

• 综 述 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 14. 025

表面增强拉曼光谱在呼吸道病毒检测中的研究进展^{*}

姜 恒¹, 张 哲², 江 申²综述, 董 妥^{1△}审校

1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院卫生微生物学教研室, 黑龙江哈尔滨 150081;

2. 哈尔滨医科大学药学院药物分析学教研室, 黑龙江哈尔滨 150081

摘 要:传统的呼吸道病毒检测方法具有需要预处理、耗时长、操作复杂等弊端,面对新发、突发呼吸道病毒感染,现有检测技术愈发难以满足需求。因此,开发新型呼吸道病毒检测技术,对阻断病毒传播、降低感染率及病死率具有重要意义。表面增强拉曼光谱是一种拥有巨大潜力的新型检测技术,基于其高特异度、超快速、高灵敏度及不需要复杂预处理等优势,在生命科学领域内广泛应用。该文从利用表面增强拉曼光谱技术对数种常见呼吸道病毒进行检测的现状与研究进展展开综述,以期新型呼吸道病毒检测技术的研发提供新思路。

关键词:表面增强拉曼光谱; 呼吸道病毒; 病毒检测

中图法分类号:O657.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)14-2096-04

Research progress of surface-enhanced Raman spectroscopy in respiratory virus detection^{*}

JIANG Heng¹, ZHANG Zhe², JIANG Shen², DONG Tuo^{1△}

1. Department of Health Microbiology, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China

Abstract: Traditional respiratory virus detection methods have the disadvantages of requiring pretreatment, long time consuming, and complex operation. In the face of new and sudden respiratory virus infections, it is increasingly difficult for existing detection techniques to meet the needs. Therefore, the development of new respiratory virus detection technology is of great significance for blocking the transmission of the virus and reducing the infection rate and mortality rate. Surface-enhanced Raman spectroscopy is a new detection technology with great potential. Based on its advantages of high specificity, ultra-fast, high sensitivity and no complex pretreatment, it is widely used in the field of life sciences. This article reviews the current status and research progress of surface-enhanced Raman spectroscopy for the detection of several common respiratory viruses, in order to provide new ideas for the development of new respiratory virus detection technology.

Key words: surface-enhanced Raman spectroscopy; respiratory viruses; virus detection

呼吸道感染常由多种病原体,包括病毒、细菌、支原体等引起^[1],其中呼吸道病毒或直接、或作为增效病原体、或作为辅助因素参与呼吸道感染的发生和发展^[2]。常见的呼吸道病毒包括流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒及引发全球大流行的新型冠状病毒等。由于呼吸道病毒传染性强、传播途径广且缺乏特效药物^[3],因此,早检测、早诊断是阻断呼吸道病毒传播的重要手段。传统的分离培养虽在准确性和权威性方面有绝对优势,但因操作繁杂、耗时较长及生物安全风险等缺点^[4],无法满足临床检测需求。现阶段主要使用的检测方法包括核酸检测及免疫学检测,均存在需配备专业实验室、人员需经过专业培训、成本过高、耗时过长等特点^[5],已无法满足日益增长的呼吸道病毒大规模现场快速检测需求。因此,新型呼吸道病毒

检测技术的研发迫在眉睫。表面增强拉曼光谱(SERS)作为一种已在多领域应用的重要光谱学检测技术^[6-7],具有优良的灵敏度和特异度^[8],具备成为一种大规模呼吸道病毒快速检测新技术的潜力。拉曼散射是指当光照射到物质上发生散射时,波长发生变化的散射光被称为拉曼散射。波长发生改变的原因是光子与被照射物质分子间发生能量转移后,分子振动能级发生了改变^[9],而光子在不同物质上发生拉曼散射时转移的能量不同,就可特异性识别被照射物质种类。而 SERS 技术则是在普通拉曼散射的基础上将被照射物质贴附于粗糙贵金属表面,使拉曼信号强度获得极大提升。目前, SERS 增强机制主要包括物理增强和化学增强。物理增强主要依靠电磁场增强^[10];化学增强主要依靠非共振增强、共振增强及类

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(32000137)。△通信作者, E-mail: dongtuo@hrbmu.edu.cn。

共振增强^[11]。在普通拉曼散射固有的无损分析、不受水成分影响、样品不需要复杂处理、检测速度快、使用便携式仪器可进行现场分析等优势基础上, SERS 技术具有更高的灵敏度, 在某些条件下可以达到单分子检测水平。本文利用 SERS 技术对以新型冠状病毒、腺病毒、流感病毒为代表的多种呼吸道病毒进行检测的研究进展及应用作一综述, 为寻求更理想的呼吸道病毒检测方法提供可行的研究思路。

1 SERS 在新型冠状病毒检测中的应用

新型冠状病毒是第 7 种可感染人类的冠状病毒类型^[12], 由于其传染性极强且尚无具有明确效果的治疗药物^[13], 因此, 开发一种超快速、高灵敏的新型检测方法尤为重要。乐玮等^[14]利用金纳米颗粒(Au NPs)对新型冠状病毒的刺突蛋白进行了无标记 SERS 检测, 带负电的羧基基团与 Au NPs 表面吸附的柠檬酸根离子产生竞争吸附而发生分子增强, 氨基则与 Au NPs 发生了电磁增强效应, 使新型冠状病毒的刺突蛋白拉曼信号明显增强, 其最低检测下限达到 1 mmol/L。乐玮等^[14]方法不同于以病毒核酸或抗体为靶点进行检测, 而是从病毒抗原蛋白入手, 与目前常用的荧光定量聚合酶链反应技术比较, 该新型检测技术耗时更短; 与胶体金试纸法比较则避免了出现假阴性误判的问题。ZHANG 等^[15]开发了一种基于新型的油/水/油三相液-液界面自组装工艺的超灵敏生物传感器以检测未处理唾液中的新型冠状病毒, 利用上述工艺将两层 Au NPs 固定在硅晶片上形成 SERS 活性基底, 再将特异性刺突蛋白抗体偶联到基底上以捕获刺突蛋白, 并使用拉曼报告分子标记的银纳米颗粒(Ag NPs)作为标记来识别抗原的种类和浓度。这种夹层免疫结构自组装方式使纳米颗粒单层具有良好的均匀性和重复性, 保证 SERS 检测的高灵敏度、稳定性和重复性。LEONG 等^[16]设计了一款基于 SERS 的手持式新型冠状病毒检测仪, 其内包含了搭载 3 组 SERS 探针分子(分别为 2-巯基苯甲酸、4-巯基吡啶和三磷酸腺苷)的芯片, SERS 探针分子附着于 Ag NPs 表面。被检者向设备呼气 10 s 左右, 由于呼气中的新型冠状病毒生物标志物会与传感器发生化学反应, 故可根据 SERS 信号的变化对反应后的化合物进行表征。在医院和机场对 501 人进行的新型冠状病毒现场检测结果表明, LEONG 等^[16]设计的检测方法的假阴性率为 3.8%, 假阳性率为 0.1%, 这与聚合酶链反应检测的准确性相当, 但费用更低, 可在 5 min 内完成检测。此外, LEONG 等^[16]设计的仪器不仅可检测生物源挥发性有机物种类改变, 还可用于筛查其他类型呼吸道感染。

为满足超快速、高灵敏、低成本的检测需求, 无标记直接捕获病毒粒子本身 SERS 信号显得尤为重要。ZHANG 等^[17]采用硼氢化钠作为还原剂制备 Ag NPs, 不仅可避免柠檬酸钠本身的杂峰信号, 而且还会

阻止 Ag NPs 表面氧化银的形成, 以增强其与病毒表面氨基的结合, 硼氢化钠还可以诱导 Ag NPs 聚集成热点, 明显增强病毒粒子的拉曼信号, 最低检测下限可达 10 copy/mL。此外, 可通过主成分分析方法, 利用 SERS 技术无标记鉴别唾液及血清中的新型冠状病毒、H1N1 流感病毒、人腺病毒, 具有较好的临床应用前景。

2 SERS 在流感病毒检测中的应用

流感病毒具有较高的传染性和突变率, 可造成季节性流行甚至全球性大流行, 给公共健康带来沉重负担^[18]。因此, 需要探索一种较常规的、更加准确敏捷的流感病毒检测方法, 以便在流感暴发前通过及时、准确的检测来遏制其蔓延。将 SERS 技术应用到流感病毒检测这一方向已有诸多研究, CHEN 等^[19]开发了一种基于 SERS 的双模 DNA 适配体传感器, 可实现对 H1N1 流感病毒的快速诊断与鉴别诊断, 该传感器装配了包裹有 H1N1 流感病毒特异性 DNA 适配体的罂粟花状 Au NPs, 当流感病毒靠近传感器时, 相应的 DNA 适配体与病毒结合, Au NPs 选择性地脱离底物, 使报告分子峰强度发生改变, 此外, 该传感器还能够定量评估流感病毒浓度且不受交叉反应的影响。KIM 等^[20]开发了一种针对流感病毒 H275Y 耐药突变株(pH1N1)的 SERS 检测免疫探针。将可与突变株特异性结合的 6E3 抗体包被在 Au NPs 表面, 当探针与 pH1N1 毒株结合后, 其会在纳米颗粒和基板之间形成热点, 可明显增强报告分子的 SERS 特征峰强度, 且特征峰强度与病毒浓度呈正相关。利用 KIM 等^[20]的检测方法可在人鼻咽部抽吸物中捕获到 pH1N1 毒株的 SERS 信号, 说明该技术在诊断耐药突变毒株感染方面具有应用潜力。此外, 吴佳岂^[21]将免疫磁珠与 SERS 技术联合, 通过 H5N1 亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体与链霉亲和素磁珠偶联制备成免疫磁珠, 与 Au NPs 分别组合成“一抗三明治”和“双抗夹心式”两种结构。其中, 利用“双抗夹心式”结构的增强基底对 H5N1 亚型禽流感的最低检测下限可达 6×10^3 copy/ μ L, 具有高特异度、高稳定性、高灵敏度的优势, 并且可在 1 h 内快速完成检测。WANG 等^[22]利用 SERS-侧流免疫层析技术, 将 Fe_3O_4 包被的 Ag NPs 作为磁性材料, 特异性地识别和磁性富集溶液中的 H1N1 流感病毒。基于此, 磁性 SERS 试纸条可直接用于真实的临床标本检测, 而不需要任何预处理步骤。WANG 等^[22]的研究方法针对 H1N1 病毒的最低检测下限可达 50 PFU/mL, 相对于传统胶体金抗原检测法提高了 2 000 倍, 是一种可用于病毒感染早期诊断的潜在工具。

3 SERS 在腺病毒检测中的应用

腺病毒可在儿童和成人中引起多种疾病, 主要影响呼吸系统、眼睛和消化系统, 是呼吸道感染的主要病原体之一^[23]。近年来, 我国多出现呼吸道腺病毒

的局部暴发^[24],尤其是在学校、军队等聚集人群中,腺病毒的危害更加明显^[25]。刘真真等^[26]利用基于双层拉曼分子 2-硝基苯甲酸修饰的银包金纳米颗粒构建了拉曼报告分子-抗原-抗体特异性结合的“三明治”夹心结构,结合 SERS-侧流免疫层析技术可在 15 min 内对人腺病毒实现高灵敏检测。同时,由于刘真真等^[26]研究的方法具有较高的稳定性,其定量范围可达 0.1~1 000.0 ng/mL,理论最低检测下限为 0.1 ng/mL,可视化最低检测下限为 10.0 ng/mL。此外,利用刘真真等^[26]研究的增强基底还将腺病毒与包括登革热病毒、黄热病毒、西尼罗河病毒、寨卡病毒、埃博拉病毒在内的 5 种新发传染病病原体进行特异性鉴定,结果表明,基于 SERS-侧流免疫层析技术的检测方法具有高度特异性,不存在交叉反应。作者认为,刘真真等^[22]研究的检测方法耗时短、操作简单、成本低,在腺病毒的现场快速检测领域有巨大应用潜力。张晓蕾^[27]设计了一种“莲藕状”的增强基底,通过将 PS 材质的球体进行刻蚀,得到适合病毒尺寸的微纳结构,克服了传统纳米颗粒“热点”较小而无法包裹腺病毒的弊端。由于张晓蕾^[27]设计的增强基底的中空结构内存在较多“热点”,且病毒在随机扩散的过程中会优先进入微纳结构,因此其 SERS 信号会明显增强。利用张晓蕾^[27]设计的结构阵列,作者成功捕获了人 5 型腺病毒,相对于传统的金膜基底在灵敏度上有了明显提升。CHOI 等^[28]设计了一种联合液滴沉积技术的 SERS 检测平台(DCD-SERS),利用该方法检测对诸如泪液等生物流体中的蛋白质进行组学分析。DCD-SERS 技术具有高重复性、噪声独立性及均匀性等特点,用来检测生物流体中是否存在腺病毒时,其拉曼位移核心区域内(1 242~1 342 波数)的检测灵敏度及特异度均为 100%。配合主成分分析,在不需要其他标签或化学修饰的情况下即可实现高化学结构检测灵敏度,使 SERS 技术成为腺病毒早期诊断的理想选择。

4 SERS 在其他呼吸道病毒检测中的应用

呼吸道合胞病毒具有较强的传染性,是婴幼儿急性呼吸道感染的主要原因,可引起细支气管炎和肺炎等严重下呼吸道感染^[29]。詹蕾^[30]构建了以酶反应产物为报告分子的 SERS 免疫分析技术,该技术以免疫学检测原理为基础,构建了病毒-抗体-辣根过氧化物酶标记二抗的“三明治”免疫结构。辣根过氧化物酶经过过氧化氢催化形成 TMB+,通过静电吸附作用吸附至带有负电荷的 Ag NPs 表面,并产生强烈的 SERS 信号。相比传统的免疫学检测方法,SERS 免疫分析技术对呼吸道合胞病毒检测的灵敏度提高了 50 倍。ZHAN 等^[31]也利用了相似的原理对呼吸道合胞病毒进行检测,其检测下限为 0.05 pg/mL,相对于比色法的灵敏度提高了 20 倍。

针对多种呼吸道病毒的高通量检测,ZHANG

等^[32]开发了一种基于 SERS 纳米标签的侧流微阵列技术,该 SERS 纳米标签标记编码包括副流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒在内的 11 种常见呼吸道病毒的核酸序列,因为标签的 SERS 信号放大效应及硝化纤维素膜的高表面积体积比,所以能在一个侧向流动微阵列上实现对 11 种病原体的高通量快速定量,且具有广泛的线性动态范围 $[(1\sim5)\times10^4\text{ pmol/L}]$ 和超高的灵敏度(最低可达 0.03 pmol/L)。

5 小 结

随着 SERS 技术的发展,目前将其应用在检测方面主要有 3 种思路:(1)将特异性的核酸序列、抗体附着在纳米颗粒表面构成 SERS 标签,使在复杂体液中准确检测呼吸道病毒成为可能;(2)利用新型增强基底制备技术,使纳米颗粒间“热点”的尺寸更适合于病毒颗粒本身,在提高检测效率、降低检测成本的同时,有效避免了唾液、血液等生物背景对检测结果的干扰;(3)与其他检测技术联合应用,例如 SERS-色谱联合应用技术,可以将 SERS 增强基底组装到光纤上作为高灵敏的检测传感器。而 SERS 与等离子体传感结合,可用于生物分子相互作用的高灵敏度的定量检测。SERS 技术克服了普通拉曼光谱信号较弱的缺点,从而获得普通拉曼光谱不易得到的结构信息。基于其具有的高灵敏度、高特异度、非侵入性、高稳定性及出色的高通量检测能力等优势,SERS 技术在呼吸道病毒检测方面有巨大的应用潜力。

SERS 技术的优势决定了其迅速发展的必然性,但目前尚有一定的技术瓶颈有待突破:在病毒检测方面,仍在探索如何实现病毒颗粒的高效捕捉,解决因纳米颗粒“热点”与病毒间大小差异所致的检测可靠性较差问题。对于日益兴起的无标签 SERS 检测,虽然消除了设计特异性标签的成本,且具有良好的普适性,但尚需要结合其他技术,如深度学习、机器学习等以保证其特异性区分能力。此外,将增强基底材质拓宽到金、银以外的非贵金属体系以降低成本及如何构建增强效果更好的特殊结构纳米颗粒等研究还有待深入。

综上所述,SERS 技术在呼吸道病毒超快速、高灵敏度检测应用上具有巨大潜力,但仍然需要不断将技术完善成熟。

参考文献

- [1] NIEDERMAN M S, TORRES A. Respiratory infections[J]. Eur Respir Rev, 2022, 31(166): 220150.
- [2] SALAZAR F, BIGNELL E, BROWN G D, et al. Pathogenesis of respiratory viral and fungal coinfections[J]. Clin Microbiol Rev, 2022, 35(1): e0009421.
- [3] WANG C, PRATHER K A, SZNITMAN J, et al. Airborne transmission of respiratory viruses[J]. Science, 2021, 373(6558): eabd9149.

- [4] LU S, LIN S, ZHANG H R, et al. Methods of respiratory virus detection: advances towards point-of-care for early intervention[J]. *Micromachines*, 2021, 12(6): 697.
- [5] ZHANG Z W, MA P, AHMED R, et al. Advanced point-of-care testing technologies for human acute respiratory virus detection[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(1): e2103646.
- [6] HE J F, LI X, LI J M. Facile construction of silver nanocubes/graphene oxide composites for highly sensitive SERS detection of multiple organic contaminants by a portable Raman spectrometer[J]. *J Environ Chem Eng*, 2022, 10(5): 108278.
- [7] WANG K Q, LI J J. Reliable SERS detection of pesticides with a large-scale self-assembled Au@4-MBA@Ag nanoparticle array[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 263: 120218.
- [8] SRIVASTAV S, DANKOV A, ADANALIC M J, et al. Rapid and sensitive SERS-based lateral flow test for SARS-CoV2-specific IgM/IgG antibodies[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(36): 12391-12399.
- [9] WANG L Y, WANG X K, CHENG L, et al. SERS-based test strips: principles, designs and applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 189: 113360.
- [10] ARMANDAS B, YOSHIKI N, SIVASHANKAR K, et al. From fundamental toward applied SERS: shared principles and divergent approaches[J]. *Adv Opt Mater*, 2018, 6(16): 1800292.
- [11] TRIVEDI D J, BARROW B, SCHATZ G C. Understanding the chemical contribution to the enhancement mechanism in SERS; connection with hammett parameters[J]. *J Chem Phys*, 2020, 153(12): 124706.
- [12] KESHEH M M, HOSSEINI P, SOLTANI S, et al. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses[J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(2): e2282.
- [13] BENAMEUR N, MAHMOUDI R, ZAID S, et al. SARS-CoV-2 diagnosis using medical imaging techniques and artificial intelligence: a review[J]. *Clin Imaging*, 2021, 76: 6-14.
- [14] 乐玮, 黄景林, 羊强, 等. 新型冠状病毒 S 蛋白在金纳米粒子中的表面增强拉曼效应[J]. *强激光与粒子束*, 2021, 33(11): 193-196.
- [15] ZHANG M L, LI X D, PAN J L, et al. Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein in untreated saliva using SERS-based biosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 190: 113421.
- [16] LEONG S X, LEONG Y X, TAN E X, et al. Noninvasive and point-of-care surface-enhanced raman scattering (SERS)-based breathalyzer for mass screening of coronavirus disease 2019 (COVID-19) under 5 min[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(2): 2629-2639.
- [17] ZHANG Z, JIANG S, WANG X T, et al. A novel enhanced substrate for label-free detection of SARS-CoV-2 based on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2022, 359: 131568.
- [18] TIM K T, LINCOLN L H L, SIMON C, et al. Household transmission of influenza virus[J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(2): 123-133.
- [19] CHEN H, PARK S K, JOUNG Y J, et al. SERS-based dual-mode DNA aptasensors for rapid classification of SARS-CoV-2 and influenza A/H1N1 infection[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2022, 355: 131324.
- [20] KIM H R, KANG H J, KIM H N, et al. Development of 6E3 antibody-mediated SERS immunoassay for drug-resistant influenza virus[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 187: 113324.
- [21] 吴佳岂. 禽流感病毒表面增强拉曼光谱(SERS)检测方法的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [22] WANG C W, WANG C G, WANG X L, et al. Magnetic SERS strip for sensitive and simultaneous detection of respiratory viruses[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(21): 19495-19505.
- [23] ÜLGER S T, BEKÇI A, YILMAZ A, et al. Detection and molecular characterization of human adenoviruses from acute conjunctivitis cases[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2019, 53(3): 297-307.
- [24] 杨传宇, 赵林清. 人腺病毒流行病学研究进展[J]. *病毒学报*, 2021, 37(3): 732-739.
- [25] KAJON A E, LAMSON D M, BAIR C R, et al. Adenovirus type 4 respiratory infections among civilian adults, Northeastern United States, 2011 – 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(2): 201-209.
- [26] 刘真真, 贾小飞, 肖瑞. 基于 SERS 免疫层析技术的人腺病毒抗原检测方法建立[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2022, 36(3): 317-322.
- [27] 张晓蕾. 基于胶体晶体模板构筑图案化微纳结构及其应用[D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
- [28] CHOI S J, MOON S W, SHIN J H, et al. Label-free biochemical analytic method for the early detection of adenoviral conjunctivitis using human tear biofluids[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(22): 11093-11099.
- [29] HADDADIN Z, BEVERIDGE S T, FERNANDEZ K L, et al. Respiratory syncytial virus disease severity in young children[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(11): 4384-4391.
- [30] 詹蕾. 呼吸道合胞病毒的纳米免疫分析新方法研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [31] ZHAN L, ZHEN S J, WAN X Y, et al. A sensitive surface-enhanced raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus[J]. *Talanta*, 2016, 148: 308-312.
- [32] ZHANG D, HUANG L, LIU B, et al. Rapid and ultrasensitive quantification of multiplex respiratory tract infection pathogen via lateral flow microarray based on SERS nanotags[J]. *Theranostics*, 2019, 9(17): 4849-4859.