

等离子激元纳米孔用于单分子光学检测的研究进展

王思媛^{1,2}, 刘虹遥^{1*}, 路鑫超^{1**}, 黄成军^{1,2***}

¹中国科学院微电子研究所健康电子研发中心, 北京 100029;

²中国科学院大学集成电路学院, 北京 100049

摘要 等离子激元纳米孔将等离子激元天线与固体纳米孔结合,可限制待测物路径,并将入射光能聚集至路径中产生热点,从而增强场与待测物质的相互作用,在纳米尺度范围内实现高灵敏度检测,近年来已被广泛应用于单分子检测研究。本文概述了几种典型等离子激元纳米孔结构及其场增强效果;分析讨论了4种目前常用的基于等离子激元纳米孔的高灵敏度检测技术及其特点,包括荧光检测、表面拉曼增强光谱、表面等离子激元共振位移传感以及光电结合方法;综述了等离子激元纳米孔在脱氧核糖核酸(DNA)、蛋白质、肽等单分子光学检测方面的应用进展及典型成果;讨论和展望了等离子激元纳米孔的未来研究趋势以及面临的机遇和挑战。

关键词 表面光学; 表面等离子激元; 纳米孔; 光学检测; 单分子检测

中图分类号 O539; O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL220914

1 引言

脱氧核糖核酸(DNA)、蛋白质、肽等生物分子与生命的演变密切相关,对其进行单分子检测具有重要意义^[1]。然而,实现单分子检测需要克服两大难点:1)单分子质量小,所引发的信号十分微弱,需要极灵敏的探测手段^[2];2)生物单分子的尺寸主要集中在纳米量级,且自然条件下生物分子在溶液中随机运动,难以保证探测信号仅来自某个确定的分子^[3]。因此,单分子的检测与分析面临巨大挑战。

纳米孔能提供与单分子尺寸相当的传感体积,并能增强信号强度,是实现单分子检测的有力手段之一^[2,4]。早期的纳米孔单分子传感主要是基于电信号进行的^[2]。近年来,随着人们对基于光信号的纳米孔单分子检测的探索,等离子激元纳米孔被提出并得到了广泛研究^[3]。表面等离子激元(SPPs)是在金属和介质界面处由自由电子与光子相互作用产生的一种电磁波,具有近场增强的特性^[5-6]。等离子激元纳米孔将等离子激元纳米天线与纳米孔相结合,通过金属结构激发表面等离子激元,将入射光能量聚拢至纳米尺度范围内,在纳米孔附近产生极大的局域电磁场增强,形成“热点”^[3,7]。该“热点”在实现单分子检测方面具有显著优势:1)热点位置处的增强电磁场可在亚波长尺度内增

强光与单分子物质相互作用产生的信号强度^[3,8];2)等离子激元纳米孔的梯度电场会对热点附近的待测分子产生吸引力,延长分子易位的时间^[9];3)热点内的分子分布直接影响等离子激元纳米孔的共振条件,可用于判断分子信息^[3,8,10]。因此,近年来,人们在等离子激元纳米孔的超高灵敏检测技术方面进行了大量探索,并将其用于单分子检测。

本文分别从等离子激元纳米孔结构及检测方法出发,介绍了常用的等离子激元纳米孔高灵敏度检测技术,并综述它们在单分子检测方面的应用进展及典型成果。其中:第二部分讨论等离子激元纳米孔的结构及其场分布特点;第三部分介绍荧光检测、表面增强拉曼光谱(SERS)、等离子激元共振位移分析以及光电结合这4种检测方法;第四部分介绍近年来基于等离子激元纳米孔的单分子检测应用进展及典型成果。与前期相关综述^[3,7,11]不同,本文着重介绍了基于不同等离子激元纳米孔的单分子检测方法的特点,并总结这些技术在单分子检测方面的最新进展以及面临的挑战,为相关领域的研究提供参考。

2 等离子激元纳米孔的结构

等离子激元纳米孔由微纳金属结构和固体纳米孔两部分组成,其中:微纳金属结构充当表面等离子激元天

收稿日期: 2022-05-27; 修回日期: 2022-06-10; 录用日期: 2022-06-15

基金项目: 中国科学院科研装备研制项目(YJKYYQ20190056)、北京市自然科学基金项目(4192063、4182073)、广东省科技计划项目(2016A040403086)、广州市科技计划项目(201604020005)、清华大学环境模拟与污染控制国家重点联合实验室开放课题资助项目(18K07ESPCT)

通信作者: *liuhongyao@ime.ac.cn; **luxinchao@ime.ac.cn; ***huangchengjun@ime.ac.cn

线,其在特定波长光照射下激发表面等离子激元,将光场聚集于纳米孔附近,从而产生亚波长尺寸的“热点”;固体纳米孔用于限制分析物的路径,使待测物依次通过或吸附于纳米孔区域^[2]。等离子激元纳米孔可以增强光场与纳米孔附近物质的相互作用,有望实现溶液内单分子物质的连续检测^[3]。热点场分布是影响等离子激元纳米孔性能的关键因素,它与等离子激元微纳结构的尺寸、材料组成以及纳米孔的位置等因素密切相关^[5,12]。针对不同的应用场景,人们提出了多种等离子激元纳米孔结构。根据场增强的机理,本文将这些结构分为基于金属微纳结构的等离子激元纳米孔、基于纳米间隙的等离子激元纳米孔以及基于玻璃纳米管控制的等离子激元纳米孔三类。

2.1 基于金属微纳结构的等离子激元纳米孔

亚波长金属微纳结构中存在的束缚力作用于自由

电子后会引起共振,从而激发表面等离子激元^[5]。人们通过设计特定的金属微纳结构来激发表面等离子激元,再叠加其他物理效应,就可在纳米孔附近产生热点场^[13-25]。典型的金属微纳结构主要包括纳米阱-孔^[13]、纳米光腔^[15-23]以及牛眼结构^[24-25]。

纳米阱-孔结构由 A. Meller 团队提出,如图 1(a)所示。A. Meller 团队在金膜上制备了直径为百纳米级的圆孔(用于实现天线效应),这些圆孔被称为“纳米阱层”;同时,他们在 SiN_x 膜上制备了纳米孔,这些孔位于纳米阱层上方且上下孔中心对准^[13]。天线的场增强效应主要源于局域表面等离子激元的激发:亚波长孔对金膜中自由电子的束缚作用可激发孔附近高电子密度的共振模式,并在入射光侧的孔边缘及中心实现场增强。该结构的局部场增强(此处及下文中均指 $|E/E_0|^2$)小于 10^{13} 。

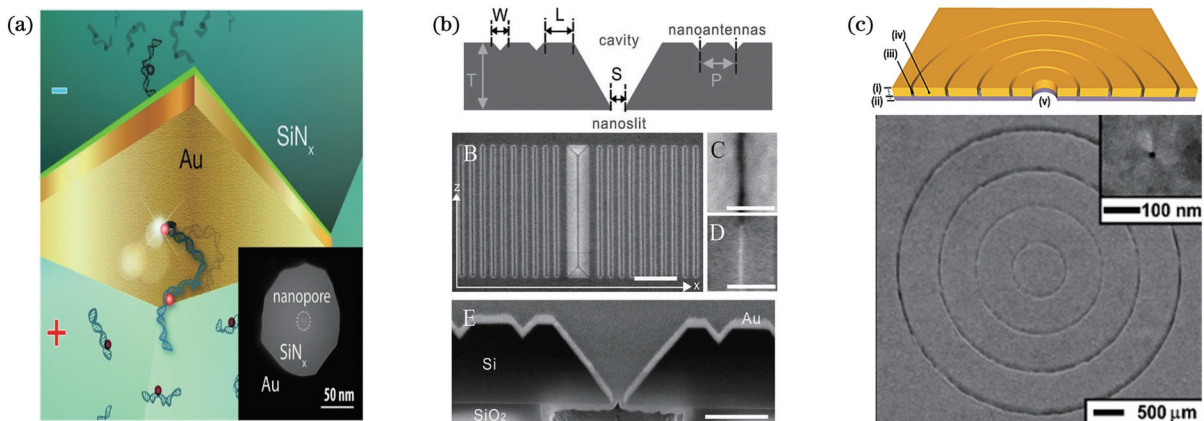


图 1 基于金属微纳结构的等离子激元纳米孔。(a)纳米阱-孔结构^[13]; (b)纳米光腔^[16]; (c)牛眼结构^[25]

Fig. 1 Plasmonic nanopore based on metal micro-nano structure. (a) Nanowell-nanopore structure^[13]; (b) nanoslit cavity^[16]; (c) bullseye structure^[25]

纳米光腔由 Chen 等^[15-23]提出,如图 1(b)所示。该等离子激元天线是覆盖金膜的倒三角形纳米凹槽结构,其底部的纳米狭缝类似于纳米孔,可以起到限制分析物通过路径的作用。倒三角腔能将入射能量有效聚集至狭缝附近,其中:倒三角腔纳米量级的纵向宽度激发表面等离子激元,波长量级的横向长度产生一阶法布里-珀罗腔共振,凹槽结构反射表面等离子激元波。这三者共同增强腔内场强^[15,17-18]。进一步地,Chen 等^[16,18-19,21,23]在倒三角腔两侧加入次级天线,该次级天线由周期性浅槽组成布拉格光栅,将更多的人射光耦合到纳米狭缝中,并限制表面等离子激元向两边传输。上述诸多增强效应的叠加使得纳米光腔获得了显著的场增强,对于 10 nm 宽的狭缝,局部场强度增强可达 10^4 量级^[21]。

牛眼结构也称靶心结构,由 Crick 等^[24-25]提出,如图 1(c)所示。该结构的等离子激元天线是有中心孔的同心金属环结构,固体纳米孔位于其下方的介质膜上,并与天线上的中心孔对齐。周期性金属环产生与光栅类似的效果,实现波矢匹配并激发表面等离子激元。环

状分布使表面等离子激元波向中心传播,增强了中心位置的场强度^[24-25]。同时,等离子激元天线中心的亚波长孔也将激发局域表面等离子激元,并进一步增强场分布^[24-25]。对于 20 nm 直径的中心孔来说,其局部电场强度增强在 $10 \sim 10^2$ 量级^[24-25]。与其他结构相比,牛眼结构对入射光偏振没有依赖性,而且可以激发窄带共振光谱^[24-25]。

2.2 基于纳米间隙的等离子激元纳米孔

利用上述金属结构激发表面等离子激元实现的局域场强度受金属表面电荷分布和金属内部损耗的限制,所以增强效果有限^[26]。由纳米间隙隔开的金属纳米结构中的等离子激元耦合能将光子能量进一步会聚到纳米维度,局部电场强度增强更明显。因此,研究人员设计、制备了含间隙结构的等离子激元天线,并将纳米孔设置在间隙位置,获得了基于纳米间隙的等离子激元纳米孔,如蝶形纳米孔^[10,27-38]、双纳米孔^[39-43]、纳米颗粒二聚体^[44]等。尽管不同形状、不同尺寸的金属结构存在差异,但总体趋势显示,电场增强随着间隙尺寸的减小而增大^[26,45-48]。

根据金属分布,基于纳米间隙的等离激元纳米孔可分为在介质基底周围产生电位的金属浮雕结构以及激发结构内部热点的中空微纳结构两类^[26]。金属浮雕结构由不相连的金属微纳结构间隔排列而成^[26],其中正蝶形结构^[27-28,30-36,38]为最具代表性的设计,如图 2(a)所示。当激发光偏振方向沿天线长轴时,正蝶形结构长轴方向边缘激发呈指数衰减的表面等离激元,纳米间隙将能量压缩在正蝶形结构中心^[26,49,50],间隙中的局域场显著增强^[30]。对于 10 nm 间隙的正蝶形结构,局部电场强度增强可达 10^4 量级^[36],而且场增强的同时伴

随着明显的热效应^[38]。中空微纳结构则是在连续金属膜上内嵌非金属微纳结构^[26],如图 2(b)所示的倒蝶形结构^[10,29,37,41]、双纳米孔^[39-43]等。它们的激发原理相似,即:当入射光偏振方向沿天线短轴时,沿该方向的金属结构边界可激发表面等离激元共振,并将能量向中空结构的中心聚拢,产生热点^[29]。相比金属浮雕结构,中空微纳结构的场增强效果稍弱,对于 20 nm 间隙,倒蝶形局部电场强度增强在 10^2 量级^[10];然而由于周围金膜更高的散热效率以及等离激元间隙的轻微非共振激发,其升温明显低于金属浮雕结构^[29]。

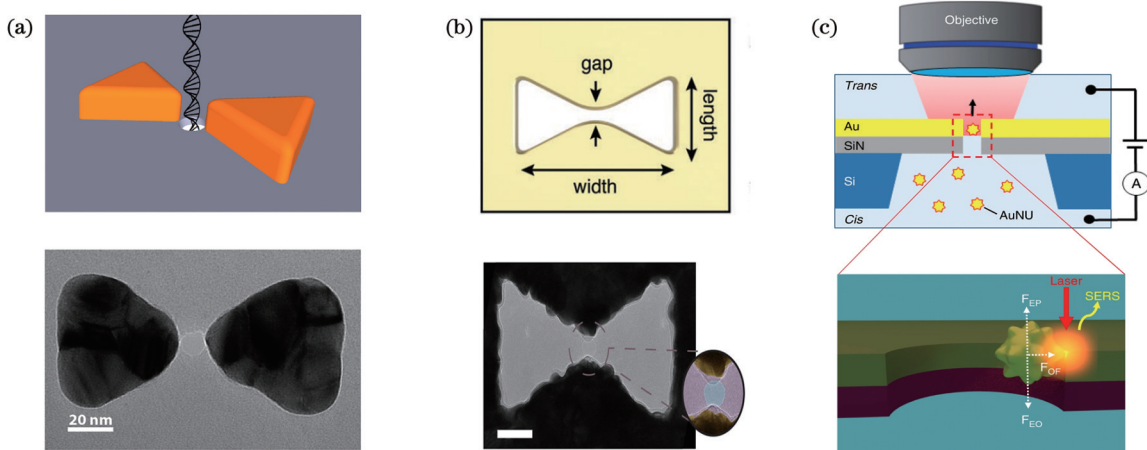


图 2 基于纳米间隙的等离激元纳米孔。(a)正蝶形结构^[36]; (b)倒蝶形结构^[10,29]; (c)纳米海胆-金纳米孔间隙^[52]

Fig. 2 Plasmonic nanopore based on nanogap. (a) Bowtie shaped structure^[36]; (b) inverted-bowtie shaped structure^[10,29]; (c) gap of nanourchin and gold nanohole^[52]

蝶形结构、双纳米孔等天线结构需要精确控制间隙距离并使其与纳米孔对准,对加工要求较高。研究人员尝试通过金属结构间的相互作用力直接构建纳米间隙^[44,51-52],这种方法无须再进行固体纳米孔制备及对准。Huang 等^[51-52]利用纳米孔阵列激发的表面等离激元场捕获分散的纳米海胆颗粒,成功实现了纳米海胆-金纳米孔间隙热点,如图 2(c)所示。激光激发时,纳米海胆颗粒尖端位置的电荷与纳米孔侧壁电荷耦合形成热点,在尖端产生受限的强电磁场。该结构在三维方向上均将场限制在纳米尺寸范围内,局部场强度增强可达 10^4 量级,且能够通过吸附纳米海胆颗粒延长被测物质在热点的停留时间^[52]。Dai 等^[44]采用光镊捕获两个表面修饰着银纳米颗粒的硅球,实现了对微米尺寸硅球亚纳米级分辨率位置的控制,并在银纳米颗粒间形成了热点。该结构的局部场强度增强在 $10^4 \sim 10^5$ 量级。这类结构的制作相对简单,但被测样品难以全部通过热点区域。

2.3 基于玻璃纳米管控制的等离激元纳米孔

利用玻璃管拉锥能以较好的重复性制造出 50 nm 到几微米的孔径,进而形成玻璃纳米管^[53]。与上述两类结构比较,玻璃纳米管具有制造简单、成本低^[54]、分析物易通过纳米孔的优点^[55]。基于玻璃纳米管的等离激元纳米孔得到了研究人员的青睐,这类等离激元纳

米孔主要利用亚波长尺寸的金属孔或金属结构激发局域表面等离激元实现场增强。玻璃纳米管上金属结构纳米孔的制备是该类结构实现的难点,研究人员主要采用自组装方法进行制造,如,采用自组装方法制备了金纳米多孔球^[53,55-56]、薄膜修饰的单纳米孔^[57-60]。其中,金纳米多孔球通过在玻璃纳米管尖端直接自组装金纳米颗粒制备而成,如图 3(a)所示。1997 年, Bard 团队^[61]首次提出了自组装超微电极的新型纳米孔——金纳米多孔球。随后,人们利用介电电泳^[55]、选择连接剂分子^[53]等方法对金纳米多孔球的制备进行改进。金纳米多孔球结构主要通过金纳米颗粒激发的局域等离激元结合相邻金纳米颗粒间的间隙效应实现局域场增强^[56]。对于 2 nm 宽的间隙,其局域场增强在 $10 \sim 10^2$ 量级^[56]。金纳米多孔球存在多个纳米孔,无法控制分析物从固定的纳米孔通过^[58]。为了使分析物以相同的方式通过受限空间,并增加其易位时间, Wang 团队^[57,59]利用金纳米盘、银纳米三角形、金纳米颗粒等纳米结构对玻璃纳米管尖端进行修饰,制备出了单一的等离激元纳米孔,如图 3(b)所示。该结构除了可以激发局域表面等离激元外,还可以通过在尖端修饰纳米结构形成更小的间隙结构,进一步增强场分布,如图 3(b)所示^[60]。对于间隙为 3 nm、厚为 30 nm 的金层修饰的单纳米孔,其局域场增强可达 $10^3 \sim 10^4$ 量级^[60]。

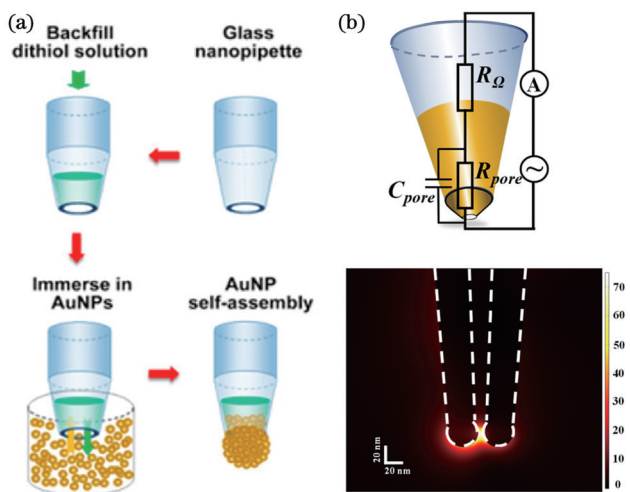


图 3 基于玻璃纳米管控制的等离子体纳米孔。(a)金纳米多孔球^[53];(b)金属纳米结构修饰的纳米孔^[60]

Fig. 3 Plasmonic nanopore based on glass nanopipette. (a) Gold nanoporous sphere^[53]; (b) metal nanostructures modified nanopores^[60]

3 基于等离子体纳米孔的信号检测方法

在基于等离子体纳米孔的传感检测中,人们主要

通过荧光检测、表面增强拉曼光谱、等离子体共振位移传感、光电结合方法实现信号检测。

3.1 基于荧光的等离子体纳米孔检测方法

荧光检测在生物学研究中被广泛应用。它将分子间相互作用的化学信息转变为对荧光信号的影响(如荧光增强/猝灭、荧光特征峰位置移动、荧光寿命变更和荧光偏振改变等)^[62],从而实现对特定分析物的选择性识别。基于等离子体纳米孔的荧光检测包括荧光增强^[13-14,63]及 Förster 共振能量转移^[64-65]两类。

纳米阱-孔^[13-14]是实现荧光增强的经典等离子体纳米孔结构,如图 4 所示。该结构利用纳米阱中强局域场对荧光激发源的增强,结合此情况下荧光困量子效率的提升,在 9 μW 的低激发功率下可以产生 10 倍净增强的荧光放大^[13];同时,表面等离子体的局域性有效降低了非检测位置的荧光干扰,降低了噪声,与缺失纳米阱的纳米孔芯片相比,其信噪比从 20 提升至 230^[13]。除了纳米阱-孔外,薄膜修饰的玻璃纳米孔也被用于荧光增强检测^[63]。此外,一些研究人员提出了将 Förster 共振能量转移(FRET)与等离子体纳米孔相结合的方法^[64-65],表面等离子体特殊的场分布特性使得供体与受体偶极子相互垂直时依然能激发 FRET,通过分析待检测物与受体功能化纳米孔的能量交换可以得到相关的 FRET 光谱特征^[64]。

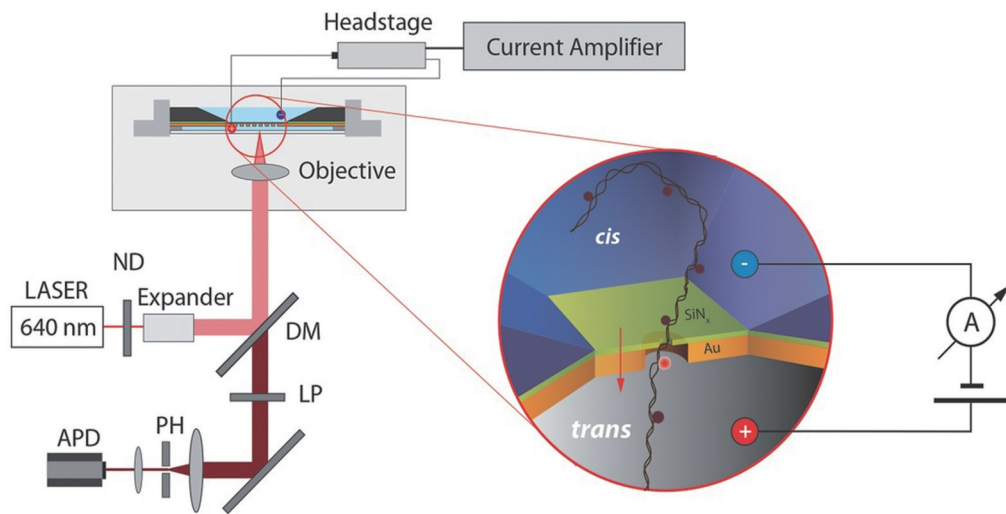


图 4 基于纳米阱-孔结构的荧光检测^[13](下层纳米阱结构激发的局域增强场用于荧光激发;标记有荧光染料的检测物流经纳米阱将激发荧光,通过探测荧光信号就可以获得检测物信息)

Fig. 4 Fluorescence detection based on nanowell-nanopore structure^[13] (local field excited by the nanowell structure is used for fluorescence excitation. When the fluorescent dye-labeled samples flow through the nanowell, the fluorescence signals are excited and detected to obtain the information of testing samples)

等离子体纳米孔可以有效增强荧光信号的强度,实现小分子的特异性检测。该方法易与固体纳米孔电测量方法联用,达到互补增强的效果。然而,该方法需要对检测物进行荧光标记,可能会影响分子状态且会增加实验的复杂性,同时荧光毒性及光漂白效应也限制了它的应用范围^[66]。因此,人们也在积极探索无标记的单分子检测方法。

3.2 基于表面增强拉曼光谱的等离子体纳米孔检测方法

对拉曼光谱进行分析可以直接获取分析物的“化学指纹”并得到其成分信息,是无标记光学检测最经典的方法之一^[3,67-68]。表面增强拉曼光谱(SERS)技术利用表面等离子体的强背景场增强拉曼信号,已被广泛用于高灵敏度拉曼检测^[68-69]。研究人员对利用等

离激光纳米孔结构测量 SERS 进行了探索。除了增强激发光强外,延长分析物在热点的停留时间也是基于等离激元纳米孔结构实现 SERS 检测的难题。这是因为获得 SERS 信号一般需要几毫秒至几十毫秒,而纳米孔体积在 10^{-20} L 量级,分析物通过热点的典型易位时间在微秒量级,不足以获得足够强的拉曼信号^[21,52]。

纳米光腔结构是基于 SERS 检测的典型等离激元纳米孔结构之一^[15-16,18,21,23]。与常规的孔结构相比,狭缝设计更易实现热点控制,且狭缝增强场的梯度分布可对狭缝中的分析物产生吸引力,延长易位时间,甚至可将 22 nm 聚苯乙烯小球限制在狭缝中^[21]。因此,纳米光腔在拉曼增强方面表现出了优异的性能,然而热点体积增加也会导致腔内存在多个分子的概率增

大^[23]。研究人员也考虑了利用纳米间隙优异的场增强效果实现 SERS 检测^[35,44,51-52,70-71],例如:Huang 等^[51-52]不仅利用纳米孔对纳米海胆颗粒的吸引力增加停留时间,如图 5(a)所示,还通过纳米海胆颗粒-纳米孔侧壁间隙的强局域场实现 SERS 传感;Dai 等^[44]通过光镊精确控制两个银纳米颗粒包覆的硅球的距离,实现了银纳米颗粒间隙中 SERS 信号的检测。此类方法能较好地控制纳米间隙的尺寸,增强效果明显,但难以实现阵列化,检测通量不高^[44]。基于玻璃纳米管的等离激元纳米孔也被用于 SERS 检测中,其中的一部分工作利用纳米多孔球尖端的热点来实现^[53,55-56,72],这些热点可以提供固有的尖端增强以及明确的 3D 定位^[55],然而纳米多孔球不同路径产生的多个随机热点也增加了 SERS 检测的复杂性^[55,58]。

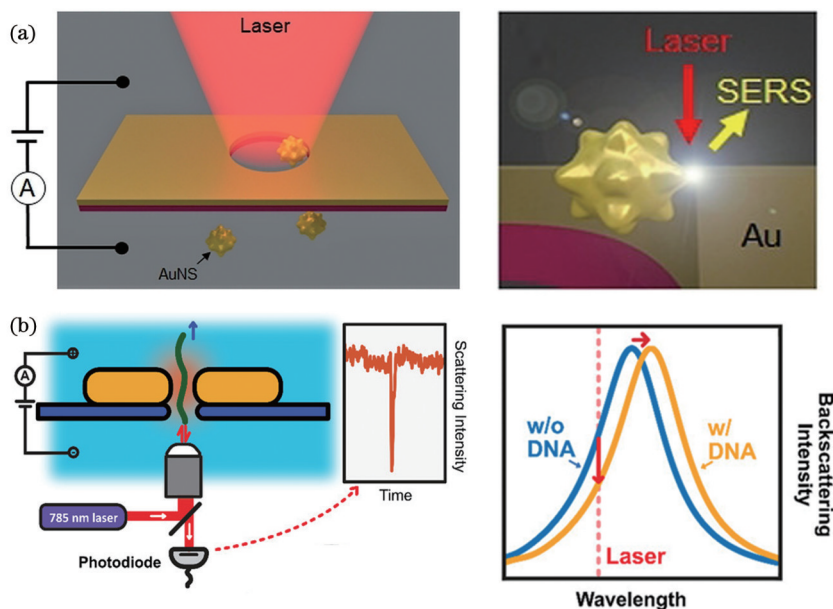


图 5 典型无标记光学传感方法示意图。(a) 基于纳米海胆-金纳米孔间隙结构的 SERS 检测^[51];(b) 基于正蝶形结构的等离激元共振位移传感^[30]

Fig. 5 Typical label-free optical sensing scheme. (a) SERS detection based on nanogap of nanourchin and plasmonic nanohole^[51]; (b) plasmon resonance shift sensing based on bowtie shaped nanoantenna^[30]

利用等离激元纳米孔进行 SERS 检测具有极高的灵敏度,能够提供丰富的分子指纹信息^[3],而且是一种无标记可长时间检测的方法^[68],被认为是等离激元纳米孔最具潜力的发展方向之一。目前,研究人员在不断尝试克服单分子拉曼信号有效采集时间不足的难题,探索制备难度低、增强效果优、重复性好的新型等离激元纳米孔结构。

3.3 基于等离激元共振位移传感的等离激元纳米孔检测方法

等离激元纳米孔是一个谐振腔,其共振频率及光强分布受热点内折射率分布的影响^[73]。分析物进入热点后,将引起等离激元共振频率改变,通过纳米孔的散射/透射光的强度也会随之发生变化^[29-30,66],可以基于此实现传感检测。尽管共振频率能更灵敏地反映热点

内分析物的情况,但同样面临光谱测量所需时间长的问题。为了避免耗时的光谱扫描,人们主要采用固定激发波长测量散射或透射光强度的方式^[30],如图 5(b)所示。Shi 等^[66]利用带有金膜的百纳米量级纳米孔激发表面等离激元,并监测其中的散射光强,成功判断了 70 nm 聚苯乙烯颗粒的过孔情况。Dekker 团队^[29-30]利用正蝶形和倒蝶形等离激元纳米孔增强光传输,对两种结构的散射/透射光强进行检测,检测结果显示:有/无分子时,光强变化显著,且光强变化与驱动电压或所使用的电解质浓度无关。

利用等离激元纳米孔共振位移传感可以实现基于光学测量的高通量、高速、高灵敏度和无标记的生物传感,该技术相对简单,易与电测量方法实现并行测量^[3,30]。其检测灵敏度与等离激元局域场分布、分子易

位、系统噪声等因素有关。可从以下三方面改进检测灵敏度:1)通过优化设计等离激元天线结构、结合光波长选择和溶液折射率优化等手段,进一步增强热点场的局域性,提高信号功率并降低检测位置存在多个分子的概率,增加相同分子引发信号的一致性^[66];2)将限制分子路径的纳米孔与等离激元局域场热点位置高精度对准^[66],并增加分子易位时间,提高信号功率,增加分子被检测到的概率;3)与电测量方法相比,共振位移传感检测信号的噪声仍比较大^[29-30],需通过降低杂散光、提高光源功率稳定性以及增加信号采集分辨率等方法来进一步降低噪声,提高信噪比。除了需要进一步提高检测灵敏度以外,因现阶段利用等离激元纳米孔共振位移传感可提取的分析物信息有限^[3],还需要改进测量方法或进一步优化信号提取算法,从光信号中获取更多分子的特异性信息,扩展其检测能力。

3.4 基于光电结合的等离激元纳米孔检测方法

除了上述利用纯光学方法外,人们也在结合现有固体纳米孔在电学检测方面的成果,探索利用光电结合获得高性能检测的方案,并取得了一些进展。

一方面,人们尝试采用电学方法和光学方法对相同的检测物实现同步测量。目前,荧光检测以及等离激元共振位移传感均已成功实现了光电同步检测,并获得了高度相关的光学与电学信号^[13,29-30]。与电学检测方法相比,光学检测方法具有信号与驱动电压、电解质溶液浓度无关以及大检测带宽的优势^[29],可以实现特殊溶液环境(如生理条件)下的检测;同时,光电同步检测有望提供相同分子的互补信息,提高检测的选择性和特异性。Dekker团队^[29-30]利用蝶形/倒蝶形等离激元结构同时对离子电流和等离激元共振位移透射/

散射信号进行了检测,电信号及光信号随时间的变化如图6(a)所示。可以发现,两者在时间及波形分布上均具有较好的一致性,证明了实现并行高通量检测的可行性^[29]。然而,与电学检测方法相比,光学信号解析方法能够获取的信息较少,研究人员仅可以提取出分子的构象信息,而该信息可从电信号中获取。因此,如何提供电信号的互补信息还有待进一步研究。

另一方面,人们尝试通过光学方法来优化固体纳米孔的电学性能,如增强电信号强度^[24-25,31,36],提高纳米孔中被测分子的通过概率^[24-25,31,36],增加分子易位时间^[39,41,43]。Dekker及其同事采用蝶形等离激元天线比较了有/无光照明下的电信号,结果发现,电场热点可对纳米孔附近的溶液实现局部加热,增加离子电导,从而增强电信号强度^[31,36]。然而,功率过高引起的温升可能会损坏等离激元结构^[24],而且更高的纳米孔加热温度带来的电噪声可能会掩盖来自单分子的电信号^[25]。同时,Dekker及其同事^[31,36]还发现,在光照明条件下,当单分子易位时间基本不变时,单位时间内被测分子通过纳米孔的次数明显增加。这被认为是纳米天线局部加热产生的强温度梯度引发的负热电泳导致的。在增加分子易位时间方面,如图6(b)所示,Peri等^[39,41,43]研究了金膜上双纳米孔结构的等离激元天线对纳米孔电信号的影响,结果发现:该结构的自诱导反向作用(SIBA)对附近分子产生了捕获力;加入促进分子通过纳米孔定向流动的偏置电压后,光的捕获力与电泳力联合控制纳米孔附近分子的易位,而且与无光照明比较,SIBA作用下纳米孔附近电信号的获取时间增加了约4个数量级。同时,研究人员基于该结构进行了光电并行检测,并发现纳米孔附近存在分子时透

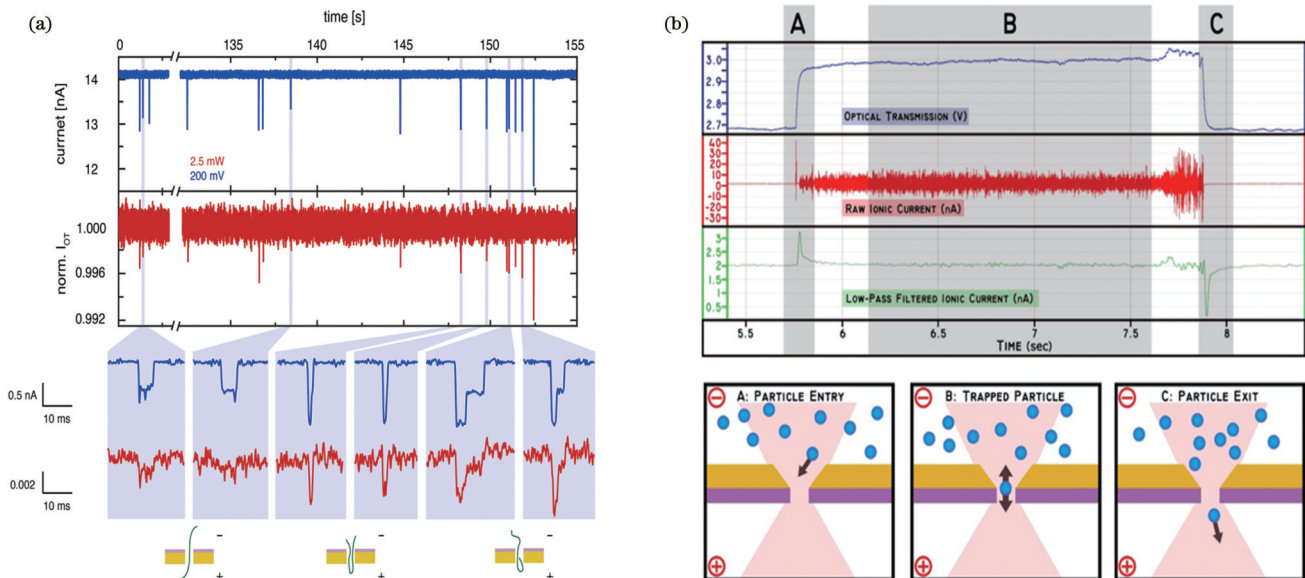


图6 基于光电结合的信号检测。(a)基于倒蝶形结构的光电同步检测^[29];(b)基于双纳米孔结构SIBA机制的光电共同测量^[43]
Fig. 6 Signal detection strategies based on optical and electrical sensing combination. (a) Photoelectric synchronization detection based on inverted-bowtie shaped aperture^[29]; (b) combined optical and electrical combination sensing based on SIBA mechanism of double nanohole^[43]

射光信号明显增强,而通过分析经低通滤波的电信号可得到分子进入及流出纳米孔的信号,两者得到的分子易位信息一致。以上研究证实了利用等离子体纳米孔增强电信号的潜力,但等离子体诱导局部加热和光学捕获等光学策略与电学协同测量还需要更进一步的研究,以突破现有固体纳米孔电信号检测的瓶颈,实现更高信噪比和更高分辨率的单分子传感。

4 等离子体纳米孔在单分子检测中的应用

等离子体纳米孔可在纳米尺度内实现高灵敏度检测,鉴于此,研究人员进行了大量的单分子检测探索工作,检测对象包含 DNA、蛋白质、肽、病毒、细菌等。这说明等离子体纳米孔在单分子检测方面具有巨大的应用潜力,对于生物学研究、早期疾病检测等具有重要意义。

4.1 等离子体纳米孔用于 DNA 检测

DNA 序列蕴含着生物体的整个遗传信息,准确解读这些遗传信息对于生命科学研究具有重要意义^[1]。研究人员进行了许多利用等离子体纳米孔对单个 DNA 分子进行检测的尝试^[1],包括 DNA 分子易位研究^[25,29-30,33,36,59]、DNA 识别^[23,72]以及基因测序等^[32,35,52,58]。

DNA 分子易位通常表示 DNA 链通过纳米孔的过程。DNA 链可以以展开、部分折叠、完全折叠等构象通过纳米孔^[29-30,59]。研究人员利用蝶形、牛眼、纳米阱等结构对单个 DNA 的易位检测进行了多层次探索^[25,29-30,33,36,59]。Dekker 团队^[36]研究了蝶形结构激发表面等离子体热点对 DNA 易位的响应,并分别利用正/倒蝶形结构,证实了可以通过等离子体共振位移测量实现单 DNA 分子的光学无标记易位检测,并获得其构象信息^[29-30]。Aksimentiev 团队^[33]通过分子动力学仿真分析了蝶形结构对 DNA 易位的影响,结果发现等离子体天线的存在会对电信号强度及易位时间产生影响,而且这种影响主要是由热效应导致的。Edel 团队^[25]基于牛眼结构,通过改变照明波长来调整热效应,结果发现热效应过大将增大电噪声,从而掩盖 DNA 易位产生的电信号。近年来,Wang 团队^[59]利用尖端附着含亚 10 nm 孔径金纳米盘的玻璃纳米管,有效增加了 DNA 的易位时间。

DNA 的识别及测序探索主要基于 SERS 实现,单个 DNA 分子的弱光谱信号促使科研人员优选具有更好场增强效果的等离子体纳米孔进行尝试^[18,23,32,35,52,58,72]。Fotouhi 等^[32]通过仿真分析对比了脱氧核糖核酸的 4 个碱基(A、G、T、C)在单纳米孔、领结结构、领结-纳米孔复合结构上的拉曼频移,并发现领结-纳米孔复合结构具有更高的灵敏度和更好的特异性。Belkin 等^[35]模拟分析了蝶形纳米孔的 SERS 信号,并证明了该结构可以实现 DNA 分段精确测序。然

而,实现测序须将进入的 DNA 尾部解开,避免其聚集和盘绕在热点附近。这是目前研究中的难点问题。Chen 等^[15-16,18-20,22-23]对纳米光腔结构进行了一系列优化,并通过实验证明了纳米光腔可以捕获 DNA 分子;进一步,他们通过 SERS 指纹对 DNA 的 4 种碱基进行了识别,并成功实现了单 DNA 分子检测^[23]。Huang 等^[52]将 DNA 吸附在纳米海胆颗粒上,用百纳米尺寸的纳米孔捕获该纳米海胆,成功实现了单碱基层面的 SERS 信号采集,向 DNA 测序迈进了一步。在基于玻璃纳米管的等离子体纳米孔方面,Wang 等^[72]在玻璃纳米孔尖端合成了具有高 SERS 活性的金等离子体纳米孔,并用它区分了具有单个碱基 C、G、A、T 和通常为 RNA 专有尿嘧啶(U)差异的非共振生物分子,证明了将等离子体纳米孔应用于 DNA 和蛋白质检测的可行性;同时,他们还利用在顶端修饰银纳米三角形的玻璃纳米孔激发 SERS 信号检测了 DNA 的碱基,发现脱氧核糖核酸的 4 种碱基显示出明显不同的 SERS 信号^[58]。

4.2 等离子体纳米孔用于蛋白质及肽检测

蛋白质作为一种典型的生物活性大分子,与疾病的发生发展密切相关^[1]。肽是一种介于氨基酸和蛋白质之间的物质,其相对分子质量比蛋白质大但比氨基酸小,在维护正常生理功能和机体健康方面起着重要作用。近年来,等离子体纳米孔传感技术在蛋白质和肽类物质检测方面有许多进展,包括传感检测、捕获与鉴定、结构表征等^[10,14,39,41,44,51,53]。

Verschueren 等^[10]采用倒蝶形等离子体纳米孔结构,基于光强探测的等离子体共振位移检测,进一步结合电泳驱动,实现了单个 200000 D(1 D=1 u) β -淀粉酶蛋白的捕获及探测。Meller 团队^[14]提出并模拟分析了一种使用纳米阱和三色荧光进行单蛋白质鉴定的方法,即使模拟中加入了实际实验的不完美因子,该方法仍获得了 97% 的蛋白质识别率,暗示了一种新的蛋白质识别方法。Dai 等^[44]利用两个银纳米粒子包覆的硅颗粒之间的热点,产生了可调节和可重复的单分子水平灵敏度的 SERS 增强,精确表征了天然状态中三种球状蛋白质的结构,为在复杂生物体系中动态获取物质结构提供了一种有效可行的解决方案。Peri 等^[39,41]采用双纳米孔结构同时获取光电信号,通过信号分析成功区分了受体、配体及其形成的复合物,实现了特异性检测,同时实现了低亲和力特定配体-受体系统的快速解离。该结构有望用于癌症免疫治疗的筛查^[39]。Huang 等^[51]将金纳米颗粒捕获在等离子体纳米孔中,产生一个 SERS 热点,该热点可以用于对两个相似的多肽(加压素和催产素)以及构成这两个多肽的 10 个不同氨基酸进行单分子检测,实现单分子水平检测以及芳香族和非芳香族氨基酸的区分。在基于玻璃纳米管的等离子体纳米孔应用方面,Wang 团队^[53]利用金纳米多孔球结构的 SERS 信号实现了单细胞水平上谷

胱甘肽的检测。

4.3 等离子体纳米孔用于其他生物颗粒的检测

除了生物单分子外,等离子体纳米孔也被用于细菌、病毒等生物颗粒的检测。Whang等^[74]分析了镀金膜纳米孔阵列与表面自组装有金纳米颗粒的细菌的相互作用,基于SERS信号实现了大肠杆菌和铜绿假单胞菌的检测。该方法有望用于细菌的精确鉴别。Burkhartsmeier等^[75]利用双纳米孔结构,基于病毒产生的自诱导反向作用,实现了phiX174病毒颗粒的捕获;进一步,他们通过对捕获的光强信号进行分析,获得了病毒颗粒的尺寸信息。该方法有望用于病毒分选。

大多数生物体均可以归入介电纳米颗粒的范畴^[21],很多研究人员用纳米颗粒模拟生物分子进行分析与操控。Shi等^[66]采用镀有金膜的单纳米孔结构,基于共振位移传感的散射光强检测,实现70 nm单个聚苯乙烯小球的过孔实时检测。Raza等^[43]采用纳米孔对-纳米孔复合结构,在电泳配合下,将20 nm SiO₂及Au颗粒的过孔时间延长了4个数量级。Bouloumis等^[76]通过理论及实验研究了等离子体同轴纳米孔对单个纳米粒子的作用力,证明了该结构可在低照明功率下快速捕获纳米颗粒。

5 结束语

等离子体纳米孔可在纳米孔附近形成具有强局域

场的热点,实现纳米尺度内的高灵敏度检测,引起了人们的广泛关注。近年来,人们利用等离子体纳米孔对单分子物质进行了光学检测以及光电结合检测的探索。与电学检测方法相比,光学检测方法具有以下优点:1)能够实现高信噪比、特异性检测(如荧光检测);2)可以提供丰富的分子指纹信息(如SERS检测);3)能够实现带宽大且信号强度与被测物质的电解质溶液、驱动电压无关的并行高通量检测(如表面等离子体共振位移传感)。发展基于等离子体纳米孔的光学检测有望与电学检测方法互补增强,进一步提高单分子检测能力。表1总结了典型等离子体纳米孔的尺寸、性能、采用的检测方法以及检测对象。在各种等离子体纳米孔结构中,纳米间隙的等离子体纳米孔能提供聚集性更好的局域场分布,更有利于实现信号的局域增强。在基于等离子体纳米孔的不同光学检测方法中,SERS能获得被测物质的“化学指纹”,实现单分子鉴别,甚至实现单脱氧核糖核酸的碱基种类检测,是等离子体纳米孔最具潜力的发展方向之一。延长纳米孔附近被测物质的停留时间是基于等离子体纳米孔实现SERS检测的重点,目前人们主要基于等离子体纳米孔本身的吸引力捕获分子,虽然已经取得了一些进展,但仍需要发展光、热、电等多物理量耦合模型,实现更可控且更稳定的分子三维操纵。等离子体共振位移传感能实现光电同步检测,有望提供相同分子的互补信

表1 等离子体纳米孔及其性能、检测应用总结

Table 1 Summary of plasmonic nanopore and their properties and detection applications

Typical structure	Typical size of nanopore /nm	Maximum field enhancement $ E/E_0 ^2$	Detection method	Detection object	Ref.
Plasmonic nanowell-nanopore	4 (nanopore) 120 (nanowell)	<10	Fluorescence detection	DNA, protein, etc	[13-14]
Plasmonic nanoslit cavity	10-33(longitudinal width) 140-1000 (lateral length)	10 ⁴	SERS	DNA, proteins, nanoparticles, etc	[17-18, 21, 23]
Bowtie shaped nanoantenna	5-40	10 ² -10 ⁴	SERS, plasmon resonance shift sensing	DNA, proteins, nanoparticles, etc	[30-33, 35-36]
Inverted-bowtie shaped aperture	20	10 ²	SERS, plasmon resonance shift sensing	DNA, proteins, nanoparticles, viruses, etc	[10, 29]
Double nanohole	25-30	10-10 ²	Combined optical and electrical sensing	Proteins, nanoparticles, etc	[39, 41, 43, 75]
Nanogap of nanourchin and plasmonic nanohole	<5	10 ⁴	SERS	DNA, protein, peptide, etc	[51-52]
Plasmonic nanopore based on glass nanopipette		10 ³ -10 ⁴	Fluorescence detection, SERS	DNA, peptides, hemoglobin molecules, etc	[53, 55-60, 72]

息,提高检测的选择性和特异性。但这还需要对光学信号作进一步解析,从而建立信号与分子信息之间的映射关系。此外,利用等离激元纳米天线产生的强局域场可以增加分子易位的时间以及增强电学测量信号,从而优化固体纳米孔电学测量方法的性能。上述技术的发展有助于等离激元纳米孔技术实现更多单分子检测与鉴别,并有望实现单分子测序技术。

参 考 文 献

- [1] Liu F F, Zhao X P, Kang B, et al. Non-linear mass transport in confined nanofluidic devices for label-free bioanalysis/sensors [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 123: 115760.
- [2] Xue L, Yamazaki H, Ren R, et al. Solid-state nanopore sensors [J]. *Nature Reviews Materials*, 2020, 5(12): 931-951.
- [3] Spitzberg J D, Zrehen A, van Kooten X F, et al. Plasmonic-nanopore biosensors for superior single-molecule detection[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(23): e1900422.
- [4] Lin Y, Ying Y L, Long Y T. Nanopore confinement for electrochemical sensing at the single-molecule level[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2018, 7: 172-178.
- [5] Maier S A. *Plasmonics: fundamentals and applications*[M]. New York: Springer, 2007.
- [6] 王琳, 张磊. 基于表面等离激元谐振腔的窄谱增强传感器[J]. *光学学报*, 2021, 41(7): 0724001.
Wang L, Zhang L. Narrow-spectrum enhanced sensor based on surface plasmon resonator[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(7): 0724001.
- [7] Garoli D, Yamazaki H, Maccaferri N, et al. Plasmonic nanopores for single-molecule detection and manipulation: toward sequencing applications[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(11): 7553-7562.
- [8] Lu W L, Hu R, Tong X, et al. Electro-optical detection of single molecules based on solid-state nanopores[J]. *Small Structures*, 2020, 1(1): 2000003.
- [9] Peng X L, Kotnala A, Rajeeva B B, et al. Plasmonic nanotweezers and nanosensors for point-of-care applications[J]. *Advanced Optical Materials*, 2021, 9(13): 2100050.
- [10] Verschuere D, Shi X, Dekker C. Nano-optical tweezing of single proteins in plasmonic nanopores[J]. *Small Methods*, 2019, 3(5): 1800465.
- [11] Maccaferri N, Barbillon G, Koya A N, et al. Recent advances in plasmonic nanocavities for single-molecule spectroscopy[J]. *Nanoscale Advances*, 2021, 3(3):633-642.
- [12] 向松, 张新宇, 邓罗根. 复合结构的等离激元模式耦合关系及光学特性研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(9): 0924001.
Xiang S, Zhang X Y, Deng L G. Plasmon mode coupling relationship and optical properties of composite structure[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(9): 0924001.
- [13] Assad O N, Gilboa T, Spitzberg J, et al. Light-enhancing plasmonic-nanopore biosensor for superior single-molecule detection[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(9): 1605442.
- [14] Ohayon S, Girsault A, Nasser M, et al. Simulation of single-protein nanopore sensing shows feasibility for whole-proteome identification[J]. *PLoS Computational Biology*, 2019, 15(5): e1007067.
- [15] Chen C, Hutchison J A, Clemente F, et al. Direct evidence of high spatial localization of hot spots in surface-enhanced Raman scattering[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2009, 48(52): 9932-9935.
- [16] Chen C, Hutchison J A, van Dorpe P, et al. Focusing plasmons in nanoslits for surface-enhanced Raman scattering[J]. *Small*, 2009, 5(24): 2876-2882.
- [17] Chen C, Juan M L, Li Y, et al. Enhanced optical trapping and arrangement of nano-objects in a plasmonic nanocavity[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(1): 125-132.
- [18] Chen C, Ye J, Li Y, et al. Detection of DNA bases and oligonucleotides in plasmonic nanoslits using fluidic SERS[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2013, 19(3): 4600707.
- [19] Li Y, Chen C, Kerman S, et al. Harnessing plasmon-induced ionic noise in metallic nanopores[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(4): 1724-1729.
- [20] Chen C, Xu X M, Li Y, et al. Full wetting of plasmonic nanopores through two-component droplets[J]. *Chemical Science*, 2015, 6(11): 6564-6571.
- [21] Kerman S, Chen C, Li Y, et al. Raman fingerprinting of single dielectric nanoparticles in plasmonic nanopores[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(44): 18612-18618.
- [22] Li Y, Chen C, Willems K, et al. Asymmetric plasmonic induced ionic noise in metallic nanopores[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(24): 12324-12329.
- [23] Chen C, Li Y, Kerman S, et al. High spatial resolution nanoslit SERS for single-molecule nucleobase sensing[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1733.
- [24] Crick C R, Albella P, Ng B, et al. Precise attoliter temperature control of nanopore sensors using a nanoplasmonic bullseye[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(1): 553-559.
- [25] Crick C R, Albella P, Kim H J, et al. Low-noise plasmonic nanopore biosensors for single molecule detection at elevated temperatures[J]. *ACS Photonics*, 2017, 4(11): 2835-2842.
- [26] Zhang Y Q, Min C J, Dou X J, et al. Plasmonic tweezers: for nanoscale optical trapping and beyond[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 59.
- [27] Zhang W J, Zhang Y Q, Zhang S S, et al. Nonlinear modulation on optical trapping in a plasmonic bowtie structure[J]. *Optics Express*, 2021, 29(8): 11664-11673.
- [28] Jiang Q B, Roy P, Claude J B, et al. Single photon source from a nanoantenna-trapped single quantum dot[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(16): 7030-7036.
- [29] Verschuere D, Pud S, Shi X, et al. Label-free optical detection of DNA translocations through plasmonic nanopores[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(1): 61-70.
- [30] Shi X, VVerschuere D V, Dekker C. Active delivery of single DNA molecules into a plasmonic nanopore for label-free optical sensing[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(12): 8003-8010.
- [31] Shi X, Verschuere D, Pud S, et al. Integrating sub-3 nm plasmonic gaps into solid-state nanopores[J]. *Small*, 2018, 14(18): e1703307.
- [32] Fotouhi B, Ahmadi V, Faramarzi V. Nano-plasmonic-based structures for DNA sequencing[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(18): 4229-4232.
- [33] Belkin M, Aksimentiev A. Molecular dynamics simulation of DNA capture and transport in heated nanopores[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(20): 12599-12608.
- [34] Pud S, Verschuere D, Vukovic N, et al. Self-aligned plasmonic nanopores by optically controlled dielectric breakdown[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(10): 7112-7117.
- [35] Belkin M, Chao S H, Jonsson M P, et al. Plasmonic nanopores for trapping, controlling displacement, and sequencing of DNA[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(11): 10598-10611.
- [36] Nicoli F, Verschuere D, Klein M, et al. DNA translocations through solid-state plasmonic nanopores[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(12): 6917-6925.
- [37] Lee T, Lee E, Oh S, et al. Imaging heterogeneous nanostructures with a plasmonic resonant ridge aperture[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(14): 145502.
- [38] Jonsson M P, Dekker C. Plasmonic nanopore for electrical profiling of optical intensity landscapes[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(3): 1029-1033.
- [39] Peri S S S, Sabnani M K, Raza M U, et al. Quantification of

- low affinity binding interactions between natural killer cell inhibitory receptors and targeting ligands with a self-induced back-action actuated nanopore electrophoresis (SANE) sensor[J]. *Nanotechnology*, 2021, 32(4): 045501.
- [40] Jiang Q B, Rogez B, Claude J B, et al. Quantifying the role of the surfactant and the thermophoretic force in plasmonic nano-optical trapping[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(12): 8811-8817.
- [41] Peri S S S, Sabnani M K, Raza M U, et al. Detection of specific antibody-ligand interactions with a self-induced back-action actuated nanopore electrophoresis sensor[J]. *Nanotechnology*, 2019, 31(8): 085502.
- [42] Jiang Q B, Rogez B, Claude J B, et al. Temperature measurement in plasmonic nanopores used for optical trapping[J]. *ACS Photonics*, 2019, 6(7): 1763-1773.
- [43] Raza M U, Peri S S S, Ma L C, et al. Self-induced back action actuated nanopore electrophoresis (SANE) [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(43): 435501.
- [44] Dai X, Fu W H, Chi H Y, et al. Optical tweezers-controlled hotspot for sensitive and reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy characterization of native protein structures[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1292.
- [45] Duan H G, Fernández-Domínguez A I, Bosman M, et al. Nanoplasmonics: classical down to the nanometer scale[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(3): 1683-1689.
- [46] Ward D R, Hüser F, Pauly F, et al. Optical rectification and field enhancement in a plasmonic nanogap[J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(10): 732-736.
- [47] Laible F, Homeber A, Fleischer M. Mechanically tunable nanogap antennas: single-structure effects and multi-structure applications[J]. *Advanced Optical Materials*, 2021, 9(20): 2100326.
- [48] Su K H, Wei Q H, Zhang X, et al. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles[J]. *Nano Letters*, 2003, 3(8): 1087-1090.
- [49] Sundaramurthy A, Crozier K B, Kino G S, et al. Field enhancement and gap-dependent resonance in a system of two opposing tip-to-tip Au nanotriangles[J]. *Physical Review B*, 2005, 72(16): 165409.
- [50] 荣升, 刘洪双, 钟莹, 等. 基于光力捕获金纳米立方体的拉曼光谱增强[J]. *光学学报*, 2021, 41(17): 1730003.
- Rong S, Liu H S, Zhong Y, et al. Enhancement of Raman spectra based on optical trapping of gold nanocubes[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(17): 1730003.
- [51] Huang J A, Mousavi M Z, Giovannini G, et al. Multiplexed discrimination of single amino acid residues in polypeptides in a single SERS hot spot[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2020, 59(28): 11423-11431.
- [52] Huang J A, Mousavi M Z, Zhao Y Q, et al. SERS discrimination of single DNA bases in single oligonucleotides by electro-plasmonic trapping[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5321.
- [53] Liu H L, Cao J, Hanif S, et al. Size-controllable gold nanopores with high SERS activity[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(19): 10407-10413.
- [54] Chang M G, Morgan G, Bedier F, et al. Review-recent advances in nanosensors built with pre-pulled glass nanopipettes and their applications in chemical and biological sensing[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2020, 167(3): 037533.
- [55] Freedman K J, Crick C R, Albella P, et al. On-demand surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy using dielectrophoretic trapping and nanopore sensing[J]. *ACS Photonics*, 2016, 3(6): 1036-1044.
- [56] Yang J M, Pan Z Q, Qin F F, et al. An *in situ* SERS study of ionic transport and the Joule heating effect in plasmonic nanopores[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(94): 13236-13239.
- [57] Nie X L, Liu H L, Pan Z Q, et al. Recognition of plastic nanoparticles using a single gold nanopore fabricated at the tip of a glass nanopipette[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(45): 6397-6400.
- [58] Cao J, Liu H L, Yang J M, et al. SERS detection of nucleobases in single silver plasmonic nanopores[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(7): 2198-2204.
- [59] Shen Q, Zhou P L, Huang B T, et al. Mass transport through a sub-10 nm single gold nanopore: SERS and ionic current measurement[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2021, 894: 115373.
- [60] Zhou J, Zhou P L, SShen Q, et al. Probing multidimensional structural information of single molecules transporting through a sub-10 nm conical plasmonic nanopore by SERS[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(34): 11679-11685.
- [61] Demaille C, Brust M, Tsionsky M, et al. Fabrication and characterization of self-assembled spherical gold ultramicroelectrodes[J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(13): 2323-2328.
- [62] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2006.
- Xu J G, Wang Z B. *Fluorimetry*[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006.
- [63] Ding S S, Liu C Y, Fu D Y, et al. Coordination of ligand-protected metal nanoclusters and glass nanopipettes: conversion of a liquid-phase fluorometric assay into an enhanced nanopore analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(3): 1779-1785.
- [64] Zambrana-Puyalto X, Ponzellini P, Maccaferri N, et al. Förster-resonance energy transfer between diffusing molecules and a functionalized plasmonic nanopore[J]. *Physical Review Applied*, 2020, 14(5): 054065.
- [65] Maccaferri N, Ponzellini P, Giovannini G, et al. FRET characterization of hollow plasmonic nanoantennas[J]. *Proceedings of SPIE*, 2019, 10894: 201-207.
- [66] Shi X, Gao R, Ying Y L, et al. A scattering nanopore for single nanoentity sensing[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(9): 1086-1090.
- [67] Zrimsek A B, Chiang N H, Mattei M, et al. Single-molecule chemistry with surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7583-7613.
- [68] Zong C, Xu M X, Xu L J, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(10): 4946-4980.
- [69] Wang X, Huang S C, Hu S, et al. Fundamental understanding and applications of plasmon-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Nature Reviews Physics*, 2020, 2(5): 253-271.
- [70] Deng L, Wang Y X, Liu C, et al. Plasmonic nanopore-based platforms for single-molecule Raman scattering[J]. *Optics Communications*, 2016, 372: 113-117.
- [71] Cecchini M P, Wiener A, Turek V A, et al. Rapid ultrasensitive single particle surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanopores[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(10): 4602-4609.
- [72] Yang J M, Jin L, Pan Z Q, et al. Surface-enhanced Raman scattering probing the translocation of DNA and amino acid through plasmonic nanopores[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(9): 6275-6280.
- [73] Koya A N, Cunha J, Guo T L, et al. Novel plasmonic nanocavities for optical trapping-assisted biosensing applications[J]. *Advanced Optical Materials*, 2020, 8(7): 1901481.
- [74] Whang K, Lee J H, Shin Y, et al. Plasmonic bacteria on a nanoporous mirror via hydrodynamic trapping for rapid identification of waterborne pathogens[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 68.
- [75] Burkhardtmeier J, Wang Y H, Wong K S, et al. Optical trapping, sizing, and probing acoustic modes of a small virus[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(1): 394.
- [76] Bouloumisi T D, Kotsifaki D G, Han X, et al. Fast and efficient nanoparticle trapping using plasmonic connected nanoring apertures [J]. *Nanotechnology*, 2021, 32(2): 025507.

Plasmonic Nanopores for Single-Molecule Optical Detection Applications

Wang Siyuan^{1,2}, Liu Hongyao^{1*}, Lu Xinchao^{1**}, Huang Chengjun^{1,2**}

¹Health Electronics R&D Center, Institute of Microelectronics of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

²School of Integrated Circuits, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract

Significance Single-molecule detection promotes the development of biological research because it reveals details that remain concealed to ensemble measurements. However, the detection and analysis of single molecules confront great challenges. On the one hand, single molecules produce very weak signals, requiring extremely sensitive detection methods. On the other hand, the sizes of single molecules are mainly confined to the nanoscale and they move with the naturally random state. It is necessary to isolate the detected signal of the target molecule and exclude interferences from other molecules. Therefore, the development of single-molecule detection methods attracts considerable researchers attention.

Nanopores provide a sensing volume comparable to the size of single molecules, which is conducive to realize single-molecule detection. Early nanopore-based sensors mainly depend on electrical measurements, single-molecule detection in nanopores using optical methods has recently emerged as an alternative approach. In this context, plasmonic nanopores have been proposed and extensively investigated. Plasmonic nanopores combine plasmonic nanoantennas with nanopores, which confine and enhance optical excitation near the nanopores, forming “hotspots” that have significant advantages for single-molecule sensing. First, the strong electromagnetic field enhances the interaction between the field and the single molecule in the hotspot, while reduces the noise generated by molecules at other locations. Second, the gradient electric field in the plasmonic nanopore attracts nearby molecules, increasing the molecular translocation time. Third, the refractive index distribution of the plasmonic nanopore directly affects the resonance conditions, which constitutes the molecular information in the hotspot. Therefore, plasmonic nanopores have been increasingly explored for single-molecule detection in recent years.

With the development of single-molecule optical detection based on plasmonic nanopores, diverse plasmonic nanopore structures and measurement schemes have been proposed to detect a variety of single molecules, which renders a review of the existing studies necessary.

Progress In this review, the typical structures of plasmonic nanopores and their mechanisms of field enhancement, the mostly used detection strategies, the application progress, and typical achievements in single-molecule detection are described.

Section 2 summarizes the classification and typical structures of plasmonic nanopores. Plasmonic nanopore structures can be divided into three types: plasmonic nanopores based on metal micro/nanostructures (including plasmonic nanowell-nanopore, plasmonic nanoslit cavity, and plasmonic bullseye structures), plasmonic nanopores based on nanogaps (including bowtie nanoantennas, double nanoholes, and nanoparticle dimers), and plasmonic nanopores based on glass nanopipettes (including gold nanoporous spheres and thin-film-modified single nanopores). The structure characteristics and field enhancement mechanisms of each plasmonic nanopore structures are discussed.

Section 3 describes the four mostly used detection strategies for plasmonic nanopores and their characteristics, including fluorescence detection, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), surface plasmon resonance displacement sensing, and combined optical and electrical sensing. Fluorescence detection is one of the most widely used methods for the detection of single molecules in solution. Plasmonic nanopores significantly amplify the fluorescence signal and decrease background noise. However, the introduction of fluorescent dyes may affect the molecular state of single molecules, increasing the experimental complexity. The development of label-free single-molecule detection strategies such as SERS and plasmonic resonance displacement sensing is highly desired. Meanwhile, combined optical and electrical sensing is expected to break the current bottleneck of electrical signal detection in solid nanopores, enabling single-molecule sensing with high signal-to-noise ratio and high resolution.

Section 4 provides a brief review of the application progress and typical achievements of plasmonic nanopores in the detection of single molecules including DNA, proteins, peptides, and other bioparticles. The detection of DNA molecules mainly includes DNA molecular translocation, DNA identification, and gene sequencing. Plasmonic structures such as bowtie nanoantennas, bullseyes, and plasmonic nanowells-nanoholes have been used for the translocation detection of single DNA molecules, and the optical label-free detection of single DNA molecules has been achieved using plasmon resonance displacement sensing. DNA identification and sequencing processes are mainly based on SERS signals. Due to the weak spectral signals of single DNA molecules, plasmonic nanopores providing larger field enhancement are preferred for SERS detection. The detection of proteins and peptides involves capture, identification, and structural characterization. In addition to the detection of biological single molecules, plasmonic nanopores are used for the detection of bioparticles such as bacteria and viruses.

Section 5 summarizes the opportunities and challenges for further research and application of plasmonic nanopores.

Conclusions and Prospects Plasmonic nanopores realize nanometer-sized hotspot fields near the nanopores, enhance the interaction between the field and matter, and achieve highly sensitive detection with high spatial resolution. In recent years,

plasmonic nanopores have been increasingly explored for the optical detection of single molecules. Optical detection offers many advantages over electrical sensing strategies, such as decoupling of the driving voltage and buffer conditions from the signal strength and big-bandwidth data acquisition. As one of the most promising optical strategies, SERS based on plasmonic nanopores provides compositional information on the detected substance. Extending the residence time of the detected substance near the nanopores is the main challenge to realize plasmonic-nanopore-based SERS. This is currently achieved through the optical force of plasmonic nanopores. Although some progress has been reported, it is still necessary to develop multiphysics coupling models to achieve a more controllable and stable three-dimensional manipulation of molecules. Combining optical and electrical sensing strategies in plasmonic nanopores has also great potential for superior single-molecule detection. Plasmonic nanoantennas optimize the performance of electrical measurements by increasing the molecular translocation time and enhancing electrical signals. Further development of the above technologies will promote the plasmonic nanopore technology for single-molecule detection and identification and realize the single-molecule sequencing technology.

Key words optics at surface; surface plasmon polaritons; nanopores; optical detection; single-molecule detection