitro* diagnostics of cancer and infectious diseases. *Biomaterials*, 2012, 33:189-206.
- [31] Du Y, Li B L, Wang E K. "Fitting" Makes "Sensing" Simple; Label-Free Detection Strategies Based on Nucleic Acid Aptamers. *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46:203-213.
- [32] Turner A P F. Biosensors; Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42:3184-3196.
- [33] Abramczyk H, Brozek-Pluska B. Raman Imaging in Biochemical and Biomedical Applications. *Diagnosis and Treatment of Breast Cancer*. *Chemical Reviews*, 2013, 113:5766-5781.
- [34] Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 1996, 382:607-609.
- [35] Weissleder R, Kelly K, Sun E Y, et al. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*, 2005, 23:1418-1423.
- [36] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2:577-583.
- [37] Wei H, Wang E. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection. *Analytical Chemistry*, 2008, 80:2250-2254.
- [38] Fan K L, Cao C Q, Pan Y X, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7:459-464.
- [39] Wei H, Wang E K. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes); Next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42:6060-6093.
- [40] Wilson D S, Szostak J W. *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68:611-647.

- [41] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* Selection of Rna Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature*, 1990, 346;818-822.
- [42] Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment-Rna Ligands to Bacteriophage-T4 DNA-Polymerase. *Science*, 1990, 249;505-510.
- [43] Robertson D L, Joyce G F. Selection *in vitro* of an Rna Enzyme That Specifically Cleaves Single-Stranded-DNA. *Nature*, 1990, 344;467-468.
- [44] Liu J W, Cao Z H, Lu Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chemical Reviews*, 2009, 109;1948-1998.
- [45] Hu M, He Y, Song S P, et al. DNA-bridged bioconjugation of fluorescent quantum dots for highly sensitive microfluidic protein chips. *Chemical Communications*, 2010, 46;6126-6128.
- [46] Nam J M, Thaxton C S, Mirkin C A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 2003, 301;1884-1886.
- [47] Link S, El-Sayed M A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103;4212-4217.
- [48] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors; Review. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1999, 54;3-15.
- [49] Jia J B, Wang B Q, Wu A G, et al. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor; Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Analytical Chemistry*, 2002, 74;2217-2223.
- [50] Kelly K L, Coronado E, Zhao L L, et al. The optical properties of metal nanoparticles; The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107;668-677.
- [51] Lee K S, El-Sayed M A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging; Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110;19220-19225.
- [52] Willets K A, Van Duyne R P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, 58;267-297.
- [53] Anker J N, Hall W P, Lyandres O, et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials*, 2008, 7;442-453.
- [54] Stewart M E, Anderton C R, Thompson L B, et al. Nanostructured plasmonic sensors. *Chemical Reviews*, 2008, 108;494-521.
- [55] Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37;2028-2045.
- [56] Jain P K, Huang X H, El-Sayed I H, et al. Noble metals on the nanoscale; Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41;1578-1586.
- [57] Zheng X, Liu Q, Jing C, et al. Catalytic gold nanoparticles for nanoplasmonic detection of DNA hybridization. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50;11994-11998.
- [58] Saha K, Agasti S S, Kim C, et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, 2012, 112;2739-2779.
- [59] Xie X, Xu W, Liu X. Improving colorimetric assays through protein enzyme-assisted gold nanoparticle Amplification. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45;1511-1520.
- [60] Wang C K, Liu D J, Wang Z X. Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay for sensitively detecting Alzheimer's disease related beta-amyloid peptide. *Chemical Communications*, 2012, 48;8392-8394.

- [61] Li T, Liu X, Liu D J, et al. Sensitive detection of protein kinase a activity in cell lysates by peptide microarray-based assay. *Analytical Chemistry*, 2013, 85:7033-7037.
- [62] Kravets V G, Schedin F, Jalil R, et al. Singular phase nano-optics in plasmonic metamaterials for label-free single-molecule detection. *Nature Materials*, 2013, 12:304-309.
- [63] Alivisatos A P, Johnsson K P, Peng X G, et al. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 1996, 382:609-611.
- [64] Storhoff J J, Elghanian R, Mucic R C, et al. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120:1959-1964.
- [65] Murphy D, O'Brien P, Redmond G. Sub-picomole colorimetric single nucleotide polymorphism discrimination using oligonucleotide-nanoparticle conjugates. *Analyst*, 2004, 129:970-974.
- [66] Tabin C J, Bradley S M, Bargmann C I, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, 1982, 300:143-149.
- [67] Boon E M, Ceres D M, Drummond T G, et al. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nature Biotechnology*, 2000, 18:1096-1100.
- [68] Li J H, Chu X, Liu Y L, et al. A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33:e168.
- [69] Li J S, Jiang J H, Xu X M, et al. Simultaneous identification of point mutations via DNA ligase-mediated gold nanoparticle assembly. *Analyst*, 2008, 133:939-945.
- [70] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289:1757-1760.
- [71] Thaxton C S, Elghanian R, Thomas A D, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106:18437-18442.
- [72] Mascini M, Tombelli S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers*, 2008, 13:637-657.
- [73] Hughes V. Markers of dispute. *Nature Medicine*, 2009, 15:1339-1343.
- [74] Prensner J R, Rubin M A, Wei J T, et al. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Science Translational Medicine*, 2012, 4:11.
- [75] Sreekumar A, Poisson L M, Rajendiran T M, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 2009, 457:910-914.
- [76] Li Z, Jin R C, Mirkin C A, et al. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:1558-1562.
- [77] Li F, Zhang H, Dever B, et al. Thermal stability of DNA functionalized gold nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, 2013, 24:1790-1797.
- [78] Pei H, Li F, Wan Y, et al. Designed diblock oligonucleotide for the synthesis of spatially isolated and highly hybridizable functionalization of DNA-gold nanoparticle nanoconjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134:11876-11879.
- [79] Wei H, Li B L, Li J, et al. DNAzyme-based colorimetric sensing of lead  $Pb^{2+}$  using unmodified gold nanoparticle probes. *Nanotechnology*, 2008, 19:095501.
- [80] Liu J W, Lu Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125:6642-6643.

- [81] Liu J W, Lu Y. Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAzymes for simple and fast colorimetric Pb<sup>2+</sup> detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126:12298-12305.
- [82] Liu J, Lu Y. Stimuli-responsive disassembly of nanoparticle aggregates for light-up colorimetric sensing. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127:12677-12683.
- [83] Wang Z, Lee J H, Lu Y. Label-free colorimetric detection of lead ions with a nanomolar detection limit and tunable dynamic range by using gold nanoparticles and DNAzyme. *Advanced Materials*, 2008, 20:3263-3267.
- [84] Liu Y, Liu Y, Mernaugh R L, et al. Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24:2853-2857.
- [85] Zhao W, Chiunan W, Lam J C F, et al. DNA aptamer folding on gold nanoparticles: From colloid chemistry to biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130:3610-3618.
- [86] Zhao W A, Chiunan W, Brook M A, et al. Simple and rapid colorimetric biosensors based on DNA aptamer and noncrosslinking gold nanoparticle aggregation. *Chembiochem*, 2007, 8:727-731.
- [87] Wang Y, Li D, Ren W, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer-Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay. *Chemical Communications*, 2008, 2520-2522.
- [88] Liu J W, Lu Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45:90-94.
- [89] Liu J, Lu Y. Colorimetric Cu<sup>2+</sup> detection with a ligation DNAzyme and nanoparticles. *Chemical Communications*, 2007, 4872-4874.
- [90] Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, et al. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126:11768-11769.
- [91] Han M S, Lytton-Jean A K R, Mirkin C A. A gold nanoparticle based approach for screening triplex DNA binders. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:4954-4955.
- [92] Lee J S, Han M S, Mirkin C A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg<sup>2+</sup>) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46:4093-4096.
- [93] Song G, Chen C, Qu X, et al. Small-molecule-directed assembly: A gold nanoparticle-based strategy for screening of homo-adenine DNA duplex binders. *Advanced Materials*, 2008, 20:706-710.
- [94] Li H X, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101:14036-14039.
- [95] Li H X, Rothberg L J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126:10958-10961.
- [96] Li H X, Rothberg L. Detection of specific sequences in RNA using differential adsorption of single-stranded oligonucleotides on gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2005, 77:6229-6233.
- [97] Wang L, Liu X, Hu X, et al. Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers. *Chemical Communications*, 2006, 3780-3782.
- [98] Wei H, Li B L, Li J, et al. Simple and sensitive aptamer-based colorimetric sensing of protein using unmodified gold nanoparticle probes. *Chemical Communications*, 2007, 3735-3737.
- [99] Lv Z, Wei H, Li B, et al. Colorimetric recognition of the coralyne-poly(dA) interaction using unmodified gold nanoparticle probes, and further detection of coralyne based upon this recognition system. *Analyst*,

- 2009, 134:1647-1651.
- [100] Lee J H, Wang Z, Liu J, et al. Highly Sensitive and Selective Colorimetric Sensors for Uranyl ( $\text{UO}_2^{2+}$ ): Development and Comparison of Labeled and Label-Free DNAzyme-Gold Nanoparticle Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130:14217-14226.
- [101] Pham V D, Hoang H, Phan T H, et al. Production of antibody labeled gold nanoparticles for influenza virus H5N1 diagnosis kit development. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol*, 2012, 3:045017.
- [102] Zhang J, Wang Y, Xu X, et al. Specifically colorimetric recognition of calcium, strontium, and barium ions using 2-mercaptosuccinic acid-functionalized gold nanoparticles and its use in reliable detection of calcium ion in water. *Analyst*, 2011, 136:3865-3868.
- [103] Rodríguez-Lorenzo L, de la Rica R, Alvarez-Puebla R A, et al. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nature Materials*, 2012, 11:604-607.
- [104] de la Rica R, Stevens M M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7:821-824.
- [105] Jiang Y, Zhao H, Zhu N, et al. A simple assay for direct colorimetric visualization of trinitrotoluene at picomolar levels using gold nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, 47: 8601-8604.
- [106] Uehara N, Ookubo K, Shimizu T. Colorimetric assay of glutathione based on the spontaneous disassembly of aggregated gold nanocomposites conjugated with water-soluble polymer. *Langmuir*, 2010, 26:6818-6825.
- [107] Zhang L, Zhao J, Jiang J, et al. Enzyme-regulated unmodified gold nanoparticle aggregation; A label free colorimetric assay for rapid and sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibition. *Chemical Communications*, 2012, 48:10996-10998.
- [108] Matsui J, Akamatsu K, Nishiguchi S, et al. Composite of Au nanoparticles and molecularly imprinted polymer as a sensing material. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:1310-1315.
- [109] Wang Z X, Levy R, Fernig D G, et al. Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles; A new approach to colorimetric kinase activity screening. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:2214-2215.
- [110] Laromaine A, Koh L, Murugesan M, et al. Protease-triggered dispersion of nanoparticle assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129:4156-4157.
- [111] Deng J, Jiang Q, Wang Y, et al. Real-time colorimetric assay of inorganic pyrophosphatase activity based on reversibly competitive coordination of  $\text{Cu}^{2+}$  between cysteine and pyrophosphate ion. *Analytical Chemistry*, 2013, 85:9409-9415.
- [112] Ai K, Liu Y, Lu L. Hydrogen-bonding recognition-induced color change of gold nanoparticles for visual detection of melamine in raw milk and infant formula. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131:9496-9497.
- [113] Zhang M, Qing G, Xiong C, et al. Dual-responsive gold nanoparticles for colorimetric recognition and testing of carbohydrates with a dispersion-dominated chromogenic process. *Advanced Materials*, 2013, 25:749-754.
- [114] Chen Y, Aveyard J, Wilson R. Gold and silver nanoparticles functionalized with known numbers of oligonucleotides per particle for DNA detection. *Chemical Communications*, 2004, 2804-2805.
- [115] Schofield C L, Haines A H, Field R A, et al. Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioas-

says. *Langmuir*, 2006, 22:6707-6711.

- [116] Lee J S, Lytton-Jean A K R, Hurst S J, et al. Silver nanoparticle-oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties. *Nano Letters*, 2007, 7:2112-2115.
- [117] Liu S H, Zhang Z H, Han M Y. Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection. *Analytical Chemistry*, 2005, 77:2595-2600.
- [118] Yoosaf K, Ipe B I, Suresh C H, et al. In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111:12839-12847.
- [119] McFarland A D, Van Duyne R P. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Letters*, 2003, 3:1057-1062.
- [120] Cao Y W C, Jin R C, Mirkin C A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297:1536-1540.
- [121] Wei H, Li J, Wang Y, et al. Silver nanoparticles coated with adenine: Preparation, self-assembly and application in surface-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology*, 2007, 18:175610.
- [122] Wei H, Chen C G, Han B Y, et al. Enzyme colorimetric assay using unmodified silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2008, 80:7051-7055.
- [123] Walekar L S, Gore A H, Anbhule P V, et al. A novel colorimetric probe for highly selective recognition of  $Hg^{2+}$  ions in aqueous media based on inducing the aggregation of CPB-capped AgNPs; Accelerating direct detection for environmental analysis. *Analytical Methods*, 2013, 5:5501-5507.
- [124] Xu X W, Wang J, Yang F, et al. Label-free colorimetric detection of small molecules utilizing DNA oligonucleotides and silver nanoparticles. *Small*, 2009, 5:2669-2672.
- [125] Miao P, Liu T, Li X X, et al. Highly sensitive, label-free colorimetric assay of trypsin using silver nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 49:20-24.
- [126] Fleisch M, Hendra P J, McQuilla A J. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26:163-166.
- [127] Jeanmaire D L, Vanduyne R P. Surface Raman spectroelectrochemistry. I. heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1977, 84:1-20.
- [128] Albrecht M G, Creighton J A. Anomalously intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99:5215-5217.
- [129] Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical Review Letters*, 1997, 78:1667-1670.
- [130] Tian Z Q, Ren B, Wu D Y. Surface-enhanced Raman scattering: From noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106:9463-9483.
- [131] Doering W E, Nie S M. Spectroscopic tags using dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 2003, 75:6171-6176.
- [132] Zhang X Y, Young M A, Lyandres O, et al. Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127:4484-4489.
- [133] Doering W E, Piotti M E, Natan M J, et al. SERS as a foundation for nanoscale, optically detected biological labels. *Advanced Materials*, 2007, 19:3100-3108.
- [134] Porter M D, Lipert R J, Siperko L M, et al. SERS as a bioassay platform: Fundamentals, design, and applications. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37:1001-1011.

- [135] Graham D, Thompson D G, Smith W E, et al. Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2008, 3:548-551.
- [136] Liu Z, Ding S Y, Chen Z B, et al. Revealing the molecular structure of single-molecule junctions in different conductance states by fishing-mode tip-enhanced Raman spectroscopy. *Nature Communications*, 2011, 2:6.
- [137] Robson A F, Hupp T R, Lickiss F, et al. Nanosensing protein allostery using a bivalent mouse double minute two(MDM2) assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109:8073-8078.
- [138] Ren W, Zhu C Z, Wang E K. Enhanced sensitivity of a direct SERS technique for  $Hg^{2+}$  detection based on the investigation of the interaction between silver nanoparticles and mercury ions. *Nanoscale*, 2012, 4:5902-5909.
- [139] McAughtrie S, Lau K, Faulds K, et al. 3D optical imaging of multiple SERS nanotags in cells. *Chemical Science*, 2013, 4:3566-3572.
- [140] Wang Y L, Schlucker S. Rational design and synthesis of SERS labels. *Analyst*, 2013, 138:2224-2238.
- [141] Wang Y L, Irudayaraj J. Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2013, 368:10.
- [142] Lin L, Tian X, Hong S, et al. A bioorthogonal Raman reporter strategy for SERS detection of glycans on live cells. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, 52:7266-7271.
- [143] Sharma B, Ma K, Glucksberg M R, et al. Seeing through bone with surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:17290-17293.
- [144] Zhang X Y, Zhao J, Whitney A V, et al. Ultrastable substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy;  $Al_2O_3$  overlayers fabricated by atomic layer deposition yield improved anthrax biomarker detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:10304-10309.
- [145] Wang Y L, Chen H J, Dong S J, et al. Fabrication and characterization of SERS-active silver clusters on glassy carbon. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007, 38:515-521.
- [146] Li J F, Huang Y F, Ding Y, et al. Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature*, 2010, 464:392-395.
- [147] Ren W, Liu J Y, Guo S J, et al. SERS imaging for label-free detection of the phospholipids distribution in hybrid lipid membrane. *Science China-Chemistry*, 2011, 54:1334-1341.
- [148] Ren W, Fang Y X, Wang E K. A binary functional substrate for enrichment and ultrasensitive SERS spectroscopic detection of folic acid using graphene oxide/Ag nanoparticle hybrids. *ACS Nano*, 2011, 5:6425-6433.
- [149] Sharma B, Cardinal M F, Kleinman S L, et al. High-performance SERS substrates: Advances and challenges. *Mrs Bulletin*, 2013, 38:615-624.
- [150] Xu H X, Bjerneld E J, Kall M, et al. Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering. *Physical Review Letters*, 1999, 83:4357-4360.
- [151] Kneipp K, Haka A S, Kneipp H, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56:150-154.
- [152] Jarvis R M, Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:40-47.
- [153] Han X X, Huang G G, Zhao B, et al. Label-free highly sensitive detection of proteins in aqueous solu-

tions using surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 2009, 81:3329-3333.

- [154] Lo H-C, Hsiung H-I, Chattopadhyay S, et al. Label free sub-picomole level DNA detection with Ag nanoparticle decorated Au nanotip arrays as surface enhanced Raman spectroscopy platform. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26:2413-2418.
- [155] Liu T Y, Tsai K T, Wang H H, et al. Functionalized arrays of Raman-enhancing nanoparticles for capture and culture-free analysis of bacteria in human blood. *Nature Communications*, 2011, 2:8.
- [156] Lin E C, Fang J, Park S C, et al. Effective localized collection and identification of airborne species through electrodynamic precipitation and SERS-based detection. *Nature Communications*, 2013, 4:8.
- [157] Cecchini M P, Turek V A, Paget J, et al. Self-assembled nanoparticle arrays for multiphase trace analyte detection. *Nature Materials*, 2013, 12:165-171.
- [158] Kim K, Han H S, Choi I, et al. Interfacial liquid-state surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nature Communications*, 2013, 4:9.
- [159] Lim D K, Jeon K S, Kim H M, et al. Nanogap-engineerable Raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. *Nature Materials*, 2010, 9:60-67.
- [160] Lim D K, Jeon K S, Hwang J H, et al. Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6:452-460.
- [161] Wang Y Q, Yan B, Chen L X. SERS Tags: Novel optical nanoprobes for bioanalysis. *Chemical Reviews*, 2013, 113:1391-1428.
- [162] Fabris L, Dante M, Braun G, et al. A heterogeneous PNA-based SERS method for DNA detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129:6086-6087.
- [163] Wang Y, Wei H, Li B, et al. SERS opens a new way in aptasensor for protein recognition with high sensitivity and selectivity. *Chemical Communications*, 2007, 5220-5222.
- [164] Wang Y L, Lee K, Irudayaraj J. SERS aptasensor from nanorod-nanoparticle junction for protein detection. *Chemical Communications*, 2010, 46:613-615.
- [165] Wang Y L, Irudayaraj J. A SERS DNase biosensor for lead ion detection. *Chemical Communications*, 2011, 47:4394-4396.
- [166] Grubisha D S, Lipert R J, Park H Y, et al. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Analytical Chemistry*, 2003, 75:5936-5943.
- [167] Qian X M, Peng X H, Ansari D O, et al. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 2008, 26:83-90.
- [168] Zavaleta C L, Smith B R, Walton I, et al. Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106:13511-13516.
- [169] Sha M Y, Xu H X, Natan M J, et al. Surface-enhanced Raman scattering tags for rapid and homogeneous detection of circulating tumor cells in the presence of human whole blood. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130:17214-17215.
- [170] Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2013, 10:472-484.
- [171] Yang L Y, Lang J C, Balasubramanian P, et al. Optimization of an enrichment process for circulating

tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102:521-534.

- [172] Plaks V, Koopman C D, Werb Z. Circulating tumor cells. *Science*, 2013, 341:1186-1188.
- [173] Ruan C M, Wang W, Gu B H. Detection of alkaline phosphatase using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2006, 78:3379-3384.
- [174] Larmour I A, Faulds K, Graham D. The past, present and future of enzyme measurements using surface enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Science*, 2010, 1:151-160.
- [175] Wang Y, Li D, Li P, et al. Surface enhanced Raman scattering of brilliant green on Ag nanoparticles and applications in living cells as optical probes. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111:16833-16839.
- [176] Wang Y L, Seebald J L, Szeto D P, et al. Biocompatibility and biodistribution of surface-enhanced Raman scattering nanoprobes in zebrafish embryos: *In vivo* and Multiplex Imaging. *ACS Nano*, 2010, 4:4039-4053.
- [177] Stockle R M, Suh Y D, Deckert V, et al. Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 2000, 318:131-136.
- [178] Zhang W H, Cui X D, Yeo B S, et al. Nanoscale roughness on metal surfaces can increase tip-enhanced Raman scattering by an order of magnitude. *Nano Letters*, 2007, 7:1401-1405.
- [179] Zhang W H, Yeo B S, Schmid T, et al. Single molecule tip-enhanced Raman spectroscopy with silver tips. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111:1733-1738.
- [180] Yeo B S, Stadler J, Schmid T, et al. Tip-enhanced Raman spectroscopy-its status, challenges and future directions. *Chemical Physics Letters*, 2009, 472:1-13.
- [181] Zhang R, Zhang Y, Dong Z C, et al. Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced Raman scattering. *Nature*, 2013, 498:82-86.
- [182] Sonntag M D, Chulhai D, Seideman T, et al. The origin of relative intensity fluctuations in single-molecule tip-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:17187-17192.
- [183] Wood B R, Bailo E, Khiavi M A, et al. Tip-enhanced Raman scattering (TERS) from hemozoin crystals within a sectioned erythrocyte. *Nano Letters*, 2011, 11:1868-1873.
- [184] Hermann P, Hermelink A, Lausch V, et al. Evaluation of tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing different virus strains. *Analyst*, 2011, 136:1148-1152.
- [185] Bohme R, Mkandawire M, Krause-Buchholz U, et al. Characterizing cytochrome c states-TERS studies of whole mitochondria. *Chemical Communications*, 2011, 47:11453-11455.
- [186] Alexander K D, Schultz Z D. Tip-enhanced Raman detection of antibody conjugated nanoparticles on cellular membranes. *Analytical Chemistry*, 2012, 84:7408-7414.
- [187] Zheng J, Nicovich P R, Dickson R M. Highly fluorescent noble-metal quantum dots. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, 58:409-431.
- [188] Xu H X, Suslick K S. Water-Soluble Fluorescent silver nanoclusters. *Advanced Materials*, 2010, 22:1078-1082.
- [189] Shang L, Dong S J, Nienhaus G U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*, 2011, 6:401-418.
- [190] Diez I, Ras R H A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 2011, 3:1963-1970.

- [191] Choi S, Dickson R M, Yu J. Developing luminescent silver nanodots for biological applications. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41:1867-1891.
- [192] Xavier P L, Chaudhari K, Baksi A, et al. Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: An emerging trend in atomic cluster nanoscience. *Nano Reviews*, 2012, 3:14767\_14761-14767\_14716.
- [193] Han B Y, Wang E K. DNA-templated fluorescent silver nanoclusters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402:129-138.
- [194] Lu Y, Chen W. Sub-nanometre sized metal clusters: From synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41:3594-3623.
- [195] Shiang Y-C, Huang C-C, Chen W-Y, et al. Fluorescent gold and silver nanoclusters for the analysis of biopolymers and cell imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22:12972-12982.
- [196] Latorre A, Somoza A. DNA-mediated silver nanoclusters: Synthesis, properties and applications. *ChemBiochem*, 2012, 13:951-958.
- [197] Jadzinsky P D, Calero G, Ackerson C J, et al. Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 angstrom resolution. *Science*, 2007, 318:430-433.
- [198] Jin R C. Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters. *Nanoscale*, 2010, 2:343-362.
- [199] Jin R C, Zhu Y, Qian H F. Quantum-sized gold nanoclusters: Bridging the gap between organometallics and Nanocrystals. *Chemistry-a European Journal*, 2011, 17:6584-6593.
- [200] Qian H F, Zhu M Z, Wu Z K, et al. Quantum sized gold nanoclusters with atomic precision. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45:1470-1479.
- [201] Yang H, Wang Y, Huang H, et al. All-thiol-stabilized Ag<sub>44</sub> and Au<sub>12</sub>Ag<sub>32</sub> nanoparticles with single-crystal structures. *Nature Communications*, 2013, 4.
- [202] Desireddy A, Conn B E, Guo J S, et al. Ultrastable silver nanoparticles. *Nature*, 2013, 501:399-402.
- [203] Chen Y-S, Choi H, Kamat P V. Metal-cluster-sensitized solar cells. A new class of thiolated gold sensitizers delivering efficiency greater than 2%. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:8822-8825.
- [204] Paau M C, Lo C K, Yang X, et al. Synthesis of 1.4 nm alpha-cyclodextrin-protected gold nanoparticles for luminescence sensing of mercury(II) with picomolar detection limit. *Journal of Physical Chemistry C*, 2010, 114:15995-16003.
- [205] Lee D, Donkers R L, Wang G L, et al. Electrochemistry and optical absorbance and luminescence of molecule-like Au-38 nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126:6193-6199.
- [206] Yang X, Shi M, Zhou R, et al. Blending of HAuCl<sub>4</sub> and histidine in aqueous solution: A simple approach to the Au-10 cluster. *Nanoscale*, 2011, 3:2596-2601.
- [207] Duan H, Nie S. Etching colloidal gold nanocrystals with hyperbranched and multivalent polymers: A new route to fluorescent and water-soluble atomic clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129:2412-2413.
- [208] Gonzalez B S, Rodriguez M J, Blanco C, et al. One step synthesis of the smallest photo luminescent and paramagnetic PVP-protected gold atomic clusters. *Nano Letters*, 2010, 10:4217-4221.
- [209] Zheng J, Petty J T, Dickson R M. High quantum yield blue emission from water-soluble Au-8 nanodots. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125:7780-7781.
- [210] Liu G Y, Shao Y, Ma K, et al. Synthesis of DNA-templated fluorescent gold nanoclusters. *Gold Bulletin*, 2012, 45:69-74.

- [211] Link S, Beeby A, FitzGerald S, et al. Visible to infrared luminescence from a 28-atom gold cluster. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106:3410-3415.
- [212] Xie J, Zheng Y, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131:888-889.
- [213] Wei H, Wang Z D, Yang L M, et al. Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster; Synthesis and application as  $Hg^{2+}$  sensor. *Analyst*, 2010, 135:1406-1410.
- [214] Sun C, Yang H, Yuan Y, et al. Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for *in Vivo* kidney targeting and biomedical imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133:8617-8624.
- [215] Wen F, Dong Y, Feng L, et al. Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:1193-1196.
- [216] Li L, Liu H, Shen Y, et al. Electrogenerated chemiluminescence of Au nanoclusters for the detection of dopamine. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:661-665.
- [217] Liu C-L, Wu H-T, Hsiao Y-H, et al. Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters; Preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50:7056-7060.
- [218] Wang Y, Wang Y, Zhou F, et al. Protein-protected Au clusters as a new class of nanoscale biosensor for label-free fluorescence detection of proteases. *Small*, 2012, 8:3769-3773.
- [219] Kong H, Lu Y, Wang H, et al. Protein discrimination using fluorescent gold nanoparticles on plasmonic substrates. *Analytical Chemistry*, 2012, 84:4258-4261.
- [220] Wang J, Zhang G, Li Q, et al. *In vivo* self-bio-imaging of tumors through *in situ* biosynthesized fluorescent gold nanoclusters. *Scientific Reports*, 2013, 3.
- [221] Xie J, Zheng Y, Ying J Y. Highly selective and ultrasensitive detection of  $Hg^{2+}$  based on fluorescence quenching of Au nanoclusters by  $Hg^{2+}$ - $Au^+$  interactions. *Chemical Communications*, 2010, 46:961-963.
- [222] Chen W B, Tu X J, Guo X Q. Fluorescent gold nanoparticles-based fluorescence sensor for  $Cu^{2+}$  ions. *Chemical Communications*, 2009, 1736-1738.
- [223] Lin Y-H, Tseng W-L. Ultrasensitive sensing of  $Hg^{2+}$  and  $CH_3Hg^+$  based on the fluorescence quenching of lysozyme type VI-stabilized gold nanoclusters. *Analytical Chemistry*, 2010, 82:9194-9200.
- [224] Tu X, Chen W, Guo X. Facile one-pot synthesis of near-infrared luminescent gold nanoparticles for sensing copper(II). *Nanotechnology*, 2011, 22:095701.
- [225] Liu Y, Ai K, Cheng X, et al. Gold-nanocluster-based fluorescent sensors for highly sensitive and selective detection of cyanide in water. *Advanced Functional Materials*, 2010, 20:951-956.
- [226] Liu J-M, Chen J-T, Yan X-P. Near infrared fluorescent trypsin stabilized gold nanoclusters as surface plasmon enhanced energy transfer biosensor and *in vivo* Cancer Imaging Bioprobe. *Analytical Chemistry*, 2013, 85:3238-3245.
- [227] Wang Y L, Chen J J, Irudayaraj J. Nuclear targeting dynamics of gold nanoclusters for enhanced therapy of HER2(+) breast cancer. *Acs Nano*, 2011, 5:9718-9725.
- [228] Shang L, Stockmar F, Azadfar N, et al. Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, 52:11154-11157.
- [229] Adhikari B, Banerjee A. Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and Hg-II sensing. *Chemistry of Materials*, 2010, 22:4364-4371.

- [230] Shang L, Dong S J. Facile preparation of water-soluble fluorescent silver nanoclusters using a polyelectrolyte template. *Chemical Communications*, 2008, 1088-1090.
- [231] Gwinn E G, O'Neill P, Guerrero A J, et al. Sequence-dependent fluorescence of DNA-hosted silver nanoclusters. *Advanced Materials*, 2008, 20:279-283.
- [232] Zheng J, Dickson R M. Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124:13982-13983.
- [233] Petty J T, Zheng J, Hud N V, et al. DNA-templated Ag nanocluster formation. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126:5207-5212.
- [234] Vosch T, Antoku Y, Hsiang J-C, et al. Strongly emissive individual DNA-encapsulated Ag nanoclusters as single-molecule fluorophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104:12616-12621.
- [235] Yu J, Choi S, Dickson R M. Shuttle-based fluorogenic silver-cluster biolabels. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, 48:318-320.
- [236] Petty J T, Story S P, Hsiang J C, et al. DNA-templated molecular silver fluorophores. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2013, 4:1148-1155.
- [237] Adhikari B, Banerjee A. Short-peptide-based hydrogel: A template for the in situ synthesis of fluorescent silver nanoclusters by using sunlight. *Chemistry-a European Journal*, 2010, 16:13698-13705.
- [238] Guo C L, Irudayaraj J. Fluorescent Ag clusters via a protein-directed approach as a Hg(II) ion sensor. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:2883-2889.
- [239] Yang X, Gan L, Han L, et al. High-yield synthesis of silver nanoclusters protected by DNA monomers and DFT prediction of their photoluminescence properties. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, 52:2022-2026.
- [240] Schultz D, Gardner K, Oemrawsingh S S R, et al. Evidence for rod-shaped DNA-stabilized silver nanocluster emitters. *Advanced Materials*, 2013, 25:2797-2803.
- [241] Guo W, Yuan J, Wang E. Oligonucleotide-stabilized Ag nanoclusters as novel fluorescence probes for the highly selective and sensitive detection of the Hg<sup>2+</sup> ion. *Chemical Communications*, 2009, 3395-3397.
- [242] Guo W, Yuan J, Dong Q, et al. Highly Sequence-dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132:932-934.
- [243] Yeh H C, Sharma J, Han J J, et al. A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization. *Nano Letters*, 2010, 10:3106-3110.
- [244] Han B, Wang E. Oligonucleotide-stabilized fluorescent silver nanoclusters for sensitive detection of biothiols in biological fluids. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26:2585-2589.
- [245] Deng L, Zhou Z, Li J, et al. Fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for the turn-on detection of Hg<sup>2+</sup> ions. *Chemical Communications*, 2011, 47:11065-11067.
- [246] Yuan J, Guo W, Wang E. Oligonucleotide stabilized silver nanoclusters as fluorescence probe for drug-DNA interaction investigation. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 706:338-342.
- [247] Sharma J, Yeh H-C, Yoo H, et al. Silver nanocluster aptamers; In situ generation of intrinsically fluorescent recognition ligands for protein detection. *Chemical Communications*, 2011, 47:2294-2296.
- [248] Yang S W, Vosch T. Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:6935-6939.

- [249] Li J, Zhong X, Cheng F, et al. One-pot synthesis of aptamer-functionalized silver nanoclusters for cell-type-specific imaging. *Analytical Chemistry*, 2012, 84:4140-4146.
- [250] Ocsoy I, Gulbakan B, Chen T, et al. DNA-guided metal-nanoparticle formation on graphene oxide surface. *Advanced Materials*, 2013, 25:2319-2325.
- [251] Liu X, Wang F, Niazov-Elkan A, et al. Probing Biocatalytic Transformations with Luminescent DNA/Silver Nanoclusters. *Nano Letters*, 2013, 13:309-314.
- [252] Zhang L, Zhu J, Zhou Z, et al. A new approach to light up DNA/Ag nanocluster-based beacons for bioanalysis. *Chemical Science*, 2013, 4:4004-4010.
- [253] Zhang L, Zhu J, Guo S, et al. Photoinduced electron transfer of DNA/Ag nanoclusters modulated by G-quadruplex/hemin complex for the construction of versatile biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:2403-2406.
- [254] Yuan X, Setyawati M I, Tan A S, et al. Highly luminescent silver nanoclusters with tunable emissions; Cyclic reduction-decomposition synthesis and antimicrobial properties. *Npg Asia Materials*, 2013, 5:e39.
- [255] Liu X, Wang F, Aizen R, et al. Graphene oxide/nucleic-acid-stabilized silver nanoclusters; Functional hybrid materials for optical aptamer sensing and multiplexed analysis of pathogenic DNAs. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:11832-11839.
- [256] Li T, Zhang L, Ai J, et al. Ion-tuned DNA/Ag fluorescent nanoclusters as versatile logic device. *Acs Nano*, 2011, 5:6334-6338.
- [257] Huang Z Z, Tao Y, Pu F, et al. Versatile logic devices based on programmable DNA-regulated silver-nanocluster signal transducers. *Chemistry-a European Journal*, 2012, 18:6663-6669.
- [258] Li J, Jia X F, Li D Y, et al. Stem-directed growth of highly fluorescent silver nanoclusters for versatile logic devices. *Nanoscale*, 2013, 5:6131-6138.
- [259] Zhou Z X, Liu Y Q, Dong S J. DNA-templated Ag nanoclusters as signal transducers for a label-free and resettable keypad lock. *Chemical Communications*, 2013, 49:3107-3109.
- [260] De Silva A P, Gunaratne H Q N, McCoy C P. A Molecular photoionic and gate based on fluorescent signaling. *Nature*, 1993, 364:42-44.
- [261] Ruben A J, Landweber L F. The past, present and future of molecular computing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000, 1:69-72.
- [262] Stojanovic M N, Mitchell T E, Stefanovic D. Deoxyribozyme-based logic gates. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124:3555-3561.
- [263] Lee T H, Dickson R M. Discrete two-terminal single nanocluster quantum optoelectronic logic operations at room temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100:3043-3046.
- [264] Stojanovic M N, Stefanovic D. A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nature Biotechnology*, 2003, 21:1069-1074.
- [265] Seelig G, Soloveichik D, Zhang D Y, et al. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science*, 2006, 314:1585-1588.
- [266] de Silva A P, Uchiyama S. Molecular logic and computing. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2:399-410.
- [267] Szacilowski K. Digital information processing in molecular systems. *Chemical Reviews*, 2008, 108:3481-3548.

- [268] Li T, Wang E K, Dong S J. Potassium-lead-switched g-quadruplexes: A new class of DNA logic gates. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131:15082-15083.
- [269] Zhou M, Du Y, Chen C G, et al. Aptamer-controlled biofuel cells in logic systems and used as self-powered and intelligent logic aptasensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132:2172-2174.
- [270] Zhou M, Zheng X L, Wang J, et al. 'Non-destructive' biocomputing security system based on gas-controlled biofuel cell and potentially used for intelligent medical diagnostics. *Bioinformatics*, 2011, 27:399-404.
- [271] Wang L, Zhu J B, Han L, et al. Graphene-based aptamer logic gates and their application to multiplex detection. *Acs Nano*, 2012, 6:6659-6666.
- [272] Hemphill J, Deiters A. DNA computation in mammalian cells: MicroRNA logic operations. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:10512-10518.
- [273] Bonnet J, Yin P, Ortiz M E, et al. Amplifying genetic logic gates. *Science*, 2013, 340:599-603.
- [274] Siuti P, Yazbek J, Lu T K. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology*, 2013, 31:448-452.
- [275] Chen S X, Zhang D Y, Seelig G. Conditionally fluorescent molecular probes for detecting single base changes in double-stranded DNA. *Nature Chemistry*, 2013, 5:782-789.
- [276] Sun Z, Wang Y, Wei Y, et al. Ag cluster-aptamer hybrid; Specifically marking the nucleus of live cells. *Chemical Communications*, 2011, 47:11960-11962.
- [277] Shang L, Doerlich R M, Trouillet V, et al. Ultrasmall fluorescent silver nanoclusters; Protein adsorption and its effects on cellular responses. *Nano Research*, 2012, 5:531-542.
- [278] Rotaru A, Dutta S, Jentsch E, et al. Selective dsDNA-templated formation of copper nanoparticles in solution. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49:5665-5667.
- [279] Wei W, Lu Y, Chen W, et al. One-pot synthesis, photoluminescence, and electrocatalytic properties of subnanometer-sized copper clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133:2060-2063.
- [280] Zhou Z X, Du Y, Dong S J. Double-strand DNA-templated formation of copper nanoparticles as fluorescent probe for label-free aptamer sensor. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:5122-5127.
- [281] Jia X, Li J, Han L, et al. DNA-hosted copper nanoclusters for fluorescent identification of single nucleotide polymorphisms. *Acs Nano*, 2012, 6:3311-3317.
- [282] Chen J H, Liu J, Fang Z Y, et al. Random dsDNA-templated formation of copper nanoparticles as novel fluorescence probes for label-free lead ions detection. *Chemical Communications*, 2012, 48:1057-1059.
- [283] Hu R, Liu Y R, Kong R M, et al. Double-strand DNA-templated formation of Copper nanoparticles as fluorescent probe for label free nuclease enzyme detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 42:31-35.
- [284] Hu Y H, Wu Y M, Chen T T, et al. Double-strand DNA-templated synthesis of copper nanoclusters as novel fluorescence probe for label-free detection of biothiols. *Analytical Methods*, 2013, 5:3577-3581.
- [285] Tanaka S-I, Miyazaki J, Tiwari D K, et al. Fluorescent platinum nanoclusters; Synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50:

431-435.

- [286] Zhou T-y, Lin L-p, Rong M-c, et al. Silver-gold alloy nanoclusters as a fluorescence-enhanced probe for aluminum ion sensing. *Analytical Chemistry*, 2013, 85:9839-9844.
- [287] Dubertret B, Calame M, Libchaber A J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 2001, 19:365-370.
- [288] Maxwell D J, Taylor J R, Nie S M. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124:9606-9612.
- [289] Du H, Disney M D, Miller B L, et al. Hybridization-based unquenching of DNA hairpins on Au surfaces; Prototypical "molecular beacon" biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125:4012, 4013.
- [290] Du H, Strohsahl C M, Camera J, et al. Sensitivity and specificity of metal surface-immobilized "molecular beacon" biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127:7932-7940.
- [291] Seferos D S, Giljohann D A, Hill H D, et al. Nano-flares; Probes for transfection and mRNA detection in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129:15477-15479.
- [292] Pons T, Medintz I L, Sapsford K E, et al. On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. *Nano Letters*, 2007, 7:3157-3164.
- [293] You C-C, Miranda O R, Gider B, et al. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer "chemical nose" sensors. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2:318-323.
- [294] De M, Rana S, Akpınar H, et al. Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein. *Nature Chemistry*, 2009, 1:461-465.
- [295] Zheng D, Seferos D S, Giljohann D A, et al. Aptamer nano-flares for molecular detection in living cells. *Nano Letters*, 2009, 9:3258-3261.
- [296] Prigodich A E, Seferos D S, Massich M D, et al. Nano-flares for mRNA Regulation and Detection. *ACS Nano*, 2009, 3:2147-2152.
- [297] Song S, Liang Z, Zhang J, et al. Gold-nanoparticle-based multicolor nanobeacons for sequence-specific DNA analysis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, 48:8670-8674.
- [298] Yin B-C, Zuo P, Huo H, et al. DNAzyme self-assembled gold nanoparticles for determination of metal ions using fluorescence anisotropy assay. *Analytical Biochemistry*, 2010, 401:47-52.
- [299] Tabakman S M, Lau L, Robinson J T, et al. Plasmonic substrates for multiplexed protein microarrays with femtomolar sensitivity and broad dynamic range. *Nature Communications*, 2011, 2.
- [300] Kim J H, Han S H, Chung B H. Improving  $Pb^{2+}$  detection using DNAzyme-based fluorescence sensors by pairing fluorescence donors with gold nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26: 2125-2129.
- [301] Wu C C, Chen T, Han D, et al. Engineering of switchable aptamer micelle flares for molecular imaging in living cells. *ACS Nano*, 2013, 7:5724-5731.
- [302] Li H X, Rothberg L J. DNA sequence detection using selective fluorescence quenching of tagged oligonucleotide probes by gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:5414-5417.
- [303] Huang C-C, Chiu S-H, Huang Y-F, et al. Aptamer-functionalized gold nanoparticles for turn-on light switch detection of platelet-derived growth factor. *Analytical Chemistry*, 2007, 79:4798-4804.
- [304] Wu P, Hwang K, Lan T, et al. A DNAzyme-gold nanoparticle probe for uranyl ion in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135:5254-5257.

- [305] Mayilo S, Kloster M A, Wunderlich M, et al. Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T. *Nano Letters*, 2009, 9:4558-4563.
- [306] Wang D, Zhu X, Zhao D, et al. Single-step turn-on homogeneous fluorescent immunosensor for rapid, sensitive, and selective detection of proteins. *Chemistry-an Asian Journal*, 2012, 7:1546-1549.
- [307] Phillips R L, Miranda O R, You C-C, et al. Rapid and efficient identification of bacteria using gold-nanoparticle-Poly (para-phenyleneethynylene) constructs. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, 47:2590-2594.
- [308] Bajaj A, Miranda O R, Kim I B, et al. Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106:10912-10916.
- [309] Carregal-Romero S, Caballero-Diaz E, Beqa L, et al. Multiplexed sensing and imaging with colloidal nano- and microparticles. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2013, 6:53-81.
- [310] Cam D, Keseroglu K, Kahraman M, et al. Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, 41:484-489.
- [311] Sun L, Sung K B, Dentinger C, et al. Composite organic-inorganic nanoparticles as Raman labels for tissue analysis. *Nano Letters*, 2007, 7:351-356.
- [312] Sokolov K, Chumanov G, Cotton T M. Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal films. *Analytical Chemistry*, 1998, 70:3898-3905.
- [313] Geddes C D, Lakowicz J R. Metal-enhanced fluorescence. *Journal of Fluorescence*, 2002, 12:121-129.
- [314] Kulakovich O, Strekal N, Yaroshevich A, et al. Enhanced luminescence of CdSe quantum dots on gold colloids. *Nano Letters*, 2002, 2:1449-1452.
- [315] Geddes C D, Cao H, Gryczynski I, et al. Metal-enhanced fluorescence(MEF) due to silver colloids on a planar surface: Potential applications of indocyanine green to *in vivo* imaging. *Journal of Physical Chemistry A*, 2003, 107:3443-3449.
- [316] Malicka J, Gryczynski I, Lakowicz J R. DNA hybridization assays using metal-enhanced fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 306:213-218.
- [317] Matveeva E, Gryczynski Z, Malicka J, et al. Metal-enhanced fluorescence immunoassays using total internal reflection and silver island-coated surfaces. *Analytical Biochemistry*, 2004, 334:303-311.
- [318] Aslan K, Gryczynski I, Malicka J, et al. Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16:55-62.
- [319] Matveeva E G, Gryczynski Z, Lakowicz J R. Myoglobin immunoassay based on metal particle-enhanced fluorescence. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 302:26-35.
- [320] Aslan K, Huang J, Wilson G M, et al. Metal-enhanced fluorescence-based RNA sensing. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:4206, 4207.
- [321] Pompa P P, Martiradonna L, Della Torre A, et al. Metal-enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control. *Nature Nanotechnology*, 2006, 1:126-130.
- [322] Tam F, Goodrich G P, Johnson B R, et al. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence. *Nano Letters*, 2007, 7:496-501.
- [323] Deng W, Jin D, Drozdowicz-Tomsia K, et al. Europium Chelate(BHHCT-Eu<sup>3+</sup>) and its metal nanostructure enhanced luminescence applied to bioassays and time-gated bioimaging. *Langmuir*, 2010, 26:10036-10043.

- [324] Hu P P, Zheng L L, Zhan L, et al. Metal-enhanced fluorescence of nano-core-shell structure used for sensitive detection of prion protein with a dual-aptamer strategy. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787: 239-245.
- [325] Deng W, Xie F, Baltar H T M C M, et al. Metal-enhanced fluorescence in the life sciences; Here, now and beyond. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, 15:15695-15708.
- [326] Sugawa K, Tamura T, Tahara H, et al. Metal-enhanced fluorescence platforms based on plasmonic ordered copper arrays; Wavelength dependence of quenching and enhancement effects. *ACS Nano*, 2013, 7:9997-10010.
- [327] Kim J H, Chung H H, Jeong M S, et al. One-step detection of circulating tumor cells in ovarian cancer using enhanced fluorescent silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 2247-2257.
- [328] Lee K, Hahn L D, Yuen W W, et al. Metal-enhanced fluorescence to quantify bacterial adhesion. *Advanced Materials*, 2011, 23:H101-H104.
- [329] Xiao Y, Patolsky F, Katz E, et al. "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 2003, 299:1877-1881.
- [330] Das J, Aziz M A, Yang H. A nanocatalyst-based assay for proteins; DNA-free ultrasensitive electrochemical detection using catalytic reduction of p-nitrophenol by gold-nanoparticle labels. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:16022-16023.
- [331] Guo S, Wang E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 598:181-192.
- [332] Soleymani L, Fang Z, Sargent E H, et al. Programming the detection limits of biosensors through controlled nanostructuring. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4:844-848.
- [333] Das J, Cederquist K B, Zaragoza A A, et al. An ultrasensitive universal detector based on neutralizer displacement. *Nature Chemistry*, 2012, 4:642-648.
- [334] Yin X B, Qi B, Sun X P, et al. 4-(Dimethylamino)butyric acid labeling for electrochemiluminescence detection of biological substances by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Analytical Chemistry*, 2005, 77:3525-3530.
- [335] Sun X P, Du Y, Dong S J, et al. Method for effective immobilization of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> on an electrode surface for solid-state electrochemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*, 2005, 77:8166-8169.
- [336] Du Y, Qi B, Yang X, et al. Synthesis of PtNPs/AQ/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> colloid and its application as a sensitive solid-state electrochemiluminescence sensor material. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110: 21662-21666.
- [337] Sun X, Du Y, Zhang L, et al. Pt nanoparticles; Heat treatment-based preparation and Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-mediated formation of aggregates that can form stable films on bare solid electrode surfaces for solid-state electrochemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*, 2006, 78:6674-6677.
- [338] Wei H, Wang E. Solid-state electrochemiluminescence of tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27:447-459.
- [339] Wei H, Yin J Y, Wang E. Bis(2, 2'-bipyridine)(5, 6-epoxy-5, 6-dihydro-[1, 10] phenanthroline) ruthenium; Synthesis and electrochemical and electrochemiluminescence characterization. *Analytical Chemistry*, 2008, 80:5635-5639.
- [340] Guo W W, Yuan J P, Li B L, et al. Nanoscale-enhanced Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> electrochemiluminescence labels

and related aptamer-based biosensing system. *Analyst*, 2008, 133:1209-1213.

- [341] Li T, Du Y, Wang E K. Polyethyleneimine-functionalized platinum nanoparticles with high electrochemiluminescence activity and their applications to amplified analysis of biomolecules. *Chemistry-an Asian Journal*, 2008, 3:1942-1948.
- [342] Bai J G, Wei H, Li B L, et al. [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dcbpy)NHS] labeling/apptamer-based biosensor for the detection of lysozyme by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Chemistry-an Asian Journal*, 2008, 3:1935-1941.
- [343] Fang L Y, Lv Z Z, Wei H, et al. A electrochemiluminescence aptasensor for detection of thrombin incorporating the capture aptamer labeled with gold nanoparticles immobilized onto the thio-silanized ITO electrode. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 628:80-86.
- [344] Hu L Z, Xu G B. Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39:3275-3304.
- [345] Wei H, Wang E. Electrochemiluminescence of tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium and its applications in bioanalysis: A review. *Luminescence*, 2011, 26:77-85.
- [346] Xu Y H, Wang E K. Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochimica Acta*, 2012, 84:62-73.
- [347] Dequaire M, Degrand C, Limoges B. An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Analytical Chemistry*, 2000, 72:5521-5528.
- [348] Chumbimuni-Torres K Y, Dai Z, Rubinova N, et al. Potentiometric biosensing of proteins with ultra-sensitive ion-selective microelectrodes and nanoparticle labels. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128:13676-13677.
- [349] Ho J-a A, Chang H-C, Shih N-Y, et al. Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. *Analytical Chemistry*, 2010, 82:5944-5950.
- [350] Shen G, Zhang Y. Highly sensitive electrochemical stripping detection of hepatitis B surface antigen based on copper-enhanced gold nanoparticle tags and magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 674:27-31.
- [351] Rusling J F, Bishop G W, Doan N M, et al. Nanomaterials and biomaterials in electrochemical arrays for protein detection. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2:12-30.
- [352] Urban M, Moller R, Fritzsche W. A paralleled readout system for an electrical DNA-hybridization assay based on a microstructured electrode array. *Review of Scientific Instruments*, 2003, 74:1077-1081.
- [353] Huang J-H, Hong Y-J, Chang Y-T, et al. Carbon nanotubes for highly sensitive colorimetric immunoassay biosensor. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1:5389-5392.
- [354] Heller D A, Baik S, Eurell T E, et al. Single-walled carbon nanotube spectroscopy in live cells: Towards long-term labels and optical sensors. *Advanced Materials*, 2005, 17:2793-2799.
- [355] Chen Z, Tabakman S M, Goodwin A P, et al. Protein microarrays with carbon nanotubes as multicolor Raman labels. *Nature Biotechnology*, 2008, 26:1285-1292.
- [356] Lu C H, Yang H H, Zhu C L, et al. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, 48:4785-4787.
- [357] Kim J-H, Heller D A, Jin H, et al. The rational design of nitric oxide selectivity in single-walled carbon nanotube near-infrared fluorescence sensors for biological detection. *Nature Chemistry*, 2009, 1:

473-481.

- [358] Zhang L, Wei H, Li J, et al. A carbon nanotubes based ATP apta-sensing platform and its application in cellular assay. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, 25:1897-1901.
- [359] Loh K P, Bao Q, Eda G, et al. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry*, 2010, 2:1015-1024.
- [360] Jin H, Heller D A, Kalbacova M, et al. Detection of single-molecule  $H_2O_2$  signalling from epidermal growth factor receptor using fluorescent single-walled carbon nanotubes. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5:302-309.
- [361] Baker S N, Baker G A. Luminescent carbon nanodots; Emergent nanolights. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49:6726-6744.
- [362] Guo C L, Book-Newell B, Irudayaraj J. Protein-directed reduction of graphene oxide and intracellular imaging. *Chemical Communications*, 2011, 47:12658-12660.
- [363] Welsher K, Liu Z, Darancioglu D, et al. Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules. *Nano Letters*, 2008, 8:586-590.
- [364] Pumera M, Ambrosi A, Bonanni A, et al. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29:954-965.
- [365] Fang Y X, Wang E K. Electrochemical biosensors on platforms of graphene. *Chemical Communications*, 2013, 49:9526-9539.
- [366] Singhal R, Orynbayeva Z, Sundaram R V K, et al. Multifunctional carbon-nanotube cellular endoscopes. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6:57-64.
- [367] Zhou M, Zhai Y M, Dong S J. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide. *Analytical Chemistry*, 2009, 81:5603-5613.
- [368] Guo Z H, Dong S J. Electrogenerated chemi luminescence from Ru(BPY)<sub>3</sub>(2+) ion-exchanged in carbon nanotube/perfluorosulfonated ionomer composite films. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:2683-2688.
- [369] Wei H, Du Y, Kang J, et al. Label free electrochemiluminescence protocol for sensitive DNA detection with a tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium(II) modified electrode based on nucleic acid oxidation. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9:1474-1479.
- [370] Kong J, Franklin N R, Zhou C W, et al. Nanotube molecular wires as chemical sensors. *Science*, 2000, 287:622-625.
- [371] Liu S, Zhang X, Luo W, et al. Single-molecule detection of proteins using aptamer-functionalized molecular electronic devices. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50:2496-2502.
- [372] Liu S, Guo X. Carbon nanomaterials field-effect-transistor-based biosensors. *Npg Asia Materials*, 2012, 4:1-10.
- [373] Yoon H J, Kim T H, Zhang Z, et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8:735-741.
- [374] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, 2005, 4:435-446.
- [375] Wu P, Yan X-P. Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42:5489-5521.
- [376] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluores-

cent labels. *Nature Methods*, 2008, 5:763-775.

- [377] Medintz I L, Clapp A R, Brunel F M, et al. Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates. *Nature Materials*, 2006, 5:581-589.
- [378] Suzuki M, Husimi Y, Komatsu H, et al. Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130:5720-5725.
- [379] Medintz I L, Stewart M H, Trammell S A, et al. Quantum-dot/dopamine bioconjugates function as redox coupled assemblies for *in vitro* and intracellular pH sensing. *Nature Materials*, 2010, 9:676-684.
- [380] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:684-688.
- [381] Hildebrandt N. Biofunctional quantum dots: Controlled conjugation for multiplexed biosensors. *ACS Nano*, 2011, 5:5286-5290.
- [382] Lowe S B, Dick J A G, Cohen B E, et al. Multiplex sensing of protease and kinase enzyme activity via orthogonal coupling of quantum dot peptide conjugates. *ACS Nano*, 2012, 6:851-857.
- [383] Wang J, Liu G D, Merkoci A. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125:3214-3215.
- [384] Zhang L, Zou X, Ying E, et al. Quantum dot electrochemiluminescence in aqueous solution at lower potential and its sensing application. *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112:4451-4454.
- [385] Wang J, Han H, Jiang X, et al. Quantum dot-based near-infrared electrochemiluminescent immunosensor with gold nanoparticle-graphene nanosheet hybrids and silica nanospheres double-assisted signal amplification. *Analytical Chemistry*, 2012, 84:4893-4899.
- [386] Stromberg M, de la Torre T Z G, Goransson J, et al. Multiplex detection of DNA sequences using the volume-amplified magnetic nanobead detection assay. *Analytical Chemistry*, 2009, 81:3398-3406.
- [387] Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional magnetic nanoparticles: Design, synthesis, and biomedical applications. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42:1097-1107.
- [388] Rissin D M, Kan C W, Campbell T G, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, 2010, 28:595-599.
- [389] Gaster R S, Xu L, Han S J, et al. Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6:314-320.
- [390] Cai K J, Haris M, Singh A, et al. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nature Medicine*, 2012, 18:302-306.
- [391] Choi C, Ganji S K, DeBerardinis R J, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in subjects with IDH-mutated gliomas. *Nature Medicine*, 2012, 18:624-629.
- [392] Ghosh D, Lee Y, Thomas S, et al. M13-templated magnetic nanoparticles for targeted *in vivo* imaging of prostate cancer. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7:677-682.
- [393] McNally A. MAGNETIC SENSORS Nanoparticles detect infection. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8:315-316.
- [394] Chung H J, Castro C M, Im H, et al. A magneto-DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8:369-375.
- [395] Le Sage D, Arai K, Glenn D R, et al. Optical magnetic imaging of living cells. *Nature*, 2013, 496:486-489.

- [396] Ma D, Gulani V, Seiberlich N, et al. Magnetic resonance fingerprinting. *Nature*, 2013, 495:187-192.
- [397] Liong M, Hoang A N, Chung J, et al. Magnetic barcode assay for genetic detection of pathogens. *Nature Communications*, 2013, 4:9.
- [398] Osterfeld S J, Yu H, Gaster R S, et al. Multiplex protein assays based on real-time magnetic nanotag sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 20637-20640.
- [399] Fritz J, Baller M K, Lang H P, et al. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, 2000, 288:316-318.
- [400] Zheng G F, Patolsky F, Cui Y, et al. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology*, 2005, 23:1294-1301.
- [401] Li Z X, Barnes J C, Bosoy A, et al. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41:2590-2605.
- [402] Yan J, Estevez M C, Smith J E, et al. Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nano Today*, 2007, 2: 44-50.
- [403] Wang F, Banerjee D, Liu Y S, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst*, 2010, 135:1839-1854.
- [404] Wang G F, Peng Q, Li Y D. Lanthanide-doped nanocrystals; Synthesis, optical-magnetic properties, and applications. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44:322-332.
- [405] Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99:10954-10957.
- [406] Ke Y G, Lindsay S, Chang Y, et al. Self-assembled water-soluble nucleic acid probe tiles for label-free RNA hybridization assays. *Science*, 2008, 319:180-183.
- [407] Della Rocca J, Liu D M, Lin W B. Nanoscale metal-organic frameworks for biomedical imaging and drug delivery. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44:957-968.
- [408] Chin C D, Laksanasopin T, Cheung Y K, et al. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nature Medicine*, 2011, 17:1015-1019.
- [409] Soper S A, Brown K, Ellington A, et al. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Sensors & Bioelectronics*, 2006, 21:1932-1942.
- [410] Gubala V, Harris L F, Ricco A J, et al. Point of care diagnostics; Status and future. *Analytical Chemistry*, 2012, 84:487-515.
- [411] Chan C P Y, Mak W C, Cheung K Y, et al. Evidence-based point-of-care diagnostics; Current status and emerging technologies. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2013, 6:191-211.
- [412] Heller A, Feldman B. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chemical Reviews*, 2008, 108:2482-2505.
- [413] Xiang Y, Lu Y. Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets. *Nature Chemistry*, 2011, 3:697-703.