

- [20] 袁丽. 1 540例两种梅毒抗体检测结果分析[J]. 中国医药导报, 2008, 5(4): 78.
- [21] Muller I, Brade V, Jochen H, et al. Is serological testing tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the Germany infection serology proficiency testing program[J]. Clinical Microbiology, 2006, 44(4): 1335-1341.

- [22] 肖勇健. 2 450例梅毒血清学结果分析[J]. 湖南师范大学学报, 2008, 5(3): 64-65.

- [23] 王素娟, 徐建平. 3种梅毒检测方法的比较[J]. 现代预防医学,

· 综述 ·

纳米材料在表面等离子体共振生物传感器中的应用

汪 龙^{1,2} 综述, 丁世家^{1△} 审校

(重庆医科大学:1. 医学检验系/临床检验诊断学教育部重点实验室;2. 公共卫生学院 400016)

关键词: 纳米材料; 生物传感器; 敏感性与特异性; 表面等离子体共振

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.028

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0066-03

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器是以金属薄膜和电介质分界面处发生的表面等离子体共振现象为基础的光学检测系统,具有方便、快捷、无需标记、实时检测、非破坏性及高选择性等特点,是检测、分析生物分子相互作用的有效工具,已被广泛应用于医学诊断、药学研究、食品安全及环境监测等领域。传统的SPR生物传感器不能检测到敏感膜上生物分子吸附量小于1 pg/mm²所引起的极小折射率变化,从而无法用于超灵敏检测分析。这成为限制SPR生物传感器应用的一项重要因素,促使国内外众多研究学者都致力于探索各种能提高该检测灵敏度的方法^[1]。纳米材料是指尺寸在三维空间中至少有一维在纳米尺度(1~100 nm)范围内或以他们为结构单元组成的材料,当物质的颗粒尺寸进入纳米级时,便有了不同寻常的小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应等。近年来,利用纳米材料来提高SPR生物传感器检测灵敏度已取得重大的进展,并展现出良好的发展势头和巨大的应用潜力。本文就金纳米粒子、磁性纳米粒子、碳纳米管三种纳米材料在SPR生物传感器中的应用现状作一综述,并对其发展前景作出展望。

1 金纳米粒子

金纳米粒子具有体积小、比表面积大、容易修饰、良好的光学可调性、生物相容性等特点。将金纳米粒子应用在SPR生物传感器中,不仅可使金膜表面的吸附量大大增加,同时金纳米粒子和金膜表面的电磁场耦合作用都可使检测信号明显增强,有效地提高检测灵敏度^[2]。因此,金纳米粒子被广泛引入到SPR生物传感器的各个应用领域。

1.1 医学诊断 SPR生物传感器能够准确、简便、快速地检测多种生化指标,并实时监测生物分子间的相互作用,可作为临床疾病诊断的有效工具。2005年 Mitchell等^[3]首次将金纳米粒子用于SPR生物传感器中检测孕酮小分子。孕酮分子通过共价结合的方式固定在CM5芯片表面,采用竞争抑制法将抗孕酮的单克隆抗体、金纳米粒子标记的第二抗体依次流经芯片表面,通过这种方式使信号增强了13倍,检测限在仅使用单抗的基础上提高了两个数量级。2008年 Mitchell和 Lowe^[4]

△ 通讯作者, E-mail: dingshijia@163.com。

- 2008, 35(3): 555.
- [24] 曹文芩, 宋文忠, 毕超. 六种梅毒初筛试验试剂的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 129-130.
- [25] 魏万惠, 尹跃平, 王红春, 等. 全国性病防治机构实验室梅毒血清学检测首次室间质评[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(2): 113-118.
- [26] 邓兆享, 彭志雄. TPPA与改进TRUST联合检测对梅毒诊治的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1136.

(收稿日期:2011-08-09)

又将该方法用于人类唾液中睾酮的测定,检测限低至3.70 pg/mL,从而为临幊上睾酮的定量分析提供了新方法。后来,Jiang等^[5]和Riskin等^[6]分别将金纳米粒子用于雌三醇(E3)和氨基酸的SPR生物传感器检测中,也都实现了超灵敏检测。金纳米粒子的应用克服了传统SPR生物传感器检测小分子化合物灵敏度低的缺陷,有效地扩大了SPR生物传感器的应用范围。

金纳米粒子增强的SPR生物传感器也广泛用于核酸及蛋白质等生物大分子的诊断研究。2006年 Yao等^[7]在羧基化的葡聚糖表面固定寡核苷酸探针,通过“三明治”杂交检测39个碱基的核酸序列,并利用金纳米粒子的信号增强作用,使检测限低至1.38 fmol/L,该检测方法还可用亍p53的互补DNA序列的分析,并呈现良好的特异性和重现性。免疫球蛋白E(IgE)对变态反应性疾病的诊断具有重要价值,Kim等^[8]通过在SPR生物传感器金膜表面固定IgE适配体捕获IgE,再用金纳米粒子标记的抗IgE抗体与被捕获的IgE特异结合来检测IgE,检测限达到飞摩尔级别,而传统检测方法的检测限仅能达到纳摩尔级别。此外,金纳米粒子也被用于提高SPR生物传感器检测转铁蛋白^[9]、金属蛋白酶^[10]、肿瘤坏死因子α^[11]等蛋白质的灵敏度。

1.2 药学研究 金纳米粒子的药物靶向传递功能被广泛应用在肿瘤化疗中,但是金纳米粒子用于药物传递系统之前,需要对其与单克隆抗体结合形成的复合物对相应抗原的亲和力进行研究。2009年 Debotton等^[12]用SPR生物传感器分析共价结合了金纳米粒子的AMB8LK单克隆抗体对相应的H-铁蛋白抗原的亲和力,结果表明金纳米粒子的应用并不会影响AMB8LK和H-铁蛋白的特异性结合,进一步实验研究表明,包裹了紫衫醇抗肿瘤药的金纳米粒子修饰的AMB8LK单克隆抗体对A-549肿瘤细胞株具有良好的特异性杀伤作用,从而为肿瘤药物靶传递系统提供了新的方法。

奶类和肉制品中的药物残留被确认为对人体健康有严重危害,因此,制定出检测微量药物残留的方法至关重要。Yuan等^[13]在SPR生物传感器金膜表面用分子自组装技术固定氯霉素,利用竞争抑制法通过抗氯霉素抗体与氯霉素结合,再利

用金纳米粒子标记的第二抗体特异识别抗氯霉素抗体来达到放大信号的作用, 灵敏度在仅使用抗氯霉素抗体的基础上提高了 2.5×10^6 倍。2010 年 Frasconi 等^[14]通过在 SPR 生物传感器金膜表面构建具有印迹识别功能的金纳米粒子桥来检测新霉素、卡那霉素、链霉素等抗菌药物, 其检测限都远低于食物中抗菌药物最大残留限量的国际标准, 从而能为食品中药物残留的监测提供有效信息。

1.3 食品安全 食品安全与人类日常生活息息相关, 摄入安全、不受污染的食品是人类维持健康的前提。因此, 对常见食品污染物如毒素、细菌等的快速、准确、高灵敏检测具有重要的实际意义。赭曲霉毒素是曲霉菌属和青霉属的高毒性次级代谢产物, 对动物和人类具有高致畸性、高致癌性。2009 年 Yuan 等^[15]通过 SPR 生物传感器对赭曲霉毒素 A 进行定量检测。他们采用分子自组装在金膜表面固定赭曲霉毒素 A, 通过竞争抑制法并用金纳米粒子标记的第二抗体的信号增强作用, 测得赭曲霉毒素 A 的检测限为 0.042 ng/mL, 比未用金纳米粒子的直接测定法信号增强了 17 倍, 检测限提高了两个数量级, 并将此方法应用于粮谷和饮料样品的检测, 检测限均低于 0.50 ng/mL, 实现了对赭曲霉毒素 A 的快速、经济、高灵敏检测。

2008 年 Joung 等^[16]利用 SPR 传感芯片上的肽核酸探针特异性捕获结肠杆菌 16S rRNA, 并在低盐弱碱性缓冲液中实现带负电荷的 rRNA 与带正电的金纳米粒子通过电荷作用相结合, 从而起到信号增强作用; 实现了 16S rRNA 的超灵敏检测, 获得的检测限为 (58.20 ± 1.37) pg/mL。2010 年 Baccara 等^[17]将经过金纳米粒子修饰的金膜用来检测大肠杆菌菌体, 他们将经过功能性修饰的金纳米粒子固定到金膜表面并进行活化, 然后将抗大肠杆菌抗体共价结合到金纳米粒子表面以此来捕获大肠杆菌。因为金纳米粒子具有高比表面积, 并能和金膜发生电磁场耦合作用, 使得该方法的检测限同没用金纳米粒子的方法相比, 由原来 10^4 cfu/mL 降低到 10^3 cfu/mL。

1.4 环境监测 SPR 生物传感器可以用来检测各种爆炸危险品分子、重金属离子等环境污染物。2009 年 Riskin 等^[18]首次在金膜表面构建具有印迹识别功能的金纳米粒子桥, 用于检测三硝基甲苯分子(一种烈性炸药分子), 获得的检测限为 10 fmol/L。后来, 有研究者运用相似的方法成功地检测三亚甲基三硝胺、季戊四醇四硝酸盐、硝酸甘油、乙二醇二硝酸酯等烈性炸药分子, 获得检测限分别为 12 fmol/L、200 fmol/L、20 pmol/L 和 400 fmol/L, 从而实现了对环境中各种常见烈性炸药分子快速、经济、灵敏的检测, 有力地保障了国家安全^[19-20]。

二价汞(Hg^{2+})已被证实为有毒的重金属离子, 其生物富集作用使它成为一种公认的环境污染物, 但其检测缺乏快速、灵敏、经济的方法。2010 年 Wang 等^[21]利用寡核苷酸探针特异性捕获 Hg^{2+} 并利用金纳米粒子的信号增强作用, 获得 Hg^{2+} 的检测限为 0.50 nmol/L, 为制定 Hg^{2+} 的快速、灵敏、经济的检测方法提供了新思路。

2 磁性纳米粒子

磁性纳米颗粒是一种处于纳米尺寸范围的磁性材料, 目前使用以铁及铁氧化物居多。2006 年 Teramura 等^[22]将磁性纳米珠应用于 SPR 生物免疫传感器中, 采用“夹心法”检测脑利尿钠肽, 然后将修饰有亲和素的磁性纳米珠特异性地连接到生物素标记的单克隆抗体上, 并通过磁性纳米珠堆积的方式来进一步放大信号, 通过该方法获得的检测限可达 25 pg/mL, 理论上完全适用于临床样品的检测, 但由于实际血清样品中的复杂成

分使非特异性吸附明显, 样品的检测限只能达到纳克水平, 仅适用于检测严重心力衰竭的血清样品。2010 年 Wang 等^[23]将 Fe_3O_4/Au 磁性纳米粒子用于 SPR 生物传感器中检测免疫球蛋白 M(IgM), 他们在 Fe_3O_4/Au 磁性纳米粒子表面修饰抗 IgM 抗体并通过磁柱的磁力作用使其吸附到金膜表面, 以此来特异性捕获 IgM。该方法的检测范围为 $0.30\sim20.00\mu g/mL$, 具有较高的灵敏度, 并且去掉磁柱的磁力作用就可以实现对金膜的再生, 方法简单有效, 相对传统再生方法对金膜的损害小, 可以重复多次利用, 降低了检测成本。该研究不仅为 IgM 检测提供了新的方法, 同时也为磁性纳米粒子的应用提供了新的方向。

3 碳纳米管

碳纳米管作为一种新型的纳米材料, 具有特殊的力学、电学和化学性能, 特别是它良好的导电性能和生物相容性, 使碳纳米管成为电化学生物传感器的常见应用材料^[24]。基于碳纳米管具有大分子质量的特点, 已有研究者尝试将碳纳米管应用到 SPR 生物传感器中。2011 年 Lee 等^[25]将碳纳米管应用于检测红细胞生成素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 他们把单克隆抗体固定在金膜表面用于特异性捕获分析蛋白, 然后再通过碳纳米管修饰的多克隆抗体连接到分析蛋白表面用于增强检测信号。碳纳米管的应用, 有效地增加了检测灵敏度并扩大了检测的线性范围, 使两种检测物质的线性范围为 $0.1\sim1000\mu g/mL$, 从而适用于各种不同低浓度的分析蛋白样品检测同时也为生物药剂学的生产过程监测提供了良好方案。

4 结语

随着纳米技术的发展, 纳米材料被广泛地应用于各类生物传感器中, 其中 SPR 生物传感技术作为近二十年新发展起来的检测方法, 为纳米材料的应用开辟了一个新领域。纳米材料在 SPR 生物传感器中的应用, 使响应信号得到不同程度的增强, 从而大大地提高了检测灵敏度, 但仍存在诸多问题亟待解决, 如纳米粒子团聚、非特异性吸附, 以及如何得到更稳定的检测结果等。因此, 纳米材料在 SPR 生物传感器中的应用研究可能有如下趋势:(1)研究不同尺寸、形貌的纳米材料及其生物功能化, 从而得到性能稳定、更易于表面修饰、能灵敏地与分析物相结合的新型纳米材料;(2)研制小型化、高通量、能适用于各种特殊环境的 SPR 生物传感器;(3)通过纳米材料和 SPR 生物传感器的改进实现对复杂实际样品的高灵敏、高选择性、高稳定性及多组分检测。

参考文献

- [1] He L, Musick MD, Nicewarner SR, et al. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization[J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(38): 9071-9077.
- [2] Cao XD, Ye YK, Liu SQ. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing[J]. Anal Biochem, 2011, 417(1): 1-16.
- [3] Mitchell JS, Wu YQ, Cook CJ, et al. Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules[J]. Anal Biochem, 2005, 343(1): 125-135.
- [4] Mitchell JS, Lowe TE. Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(7): 2177-2183.
- [5] Jiang XQ, Waterland M, Blackwell L, et al. Sensitive determination of estriol-16-glucuronide using surface plasmon resonance sensing[J]. Steroids, 2009, 74(10/11): 819-824.

- [6] Riskin M, Tel-Vered R, Frasconi M, et al. Stereoselective and chiroselective surface plasmon resonance (SPR) analysis of amino acids by molecularly imprinted Au-nanoparticle composites[J]. *Chem Eur J*, 2010, 16(24): 7114-7120.
- [7] Yao X, Li X, Toledo F, et al. Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification[J]. *Anal Biochem*, 2006, 354(2): 220-228.
- [8] Kim S, Lee J, Lee SJ, et al. Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR[J]. *Talanta*, 2010, 81 (4/5): 1755-1759.
- [9] Liu X, Sun Y, Song DQ, et al. Enhanced optical immunoassay based on surface plasmon resonance for determination of transferrin[J]. *Talanta*, 2006, 68(3): 1026-1031.
- [10] Pieper-Fürst U, Stöcklein WFM, Warsinke A. Gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance measurement with highly sensitive quantification for human tissue inhibitor of metalloproteinases-2[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 550(1/2): 69-76.
- [11] Law W, Yong K, Baev A, et al. Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmatic enhancement[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(6): 4858-4864.
- [12] Debotton N, Zer H, Parnes M, et al. A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74(2): 148-156.
- [13] Yuan J, Oliver R, Aguilar M, et al. Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(21): 8329-8333.
- [14] Frasconi M, Tel-Vered R, Riskin M, et al. Surface plasmon resonance analysis of antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized Au nanoparticle composites[J]. *Anal Chem*, 2010, 82 (6): 2512-2519.
- [15] Yuan J, Deng DW, Lauren DR, et al. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereal and beverages[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 656(1/2): 63-71.
- [16] Joung H, Lee N, Lee SK, et al. High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 630(2): 168-173.
- [17] Baccara H, Mejri MB, Hafayedha I, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection[J]. *Talanta*, 2010, 82 (2): 810-814.
- [18] Riskin M, Tel-Vered R, Lioubashevski O, et al. Ultrasensitive surface plasmon resonance detection of trinitrotoluene by a bis-aniline-cross-linked Au nanoparticles composite[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(21): 7368-7378.
- [19] Riskin M, Tel-Vered R, Willner I. Imprinted Au-nanoparticle composites for the ultrasensitive surface plasmon resonance detection of hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine (RDX)[J]. *Adv Mater*, 2010, 22(12): 1387-1391.
- [20] Riskin M, Ben-Amram Y, Tel-Vered R, et al. Molecularly imprinted Au nanoparticles composites on Au surfaces for the surface plasmon resonance detection of pentaerythritol tetranitrate, nitroglycerin, and ethylene glycol dinitrate[J]. *Anal Chem*, 2011, 83 (8): 3082-3088.
- [21] Wang L, Li T, Du Y, et al. Au NPs-enhanced surface plasmon resonance for sensitive detection of mercury(II) ions[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(12): 2622-2626.
- [22] Teramura Y, Arima Y, Iwata H. Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification[J]. *Anal Biochem*, 2006, 357 (2): 208-215.
- [23] Wang J, Sun Y, Wang LY, et al. Surface plasmon resonance biosensor based on $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanocomposites[J]. *Colloid Surface B*, 2010, 81(2): 600-606.
- [24] Liu LJ, Zhang F, Xi FN, et al. Highly sensitive biosensor based on bionanomultilayer with water-soluble multiwall carbon nanotubes for determination of phenolics[J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24 (2): 306-312.
- [25] Lee EG, Park KM, Jeong JY, et al. Carbon nanotube-assisted enhancement of surface plasmon resonance signal[J]. *Anal Biochem*, 2011, 408(2): 206-211.

(收稿日期:2011-06-28)

(上接第50页)

- metalloproteinases[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2004, 23: 195-228.
- [8] Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, et al. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications[J]. *The Ocular Surface*, 2008, 6(1): 24-43.
- [9] Xiao R, Liu FY, Luo JY, et al. Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis [J]. *Br J Dermatol*, 2006, 155(6): 1145-1153.
- [10] 赵平, 李世荣. RNA干扰对人瘢痕疙瘩成纤维细胞CTGF表达和胶原合成的影响[J]. 中国美容医学, 2008, 17(5): 683-685.
- [11] Li GM, Li DG, Xie Q, et al. RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production[J]. *J Gene Med*, 2008, 10(9): 1039-1047.

- [12] Schenborn ET, Oler J. Liposome-mediated transfection of mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 130: 155-164.
- [13] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications[J]. *Methods*, 2004, 33(2): 95-103.
- [14] 李佩玲, 胡春杰, 李长民, 等. 脂质体介导的DCC基因对卵巢上皮性癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 186-189.
- [15] Yang D, Goga A, Bishop JM. RNA interference (RNAi) with RNase III-prepared siRNAs[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 252: 471-482.
- [16] 吕颖慧, 王启钊, 刁勇, 等. 脂质体转染人肝星状细胞和肝细胞条件优化[J]. 华侨大学学报, 2010, 31(1): 49-52.

(收稿日期:2011-09-08)