纳米生物传感研究进展

崔宗强^{1*}, 李炜¹, 张先恩²

1. 中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 生物安全大科学中心, 武汉 430071;

2. 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

* 联系人, E-mail: czq@wh.iov.cn

收稿日期: 2019-12-29; 接受日期: 2020-03-21; 网络版发表日期: 2020-05-20

国家自然科学基金(批准号: 31925025, 91859108)资助

摘要 纳米生物传感利用了新型纳米材料极佳的反应活性、催化效率、光谱效应、导电性、强度、韧性和超顺磁性等特有性质, 因此具有灵敏度高、体积小、速度快、功耗小、多功能集成等诸多优势. 近年来, 纳米生物传感技术发展迅猛, 应用广阔. 本文归纳总结了纳米生物传感技术研究的历史和最新进展, 为纳米生物传感技术的深入研究与应用提供了资料.

关键词 生物传感, 纳米技术, 纳米材料, 传感器, 灵敏度

从感觉器官到细胞和分子传感器, 生物体集成了丰富多样的天然生物传感器, 在生命活动中承担着多种多样的生物功能. 受天然生物传感启发, 人工生物传感(简称生物传感)以生物分子为敏感元件, 以物理化学器件为换能器, 通过特异性分子识别, 将生物反应(催化、相互作用等)转换成物理化学信息, 再通过物理化学换能器转换为可定量的信号^[1]. 生物传感属于典型的交叉学科和汇聚技术. 纳米生物传感是生物传感的一个重要分支. 将新型纳米材料, 如碳纳米管^[2]、纳米金^[3]、量子点^[4]、纳米线^[5]、生物纳米材料^[6]等作为生物传感介质, 基于声、光、电、磁、力等不同的换能原理, 多种类型的新型纳米传感技术和装置得到了迅猛发展. 由于性能优良, 纳米传感器在医疗、生物等领域展现出重要的应用价值和前景. 譬如, 利用纳米技术制成的生物传感器用于疾病的诊断和监测治疗, 使一些癌症的诊断成为可能^[7]. 目前, 纳

米生物传感是方兴未艾的热点领域. 基于新的纳米材料和生物传感新原理, 将催生一系列高灵敏、高通量、小尺寸、低能耗等性能优越的生物传感器的研究及应用, 包括可穿戴、可吞咽、可植入的纳米生物传感器、体内诊疗一体化纳米器件或机器人、单细胞单分子超高分辨检测等, 这些新型传感模式的发展, 对健康监测、疾病诊断、病原筛查、环境监测、食品安全等具有重大意义.

1 生物传感技术的发展历程

20世纪60年代, Updike和Hicks^[8]制造出了第一个检测葡萄糖的生物传感器, 它就是第一个生物传感器(biosensor). 该葡萄糖传感器的原理是将葡萄糖氧化酶包含在聚丙烯酰胺胶体中加以固化, 再将此胶体膜固定在隔膜氧电极的尖端上. 当改用其他酶或微生物

引用格式: 崔宗强, 李炜, 张先恩. 纳米生物传感研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 755–765

Cui Z Q, Li W, Zhang X E. Advances in nano-biosensing: a review (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 755–765, doi: 10.1360/SSV-2019-0300

等固化膜时,便可迅速制造出检测其对应物的其他生物传感器。

20世纪80年代,生物传感经历了第一次发展高潮。这期间,利用不同的物理和化学换能原理以及生物分子和生物材料作为生物传感器的分子识别元件,发展出了电化学生物传感、热学生物传感、半导体生物传感、光纤生物传感、压电、质量及声波生物传感等一系列生物传感大家族。此外,三个标志性事件也代表着该领域的发展和成熟,它们是: *Biosensors* 的创刊(1985年),后更名为 *Biosensors and Bioelectronics*; 第一部生物传感专著 *Biosensors: Fundamentals and Applications* 出版(1987年); 首届世界生物传感器学术大会召开(1990年,新加坡),现已成为生物传感领域最具影响力的学术盛会。

20世纪90年代,生物传感经历了第二个发展高潮。这期间,由Cass等人^[9]发明的介体酶电极,结合印刷酶电极技术极大地促进了医院和家用血糖测定仪发展,并促使生物传感产业化蓬勃发展。基因芯片的出现和快速发展则实现了大规模、高通量测定。生物传感与微流控技术的结合为药物筛选与基因诊断等提供了新的技术手段。表面等离子体共振生物传感商业化,广泛用于生物分子相互作用研究。

进入21世纪以来,纳米技术和纳米材料广泛用于生物传感,使生物传感正在经历第三次发展高潮,生物传感正式进入纳米生物传感器时代。

2 纳米生物传感技术

纳米技术和纳米材料的发展极大地提升了生物传感性能(高灵敏、高选择性、高通量等)。基于电、光、声、磁、力等信号转换原理,利用各种纳米材料和纳米结构的优良性能,各类新型纳米生物传感技术和传感器开始蓬勃发展。

2.1 基于不同换能原理的纳米生物传感

(1) 电生物传感。电生物传感是纳米生物传感器中最常用的信号检测原理,主要是因为它将分子现象直接转化为定量的电信号,适于数据处理和存储。用于生物传感的主要电分析技术有电位法、循环伏安法、差分脉冲伏安法、方波伏安法、安培法和电化学阻抗谱法。而电生物传感中最常见的是电化学生物传

感。电化学传感,即用纳米材料修饰电极表面测量电化学系统中电流、电势或阻抗。在电化学生物传感器中,生物材料可以通过吸附、共价附着或包封在可渗透导电聚合物或交联试剂的涂层内直接固定在电极上。2014年,Zuliani等人^[10]报道研制了一种基于平面丝网印刷衬底的便携式电位传感器,可用于唾液样品中pH值的直接测量。随着纳米技术的发展,新型纳米材料,如碳纳米管、石墨烯、氮化物半导体等在电化学生物传感领域得到广泛应用,这些材料极大地提高了电化学生物传感器的性能^[11]。基于纳米线导电测定的纳米传感器也常被用于生物传感,其主要是基于两端欧姆接触的纳米线,并通过目标分子在纳米线表面吸附引起的纳米线电阻改变来进行检测^[12]。

(2) 光学纳米传感。光学纳米传感技术是利用分子识别元件与待测物特异性结合过程中产生的光学信号,并通过换能器与信号放大装置处理信号,实现待测物的测量分析。其主要分为紫外-可见光谱型、荧光光谱型、拉曼散射型、表面等离子共振光谱型等,其中,可见光谱型和荧光光谱型是目前光学生物传感设计中最常见的。早在1992年,Tan等人^[13]曾构建了基于荧光法的光纤纳米传感器,以检测微环境中的pH值。其工作原理是在光纤头部固定荧光剂,当荧光剂与质子发生可逆反应时,液体光学性质发生变化,根据荧光强度的变化即可测定pH值。2016年,Case Western Reserve大学的物理学家和工程师开发出一种基于纳米结构超材料的光学传感器,其灵敏度比目前最好的光学传感器高100万倍,它能够在高度稀释的溶液中识别单个分子,为肿瘤学家提供了一种检测循环肿瘤细胞产生的单分子酶的方法^[14]。

表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)是将表面等离子体技术应用到光子学领域而发展出来的一门新学科,是近年来研究十分活跃的一门新兴光学分支,也被应用于生物传感^[15]。譬如,贵金属纳米颗粒在可见光区表现出很强的宽带光吸收特征,即费米能级附近导带上的自由电子在电磁场的驱动下在金属表面发生集体振荡,产生局域表面等离子激元。金纳米颗粒等贵金属纳米材料可结合抗体或其他识别分子,并利用其等离子激元光子学效应获得特异性检测信号。

表面增强拉曼散射技术(surface enhancement of Raman scattering, SERS)是利用物理增强(吸附在粗糙金属表面的化合物由于表面局域等离子激元被激发引

起的电磁增强)和化学增强(粗糙表面上的原子簇及吸附其上的分子构成拉曼增强)的活性点作用使被测定物的拉曼散射产生极大的增强效应。自Fleischmann等人^[16]首次报道银电极表面的SERS现象以来, SERS已成为纳米生物传感研究的一个重要的领域。为了提高SERS生物传感器的灵敏度, 基于纳米材料和结构的SERS纳米团被广泛用于检测信号的放大, 如纳米金或纳米银等。比如, Cui团队^[17]合成了三角形纳米银颗粒作为SERS活性底物, 并将DNA修饰的金纳米颗粒作为SERS纳米标记物, 加入目标DNA进行检测时, 在水溶液中获得清晰的SERS信号。近来, SERS生物传感与其他生物传感联用技术也得到发展, 例如, Yang等人^[18]提出了一种基于竞争性免疫分析和磁分离的SERS生物传感器, 可用于氯霉素的敏感检测。

(3) 纳米声波生物传感。声波传感器使用压电材料, 特别是石英晶体, 来产生声波。声波传播的方向决定了传感器的性质, 以及可以从传感器获得何种类型的信息^[19]。1996年, Ward和Ebersole^[20]研制了纳米声波生物传感器, 该传感器用纳米胶颗粒标记抗体, 通过抗体-抗原免疫方法将其结合到石英晶体表面。由于修饰胶体颗粒(溶胶颗粒的直径在5~100 nm)提高了标记分子的质量, 根据Sauerbrey方程, 石英晶体的振荡频率也相应得以提高, 因而检测信号被放大。基于该原理, 现已发展出多种类型的石英晶天平传感器^[21]。现阶段, 声波生物传感器趋向于多功能化与集成, 包括与微流体学和电子学的集成, 确保拥有更小的尺寸和更高操作频率相关缩放灵敏度, 以及在一个嵌入数百个设备的阵列的芯片中进行多路检测, 提高检测通量。比如, 基于声波的共振微机电系统(micro-electro-mechanical systems, MEMS)生物传感器已被用于检测潮湿环境下的大肠杆菌, 以及利用机械谐振器检测和表征病毒颗粒^[22]。另外, 悬浮微通道谐振器还被用来称量单个细菌细胞, Burg等人^[23]利用样品在悬臂梁在真空中振动, 通过抗体与抗原结合, 成功检测了单个细菌和金纳米颗粒质量。Braun等人^[24]的研究表明, 在接近生理条件下, 可通过膜基蛋白-配体相互作用在液体中检测到亚皮摩尔浓度的T5病毒颗粒。

(4) 磁性纳米生物传感。近年来, 基于磁性原理的生物传感技术也受到越来越多的关注。磁性纳米颗粒粒径在50 nm以下表现出超顺磁性, 在需要快速响应磁场的传感器中是一个合适的选择。这类传感器最重

要的特性是适合磁性富集和磁性分离, 能够集成到传感器材料中, 通过外部磁场吸引样品中的分析物。2001年, Richardson等人^[25]通过磁性纳米颗粒标记抗体分子, 并利用磁免疫分析技术以及磁力计数器检测磁性标记的方法, 制备了纳米磁性生物传感器。该技术可以实现复杂样品的特异性分离和检测等。

(5) 力学纳米生物传感。微纳米尺度的机械力学传感通常可以达到极高的分辨率, 特别适用于测量微纳物体(例如细胞和分子)的超低质量, 以及研究化学和生物分子引起的力或应变/应力^[26]。影响机械力生物传感器性能的因素主要包括换能器材料的力学性能和机电耦合系数。此外, 环境也可能是一个关键因素, 例如传感器结构周围流体的黏度影响动态传感器的阻尼。利用原子力显微技术, 美国华盛顿Naval Research Laboratory的研究人员首次利用原子力作为纳米生物传感器检测了DNA分子之间、生物素分子与亲和链霉素分子之间、抗体-抗原之间的一系列力学相互作用^[27]。2004年, Gupta等人^[28]报道了纳米悬臂梁技术, 该悬臂梁厚20~30 nm, 在悬臂梁的垂直方向引入磁场, 可以称量单个病毒的重量。在单个牛痘病毒粒子吸附后, 悬臂梁的谐振频率降低了60 kHz。未负载谐振频率 $f_0=1.27$ MHz, 单个病毒粒子负载谐振频率 $f_1=1.21$ MHz, 质量因子 $Q=5$, 弹性系数 $k=0.006$ N/m, 最终称出单个牛痘病毒的重量为 9.5×10^{-15} g。2016年, Alsteens等人^[29]将荧光传感技术和原子力显微镜传感联用, 定量表征了病毒与哺乳动物细胞膜表面受体的结合过程, 发现病毒糖蛋白与其同源细胞表面受体之间形成的第一个键具有较低的寿命和自由能。

2.2 不同纳米材料和纳米结构用于生物传感

(1) 碳纳米材料。各种新型纳米材料应用于生物传感, 极大地促进了生物传感器性能的提升。其中, 各种碳纳米材料, 包括碳纳米管、石墨烯和炭黑等在生物传感器的开发和发展中得到了广泛的应用。

近年来, 碳纳米管和石墨烯在电化学生物传感器等应用领域发展迅速。碳纳米管具有优异的表面化学性能和良好的电学性能, 无论是单壁碳纳米管(single-wall nanotubes, SWNT), 还是多壁碳纳米管(multi-wall nanotubes, MWNT)在生物传感的应用上都具有显著优势^[2]。与常规的固态碳传感器相比, 碳纳米管制作的生

物传感器的灵敏度高、反应速度快、检测温度范围广。Azamian等人^[30]在SWNT表面固定葡萄糖氧化酶,使酶的催化活性比普通碳电极固定的酶的催化活性提高1个数量级。Kumar等人^[11]第一次将碳纳米管-DNA-电化学相结合的纳米生物传感器用于信号的放大传导。

石墨烯是一种二维单原子碳层,2004年由安德烈·海姆和克斯特亚·诺沃塞洛夫^[31]在曼彻斯特大学首次分离出来,电子学性能良好,纳米石墨烯还具有较大的表面积比、优秀的载流子迁移率和高兼容性,使得它作为电化学生物传感器具有优良的前景。作为纳米电化学生物传感材料,石墨烯在近10年来还只是刚起步,但发展迅猛。2012年,Yin等人^[32]提出了一种基于石墨烯的电化学生物传感器,用于测定miRNA-21。石墨烯在体内的作用已被证明与其物理化学性质有关,而体内电化学装置的使用是了解生物体特别是人类生理和病理过程的重要一步。自石墨烯首次制备以来,利用石墨烯修饰电化学生物传感器用于体内环境的研究报道较少。2012年,Gu等人^[33]采用末端氨基离子液体(IL-NH₂)和磺酸功能化石墨烯共价键合层层自组装的方法,研制了一种用于体内葡萄糖灵敏检测的电流型生物传感器集成系统。他们还利用石墨烯混合材料开发了一种双酶电化学生物传感器,用于连续和同时监测小鼠体内葡萄糖和L-乳酸^[34]。近两年来,石墨烯和氧化石墨烯已经被用于开发检测病毒和微生物的纳米生物传感器,包括寨卡病毒^[35](图1)和登革病毒^[36]等的检测。

炭黑是一种由石油产品燃烧制备的导电低成本纳米材料,具有缺陷位点,是可以用于开发电化学生物传感器的新型材料^[37]。炭黑作为纳米生物传感器制备修饰材料的研究还不足10年,其中一个开创性的工作是Dang等人^[38]和Zhang^[39]报道的将炭黑与乙炔黑联用,通过电化学传感器用于四环素、秋水杉碱和芦丁的伏安检测与分析。与碳纳米管和石墨烯相比,炭黑还被认为是一种对神经递质多巴胺电化学传感优良的修饰材料^[40]。

(2) 纳米金。金纳米颗粒因其良好的生物相容性、光学和电学特性,以及易制备、易修饰的特点,被广泛应用于生物传感领域。研究表明,当金纳米颗粒直径显著小于激发光波长时,因等离子体以激发光频率共振,其表面的电子簇会聚集于颗粒一侧。该现

图1 石墨烯纳米生物传感器用于寨卡病毒的检测。A: 石墨烯纳米生物传感器用于寨卡病毒的检测示意图; B: 石墨烯纳米生物传感芯片示意图; C: 与石墨烯纳米生物传感器相关的芯片、读卡器、数字控制及软件等全套检测系统示意图^[35](网络版彩图)

Figure 1 Graphene-based biosensor for detection of Zika virus. A: Schematic diagram of graphene-based biosensor for detection of Zika virus; B: diagram of the sensor element of the graphene biosensor chip; C: illustration of the entire sensor chip system, reader electronics and digital control, and data presentation software^[35] (color online)

象依赖于纳米颗粒的大小、形状及其所处环境的介电常数等参数。在生物传感体系中,因生物识别反应导致颗粒外环境发生变化,进而引起振动频率的改变,因而肉眼可观察到金纳米颗粒颜色。利用上述原理,Reynolds等人^[41]首先发展了基于金纳米颗粒,用于检测DNA或寡核苷酸分子的比色传感器。金纳米颗粒可在许多电活性生物分子和电极之间传递电子,该特性被用于氧化还原酶的生物传感检测研究。Xiao等人^[42]开创性地将脱辅基葡萄糖氧化酶整合至单个金纳米颗粒-黄素腺嘌呤二核苷酸单元,成功构建了生物电催化传感体系。

(3) 量子点。量子点是一种半导体纳米晶体,一般由II~VI族元素或III~V族元素等材料构成,也可由两种或两种以上的半导体材料构成核/壳结构(如常见的CdSe/ZnS核/壳结构量子点等)。量子点的物理、光学、电学特性远优于现有有机荧光染料,具有灵敏度高、稳定性好、荧光寿命长、生物相容性好等优点,是一种优良的荧光标记探针。此外,硅量子点、硫化银量子点、碳量子点等已被开发用于近红外成像传感,可以更深入地穿透生物样本,这使得基于荧光的深层组织成像传感成为可能^[43]。2002年,Maxwell等人^[44]利用表面修饰有寡核苷酸的量子点作为荧光探针,与作为纳米支架和纳米猝灭分子的金纳米颗粒组合,成功

构建了杂合生物/无机纳米荧光探针, 该探针可有效检测核酸分子. 2003年Medintz等人^[45]将麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)与量子点偶联, 首次构建了QD-蛋白质纳米传感器. 通过加入 β -环糊精-QSY9分子, 量子点与 β -环糊精-QSY9之间的荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy-transfer, FRET)使量子点荧光猝灭; 加入待检测的MBP配体分子麦芽糖取代 β -环糊精-QSY9, 通过量子点荧光强度可定量检测被检测物麦芽糖. 由于在同一个激发波长条件下, 发射光频率会随量子点尺寸的改变而变化, 调节量子点尺寸可以获得不同的发射颜色, 这使得多靶标光学测定变得简单. 由于量子点比荧光染料和荧光蛋白的抗光漂白的能力要强得多, 适合于长时程观察, 目前已在生命科学研究和疾病检验方面获得广泛应用. 利用量子点标记病毒, 也可以实现病毒粒子的单颗粒实时动态示踪, 解析和阐明病毒侵染过程中的一些关键分子事件的动态过程与机制(图2)^[46,47], 包括病毒的进入、脱壳和复制等. 譬如, Li等人^[47,48]建立了细胞辅助的病毒包装荧光量子点技术, 动态解析了单个艾滋病病毒入侵人原代巨噬细胞过程以及与线粒体的互作. Qin等人^[49]建立了量子点位点特异性标记甲型流感病毒基因组技术, 首次记录到单个流感病毒脱壳的实时动态过程.

(4) 磁性纳米材料. 磁性纳米材料近年来在生物传感器的开发和应用中受到广泛的关注, 它们具有表面积大、传质能力强、独特的理化性质、与生物分子的生物相容性、易于生产等特点. 磁性纳米材料在50 nm以下表现出超顺磁性, 在10~20 nm时表现最佳, 因此在需要快速响应的磁场中是一个合适的选择^[50]. 此外, 磁性纳米颗粒能够集成到传感器材料中, 通过外部磁场吸引样品中的分析物. 与基于非磁性纳米颗粒的生物传感策略相比, 基于磁性纳米颗粒的生物传感策略具有高灵敏度、低检测限、低噪声等优点^[51].

(5) 纳米金属氧化物. 金属氧化物-氧化锌也是一种半导体纳米材料^[52], 它具有强的电子迁移率, 在生物医学和临床科学中具有广泛的应用, 尤其是在生物传感技术领域发展迅速. 由于纳米氧化锌良好的片层结构和黏附能力、大的表面积、高等电点(~9.5)和强吸附能力, 因此它具有高的催化效率(储氧能力)、更好的化学稳定性、耐腐蚀和氧化、较小的晶粒尺寸, 非常适合于生物分子传感应用. 此外, 它还具有良好的

图2 量子点标记病毒用于单病毒示踪. A: 细胞辅助的HIV病毒包装荧光量子点技术^[47]; B: 9个代表性流感病毒在细胞内的运动轨迹图^[46](网络版彩图)

Figure 2 QDs-labelled virus for single virus tracking. A: Schematic strategy of HIV-1 particles encapsulating QDs^[47]; B: nine typical trajectories of the influenza virus transports in the cell^[46] (color online)

导电性、良好的生物相容性, 在不同的温度和pH值下, 氧化锌纳米结构可作为表面功能化和化学/生物化合物界面的理想选择, 非常适合于开发快速、稳定、可靠的传感器设备.

氧化锌纳米颗粒最早被应用于电化学无酶生物传感器和构造场效应晶体管(field-effect transistor, FET)生物传感器, 但是由于其对生物分子较弱的催化能力, 它并不是无酶生物传感器最佳的纳米材料. 然而, 如果在其表面修饰其他的金属氧化物, 如CuO, Fe₂O₃, TiO₂, Co₃O₄, NiO等, 使之成为氧化锌纳米复合材料(图3), 则可以作为无酶生物传感器的纳米材料^[53]. Zhou等人^[54]制备的CuO-ZnO纳米复合材料, 在葡萄糖的无酶检测和传感上具有极佳的优势(低检测限、高灵敏度和稳定性). 近来, Jung等人^[55]用QDs-ZnO制备了一种基于FET的无酶葡萄糖生物传感器, 该无酶FET传感器在血糖检测中灵敏度高、线性范围宽、稳定性和重复性好, 可以检测复杂全血和血清样品中的葡萄糖.

(6) 纳米孔. 纳米孔传感器的工作原理是在纳米孔两端施加一个外加电场, 通过监测电解液流经纳米孔时的微弱电流(皮安级)信号变化, 包括变化频率、幅度和指纹性信号来判断穿越纳米孔的离子或分子的浓度、带电情况和结构特征等. 目前, 基于纳米孔的传感器主要分为两类, 一类是生物源的蛋白纳米孔家族, 包括金黄色葡萄球菌 α -溶血毒素、耻垢分枝杆菌毒素蛋白以及噬菌体phi29连接器马达蛋白等(图4)^[56]; 另一类是以人工材料制备的固态纳米孔, 包括无机硅、氮化硅、石墨烯以及有机高分子薄膜, 主要用于DNA测

图3 Fe_2O_3 -ZNRs FET生物传感器用于葡萄糖的无酶检测系统。A: 氧化铁颗粒修饰的氧化锌纳米棒(Fe_2O_3 -ZNRs FET)生物传感器示意图; B: Fe_2O_3 -ZNRs FET生物传感器用于含葡萄糖、不含葡萄糖体系的无酶检测^[53](网络版彩图)

Figure 3 Illustration of the Fe_2O_3 -ZNRs FET-based non-enzymatic glucose sensor. A: Schematic diagram of the fabrication of the Fe_2O_3 -ZNRs FET-based non-enzymatic glucose sensor; B: glucose detection by using the non-enzymatic FET-based glucose sensor^[53] (color online)

图4 纳米孔基因测序示意图^[56]。A: 纳米孔基因测序; B: 纳米孔基因测序中的碱基识别(网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of gene sequencing using nanopore^[56]。A: Basis of nanopore sequencing; B: early base identification experiments (color online)

序。世界纳米生物领域著名科学家郭培宣教授团队^[57]发明了基于 ϕ 29蛋白纳米孔道的DNA测序技术。固态纳米孔相比于生物膜有很多优势,比如纳米孔径和孔深灵活可调,对于温度、溶液pH值和生理环境稳定,纳米孔表面性质的可调节性。近年来,纳米孔生物传感技术发展迅速,最新的基于纳米孔测序的DNA测序仪已经由牛津纳米孔技术公司商业化^[58]。

(7) III族氮化物半导体材料。由于其优良的性能,III族氮化物(group III nitride)半导体材料被认为是一种新型、优异的转换材料,在新型光电器件中具有潜在的应用,它的研究目前已成为近年来材料科学中一个极其活跃的前沿领域。最典型的III族氮化物包括纳米氮化镓(GaN)、氮化铝(AlN)、氮化铟(InN)以及它们的纳米合金材料等^[59]。这些纳米材料可被广泛用于前述的电导、电化学生物传感、力学生物传感和

拉曼光学生物传感等。比如, Chattopadhyay等人^[60]通过在氮化铝上修饰银纳米颗粒,使其可用于基于SERS的分子传感。而另一研究表明,包覆金的纳米氮化镓可以通过SERS检测氨基酸和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),且精确度和重复性非常好^[61]。

(8) 新型生物纳米材料。除以上列举的碳纳米管、纳米金、量子点等无机纳米材料外,一些新型的生物纳米材料也被用于生物传感。

DNA分子。利用DNA分子的自识别特性、高刚性、可控性和功能化的方式制备多功能的DNA纳米结构,为DNA的生物传感器的开发提供了前所未有的机遇^[62]。DNA作为生物纳米传感材料,最早是1983年开创的DNA Four-arm Junction工作,具有标志性的划时代里程碑意义^[63]。随后,发展出多种DNA生物纳米

传感结构, 包括DNA单链结构、双链结构、DNA茎环结构分子、DNA寡核苷酸适配子、DNA瓦片、DNA折纸、四面体DNA纳米结构和DNA水凝胶等. 在DNA的四面体纳米结构方面, 上海交通大学樊春海教授团队^[64,65]利用DNA的精确组装能力构筑的框架核酸, 提出了“生物分子识别-生物分子折叠-电子/能量传递”的耦联传感模式, 构建了基于DNA分子设计与界面调控的电化学生物传感器以及纳米生物复合探针的超灵敏生物传感器.

铁蛋白. Fan等人^[66]在人铁蛋白壳内部合成了氧化铁纳米颗粒, 并在蛋白壳表面限量标记上放射核素(图5A), 实现了肿瘤的核医学/磁共振双模成像. 铁蛋白通过肿瘤高表达的受体TfR1的介导, 快速循环内化进入到肿瘤细胞内部, 将其所携带的铁纳米颗粒释放到肿瘤细胞内部, 受体TfR1的不停循环内化使铁纳米颗粒高浓度富集于肿瘤内部, 实现了肿瘤的高灵敏MRI(magnetic resonance imaging)对比造影成像(图5B)^[67]. 此外, 由于放射核素的限量标记使得肿瘤摄取的放化剂量有限, 因此, 在实现MRI检测的同时又避免了由于放射核素的过量摄取造成的机体危害. Li等人^[68]基于铁蛋白自组装笼形结构, 在其内腔合成四氧化三铁纳米颗粒, 同时在其表面展示荧光蛋白和肿瘤靶向肽, 发展了一种“肿瘤靶向-磁性-荧光”多功能纳米颗粒, 并用于肿瘤细胞的特异性荧光和磁共振成像检测.

噬菌体. 噬菌体等也被用于生物传感中的信号放大, 如利用噬菌体同时展示金结合肽和单链抗体, 构建免疫传感, 由于大量金纳米颗粒及银染增强的作用, 其结果肉眼可见^[69]. 利用噬菌体展示单链抗体, 识别并结合, 释放噬菌体基因组, 直接完成免疫识别和PCR信号扩增, 也大幅度提高了ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)的检测灵敏度. 东南大学生物科学与医学工程学院顾宁教授团队^[70]创新性地发展了噬菌体修饰的金纳米探针来肉眼计数样本中生物标志物分子的诊断策略, 其灵敏度达到3~5 amol/L, 可计数仅含20个目标的样本. 这一研究成果对检测对象具有广泛适用性, 对纳米探针上的配体进行适当替换, 不仅可检测核酸类分子, 还可检测蛋白类分子, 以及病毒等病原体. 若将此策略进一步发展为自动化的检测系统, 将可实现快速定量分析, 具有良好的临床应用前景.

图 5 铁蛋白纳米颗粒用于体内肿瘤成像. A: 铁蛋白壳内部合成了氧化铁纳米颗粒^[66]; B: 放射性核素标记的铁蛋白壳-氧化铁纳米颗粒用于肿瘤(红色圆圈)的SPECT与MRI对比造影成像^[67](网络版彩图)

Figure 5 *In vivo* tumor imaging using magnetoferritin nanoparticles. A: Schematic of the magnetoferritin nanoparticles (M-HFn); B: tumor images (red circles) with ^{125}I -M-HFn nanoparticles were obtained using single-photon emission computed tomography (SPECT) and MRI techniques^[67] (color online)

蛋白质纳米线. 蛋白质纳米线也被用于超灵敏生物传感. 利用淀粉样纤维蛋白可以自组装成为纳米纤维的特性, 通过基因融合的方法, 将酵母朊蛋白Sup35的组装决定域分别与可与抗体结合的protein G和甲基对硫磷水解酶(methyl parathion hydrolase, MPH)相融合. 通过模拟淀粉样蛋白纤维形成过程中的种子现象, 在Sup35蛋白自组装的带动下将不同的功能配体整合到一条纳米纤维中, 并控制两种不同功能配体的比例和纳米纤维的长度, 最终得到了由大量MPH与少量protein G组成的双功能纳米纤维(图6), 将其用于免疫分析中, 灵敏度相比商业化传统方法提高了100倍^[5].

病毒衣壳蛋白. 病毒衣壳蛋白也被用于构建了一系列纳米生物传感器件^[6]. 例如, 利用猴空泡病毒40 (Simian virus 40, SV40)衣壳蛋白VP1, 通过基因操作, 并整合动脉粥样硬化斑块不同时期的靶向肽、治疗药物水蛭素、近红外量子点, 构建成一种“荧光-靶向-药物”三功能病毒样纳米颗粒. 利用该多功能器件, 在实验小鼠活体内实现了动脉粥样斑块早期、中期和晚期的成像检测(图7). 同时, 所携带的多肽药物水蛭素主动靶向至斑块, 显著提高了药物在病变区域的浓度和功能. 与传统的CT、PET等检测技术相比, 该研究建立的方法无放射性且可获得更高的时空分辨率, 为诊疗一体化提供了新的思路^[4].

图6 酵母朊蛋白纳米线信号放大系统用于超灵敏生物传感^[5](网络版彩图)

Figure 6 Schematic diagram of yeast amyloid protein nanowire-mediated signal amplification for immunoassays^[5] (color online)

图7 病毒纳米器件SV40用于活体内生物传感靶向成像小鼠动脉粥样硬化斑块^[4](网络版彩图)

Figure 7 *In vivo* targeting and imaging of atherosclerosis using multifunctional virus-like particles of Simian virus 40^[4] (color online)

3 总结与展望

综上, 生物传感技术是多学科交叉融合的产物,

纳米材料与纳米技术的发展更是为生物传感器的研究增添了新的活力。相比传统的生物传感, 纳米生物传感器具有更好的灵敏度、高通量和重复性。各种纳米技术和纳米材料的应用, 也将更有利于生物传感器的小型化、微型化、可携带、可穿戴等, 从而发展出针对体内健康监测、疾病诊断和环境监测等更多、更先进的传感模式。可以预见, 纳米生物传感技术将在疾病早期诊断和在体实时诊疗、口岸检疫及违禁化合物检测、生物反恐现场侦检、水体、土壤和大气环境污染等指标的测定、农田肥力检测、食品成分、添加剂及污染物的现场检测等多种领域发挥越来越重要的作用。

参考文献

- 1 Zhang X-E. Biosensors: 50 years development and future perspectives (in Chinese). *Bull Chin Acad Sci*, 2017, 32: 1271–1280 [张先恩. 生物传感发展50年及展望. 中国科学院院刊, 2017, 32: 1271–1280]
- 2 Yang N, Chen X, Ren T, et al. Carbon nanotube based biosensors. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 207: 690–715
- 3 Aldewachi H, Chalati T, Woodrooffe M N, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, 2017, 10: 18–33
- 4 Sun X, Li W, Zhang X, et al. *In vivo* targeting and imaging of atherosclerosis using multifunctional virus-like particles of simian virus 40. *Nano Lett*, 2016, 16: 6164–6171
- 5 Men D, Guo Y C, Zhang Z P, et al. Seeding-induced self-assembling protein nanowires dramatically increase the sensitivity of immunoassays. *Nano Lett*, 2009, 9: 2246–2250
- 6 Li F, Zhang Z P, Peng J, et al. Imaging viral behavior in Mammalian cells with self-assembled capsid-quantum-dot hybrid particles. *Small*, 2010, 5: 718–726
- 7 Gdowski A, Ranjan AP, Mukerjee A, et al. Nanobiosensors: role in cancer detection and diagnosis. In: Adhikari R, Thapa S, eds. *Infectious Diseases and Nanomedicine I. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 807. New Delhi: Springer, 2014. 33–58
- 8 Updike S J, Hicks G P. Reagentless substrate analysis with immobilized enzymes. *Science*, 1967, 158: 270–272
- 9 Cass A E G, Davis G, Francis G D, et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal Chem*, 1984, 56: 667–671
- 10 Zuliani C, Matzeu G, Diamond D. A potentiometric disposable sensor strip for measuring pH in saliva. *Electrochim Acta*, 2014, 132: 292–296

- 11 Kumar S, Ahlawat W, Kumar R, et al. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70: 498–503
- 12 Cui Y, Wei Q, Park H, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 2001, 293: 1289–1292
- 13 Tan W, Shi Z Y, Smith S, et al. Submicrometer intracellular chemical optical fiber sensors. *Science*, 1992, 258: 778–781
- 14 Sreekanth K V, Alapan Y, ElKabbash M, et al. Extreme sensitivity biosensing platform based on hyperbolic metamaterials. *Nat Mater*, 2016, 15: 621–627
- 15 Anker J N, Hall W P, Lyandres O, et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater*, 2008, 7: 442–453
- 16 Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett*, 1974, 26: 163–166
- 17 Liu M, Wang Z, Zong S, et al. SERS-based DNA detection in aqueous solutions using oligonucleotide-modified Ag nanoprisms and gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 6131–6136
- 18 Yang K, Hu Y, Dong N. A novel biosensor based on competitive SERS immunoassay and magnetic separation for accurate and sensitive detection of chloramphenicol. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 373–377
- 19 Fogel R, Limson J, Seshia A A. Acoustic biosensors. *Essays Biochem*, 2016, 60: 101–110
- 20 Ward M D, Ebersole R C, inventors. Piezoelectric specific binding assay with mass amplified reagents. US Patent 5,501,986. 1996
- 21 Hao R, Wang D, Zhang X E, et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 1330–1335
- 22 Johnson L, Gupta A K, Ghafoor A, et al. Characterization of vaccinia virus particles using microscale silicon cantilever resonators and atomic force microscopy. *Sens Actuators B-Chem*, 2005, 115: 189–197
- 23 Burg T P, Godin M, Knudsen S M, et al. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 2007, 446: 1066–1069
- 24 Braun T, Ghatkesar M K, Backmann N, et al. Quantitative time-resolved measurement of membrane protein-ligand interactions using microcantilever array sensors. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 179–185
- 25 Richardson J, Hawkins P, Luxton R. The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 989–993
- 26 Arlett J L, Myers E B, Roukes M L. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 203–215
- 27 Baselt D R, Lee G U, Hansen K M, et al. A high-sensitivity micromachined biosensor. *Proc IEEE*, 1997, 85: 672–680
- 28 Gupta A, Akin D, Bashir R. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl Phys Lett*, 2004, 84: 1976–1978
- 29 Alsteens D, Newton R, Schubert R, et al. Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 177–183
- 30 Azamian B R, Davis J J, Coleman K S, et al. Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 12664–12665
- 31 Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 2004, 306: 666–669
- 32 Yin H, Zhou Y, Zhang H, et al. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33: 247–253
- 33 Gu H, Yu Y, Liu X, et al. Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing *in vivo* integrated with on-line microdialysis system. *Biosens Bioelectron*, 2012, 32: 118–126
- 34 Gu H, Yang Y, Zhou X, et al. Online electrochemical method for continuous and simultaneous monitoring of glucose and l-lactate *in vivo* with graphene hybrids as the electrocatalyst. *J Electroanal Chem*, 2014, 730: 41–47
- 35 Afsahi S, Lerner M B, Goldstein J M, et al. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. *Biosens Bioelectron*, 2018, 100: 85–88
- 36 Navakul K, Warakulwit C, Yenchitsomanus P T, et al. A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor. *Nanomaterials*, 2017, 13: 549–557
- 37 Silva T A, Moraes F C, Janegitz B C, et al. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: a review. *J Nanomater*, 2017, 2017: 1–14
- 38 Dang X, Hu C, Wei Y, et al. Sensitivity improvement of the oxidation of tetracycline at acetylene black electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Electroanalysis*, 2010, 16: 1949–1955

- 39 Zhang H. Preparation of an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite film modified glassy carbon electrode and the application in the determination of hydroxycamptothecin in blood serum. *J Membrane Sci*, 2005, 251: 43–49
- 40 Sheng Z H, Zheng X Q, Xu J Y, et al. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosens Bioelectron*, 2012, 34: 125–131
- 41 Reynolds R A, Mirkin C A, Letsinger R L. Homogeneous, nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 3795–3796
- 42 Xiao Y, Patolsky F, Katz E, et al. “Plugging into enzymes”: Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 2003, 299: 1877–1881
- 43 Reineck P, Gibson B C. Near-infrared fluorescent nanomaterials for bioimaging and sensing. *Adv Opt Mater*, 2017, 5: 1600446
- 44 Maxwell D J, Taylor J R, Nie S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 9606–9612
- 45 Medintz I L, Clapp A R, Mattoussi H, et al. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater*, 2003, 2: 630–638
- 46 Liu S L, Zhang Z L, Tian Z Q, et al. Effectively and efficiently dissecting the infection of influenza virus by quantum-dot-based single-particle tracking. *ACS Nano*, 2012, 6: 141–150
- 47 Li Q, Li W, Yin W, et al. Single-particle tracking of human immunodeficiency virus type 1 productive entry into human primary macrophages. *ACS Nano*, 2017, 11: 3890–3903
- 48 Li Q, Yin W, Li W, et al. Encapsulating quantum dots within HIV-1 virions through site-specific decoration of the matrix protein enables single virus tracking in live primary macrophages. *Nano Lett*, 2018, 18: 7457–7468
- 49 Qin C, Li W, Li Q, et al. Real-time dissection of dynamic uncoating of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 2577–2582
- 50 Netto C G C M, Toma H E, Andrade L H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J Mol Catal B-Enzym*, 2013, 85-86: 71–92
- 51 Rocha-Santos T A P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends Anal Chem*, 2014, 62: 28–36
- 52 Shetti N P, Bukkitgar S D, Reddy K R, et al. ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111417
- 53 Ahmad R, Ahn M S, Hahn Y B. Fabrication of a non-enzymatic glucose sensor field-effect transistor based on vertically-oriented ZnO nanorods modified with Fe₂O₃. *Electrochem Commun*, 2017, 77: 107–111
- 54 Zhou C, Xu L, Song J, et al. Ultrasensitive non-enzymatic glucose sensor based on three-dimensional network of ZnO-CuO hierarchical nanocomposites by electrospinning. *Sci Rep*, 2014, 4: 7382
- 55 Jung D U J, Ahmad R, Hahn Y B. Nonenzymatic flexible field-effect transistor based glucose sensor fabricated using NiO quantum dots modified ZnO nanorods. *J Colloid Interface Sci*, 2017, 512: 21–28
- 56 Bayley H. Nanopore sequencing: from imagination to reality. *Clin Chem*, 2015, 61: 25–31
- 57 Wendell D, Jing P, Geng J, et al. Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 765–772
- 58 Brown C G, Clarke J. Nanopore development at Oxford nanopore. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 810–811
- 59 Li X, Liu X. Group III nitride nanomaterials for biosensing. *Nanoscale*, 2017, 9: 7320–7341
- 60 Chattopadhyay S, Shi S C, Lan Z H, et al. Molecular sensing with ultrafine silver crystals on hexagonal aluminum nitride nanorod templates. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 2820–2821
- 61 Kamińska A, Dziecielewski I, Weyher J L, et al. Highly reproducible, stable and multiply regenerated surface-enhanced Raman scattering substrate for biomedical applications. *J Mater Chem*, 2011, 21: 8662–8669
- 62 Chao J, Zhu D, Zhang Y, et al. DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2016, 76: 68–79
- 63 Kallenbach N R, Ma R I, Seeman N C. An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 1983, 305: 829–831
- 64 Pei H, Lu N, Wen Y, et al. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4758
- 65 Lin M, Wen Y, Li L, et al. Target-responsive, DNA nanostructure-based E-DNA sensor for microRNA analysis. *Anal Chem*, 2014, 86: 2285–

2288

- 66 Fan K, Cao C, Pan Y, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 459–464
- 67 Zhao Y, Liang M, Li X, et al. Bioengineered magnetoferritin nanoprobe for single-dose nuclear-magnetic resonance tumor imaging. *ACS Nano*, 2016, 10: 4184–4191
- 68 Li K, Zhang Z P, Luo M, et al. Multifunctional ferritin cage nanostructures for fluorescence and MR imaging of tumor cells. *Nanoscale*, 2011, 4: 188–193
- 69 Guo Y, Liang X, Zhou Y, et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay. *Anal Biochem*, 2010, 396: 155–157
- 70 Zhou X, Cao P, Zhu Y, et al. Phage-mediated counting by the naked eye of miRNA molecules at attomolar concentrations in a Petri dish. *Nat Mater*, 2015, 14: 1058–1064

Advances in nano-biosensing: a review

CUI ZongQiang¹, LI Wei¹ & ZHANG Xian-En²

1 State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Center for Biosafety Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2 National Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

New nanomaterials used in nano-biosensing technologies are among the most interesting sensing materials owing to their unique size and shape-dependent optical properties, high surface energy, large surface-to-volume ratio, and tunable surface properties. Such materials exhibit excellent reactivity, spectral effects, catalytic efficiency, electrical conductivity, strength, toughness, and superparamagnetism. Consequently, nano-biosensing techniques have many advantages such as high sensitivity, small volume, high speed, low resource consumption, and integrated multi-functionality. In recent years, nano-biosensing technologies have been rapidly developed and widely applied. This paper summarizes the history and progress of nano-biosensing technologies, laying a foundation for further in-depth understanding of the research and applications of nano-biosensors.

biosensing, nanotechnology, nano-materials, biosensor, sensitivity

doi: [10.1360/SSV-2019-0300](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0300)