

单分子生物检测方法及应用研究进展

周文超 李政昊 武杰

Research progress of single molecule biological detection methods and applications

ZHOU Wen-chao, LI Zheng-hao, WU Jie

引用本文:

周文超, 李政昊, 武杰. 单分子生物检测方法及应用研究进展[J]. 中国光学, 2022, 15(5): 878-894. doi: 10.37188/CO.2022-0129 ZHOU Wen-chao, LI Zheng-hao, WU Jie. Research progress of single molecule biological detection methods and applications[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(5): 878-894. doi: 10.37188/CO.2022-0129

在线阅读 View online: https://doi.org/10.37188/CO.2022-0129

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像中的应用

Application in nucleic acid functionalized nanoprobe in cellular fluorescence imaging 中国光学(中英文). 2018, 11(3): 363 https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0363

长周期光栅生物传感器研究进展

Research progress of biosensors based on long period fiber grating 中国光学(中英文). 2018, 11(3): 475 https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0475

光交联技术的生物应用研究进展

Advances in biological application of photo-crosslinking technique 中国光学(中英文). 2018, 11(3): 444 https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0444

光学无创血糖浓度检测方法的研究进展

Research progress in optical methods for noninvasive blood glucose detection 中国光学(中英文). 2019, 12(6): 1235 https://doi.org/10.3788/CO.20191206.1235

剪切散斑干涉技术及应用研究进展

Research progress in shearography and its applications 中国光学(中英文). 2017, 10(3): 300 https://doi.org/10.3788/CO.20171003.0300

荧光碳量子点的制备与生物医学应用研究进展

Advances in preparation and biomedical applications of fluorescent carbon quantum dots 中国光学(中英文). 2018, 11(3): 431 https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0431 文章编号 2097-1842(2022)05-0878-17

单分子生物检测方法及应用研究进展

周文超1**,李政昊1,2*,武 杰1,2

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所应用光学国家重点实验室, 吉林长春 130033;

2. 中国科学院大学,北京 100049)

+共同第一作者

摘要:单分子生物检测技术是通过了解单分子层面上各生物分子间的动态特性,以发掘生物分子的结构与功能的高效技术。该技术的优势在于能够在单个分子上探测自由能的异质性,这是传统方法无法实现的。利用这一性能,研究人员可以解决复杂生物系统、多相催化、生物分子相互作用、酶系统和构象变化等长期存在的问题。在医疗检测方面,检测单个分子的具体信息或它们与生物因子的相互作用,不仅对癌症等各种疾病的早期诊断和治疗至关重要,而且在实时检测和精准医疗方面具有巨大的潜力。利用单分子生物检测高特异性和高精度的优势,实现对分子群中单个生物分子的实时检测,且可与阵列高通量分析相结合对临床样本进行精确诊断。本文简要介绍了单分子检测原理及其在生物传感方面的应用,在此基础上,重点概述了检测方法及相关应用,最后探讨了该研究方向的前景与发展方向。

关键 词:单分子生物检测;核酸;纳米孔;蛋白质;异质性

中图分类号:Q632;O439 文献标志码:A **doi**:10.37188/CO.2022-0129

Research progress of single molecule biological detection methods and applications

ZHOU Wen-chao1*†, LI Zheng-hao1,2†, WU Jie1,2

(1. State Key Laboratory of Applied Optics, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)
† These authors contributed equally to this work
* Corresponding author, E-mail: zhouvc@ciomp.ac.cn

Abstract: Single molecule biological detection technology is an efficient technology to understand the dynamic characteristics of various biomolecules at the single molecule level and explore their structure and function. The advantage of this technology is that it can detect the heterogeneity of free energy on a single molecule, which is beyond the traditional methods. Therefore, researchers use it to solve long-standing problems in complex biological systems, heterogeneous catalysis, biomolecular interactions, enzyme systems and conformational changes. In terms of medical detection, detecting specific information about single molecules

收稿日期:2022-06-14;修订日期:2022-07-12

基金项目:中科院青促会会员项目(No. 2020223);国家自然科学基金面上项目(No. 61974143)

Supported by Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (No. 2020223); National Natural Science Foundation of China (No. 61974143)

879

or their interactions with biological factors is not only crucial for the early diagnosis and treatment of various diseases such as cancer, but also has great potential for real-time detection and precision medicine. The advantages of high specificity and high precision of single-molecule bioassays are used to real-time detection of single biomolecules in molecular populations, and can be combined with multiple high-throughput analysis for the precise diagnosis of clinical samples. In this paper, the principle of single molecule detection and the application of biosensing are introduced, and the detection methods and related applications are summarized. Finally, the prospect and development direction of this research direction are discussed.

Key words: single molecule biological detection; nucleic acid; nanopore; protein; heterogeneity

1引言

单分子是探索生物性质过程的最小单元。对 单分子的研究有助于发现生物系统中时间和空间 的异质性,以及观测生物分子的潜在机制。单生 物分子主要包括蛋白质、核酸、病毒和生物小分 子等,高灵敏度检测可以量化单个生物分子,在临 床诊断和探索潜在疾病等应用上,起到至关重要 的作用。目前被广泛使用的单分子检测方法包括 表面等离子体共振 (SPR), 光波导光栅 (OWG), 生 物层干涉法 (BLI), 酶联免疫法 (ELISA)、聚合酶 链式反应 (PCR) 和质谱分析法等, 用于定量检测 患者样本中的生物分子水平,检测结果对评估患 者的健康状况和规划治疗方案非常重要。然而, 血液、唾液或其他生物体液中许多潜在、起到决 定性作用的蛋白质、核酸或生物标志物的浓度远 低于当前方法的检测限,因此需要开发检测限更 低的技术。具有在临床样本中测量低浓度生物标 志物的能力,就可以通过无创或微创的方式提前 发现疾病。因此,需要超灵敏的分析技术来检测 和分析当前无法检测到的重要生物标志物。

单分子生物检测技术在低浓度蛋白、核酸和 其他生物相关分子的超灵敏分析方面具有巨大的 应用潜力。与传统方法检测生物分子整体平均值 不同,单分子检测方法可以测量到单个生物分子 层次。核酸作为生命的基本分子之一,具有储 存、传递和表达遗传信息的能力,也与各种临床 疾病密切相关,已成为临床诊断和治疗的重要依 据。在核酸检测方面,该技术准确性高,可以直接 识别碱基,实现核酸的长读取,从而发现新发致病 结构变异。蛋白质分子在生物体中执行许多重要 的任务,包括代谢催化、DNA 转录和复制、信号 转导和分子运输等。在蛋白质与多肽检测方面, 单分子生物传感器除了具有高灵敏度、特异性和 选择性外,显示的分析时间更短,这使得临床环境 和新的药物研发中的矩阵高通量分析成为可能。 除了蛋白质和核酸,单分子检测还可以应用于在 代谢途径、临床诊断和药物中发挥不同作用的小 分子,发现活细胞中的个体异常,量化人体中含量 极低的生物小分子,对解决生命科学中许多长期 存在的问题具有十分重大的意义。

2 发展、分类及应用

霍尔于 1956 年用透射电子显微镜(EM)拍摄 到第一张单生物分子图像,包括脱氧核糖核酸 (DNA)分子和胶原蛋白等生物分子,对细胞潜在 过程的生物学机制研究有了实质性的突破印。 1961年, 斯坦福医学院的 Rotman 教授第一次实 现单分子检测,他将含有β-半乳糖苷酶和荧光底 物的混合溶液喷在硅油上,在油中产生液滴,每个 液滴中含有0个或1个酶分子,经过数小时的等 待,能够通过观察发出荧光的液滴来检测和测量 出单个酶分子的存在[2]。随后,研究人员将膜片 钳用于单分子的相关研究,为离子通道蛋白检测 奠定了基础^[3]。早在 1976 年, Hirschfeld开始进行 光学单分子检测的相关研究,使用异硫氰酸荧光 素的 80~100 个分子对 20000 kDa 聚乙烯亚胺进 行标记,然后将这种高荧光聚合物与γ-球蛋白结 合,使用全内反射显微镜,用高强度激光检测单个 蛋白质分子。在完全光漂白之前最大化荧光信号 (当时的探测器性能较现在的集成探测器略差,这 样做可以尽可能多地收集光子),根据已知的分子 浓度进行检测,观察荧光检测的预计数量^[4]。这 次实验非常重要,因为它是首次不使用酶的单分 子测量,也是第一个使用全内反射进行单分子检

测的研究。1988年, Gelles 等人通过对计算机图 像进行数字化处理,发现塑料珠可以在其中心的 驱动蛋白马达驱动下,实现精度为纳米尺度的旋 转^[5]。在 1990年, Orrit 和 Bernard 首次检测到一 个并五苯分子的荧光信号^[6]。此后,随着荧光探 针和超分辨率显微镜的发展,科学家们解决了许 多复杂生物系统、多相催化、生物分子相互作用、 酶系统和实时构象变化等长期存在的问题。 1997年首次将表面增强拉曼光谱(SERS)技术应 用于单分子检测,为化学分析提供了一种前所未 有的高含量、超灵敏的光学方法[7]。1998年,谢晓 亮团队首次利用荧光显微镜实时观察到单个酶蛋 白分子的催化循环过程。这项研究成果成为单分 子酶学的里程碑,成为单分子 DNA 测序技术的 核心技术^[8]。Vgelstein 与 Kinzter 于 1999 年发表 了采用数字 PCR(digital PCR) 方法定量检测结肠 癌患者粪便中的微量 K-RAS 基因突变的成果^[9]。 2006年,首台数字式单分子免疫阵列蛋白分析仪 Simoa HD1 面世。该检测平台由光纤微阵列技术 和单分子检测技术构成,可进行单分子酶分析。 2012年,纽约冷泉港实验室的研究人员将 Pacific Biosciences 单分子测序技术与 Illumina 公司的传 统测序技术相结合,用于修正单分子测序中的错 误,结果表明该方法显著提高了测序结果的准确 性[10]。布罗德研究所张锋团队于 2017 年研发出 一种全新的 CRISPR 应用工具(SHERLOCK 系 统)。该 CRISPR 系统对于 RNA 和 DNA 的检测 灵敏度均可达单分子级[11]。

2.1 纳米孔的单分子生物检测

在过去的几十年里,基于纳米孔的检测方法 在许多学科和领域起到关键作用,包括生物医 学、纳米尺度化学、生物物理学等。纳米孔单分 子生物检测传感器由一个直径在 1~100 nm 之间 的孔,嵌入到或形成于两个含有电解质溶液的腔 室的绝缘膜中,在外加电场作用下,离子自由流过 纳米孔,形成稳态离子电流。在检测过程中,带电 分子(核酸、多肽、蛋白质、聚合物分子等)阻塞纳 米孔,导致孔隙离子电流下降,分子通过纳米孔 后,电流会恢复正常,分子在纳米孔中通过产生的 电信号可传达出生物分子的尺寸、浓度、结构等 信息。待测生物分子的尺寸与纳米孔尺寸越接 近,从孔隙通过产生的离子电流信号波动越明 显¹⁴。纳米孔单分子传感器每次只通过一个待测 分子,表现出对单一个体的极强灵敏度。此外,纳 米孔检测技术具有重复性高、操作简单、成本低、 有助于理解单分子行为等优点。纳米孔包括生物 纳米孔与固态纳米孔两类,都可进行单分子层次 的生物检测。

2.1.1 生物纳米孔

生物纳米孔的优点是具有良好的三维结构和 高复现性。常用的生物纳米孔包括α溶血素[12]、耻 垢分枝杆菌孔蛋白 A(MspA)^[13]、气溶素 (AeL)^[14]、 Fragaceatoxinc (frac) 纳米孔^[15] 等, 也可由双层膜 中的生物合成或固相合成的小肽(小于100个氨基 酸的肽)产生,研究人员还通过软件设计出由 DNA 链构成的 DNA 折纸纳米孔, 可以控制纳米孔结 构尺寸[16]。生物纳米孔也称为跨膜蛋白通道,第 一个用于单生物分子检测的纳米孔是 α 溶血素。 其孔通道宽度只可以通过单链 DNA, 双链 DNA 尺寸过大无法通过,从而实现了对单链 DNA 的 检测[17]。随着研究的深入,生物纳米孔也用于癌 症生物标志物、对映异构体、miRNA、多肽与蛋 白质等分子的传感。弗吉尼亚大学相关研究团队 研发了一种基于光谱的单分子纳米孔用于表征水 溶性肽。这项技术的基础原理是利用生物蛋白的 纳米孔分解不同大小的分子,利用 Au25(SG)18 团 簇来改善聚乙二醇 (PEG) 的检测结果, 增加多肽 对孔的开启和关闭率(如图1所示)。同时,溶剂/ 溶液的 pH 值对提高多肽的活性也有重要作用, 在单分子检测中表现出相应的信号波动[18]。



- 图 1 (a) 阴离子 Au₂₅(SG)₁₈ 团簇增强纳米孔检测示意图 及(b) 相应的电流强度^[18]
- Fig. 1 (a) Schematic diagram of the anionic Au₂₅(SG)₁₈ cluster-enhanced nanopore detection and (b) it's corresponding current traces^[18]

2.1.2 固态纳米孔

固态纳米孔较生物纳米孔表现出更强的鲁棒 性,制备方法可与传统半导体制造工艺兼容,也可 以与微流体及光学检测方法集成。控制其孔隙几 何形状,使其与生物分子相匹配。在电解质中施 加电压,使带电的生物分子在电泳力作用下通过 纳米孔,可以提高易位过程中产生的离子电流阈 值,并最大限度地提高信噪比^[19]。

在纳米孔为主体的检测系统中,孔径无法通 过以光传播的方式进行检测的纳米孔称为零模 波导(ZMWs)。ZMWs通常由金属铝制成,置于 透明衬底上,并要降低背景荧光。对于孔径小于 光波长的金属纳米孔,即光波无法通过,但生物 分子仍能通过的孔隙,将待测生物分子进行荧光 标记。在一定的光照下,金属膜上方的荧光分子 层被金属膜屏蔽,因此,只有位于孔底部的荧 光团能产生可检测的信号(如图 2 所示,彩图见 期刊电子版)。零模波导多用于 DNA 和蛋白质 生物分子的检测以及单分子的生物物理学研 究等^[20]。

以 ZMWs 为基础, 目前普遍使用金代替铝, 使其产生强的等离子体共振效应。等离子体与固 态纳米孔检测技术集成, 在灵敏度、特异性、阵列 检测、持续时间等方面有所提升。在等离子体纳 米孔周围的电磁场起到增强光学光谱、提高荧光 标记分析物信号、实现分子和离子在传感器之间 热迁移的作用。高限制的等离子体场可用于增强 标记了适当荧光染料的生物分子的荧光能量 (FE)和荧光共振能量转移(FRET)^[21]。利用等离 子体纳米孔技术对电磁场进行限制, 可以对背景 荧光产生很强的抑制作用, 同时将 FE 净增强 10 倍以上。



- 图 2 不同材料架构的零模波导(ZMW)等离子体纳米孔^[20]。(a)深紫外等离子体增强 Al ZMW 单蛋白自身荧光。(b)用于 增强单分子探测的 Au-Si 零模混合波导。(c)等离子体纳米孔器件结构增强单分子荧光检测,该结构由金膜制备的 纳米孔和独立式氮化硅膜制备的纳米孔组成。
- Fig. 2 Various material framework of zero-mode waveguide (ZMW) plasma nanopore^[20]. (a)The autofluorescence of Al ZMW monoprotein was enhanced by deep ultraviolet plasma. (b) Au-Si zero-mode hybrid waveguides for enhanced single-molecule detection. (c)The plasma nanopore device structure enhances single-molecule fluorescence detection, which consists of nanopore prepared by gold film and nanopore prepared by independent silicon nitride film.

2.1.3 相关应用

2.1.3.1 核酸检测

纳米孔核酸检测读取长度不受限制,小型化 纳米孔核酸检测仪器可用于实时检测。通过单分 子检测,直接进行核酸读取,不需要进行扩增的方 法被称为第三代测序。纳米孔核酸检测利用 DNA 穿过孔时,产生的电荷变化来识别不同的核酸^[22-23]。 对于临床样本,一般利用杂交原理构建的生物传 感器的灵敏度和选择性存在缺陷,由于血清中存 在其他各种蛋白和非靶核酸,可导致离子电流阻 滞干扰靶信号等问题^[24]。纳米孔核酸检测的难点 之一是控制 DNA 链通过纳米孔的易位速度,时间过短会导致采集到的电流特征信号无法被记录 或记录错误。研究人员发现对于生物纳米孔可以 在待测 DNA 分子入口处使用分子马达,如 DNA 聚合酶或解旋酶,可以显著降低 DNA 的移动速 度,并在核酸水平上精确控制 DNA 移动^[25]。DNA 链中相邻核酸之间的长度只有 0.5 nm,膜的厚度 了决定测序的分辨率,更薄的厚度可使识别更加 准确,随着石墨烯材料的出现,发现其厚度与核酸 之间间距相当,具有很高的空间分辨率,并且具有 高机动和栅可调载流子的电子导电性,可应用于 纳米孔单分子检测^[26]。氮化硅作为一种可靠的半导体相关材料,使用氮化硅薄膜制造纳米孔更适合大规模生产,目前发现的最短有效厚度约为1.7~1.8 nm,大约可容纳4个连续的核酸^[27]。Burck等人最近提出了一种基于纳米孔的生化分析方法。其利用纳米孔中的光电传感技术对小的外周血循环中的游离 DNA 片段进行定量分析,证明小鼠血液中特异性检测 ERBB2 S310F 和 PIK3CA H1047R 的基因突变^[28]。

2.1.3.2 蛋白质与多肽检测

蛋白质与多肽都是由氨基酸组成的。与 DNA 测序不同的是,纳米孔技术无法对蛋白质或多肽 的每个氨基酸进行测序,所以研究人员把精力集 中在区分单一氨基酸上。单氨基酸检测灵敏度 与分子通过纳米孔的易位速度相关,Yuan等人使 用未修饰的气溶胶纳米孔与待测氨基酸之间的 氢键成功检测出单个半胱氨酸^[29]。为了检测单 氨基酸分辨率下的多肽,研究人员将不同分子量 的多肽用不同阻滞信号幅度加以区分,Piguet 等人在单氨基酸分辨率下对混合溶液或独立的 均荷电短同肽 (5~10个氨基酸)进行了大小区 分。在这项研究中,气溶胶纳米孔是完全未经修 饰的,可以正确区分不同长度的多肽^[30]。2019 年, Matteo Dal Peraro 课题组以纳米孔单分子检 测技术为基础,对气溶素的离子选择能力与传 感能力展开研究。因为气溶素与其他生物纳米 孔的区别主要在于其孔径长度,研究发现其能力 主要由静电和双β-桶的最狭小部分直径控制,较 长的孔与直径较小的孔径相结合可使分子的易 位变慢,可实现对多肽分子更高精度的检测[31]。 2021年,荷兰格罗宁根大学的 Giovanni Maglia 教 授通过低 pH 条件以及在孔道内引入芳香族氨基 酸突变的方法,提高了多肽在纳米孔中的停留时 间、捕获频率和分辨率,同时对纳米孔的多肽传 感机制做出一定验证,为纳米孔的多肽检测提供 了一种切实可行的方法[32]。同年,为了促进蛋白 质纳米孔的实际应用, LIMY团队通过纳米孔实 验与分子动力学模拟,实现了高度特异的离子电 流强度对待测物体积差分辨(如图 3 所示,彩图 见期刊电子版)[33]。



- 图 3 通过野生型气溶胶膜通道运输 C-A₃和 mC-A₃^[33]。(a)气溶胶纳米孔模型。气溶素(灰色)嵌入脂质双层膜(深蓝色), 核苷酸(红色)放置在孔的入口;(b)含有甲基胞嘧啶和胞嘧啶的甲基化和非甲基化寡核苷酸结构。红色部分为添加 的甲基部分
- Fig. 3 Transporting C-A₃ and mC-A₃ through a wild-type aerolysin membrane channel^[33]. (a) All-atom model of the fulllength aerolysin nanopore system. Aerolysin (gray) was inserted into a lipid bilayer membrane (dark blue), while nucleotides (red) were placed at the entrance of the pore. (b) Structure of methylated and unmethylated oligonucleotides containing methylcytosine and cytosine, respectively. The only difference between them was the addition of a methyl group which is marked in red

2.2 数字式单分子生物检测

数字式单分子生物检测通过将待测分子以

统计学原理分离出"有"与"无"两种状态,对 "有"的分子进行计数,获得待测分子数量。与批 量检测方法相比,数字式单分子生物检测系统在 对蛋白质和核酸的测量上具有明显优势。在批 量测量中,待测物的浓度与信号强度成比例,样 本总体的特异性被忽略,只能测量平均活性。与 整体检测相比,数字式检测与信号强度无关,读 取单个信号的有无并进行计数^[34]。数字式单分 子生物检测将单个带有荧光底物的酶分子加载 到飞升体积大小的微孔中,在微孔中每个酶分子 都能催化大量底物使其转化为荧光分子,产生较高的局部浓度,观测含有荧光信号的微孔,计算酶分子的数量。以微磁珠为载体将待测生物分子与荧光底物捕获到单个飞升体积大小的微孔或微反应器中,对微孔阵列中每个孔中的荧光信号同时进行数据采集,通过增加微磁珠被捕获的概率检测浓度极低的待测分子(如图 4 所示,彩图见期刊电子版)^[35]。



图 4 微磁珠加载示意图^[35]。(a)使用磁力和亲-疏水微孔阵列高效加载微磁珠。(b)直径、间距和深度不同的微孔阵列在 多次循环下的加载率。(c,d)40 倍显微镜下加载前后的亮场显微图像。(e)100 倍显微镜下加载后的亮场显微图像

Fig. 4 Magnetic bead seeding^[35]. (a) Schematic of the magnetic bead seeding on HIH microwell arrays. (b) The bead distribution in arrays with varying well diameters, array pitches and well depths, for multiple-seeding cycles. (c,d) ×40 magnification bright field microscopy image of a microwell array before and after magnetic bead seeding, respectively. (e) ×100 magnification bright field microscopy image of a microwell array after seeding

Rissin 课题组提出以微珠为载体的 ELISA 单 分子阵列检测方法, 使检测过程更加稳定, 可实现 单个蛋白质分子的检测^[36]。首先使用单个蛋白分 子被结合抗体的微珠捕获, 携带蛋白分子的微珠 遵循泊松分布的百分比, 即每个珠粒结合一个或 零个目标分子, 与加入生物素化的检测抗体形成 三明治式免疫复合物, 然后用链霉亲和素结合的 β-半乳糖苷酶进行标记, 将微珠与荧光底物共同 加入到与微孔尺寸相匹配的微孔阵列中,即每个 微孔最多存在一颗微珠(如图 5 所示)^[37]。通过这 种方法,可以使捕获的单个蛋白分子被分离在独 立的孔中。微孔封闭后,通过观察微孔上的荧光 数量计算单目标分子。每个单独的微反应器在这 个过程中起到分散待测分子,数字化检测目标的 作用。蛋白质浓度是通过测量同时含有珠粒和荧 光产物的孔数与含有珠粒的孔总数的比率来确定 的。该方法大大降低了检测抗体和酶的使用量, 也减少了与微珠的非特异性结合,降低了背景噪 声。因此,数字式单分子生物检测方法的检测限 比传统 ELISA 低 1000 倍。



- 图 5 数字 ELISA 示意图^[37]。(a)抗体结合微珠捕获单个 目标生物分子,然后由另一个与标记抗体结合的抗 体检测。将微珠装入飞升微孔阵列中用于分离和检 测单个分子。(b)产生单分子信号的飞升微孔阵列 的一部分荧光图像。大多数飞升体积微孔含有一颗 微珠,但这些珠中只有一小部分具有催化酶活性,表 明是一种单一的结合蛋白。(c)蛋白质在本体溶液 中的浓度与结合蛋白质分子的微珠的百分比关系
- Fig. 5 Schematic representation of digital ELISA^[37]. (a) Antibody-coated beads captures the single target biomolecules, which are then detected by another antibody conjugated with a labeled antibody. Loading of beads into femtoliter well arrays for isolation and detection of single molecules. (b) Fluorescence image of a small section of the femtoliter well array after signals from single molecules are generated. While the majority of femtoliter chambers contain a bead from the assay, only a fraction of those beads possesses catalytic enzyme activity, indicative of a single, bound protein. (c) The concentration of protein in the bulk solution is correlated to the percentage of beads that have bound a protein molecule

数字式单分子检测方法提高了研究人员对酶 机制和酶群体的异质性理解,将单酶分子捕获到 具有荧光底物的微孔中,在高通量的微孔阵列中 同时观测大量酶分子的活性,能够获得酶群长期 的动力学状态。数字式单分子检测方法也可以直 接以外周血为检测对象,通过提取其生物标志物 定量分析自身循环系统血浆中的细胞因子含量, 与痊愈患者进行比较,观察产生的生理变化,用于 评估免疫疗法的效果^[38]。

2.2.1 核酸检测

目前大多数的核酸检测需要对目标 DNA 或

RNA 进行扩增,通常使用聚合酶链式反应 (PCR)。 在定量 PCR (qPCR) 中,每个扩增周期后通过荧 光增强程度判断扩增产物的相对丰度。这种方法 可以在短时间内将目标序列扩增 100 万次以上, 所需样本量小^[39]。除此之外,包括滚动环扩增反 应 (RCA)、杂交化链式反应 (HCR) 和环介导等温 扩增 (LAMP)等技术也可用于核酸检测,但是这 些方法往往耗时费力、需要消耗大量样本、并且 灵敏度不足。

为了解决这些问题并获得更高的灵敏度,数 字 PCR 方法对样品进行稀释,并将其划分到含 有一个或零个目标模板分子的孔中,从而允许对 目标序列进行排除扩增偏差的绝对定量[40],由此 发展出的液滴数字 PCR (ddPCR) 方法利用油包 水乳化液滴限制单个核酸靶点,能够实现大规模 数字化检测。此外,数字式 ELISA 的检测方法 能够在不需要进行 DNA 扩增的条件下, 检测亚 飞摩浓度的基因组 DNA^[41]。该方法成功检测到 全血中浓度为 0.016 fmol/L 的金黄色葡萄球菌 的基因组 DNA。数字式 ELISA 方法对 miRNA 的检测也具有极高的灵敏度,通过与目标 miRNA 序列互补的锁定核酸探针的直接杂交,检测限可 达到 1~10 fmol/L, 能够通过多重检测飞摩浓度 的具有单核苷酸错配的同源 miRNA^[42]。除了高 灵敏度之外,该方法还解决了逆转录定量 PCR (miRNA 检测的金标准方法)所面临的样品丢失 和扩增变异的问题(如图 6所示,彩图见期刊电 子版)[43]。







- 图 6 数字式单分子阵列检测技术进行 MicroRNA 检测^[43]。(a)单个 miRNA 分子通过与生物素化的探测 器探针杂交到探针化的顺磁珠中被捕获。随后加入 链霉亲和素结合酶来标记捕获的 miRNA 复合物, 以便在与荧光酶底物孵育时产生荧光信号。(b)单 个微珠与荧光衬底一起装入飞升微孔阵列,随后用 油密封。然后将孔上荧光的数量作为目标 miRNA 浓度的数字读数
- Fig. 6 MicroRNA detection with digital single molecule detection technology^[43]. (a) Individual miRNA molecules are captured by hybridization to probecoated paramagnetic beads, along with biotinylated detector probe. The streptavidin-conjugated enzyme is subsequently added to label the captured miRNA complex, to allow generation of a fluorescent signal upon incubation with a fluorogenic enzyme substrate. (b) Individual beads are loaded along with fluorogenic substrate into a femtoliter microwell array, which is subsequently sealed with oil. The number of fluorescent "on" wells is then counted as a digital readout of the target miRNA concentration

2.2.2 蛋白质检测

数字式单分子检测技术最大应用领域之一是 对神经病学和神经退行性疾病的诊断。常见的检 测对象包括神经丝光 (NfL)、Tau 蛋白、淀粉样蛋 白 (Aβ)、α-突触蛋白 (a-synuclein) 和胶质纤维酸 性蛋白 (GFAP)。这些蛋白在血浆中的浓度低于 在脑脊液(CSF)中的浓度, 血浆检测比脑脊液检 测对人体的伤害小很多,因此需要一种灵敏度极 高的技术,获得对血浆中低浓度蛋白质的技术量 化检测指标,如数字式 ELISA 单分子检测技术。 Mattsson 团队证实患老年痴呆症患者神经丝光 NfL 血浆水平(平均 51.0 ng/L)显著高于认知健康 的对照组的检测物水平(平均 34.7 ng/L), 而轻度 认知障碍患者(平均 42.8 ng/L)与其他两组之间无 显著差异^[44]。其他研究人员也通过对血浆中 NfL 量化,确认额颞叶痴呆症与其相关,且血浆中的 NfL 浓度与脑脊液中浓度呈正相关。Gill 课题组 使用单分子阵列技术对疑似轻度创伤性脑损伤 (mTBI) 患者与健康对照组的 tau、NfL 和 GFAP 进行测量,结果表明患者血浆中检测蛋白含量明 显偏高[45-46]。鲁汶大学生物传感器研究人员使用 同一检测方法对阿摩到皮摩的 Tau 蛋白水平进行 量化,证明了所提出的检测方法与不同生物样品 中 Tau 浓度范围具有兼容性,获得 55±29 aM 的 检测限,灵敏度较商用产品提高了5000倍[47]。在 另一项研究中, Dinh 等研究人员使用数字式 ELI-SA方法测量血清与尿液中肉毒杆菌神经毒素 A1(BoNT/A1)量化值,检测限分别达到 200 pg/L 和 1 ng/L^[48]。

除神经学标志物外,单分子阵列技术也越来 越多地应用于检测血液中的肿瘤标志物、心脏验 证标志物、自身免疫性疾病中的细胞因子与趋化 因子等。

2.2.3 小分子的单分子检测

为了检测单个小分子, Wang 课题组将单分 子阵列检测调整为一种竞争性免疫分析形式, 分 析修饰的微珠或分析标记的酶与样品中的目标分 析物竞争结合, 竞争免疫分析法成功用于检测唾 液和血清中的皮质醇和前列腺素 E2。结果表明 竞争免疫分析法对小分子的灵敏度较传统竞争 ELISA 法高出约 50 倍^[49]。

通过将单个分子限制在飞升级微反应器阵列 中,基于微孔的检测技术为检测单个目标分子提 供了一种强大的工具,提高了灵敏度。随着灵敏 度、小型化和成本效益的不断提高,这种单分子 生物检测技术在推进临床诊断和理解疾病机制方 面表现出重要的潜力。

2.3 回音壁模式光学谐振腔(WGM)单分子生 物检测

回音壁模式光学谐振腔(WGM)作为无标的

微纳米传感器,可以让人们直接在光下观察单分 子水平的动态过程,具有高时间和空间分辨率,并 且能够响应影响光模式分布的环境扰动。WGM 器件具有高灵敏度,此外,其结构具有多样性且 易于与现有制造设备 (如传统的基于芯片的技 术)集成,促使 WGM 传感器广泛用于生物分子 检测。典型的 WGM 传感器由一个低噪声泵浦光 源和一个高Q值微腔组成。通过光的全反射将 光波限制在谐振腔内,循环的光波会产生自干涉 光学共振,光波倏逝场从微腔激发延伸到周围的 介质中,当生物分子与纳米级光场重叠时,就会产 生检测信号(WGM 共振漂移)。理论上,生物分 子与光相互作用,光波每循环一圈,路径长度都会 发生一些变化,这种路径长度的变化使光的共振 波长或频率发生偏移^[50]。利用谐振腔表面散射损 失和吸收损失导致光学共振频率信号变化,可实 现生物分子的高灵敏检测(如图 7 所示,彩图见期 刊电子版)^[51]。为了将 WGM 的检测能力提升到 单分子级别,可以通过增强光与金属纳米结构上 分子的相互作用而实现,使用金属纳米结构将光 集中在超出衍射极限的深亚波长尺度,以增强与 单一分子的相互作用。然而,用这种方法获得的 单分子高分辨率,导致传感部分缩小,有效传感面 积为纳米粒子的结合部分的表面积,在与 NPs 结 合时,只有少量分子可以被识别[52]。另一种基于 光学 WGM 与微腔的机械本征模耦合的传感方 法,不受这种传感体积减小的影响,其用足够的功 率激发空腔内的光波导,其共振频率相对于谐振 频率略有蓝移,则可以在亚 Hz 线宽的频率 Vm 上引起谐振腔的相干光机械振荡 (OMO), 振荡频 率和它的高次谐波可以直接由腔发射的功率谱确 定。由于腔内光场本身就像光弹簧一样做机械运 动, OMO 的频率取决于激发频率相对于 WGM 共振位置的失谐^[53]。为了检测特定的生物分子, 需要使用分析特异性捕获剂(抗体^[54]、抗体片 段[55]、互补核酸适体[56]、其他识别分子)对 WGM 进行修饰,在捕获剂将待测分子捕获到传感区域 中时,会导致共振波长偏移,由于这一现象, WGM 已被用于核酸、病毒、蛋白质、端粒酶活性 等目标的检测。研究人员基于该原理成功检测到 大肠杆菌聚合酶打开和关闭时信号的变化。通过 改变检测波长,也可以在蛋白质不同体积的位置 探测单蛋白质动力学,这种多模态 WGM 传感器 甚至可以使蛋白质的三维动力学达到原子级分辨 率,成为单分子动力学研究的重要工具。



Fig. 7 Illustration of a WGM cavity excited by frustrated total internal reflection at a prism surface^[51]

2.3.1 单分子检测应用

WGM 的检测方法为无标检测,其对分子的 类型往往无法识别,通常使用与待测分子尺寸匹 配的微粒子代替。病毒一直对人类构成潜在威 胁,早在 2008年, Vollmer F 课题组首次报道了使 用模式偏移技术检测单个甲型流感病毒粒子(半 径约 50 nm), 从微球形 WGM 的共振频率/波长的 离散变化观察到单个病毒粒子的结合,通过减小 微球的尺寸,可以增强离散波移信号的幅度。在 使用与病毒大小相当的聚苯乙烯纳米颗粒的实验 中,证实传感机制与模式体积成反比。将此效应 的基础电磁理论与实验进行比较,既可以从最佳 共振位移直接获得结合病毒粒子的大小和质量[57]。 美国伊利诺伊大学研究团队应用无标的硅光子微 环谐振器直接在一个复杂的分析矩阵检测完整 病毒的纯化样品,并且对菜豆荚斑驳病毒(一种重 要的农业病原体)实现了定量检测,检测限为 10 ng/mL。通过在缓冲液中研磨少量叶片样本, 于45 min内,就可以识别受感染的叶片^[58]。 空气中也存在很多微小的病毒分子, Shao L 团队 研究人员基于自由空间耦合的微环面成功检测出 了单个聚苯乙烯颗粒 (半径为 70 nm) 以及空气中 的病毒粒子[59]。蛋白质的尺寸通常小于病毒的尺 寸,在对蛋白质分子进行检测时,就需要更高的灵 敏度 WGM 检测装置,才能实现对蛋白质的定量

检测。许多研究小组已经实现了在纯缓冲溶液和 复杂介质中对蛋白质的直接检测[60-61]。Robison H M课题组利用循环免疫细胞中结核相关抗原和 对照抗原暴露进行多重细胞因子免疫分析,验证 了适用于结核杆菌 (LTBI) 的 7-plex 细胞因子检 测。该方法具有良好的动态范围、检测限和重现 性,与单酶联免疫吸附测定法具有良好的相关性, 准确地检测和量化了患者的 PBMCs 在结核相关 抗原和对照抗原刺激后分泌的7种细胞因子浓 度,并与强大的特征选择方法相结合,揭示了与 LTBI 状态和再激活风险相关的个体规范化免疫 信号[62]。近期,肖云峰教授和龚旗煌院士课题组 首先成功制备出壁厚约为1µm的微泡腔,并利用 热光效应进行筛选,进一步将微泡腔接入微流系 统构成微流光学传感器,并成功实现了单链 DNA 分子的检测[63]。

2.3.2 蛋白质分子构象动力学检测

蛋白质结构内的动态运动是极其复杂的,涉 及到与结构运动和波动相关的不同时间尺度、运 动幅度和不同方向。大多数蛋白质的功能来自于 复杂的三维结构和结构的改变,通常在与其他分 子的相互作用,或环境条件如温度和 PH 值的变 化时发出响应,蛋白质可以在很短的时间间隔内 采用许多不同的构象,因此检测蛋白质的构象动 态对于更好地理解其生物学功能至关重要。为了 观察蛋白质的结构动力学,常常需要对单个分子 进行研究。研究单个蛋白构象变化的一种方法是 将光集中在深亚波长尺度上,以增强与单一蛋白 质的相互作用。通过附加一个等离子体金属纳米 棒,可以将光集中到一个蛋白质的尺寸(约10nm), 生物分子与这种光场相互作用可产生检测信号[4]。 通过这种方法,已经有科研人员实现对固定在 WGM 传感器上的活性聚合酶的构象运动的检 测。利用这种无标的光学检测方法观测出单分子 水平上的相互作用和相关的构象变化[65]。为了实 现具有多个传感通道的 WGM 传感器平台,研究 人员利用不同的激光探测蛋白质分子动力学,从 而获得蛋白质不同部分的动力学信息。通过使用 等离子体金纳米颗粒耦合 WGMs, 以微秒时间分 辨率探测周转期间的酶构象动力学,对单分子水 平上酶周转的温度依赖进行研究,并对其建立物 理模型,成为研究酶周转和热力学之间关系的重 要工具[66]。

2.4 表面增强拉曼光谱(SERS)单分子生物 检测

拉曼光谱是一种功能强大的分析工具,可以 探测分子的震动指纹信号,根据拉曼光谱固有的 特异性,可以对物理、化学和生物的复合系统进 行分析。这种光学技术具有低损害性和用途广泛 等特点,可用于固体、液体和气体样品的研究,已 被应用于化学检测、疾病诊断和环境监测等领 域。然而,自发拉曼散射很弱,拉曼光谱的灵敏度 较低。表面增强拉曼光谱 (SERS) 能够显著增强 表面吸附分子的拉曼信号,克服传统拉曼光谱灵 敏度低的限制。经过技术的不断完善, SERS 技 术在生物传感领域表现出优异的灵敏度。通常利 用互补核酸、抗体和适配体作为识别病毒的识别 元件[67]。在 SERS 发展的早期阶段,使用表面粗 糙的金属衬底,能够为被检测分子提供良好的拉 曼增强^[68-69]。但是,由于粗糙的金属基底对场的 增强能力有限,不足以满足单分子检测。随后,研 究证明大幅的电磁增强,可以使测量非共振分子 拉曼微分截面的 SERS 信号在 10⁻²⁹~10⁻³⁰ cm²/sr 范围内[70]。SERS 衬底 (如非晶态 Au 衬底) 表面 原子迁移会使测量到的单分子信号受到影响[71]。 在 SERS 理论中, 电磁场方法激活的拉曼增强因 子与局域电场增强的四次方成正比,表示为:

$$G(r_0) = |E(r_0, \omega)|^4 / |E_0(r_0, \omega)|^4 \quad , \qquad (1)$$

其中*E*₀(*r*₀, *ω*)是入射光的电场, *E*(*r*₀, *ω*)为热点处的局部电场。相应的增强拉曼强度可表示为:

$$I(\omega_R) = AG(r_0)|\alpha(\omega_R,\omega)|^2 I_0(r_0,\omega) =$$

$$AI_0(r_0,\omega)|\alpha(\omega_R,\omega)|^2 \times |E(r_0,\omega)|^4 / |E_0(r_0,\omega)|^4,$$
(2)

其中 *A* 表示实际中与用于采集拉曼信号的光学 系统的采集效率相关的系数; |α(ω_R,ω)|表示被检 测分子的拉曼极化率; *I*₀(*r*₀,∞)表示入射光强度^[72]。 根据公式(2)可知,使用特定的光学系统来提高 SERS 测量的灵敏度,主要有两种增强方法。一 个是局域电场增强,对应于 EM,另一个是增加被 检测分子的拉曼极化率,对应于 CM。

SERS 单分子生物检测可以在不统计平均值的情况下观察单分子中细微的光谱现象。实验验证, SERS 单分子检测可以准确观察到拉曼峰的均匀展宽和非均匀展宽。在应用方面, SERS 单分子生物检测显著增加了拉曼光谱的可应用区域^[73]。利用单分子 SERS 技术,在单分子水平上实现了对

还原氧化反应和催化反应的实时监测,可用于 指导具有最高催化活性的多相生物催化剂的 设计^[74]。

2.4.1 病毒检测

病毒感染是导致人类发病和死亡的主要原因 之一,给卫生保健系统造成了重大经济成本。SE-RS 技术是一种非常可靠的常规病毒感染快速识 别技术。谱分析统计方法的发展使得人们能够对 同一病毒不同毒株的 SERS 光谱加以区分。例 如,银纳米棒阵列用于 SERS 技术可检测几种致 病性病毒,如腺病毒、鼻病毒和人类免疫缺陷病 毒等[75]。此外,还可以区分不同毒株的甲型流感 病毒^[76]、呼吸道合胞病毒^[61]和轮状病毒^[77]。Oganes Ambartsumyan 课题组于 2021 年, 以多层金底 物制备新型 SERS, 成功识别出浓度为 10^e pfu/ml 的腺病毒和柯萨奇病毒(其中 pfu 是斑块形成单 位,即感染病毒颗粒的数量)[61]。相关研究团队还 使用 SERS 检测方法磁捕获病毒基因组, 使用镀 金的顺磁纳米粒子 (NPs), 其既可用作 SERS 底 物,也可作为从其他成分靶向纯化病毒基因组的 高效方法[78]。而 Saira Nasir 课题组通过 SERS 方





法,采用多元数据分析技术,实现对血液样本中丙型肝炎病毒(HCV)的定性与定量分析,准确率达99%^[75]。采用夹心法对流感病毒进行全病毒捕获和血凝素适配体鉴定。初级适配体附着在SERS底物的金属颗粒上,捕获流感病毒并与具有拉曼活性分子标记的二级适配体结合。捕获流感病毒颗粒后,加入拉曼染料标记的二级适配体(如图8所示,彩图见期刊电子版),使用拉曼染料在生物液中几分钟完成检测,并成功检测到多种A型流感病毒株^[79]。

2.4.2 蛋白质检测

SERS 可以检测蛋白质的内在信号,因此可 以作为一种有效的蛋白质检测方法。PENG Y S 课题组于 2021 年利用 Nb2C 和 Ta2C MXenes 在 电荷转移共振增强和电磁增强的协同作用下,显 著增强 SERS, 准确识别 5×10⁻⁹ M 的 SARS-CoV-2 刺突蛋白,有利于实现新型冠状病毒的实时监测 和预警[80]。随后, 2022 年 DELPHINE 课题组也对 世界范围内快速传播的新冠病毒进行 SERS 检 测, 通过对人体的 SARS-CoV-2 刺突蛋白单链抗 体文库进行生物筛选,获得了结合 SARS-CoV-2 刺突蛋白的单链抗体片段。将单链抗体与磁性纳 米颗粒和 SERS 纳米标记相结合, 形成免疫复合 物,在病毒载体中检测 SARS-CoV-2 刺突蛋白, 30 min 内检测限为 257 fg/mL。同时检测到 B.1. 1.7 (alpha)、B.1.351 (beta) 和 B.1.617.2 (delta) 刺突 蛋白,与冠状病毒 HKU1 刺突蛋白无交叉反应^[81]。 LIU B 课题组基于金银核壳结构的 SERS 纳米标 记和多氯联苯 (PCBS)相结合的生物传感器,实现 具有宽线性动态范围的蛋白质超灵敏检测。结果 表明,该生物传感器对小鼠免疫球蛋白 G(IgG)具 有良好的检测限 672 fg/mL,线性动态检测范围 为 10 pg/mL~10 µg/mL^[82]。然而,由于 SERS 信号 的复杂性和不可靠性,需要对目标蛋白进行纯 化。科研人员在 SERS 的基础上研发直接免疫分 析 (SERSIA) 技术离心,将金纳米颗粒 (GNPs) 均 匀地包裹在目标蛋白上, 与靶蛋白密切接触, 可以 检测到靶蛋白的内在信号,能够在微米范围内对 固定化蛋白进行定量成像[83]。

2.4.3 生物标志物检测

SERS 被认为是一种非常有前途的超灵敏技术,甚至可以检测单个分子,长期以来一直被认为 是一种强大的微量生物标志物分析工具。同步的

癌症生物标志物检测为癌症的早期诊断带来了巨 大希望。在相关检测初期, SERS 单分子生物检 测可用于同时检测多种肝癌相关的 microRNA (miRNA) 生物标志物, 通过合成 3 种高度均匀、 可重复的纳米标记,产生强烈的 SERS 信号,其具 有特征的拉曼光谱。上述结果表明 SERS 纳米标 记具有很高的灵敏度和优良的复用检测能力,在 研究3个目标 miRNA 的同时,通过多重和定量 测定,成功地进行了矩阵分析,检测限在皮摩范围 内^[84]。最近,国内研究团队使用 SERS的检测方法 对外泌体和上清血液中的 microRNA, 通过 Fe₃O₄ @Ag-SERS 辅助增强接受信号, 单基的错配识 别达到 1aM,在这个灵敏度下,可以将胰腺癌与慢 性胰腺炎 (CP) 和正常对照 (NC) 区分开来[85]。随 着新型分析技术的发展,矩阵化生物检测方法 越来越受到人们的重视,采用光子晶体 (PC) 和 SERS 作为两种编码元素,在不同模式下对多重 生物检测进行双重编码。在实践中, PC 微珠和 SERS 纳米标记分别作为载体和标签, 以三明治 形式对抗原进行多重检测。双编码多重生物检 测具有极低的背景和干扰,以及高稳定性和重 复性。定量分析结果表明,该检测系统具有良好 的分析性能和较高的灵敏度。对肿瘤标志物 AFP 和 CEA 的多重检测结果表明,该方法具有灵 敏度高、检测范围广、交叉反应性低的特点1861。

LI 课题组利用 SERS 有序金纳米蜂窝阵列可同时 灵敏检测 3 个或 3 个以上目标。SERS 是一种有 效的分子成像光学形态,由于其固有的性质,生成 的增强拉曼光谱分析物接近纳米粗糙银等贵金属 表面 (Ag) 或金 (Au)。由于化学物质独特的窄指 纹拉曼光谱, SERS 技术为生物医学研究提供了 多参数分子分析和多路复用等具有重要意义的方 法。这些特征增强的拉曼光谱从一个特定的分子 物种可以明确用来识别和量化混合物中的不同 目标^[87]。

2.5 CRISPR(聚簇规则间隔短回文重复)单分 子检测

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short palindromic repeats)序列是一种基于基因组编 辑的技术,目前已被广泛应用于生物学研究中^[88]。 CRISPR 不仅可以用于核酸生物标志物的检测, 以其为基础的特异性高灵敏度酶促报告子解锁 (SHERLOCK)和 DNA内切酶靶向 CRISPR 反式 报告系统 (DETECTR)对检测病毒与细菌核酸也 表现出单分子层次的超高灵敏度(如图 9 所示,彩 图见期刊电子版)^[89]。这些方法灵敏度可以用于 检测特定的阿摩尔单链 DNA 或 RNA 序列和高 特异性的单碱基错配。

基于 CRISPR 的方法也适用于矩阵检测。例 如,使用具有特定切割偏好的不同 Cas 酶进行多



图 9 两种检测病毒 RNA 的 CRISPR 方法^[89]。(a)SHERLOCK 方法; (b)DETECTR 方法 Fig. 9 Two CRISPR methods for detecting viral RNA^[89]. (a) SHERLOCK assay; (b) DETECTR assay 重 SHERLOCK 测定,实现了 4 个 RNA 和 DNA 靶 点的多重检测,保持了在阿摩级范围内的灵敏 度^[90]。SHERLOCK 和 DETECTR 的主要优点是 它们适用于即时诊断。SHERLOCK 已经在基于 纸张的横向流动分析中实现超灵敏的核酸检 测,可以快速检测核酸(小于 90 min),且检测仪器 便于制造。SHERLOCK 更被用于检测血清、唾 液和尿液样本矩阵中的登革热和寨卡病毒^[91]。 SHERLOCK 还因其具有检测单碱基差异的能力, 可用来区分密切相关的病毒株^[92]。该技术还被用 于检测引起宫颈癌的人乳头术瘤病毒 (HPV) 进行检测,响应时间为1h。其他Cas酶与DE-TECTR 配合检测可以提高检测性能,例如Cas14 检测DNA单核苷酸多态性(基因组水平上由单 个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性;SN-Ps)用于检测游离细胞的DNA,可用于癌症的 诊断^[93]。

3 单分子检测方法总结

在这篇综述中,介绍了一些前沿的单分子检 测方法及相关应用,并对文中综述的检测方法的 特点进行汇总(表1)。

	表1 文中不同单	分子生物检测方法的优缺点对比	Ł
Tab. 1 Ad	vantages and disadvantages of	f various methods of single mole	ecule biological detection
lecule methods	Main detection molecules	Main advantages	Main disadvantage

Single molecule methods	Main detection molecules	Main advantages	Main disadvantages
Nanopore	Long and short chains of DNA and RNA, proteins, and polypeptide	Required low sample volume; compact and simple; allows label free detection	Prone to error; high cost
SERS	Virus, protein, biomarkers	High sensitivity; high selectivity	Nonspecific binding with interfering molecule can give false signals
Digital single molecule	Nucleic acid, protein, small molecule	High specificity; quantitative; wide dynamic range	Limited multiplexing capabilities; high cost
WGM	Virus, Protein conformation etc.	High sensitivity; easy to manufacture; low cost	Low specificity, limited to frequency and wavelength
CRISPR	Nucleic acid	Low cost; high efficiency	Not suitable for multiple analyte detection, required sample pretreatment

4 未来展望及总结

不同方法的灵敏度、特异性、动态范围、矩阵 检测和成本对于单分子检测技术都十分重要。单 分子生物检测在生命科学领域具有革命性的突 破,不仅在于对疾病的早期诊断与治疗上,更突出 体现在准确了解潜在生物学机制上。许多检测方 法不能提供足够的敏感性和特异性,单分子生物 检测的目的是可以实现对生物分子的定量分析, 定量是理解反应动力学和生物系统分子动力学的 核心,也是核酸检测、测量从病变细胞分泌到血液 中的蛋白质、测量与神经系统疾病相关的生物标 记物等的核心。在这些技术中,生物传感器对单 个分子表现出较高的灵敏度和选择性。基于单分 子检测的方法都具有各自的优势,虽然这些检测 方法或系统得到了优秀的实验结果,大幅提高了 原有的灵敏度与分辨率,但还存在很多需要突破 的关键方向,比如,待测分子的实时量化、生物体 内或细胞内的生物传感、多路复用能力、不同生 物分子检测的通用性、检测速率等仍存在局限性。 这是未来能够让人们对生命科学有更深认识的关 键,需要科研人员共同努力继续优化,解决尚存的 问题,以应用、实用为主,实现多种正交技术的分析。

参考文献:

- [1] HALL C E. Method for the observation of macromolecules with the electron microscope illustrated with micrographs of DNA[J]. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1956, 2(5): 625-628.
- [2] ROTMAN B. Measurement of activity of single molecules of β -D-galactosidase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1961, 47(12): 1981-1991.
- [3] MILLER H, ZHOU ZH K, SHEPHERD J, *et al.*. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications [J]. *Reports on Progress in Physics*, 2018, 81(2): 024601.
- [4] HIRSCHFELD T. Optical microscopic observation of single small molecules [J]. Applied Optics, 1976, 15(12): 2965-

891

2966.

- [5] GELLES J, SCHNAPP B J, SHEETZ M P. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision[J]. *Nature*, 1988, 331(6155): 450-453.
- [6] ORRIT M, BERNARD J. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal[J]. *Physical Review Letters*, 1990, 65(21): 2716-2719.
- [7] KNEIPP K, WANG Y, KNEIPP H, et al.. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)[J]. *Physical Review Letters*, 1997, 78(9): 1667-1670.
- [8] LU H P, XUN L, XIE X S. Single molecule enzymatic dynamics [J]. Science, 1998, 282(5395): 1877-1882.
- [9] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [10] KOREN S, SCHATZ M C, WALENZ B P, et al.. Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads [J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(7): 693-700.
- [11] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al.. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [12] FUXREITER M, VENDRUSCOLO M. Generic nature of the condensed states of proteins[J]. Nature Cell Biology, 2021, 23(6): 587-594.
- [13] WANG Y Q, GUAN X Y, ZHANG S Y, et al.. Structural-profiling of low molecular weight RNAs by nanopore trapping/translocation using *Mycobacterium smegmatis* porin A[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3368.
- [14] RUAN J B, XIA SH Y, LIU X, et al.. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore[J]. Nature, 2018, 557(7703): 62-67.
- [15] WANG J Z, HU M J, WANG J, et al.. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity [J]. Science, 2019, 364(6435): eaav5870.
- [16] LANGECKER M, ARNAUT V, MARTIN T G, et al.. Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures [J]. Science, 2012, 338(6109): 932-936.
- [17] KASIANOWICZ J J, BRANDIN E, BRANTON D. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(24): 13770-13773.
- [18] CHAVIS A E, BRADY K T, HATMAKER G A, et al.. Single molecule nanopore spectrometry for peptide detection[J]. ACS Sensors, 2017, 2(9): 1319-1328.
- [19] RAHMAN M M, SAMPAD M J N, HAWKINS A, et al.. Recent advances in integrated solid-state nanopore sensors [J]. Lab on a Chip, 2021, 21(16): 3030-3052.
- [20] MACCAFERRIN, BARBILLON G, KOYAAN, *et al.*. Recent advances in plasmonic nanocavities for single-molecule spectroscopy [J]. *Nanoscale Advance*, 2021, 3(3): 633-642.
- [21] ASSAD O N, GILBOA T, SPITZBERG J, et al.. Light-enhancing plasmonic-nanopore biosensor for superior singlemolecule detection [J]. Advanced Materials, 2017, 29(9): 1605442.
- [22] BUCHFINK B, REUTER K, DROST H G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(4): 366-368.
- [23] BELLENGUEZ C, KÜÇÜKALI F, JANSEN I E, et al.. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias [J]. Nature Genetics, 2022, 54(4): 412-436.
- [24] DEVESON I W, GONG B SH, LAI K, *et al.*. Evaluating the analytical validity of circulating tumor DNA sequencing assays for precision oncology[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(9): 1115-1128.
- [25] BRINKERHOFF H, KANG A S W, LIU J Q, *et al.*. Infinite re-reading of single proteins at single-amino-acid resolution using nanopore sequencing[J]. *BioRxiv*, 2021, doi: 10.1126/science.abl4381.
- [26] SEN P, GUPTA M. Single nucleotide detection using bilayer MoS₂ nanopores with high efficiency[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(11): 6114-6123.
- [27] YAMAZAKI H, HU R, ZHAO Q, *et al.*. Photothermally assisted thinning of silicon nitride membranes for ultrathin asymmetric nanopores [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(12): 12472-12481.
- [28] BURCK N, GILBOA T, GADI A, et al.. Nanopore identification of single nucleotide mutations in circulating tumor DNA by multiplexed ligation[J]. Clinical Chemistry, 2021, 67(5): 753-762.

[29] YUAN B, LI SH, YING Y L, et al.. The analysis of single cysteine molecules with an aerolysin nanopore[J]. Analyst,

[30]	PIGUET F, OULDALI H, PASTORIZA-GALLEGO M, et al Identification of single amino acid differences in
	uniformly charged homopolymeric peptides with aerolysin nanopore [J]. <i>Nature Communications</i> , 2018, 9(1): 966.
[31]	CAO C, CIRAUQUI N, MARCAIDA M J, et al Single-molecule sensing of peptides and nucleic acids by engineered
	aerolysin nanopores [J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-11.
[32]	ZHANG SH L, HUANG G, VERSLOOT R C A, et al Bottom-up fabrication of a proteasome-nanopore that unravels
	and processes single proteins [J]. <i>Nature Chemistry</i> , 2021, 13(12): 1192-1199.
[33]	LI M Y. YING Y L. YU J. <i>et al.</i> , Revisiting the origin of nanopore current blockage for volume difference sensing at the
	atomic level [J]. JACS Au. 2021, 1(7): 967-976.
[34]	LEIRS K KUMAR P T DECROP D <i>et al</i> Bioassay development for ultrasensitive detection of influenza a
	nucleonrotein using digital ELISA [1] Analytical Chemistry 2016 88(17): 8450-8458
[35]	SHAFAGH R Z DECROP D VEN K <i>et al.</i> Reaction injection molding of hydrophilic-in-hydrophobic femtolitre-well
	arrays[1] Microsystems & Nanoengineering 2019 5: 25
[36]	RISSIN D M WALT D R Digital readout of target hinding with attomole detection limits via enzyme amplification in
[30]	femtoliter arrays[1] Journal of the American Chemical Society 2006 128(19): 6286-6287
[37]	RISSIN D M KAN C W CAMPRELLT G at al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum
[]]	proteins at subfamtomolar concentrations [1] Nature Biotechnology 2010, 28(6): 505, 500
[20]	LEE L CRAMPTON K T. TALLAPIDA N. at al. Visualizing vibrational normal modes of a single molecule with
[30]	etemically confined light[1] Nature 2010 569(7750); 78.92
[20]	atomically commed $\operatorname{ight}[J]$. Nature, 2019, 308(7/30). 78-82.
[39]	On the langlose 2021, 105(0): 1202, 1206
[40]	UNDSON D. L. NESS K. D. MASOUELIER D. A. et al. High throughout droubt digital DCD system for shashits.
[40]	minDSON B J, NESS K D, MASQUELIEK D A, <i>et al.</i> . High-unoughput diopiet digital FCK system for absolute
[41]	quantitation of DNA copy number [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8004-8010.
[41]	CHEN Y J, QIAN CH, LIU CH ZH, <i>et al.</i> . Nucleic acid amplification free biosensors for pathogen detection[J].
[40]	Biosensors and Bioelectronics, 2020, 153: 112049.
[42]	GINES G, MENEZES R, NARA K, <i>et al.</i> . Isothermal digital detection of microRNAs using background-free molecular $\frac{1}{10000000000000000000000000000000000$
[42]	circuit[J]. Science Advances, 2020, 6(4): eaay5952.
[43]	COHEN L, HARIMAN M R, AMARDEY-WELLINGTON A, <i>et al.</i> . Digital direct detection of microkinas using $\frac{1}{2}$
[4 4]	single molecule arrays [J]. <i>Nucleic Acids Research</i> , 2017, 45(14): e137.
[44]	ASHION N J, LEUZY A, KARIKARI I K, <i>et al.</i> . The validation status of blood biomarkers of amyloid and phospho-
	tau assessed with the 5-phase development framework for AD biomarkers[J]. European Journal of Nuclear Medicine
[4]]	and Molecular Imaging, 2021, 48(7): 2140-2156.
[45]	GILL J, LATOUR L, DIAZ-ARRASTIA R, <i>et al.</i> . Ghal fibrillary acidic protein elevations relate to neuroimaging
F 4 4 7	abnormalities after mild TBI[J]. <i>Neurology</i> , 2018, 91(15): e1385-e1389.
[46]	THELIN E, AL NIMER F, FROSTELL A, <i>et al.</i> . A serum protein biomarker panel improves outcome prediction in
[4 77]	human traumatic brain injury [J]. Journal of Neurotrauma, 2019, 36(20): 2850-2862.
[47]	PEREZ-RUIZ E, DECROP D, VEN K, et al Digital ELISA for the quantification of attomolar concentrations of
F 4 0 7	Alzheimer's disease biomarker protein Tau in biological samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1015: 74-81.
[48]	DINH T L, NGAN K C, SHOEMAKER C B, <i>et al.</i> . Rapid and ultrasensitive detection of botulinum neurotoxin serotype
F 7	A1 in human serum and urine using single-molecule array method[J]. <i>Forensic Toxicology</i> , 2017, 35(1): 179-184.
[49]	WANG X, COHEN L, WANG J, et al Competitive immunoassays for the detection of small molecules using single
	molecule arrays[J]. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 2018, 140(51): 18132-18139.
[50]	KIM E, BAASKE M D, VOLLMER F. Towards next-generation label-free biosensors: recent advances in whispering
	gallery mode sensors $\lfloor J \rfloor$. Lab on a Chip, 2017, 17(7): 1190-1205.
[51]	SUBRAMANIAN S, VINCENT S, VOLLMER F. Effective linewidth shifts in single-molecule detection using optical
	whispering gallery modes[J]. <i>Applied Physics Letters</i> , 2020, 117(15): 151106.
[52]	SANTIAGO-CORDOBA M A, CETINKAYA M, BORISKINA S V, et al Ultrasensitive detection of a protein by
	optical trapping in a photonic-plasmonic microcavity[J]. <i>Journal of Biophotonics</i> , 2012, 5(8-9): 629-638.

2020, 145(4): 1179-1183.

- [53] YU W Y, JIANG W C, LIN Q, et al.. Cavity optomechanical spring sensing of single molecules[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12311.
- [54] BAILEY R C, WASHBURN A L, QAVI A J, *et al.*. A robust silicon photonic platform for multiparameter biological analysis[J]. *Proceedings of SPIE*, 2009, 7220: 72200N.
- [55] SHI H X, CUI J J, SULEMANA H, *et al.*. Protein detection based on rolling circle amplification sensors[J]. *Luminescence*, 2021, 36(4): 842-848.
- [56] NITU F R, SAVU L, MURARU S, et al.. Label-free homogeneous microRNA detection in cell culture medium based on graphene oxide and specific fluorescence quenching[J]. Nanomaterials, 2021, 11(2): 368.
- [57] VOLLMER F, ARNOLD S, KENG D. Single virus detection from the reactive shift of a whispering-gallery mode[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20701-20704.
- [58] CARDENOSA-RUBIO M C, ROBISON H M, BAILEY R C. Recent advances in environmental and clinical analysis using microring resonator–based sensors[J]. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2019, 10: 38-46.
- [59] SHAO L B, JIANG X F, YU X CH, *et al.*. Detection of single nanoparticles and lentiviruses using microcavity resonance broadening[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(39): 5616-5620.
- [60] DOMINGUEZ I, DEL VILLAR I, FUENTES O, et al.. Dually nanocoated planar waveguides towards multi-parameter sensing[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3669.
- [61] COGNETTI J S, STEINER D J, ABEDIN M, *et al.*. Disposable photonics for cost-effective clinical bioassays: application to COVID-19 antibody testing[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(15): 2913-2921.
- [62] ROBISON H M, ESCALANTE P, VALERA E, et al.. Precision immunoprofiling to reveal diagnostic signatures for latent tuberculosis infection and reactivation risk stratification[J]. *Integrative Biology*, 2019, 11(1): 16-25.
- [63] YU X CH, TANG SH J, LIU W J, *et al.*. Single-molecule optofluidic microsensor with interface whispering gallery modes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(6): e2108678119.
- [64] KIM E, BAASKE M D, VOLLMER F. In situ observation of single-molecule surface reactions from low to high affinities [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(45): 9941-9948.
- [65] KIM E, BAASKE M D, SCHULDES I, et al.. Label-free optical detection of single enzyme-reactant reactions and associated conformational changes[J]. Science Advances, 2017, 3(3): e1603044.
- [66] SUBRAMANIAN S, JONES H B L, FRUSTACI S, et al.. Sensing enzyme activation heat capacity at the singlemolecule level using gold-nanorod-based optical whispering gallery modes[J]. ACS Applied Nano Materials, 2021, 4(5): 4576-4583.
- [67] AMBARTSUMYAN O, GRIBANYOV D, KUKUSHKIN V, et al. SERS-based biosensors for virus determination with oligonucleotides as recognition elements [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3373.
- [68] FLEISCHMANN M, HENDRA P J, MCQUILLAN A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. Chemical Physics Letters, 1974, 26(2): 163-166.
- [69] LI W Y, CAMARGO P H C, LU X M, et al.. Dimers of silver nanospheres: facile synthesis and their use as hot spots for surface-enhanced Raman scattering[J]. Nano Letters, 2009, 9(1): 485-490.
- [70] BLACKIE E J, LE RU E C, ETCHEGOIN P G. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(40): 14466-14472.
- [71] LINDQUIST N C, DE ALBUQUERQUE C D L, SOBRAL-FILHO R G, et al.. High-speed imaging of surfaceenhanced Raman scattering fluctuations from individual nanoparticles [J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(10): 981-987.
- [72] LI ZH Y. Mesoscopic and microscopic strategies for engineering Plasmon-enhanced Raman scattering[J]. *Advanced Optical Materials*, 2018, 6(16): 1701097.
- [73] YAMPOLSKY S, FISHMAN D A, DEY S, et al.. Seeing a single molecule vibrate through time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(8): 650-656.
- [74] ZHANG K, LIU Y J, WANG Y N, et al.. Direct SERS tracking of a chemical reaction at a single 13 nm gold nanoparticle[J]. Chemical Science, 2019, 10(6): 1741-1745.
- [75] NASIR S, MAJEED M I, NAWAZ H, *et al.*. Surface enhanced Raman spectroscopy of RNA samples extracted from blood of hepatitis C patients for quantification of viral loads[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, 33:

102152.

- [76] CHEN H, PARK S G, CHOI N, et al.. SERS imaging-based aptasensor for ultrasensitive and reproducible detection of influenza virus A[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 167: 112496.
- [77] CHAUHAN N, SAXENA K, TIKADAR M, *et al.*. Recent advances in the design of biosensors based on novel nanomaterials: an insight[J]. *Nanotechnology and Precision Engineering*, 2021, 4(4): 045003.
- [78] NGUYEN H A, JUPIN I, DECORSE P, et al.. Assembly of gold nanoparticles using turnip yellow mosaic virus as an insolution SERS sensor [J]. RSC Advances, 2019, 9(55): 32296-32307.
- [79] KUKUSHKIN V I, IVANOV N M, NOVOSELTSEVA A A, *et al.*. Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0216247.
- [80] PENG Y S, LIN C L, LONG L, *et al.*. Charge-transfer resonance and electromagnetic enhancement synergistically enabling MXenes with excellent SERS sensitivity for SARS-CoV-2 S protein detection [J]. *Nano-Micro Letters*, 2021, 13: 52.
- [81] ANTOINE D, MOHAMMADI M, VITT M, et al.. Rapid, point-of-care scFv-SERS assay for femtogram level detection of SARS-CoV-2[J]. ACS Sensors, 2022, 7(3): 866-873.
- [82] LIU B, ZHENG SH Y, LI H T, *et al.*. Ultrasensitive and facile detection of multiple trace antibiotics with magnetic nanoparticles and core-shell nanostar SERS nanotags[J]. *Talanta*, 2022, 237: 122955.
- [83] SHIN H, OH S, KANG D, et al.. Protein quantification and imaging by surface-enhanced Raman spectroscopy and similarity analysis [J]. Advanced Science, 2020, 7(11): 1903638.
- [84] ZHOU W, TIAN Y F, YIN B CH, et al.. Simultaneous surface-enhanced Raman spectroscopy detection of multiplexed microRNA biomarkers[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(11): 6120-6128.
- [85] PANG Y F, WANG CH G, LU L CH, et al.. Dual-SERS biosensor for one-step detection of microRNAs in exosome and residual plasma of blood samples for diagnosing pancreatic cancer[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 130: 204-213.
- [86] NING C F, WANG L Y, TIAN Y F, et al.. Multiple and sensitive SERS detection of cancer-related exosomes based on gold–silver bimetallic nanotrepangs[J]. Analyst, 2020, 145(7): 2795-2804.
- [87] LI L, LIU CH, CAO X W, *et al.*. Multiplexing determination of cancer-associated biomarkers by surface-enhanced Raman scattering using ordered gold nanohoneycomb arrays[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(20): 1561-1572.
- [88] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, *et al.*. Natural products in drug discovery: advances and opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 200-216.
- [89] CARTER L J, GARNER L V, SMOOT J W, et al.. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis [J]. ACS Central Science, 2020, 6(5): 591-605.
- [90] DE PUIG H, LEE R A, NAJJAR D, *et al.*. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants [J]. *Science Advances*, 2021, 7(32): eabh2944.
- [91] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, *et al.*. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [92] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, *et al.*. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [93] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, *et al.*. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.

作者简介:



周文超(1987—), 男, 山东德州人, 博 士, 博士生导师, 2014年于中国科学 院长春光学精密机械与物理研究所获 得博士学位, 主要研究方向为高灵敏 度光学生物检测。E-mail: zhouvc@ciomp. ac.cn



李政昊(1995—),男,吉林榆树人,硕 士研究生,2019年于延边大学获得学 士学位,主要研究方向为光学生物检 测为基础的微流控芯片设计及工艺研 究。E-mail: zhenghlee@163.com