

表面增强拉曼光谱技术在流行性病毒检测领域的研究进展

刘艺, 王楠, 何绍华, 张竣, 冯尚源, 林多*

福建师范大学光电与信息工程学院医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

摘要 近几年新型冠状病毒 COVID-19 的迅速传播, 引起了全球对传染病防控和快速病毒检测技术的高度关注。表面增强拉曼光谱(SERS)作为一种光学分析技术, 凭借其独特的分子指纹特性和高检测灵敏度的特点, 成为生物医学检测领域的有力工具, 对可能大规模暴发的流行性病毒灵敏迅速的检测以及监控提供新颖、高效的光学解决方案。本文对从 2021 年以来开展的 DNA、RNA 病毒, 尤其是威胁人类生命健康的流行性病毒检测工作当中使用的标记、非标记 SERS 技术进行梳理, 从 SERS 基底结构建构及功能化修饰, 分子探针的设计, 高速响应、高灵敏度检测模型构建, 生物技术、机器学习方法的联合使用等方面, 特别是基于便携式、手持式拉曼光谱仪的研究, 对 SERS 技术在病毒检测领域的应用进展进行了总结和展望。

关键词 医用光学; 表面增强拉曼光谱; 病毒检测; 生物传感器; 纳米光子学; 纳米医学

中图分类号 O657.37

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231604

1 引言

病毒是引起许多感染性疾病的主要原因, 包括流感、高死亡率的下呼吸道感染、腹泻、结核病、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、登革热、乙肝等^[1-2]。这些疾病可以对人体的各个系统造成严重的损害, 甚至产生生命威胁。大规模的病毒传播, 不仅对个体的健康产生影响, 还可能对整个社会和经济造成巨大冲击^[3]。1918 年的流感大流行导致 5000 万人或更多人死亡, 是人类历史上有记录以来最致命的事件。过去十年见证了史无前例的大流行暴发: H1N1 猪流感(2009)、寨卡病毒(2015), 以及非洲大部分地区出现的类似大流行的埃博拉热^[4]。而 2019 年暴发的新型冠状病毒 COVID-19 已演变为一场全球性危机, 已被世界卫生组织定义为国际关注的突发公共卫生事件。截至 2022 年 2 月 25 日, 206 个国家和地区的当局报道了超过 4.31 亿例病例, 其中, 至少 590 万人死亡^[5]。传染性病毒的暴发对公共医疗系统提出了重大挑战。早期和准确的病毒诊断对防止病毒传播至关重要, 特别是在没有特定疫苗或有效药物的情况下^[6]。

病毒由核酸(DNA 或 RNA)和包膜蛋白外壳组成。它们通常需要宿主细胞来复制它们的基因组并繁殖病毒颗粒^[2]。基于核酸的检测的一个关键要素

是聚合酶链反应(PCR), PCR 和逆转录-PCR 分别是用于检测 DNA 和 RNA 病毒的常规方法(Lin 等^[7]、Liu 等^[8]), 但这种方法只能获得半定量结果, 并且无法检测到浓度较低的目标物。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)是一种更具靶特异性的方法, 使用多对特异性引物和合适的探针, 靶向同一样品中可能发现的不同病毒, 有助于检测病毒组(Ou 等^[9]、Bustin 等^[10]), 但其样品准备时间长, 设备和试剂成本高, 需要严格控制温度循环。环介导等温扩增(LAMP)使用多个引物来启动聚合酶驱动的基因序列延伸, 通过这种方法扩增不需要复杂的设备, 是一种稳健快捷的方案(Soroka 等^[11]), 但其面临的挑战是引物设计复杂以及污染残留。而常见的蛋白检测手段有抗体检测、抗原检测等^[12]。应用最广泛的免疫测定之一是酶联免疫吸附测定(ELISA), 其高灵敏度和稳健性使其成为病毒检测的重要手段, 但其缺点在于抗体与其他共同感染病毒的交叉反应导致假阳性或定量不准确^[6, 13]。上述实验大多需要复杂的设备以及具备专业技能的人员, 不利于在快速暴发病毒传染的区域开展大规模的检测。对于资源稀缺地区的大多数人来说, 基于大型设备高精度仪器的实验在许多地区也是难以实现的, 无法满足其对病毒的监控与防护^[3]。随着检测技术的进步与融合, 新兴的病毒等生物分子检测技术, 如表面增强拉曼散射(SERS),

收稿日期: 2023-12-29; 修回日期: 2024-02-05; 录用日期: 2024-02-19; 网络首发日期: 2024-02-29

基金项目: 国家自然科学基金(12374405)、福建省雏鹰计划青年拔尖人才

通信作者: *duo@fjnu.edu.cn

逐渐成为研究热点,以期克服传统方法的一些局限性^[14]。

SERS 技术是一种基于局域等离子体共振的超灵敏分子振动光谱技术^[15]。它能够使吸附于或者非常靠近纳米金属表面的待测物质的拉曼信号提升 $10^4 \sim 10^{11}$ 倍^[16-17],甚至可以实现单分子检测。SERS 继承自发拉曼分子指纹光谱的特性^[18],并且凭借其超灵敏、多路复用和定量检测等特点,在生物化学和生命科学领域表现出了独特的优势^[15],已被广泛应用于疾病筛查、环境检测、食品药品安全等领域^[19-20]。其中,SERS 技术在病毒检测中表现出极高的检测灵敏性,能够实现对极微量病毒的快速、准确检测^[21],这对于早期病毒感染的迅速筛查具有重要意义,有助于采取及时的医学干预^[22]。SERS 技术

通过对病毒的光谱特征进行分析,展现出卓越的特异性,能够区分不同类型的病毒,包括病毒亚型和变异株。这种高度特异性使其在病毒溯源、分类和流行病学研究中具备独特的优势^[5,19]。近年来,研究人员聚焦新型 SERS 纳米材料研发、高效 SERS 探针设计、检测平台优化,以及 SERS 技术与其他分析方法的融合,这些努力极大推动了 SERS 技术在病毒检测中的检测研究,以更好地满足临床、实验室和应急领域的需求。

在本篇综述中,我们总结了近三年 SERS 技术在病毒检测领域的研究进展以及应用潜力。从病毒的遗传物质、病毒种类、影响程度等多个角度,对其应用到的 SERS 技术、检测设备和联合使用的其他技术进行了梳理和总结,如图 1 所示。

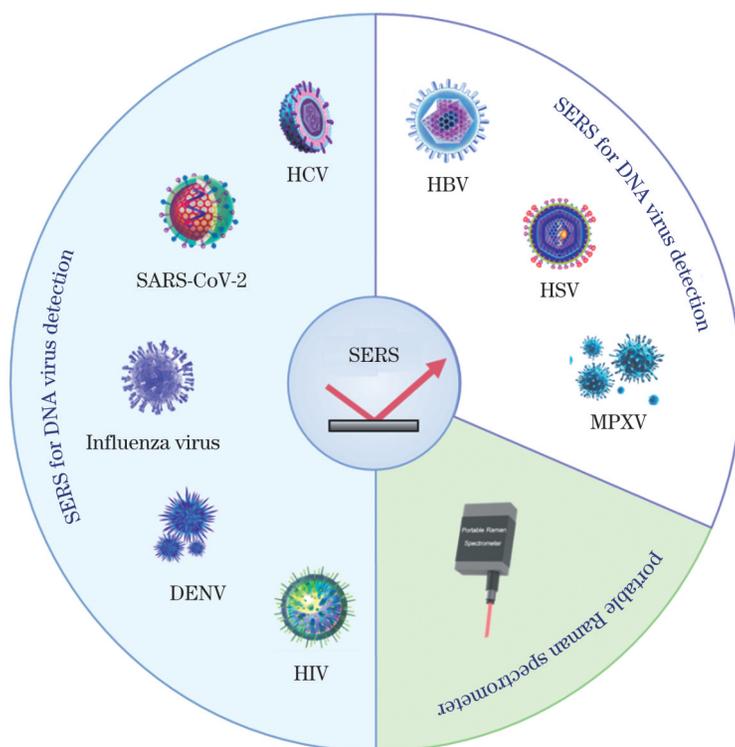


图 1 SERS 技术的病毒检测示意图

Fig. 1 Schematic diagram of virus detection based on SERS technology

2 SERS 技术以及其增强机制

1928 年,印度物理学家 Raman^[23]发现了光的非弹性散射现象,即拉曼效应。用单色光照射在分子上时,绝大部分光子的频率、波长和能量都没有发生变化,这种弹性散射被称为瑞利散射,小部分光子产生非弹性散射,即拉曼散射。分子振动会引起的光子频率的偏移,这种波长偏移取决于散射分子的化学结构^[24]。拉曼光谱利用散射光来获取关于分子振动的信息,这可以提供有关分子的结构、含量等信息^[25]。由于自发拉曼光谱信号微弱,荧光噪声强等局限性,对于低浓度的样品或微弱振动模式的检测具有一定的限制。SERS

现象最早由 Fleischmann 等^[26]在 1974 年发现,1977 年, Jeanmaire 等^[27]通过系统的实验和计算发现吸附在粗糙银表面上的每个吡啶分子的拉曼散射信号与溶液相中的吡啶的拉曼散射信号相比增强约 10^6 倍,这是一种与粗糙表面相关的表面增强效应,被称为 SERS 效应。

SERS 的增强机制如下:1) 电磁场(EM)增强, SERS 是一种结合光-金属相互作用和光-分子相互作用的现象^[21]。入射激光撞击金属和介电界面时,电磁波可以驱动金属纳米结构的局域传导电子进行集体振荡。当入射光的频率与金属中自由电子的固有振荡频率相匹配时,就会发生表面等离子体共振(SPR)。共

振频率取决于粒子的大小、形状、介电环境和电子密度、有效电子质量等。在金属纳米结构中,SPR可以高度定位到特定位置,这被称为局域表面等离子共振(LSPR)。能够产生强LSPR效应的纳米粒子称为等离子体纳米粒子(PNP),通常是Ag、Au和Cu,它们在可见光到近红外区域显示出很强的SPR。LSPR使得入射光发生共振吸收或散射^[16]。因此,入射光可以有效地耦合到金属纳米粒子中,并使纳米粒子表面的局部电磁场强度增强多个数量级,这是SERS信号增强的关键^[24]。特别在一些等离子体结构的狭窄间隙中,可通过光的集中而产生强烈的局部场增强,称为“热点”效应^[28]。2) 化学(CM)增强,主要是由于吸附在粗糙金属表面上的分子与金属之间发生电荷转移引起的。这两种增强中,电磁场增强往往占据主导地位^[29]。

由于其响应快、特异性强、检测无损等特性,SERS在表面与界面研究、化学与生物传感器、生物医学监测、痕量分析、电化学反应与催化反应等领域得到了广泛的应用^[30-31]。

3 SERS技术检测RNA病毒

病毒的遗传物质可以由DNA或RNA组成^[32]。病毒家族是根据其遗传物质的核酸类型来进行分类的。核糖核酸病毒又称为RNA病毒,其遗传物质为RNA。相较于DNA病毒,RNA病毒具有较高的变异性^[2],影响全世界人类生活安全健康程度严重、范围较广的传染性疾病主要由其引发,由RNA病毒感染造成的著名人类疾病包括艾滋病(AIDS)、严重急性呼吸道症候群(SARS)、2019新型冠状病毒(COVID-19)、流行性感冒、丙型肝炎、西尼罗河热、脊髓灰质炎、麻疹等^[33]。

新型冠状病毒SARS-CoV-2近几年的大规模迅速传播,造成大量严重肺炎病例,同时其自身通过免疫逃逸又具有较高的变异性,使新型冠状病毒、流感等呼吸道传染类疾病成为病毒检测领域中的重点、难点问题^[1],传统的检测手段面临着挑战。在这一背景下,本小节将着重探讨SERS技术在检测这些关键病原体中的应用进展。

3.1 SERS技术应用于新型冠状病毒检测

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是已知的第七种感染人类的冠状病毒,并引发了名为COVID-19的传染病,其主要传播途径是接触含SARS-CoV-2病毒的飞沫或污染物^[34]。实时定量聚合酶链反应已成为病毒鉴定定量的金标准^[35]。大量工作表明,与逆转录-定量聚合酶链反应、酶联免疫吸附实验为代表的需要长时间预处理和专业人工操作的常用方法相比,SERS技术以快速响应、灵敏度高、操作简便等优势可用于SARS-CoV-2在大规模传染前期控制、中期诊断、后期防御等不同时段的快速准确鉴定^[36]。

SERS在病毒检测应用中主要使用标记和非标记

两种检测策略。由SARS-CoV-2的结构可知,其编码29个蛋白,包括4个关键结构蛋白:核衣壳(N)、刺突(S)、包膜(E)和膜蛋白(M)^[37],针对每一个目标抗原,这两种方法都有各自的优势和应用场景。

非标记技术的原理是将病毒样本直接与SERS增强基底混合,获取病毒样本自身的SERS信号,无需添加外部标志物。由于样本中的天然分子信号较弱,非标记技术对检测基底的信号增强性能有着更高的要求。Yang等^[36]提出了一种以人血管紧张素转换酶2(ACE2)功能化的金“病毒陷阱”纳米结构作为SERS基底的方案,此方案可以选择性地捕获和快速检测S蛋白表达的冠状病毒,实现单个病毒水平检测。如图2(a)所示,SARS-CoV-2可以被由斜金纳米针阵列(GNAs)组成的“病毒陷阱”纳米森林定位,并被锚定在含病毒尿液中酰胺修饰的GNAs上的ACE2捕获,即使是复杂的多蛋白质环境也能通过机器学习和识别技术,建立病毒信号的识别标准,仅用时5 min可实现模拟病毒污染水样本的检测,检测限为80 copies/mL。准确、可靠、廉价和完全可循环利用的分析平台的开发对从医疗诊断到环境筛查的多个领域至关重要^[38]。在进行特殊结构优化以提升检测灵敏度的重要工作中,Sarychev等^[39]从SARS-CoV-2刺突糖蛋白(S蛋白)的受体结合域(RBD)膜和银表面上设计一个超箭头金属介电纳米腔,可检测到小于1 pg的蛋白质样品,无标记情况下直接获得SARS-CoV-2病毒关键抗原S糖蛋白RBD的拉曼和SERS特征光谱。Wu等^[40]设计并制作了一种新型的远程SERS(LR-SERS)衬底,该衬底采用了Au纳米板薄膜/MgF₂/Au镜/玻璃结构,以提高电子场扩展后的LR-SERS效果,其中,Au薄膜被对称介质束缚由有序的六方Au纳米板(Au NPLs)自组装而成,最低检测限为 9.8×10^{-11} g/mL。结合主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA),可将S蛋白感染的唾液与健康人唾液进行区分,灵敏度为98%,特异性为100%。Leonardi等^[41]通过SERS技术展现了SARS-CoV-2 Omicron变体基因组的振动指纹,明确地揭示了其中核苷的碱基指纹信息。

柔性材料的使用使得SERS技术可以在复杂的样品表面进行高灵敏度的光谱检测,增加生物样品与基底的接触面积。Paria等^[42]开发了一种新的纳米模型,通过纳米压印技术(NIL)结合转移打印刚性和柔性SERS基底来实现病毒无标记检测,如图2(b)所示,增强磁场的金属绝缘子天线(FEMIA)结构由多个交替堆叠的银和二氧化硅组成。在25 min内可从金属-绝缘体-金属纳米结构上的病毒样本获得放大数倍的SERS光谱,读取纯化形式的SARS-CoV-2与H1N1病毒融合蛋白的强信号,实验检测限为500 nmol。此外,利用PCA和随机森林分类算法可以识别4种不同类型的包膜RNA病毒,准确率超过83%。可弯曲的

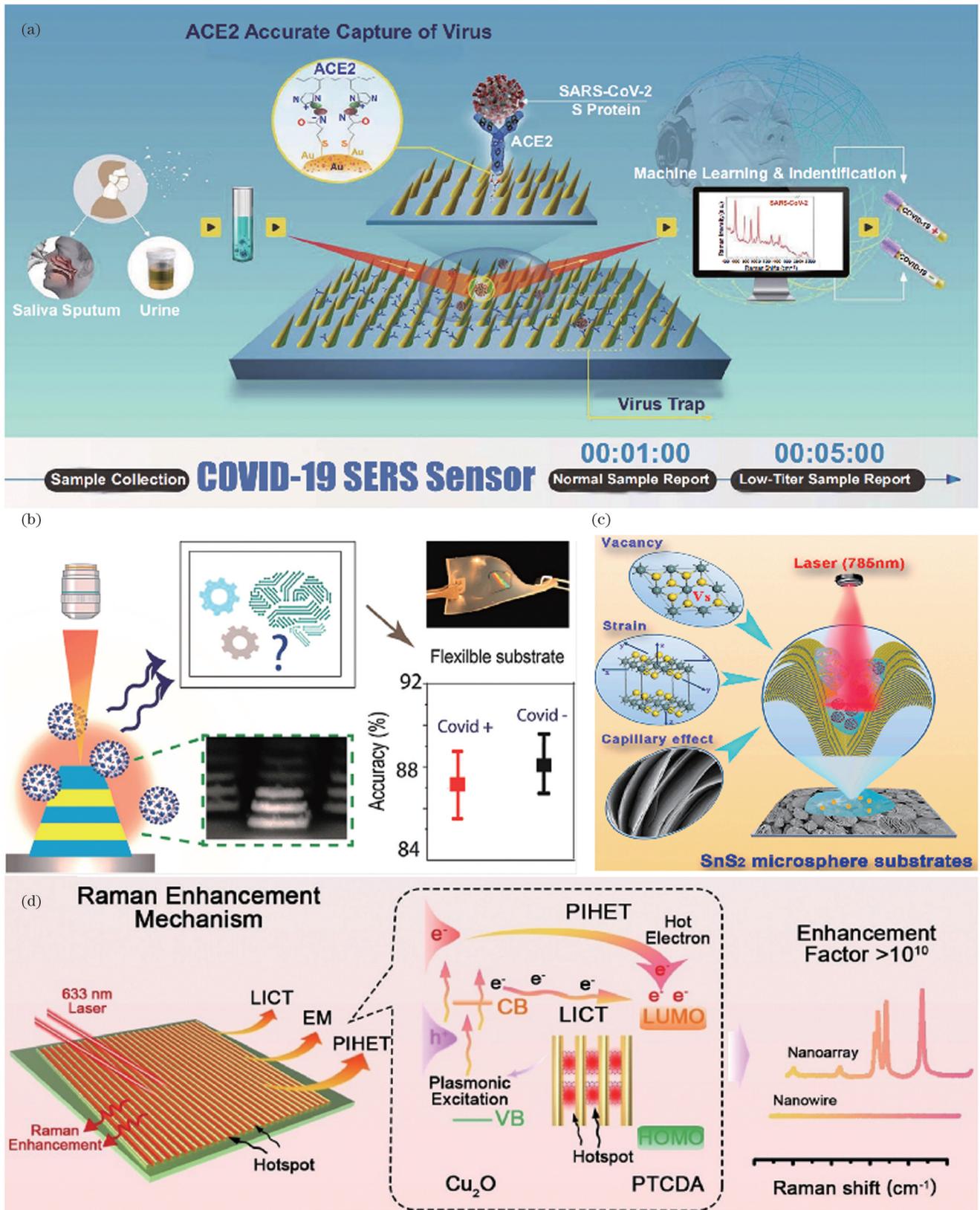


图 2 SERS 传感器及平台的多元化设计应用于 SARS-CoV-2 非标记检测。(a) COVID-19 SERS 传感器设计及操作流程示意图^[36]；(b) SERS 金属-绝缘体-金属纳米结构柔性基底结合机器学习的无标签检测平台^[42]；(c) SnS₂ 微球基板设计示意图^[44]；(d) 具有显著增强因子的 Cu₂O 纳米阵列的拉曼增强机理^[45]

Fig. 2 SERS sensors and platforms are designed in a variety of diverse ways for label-free detection of SARS-CoV-2. (a) Schematic diagram of the design and operation process of the COVID-19 SERS sensor^[36]; (b) flexible substrate combined with SERS metal-insulator-metal nanostructures and machine learning-based label-free detection platform^[42]; (c) schematic diagram of SnS₂ microsphere substrates design^[44]; (d) Raman enhancement mechanism of Cu₂O nanoarray with significant enhancement factor^[45]

FEMIA 基板允许人们将生物传感器安装在弯曲和可弯曲的表面以及可穿戴设备上,以便在各种检测环境下快速识别病毒。Ramachandran 等^[43]开发了一种绿色环保纸基 SERS 平台,疏水纸基体可使银纳米粒子获得高约束区域,从而提高其灵敏度。利用带 GAgNPs 的柔性纸传感器对刺突蛋白进行检测,该传感器的检测限为 2.4 pg/ μL 。对人唾液中的刺突蛋白进行实时分析,可在 2 min 内得出检测结果。

半导体作为基于化学机理的 SERS 衬底,在病毒检测过程当中可将 SERS 技术的应用范围拓展^[12,44]。Peng 等^[44]开发了一种微米大小的球形 SnS₂ 结构,如图 2(c)所示,以纳米峡谷形貌的分级纳米结构作为半导体基 SERS 基底,晶格变化和硫空位促进的电荷转移化学增强以及毛细管效应引起分子富集的协同增强,使基底具有超高的 SERS 灵敏度。结合两步法 SERS 诊断新途径,通过 SARS-CoV-2 S 蛋白和 RNA 的 SERS 信号识别,诊断 SARS-CoV-2 的传染性,能够准确捕捉实际环境中非感染性裂解的 SARS-CoV-2 病毒粒子,而目前的 PCR 方法却无法实现。Feng 等^[45]自组装了一种可与贵金属相媲美的自由载流子密度为 $1.78 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ 的新型 Cu₂O 纳米阵列,如图 2(d)所示。高灵敏度主要得益于半导体中等离子体诱导的热电子转移(PIHET)。纳米阵列能够实现非酶和无扩增的 SARS-CoV-2 RNA 的定量检测,测量时间仅需 5 min,检测极限为 60 copies/mL。

在非标记 SERS 检测工作当中,常常利用机器学习技术进行数据处理。由于 SERS 技术产生的拉曼光谱数据复杂而丰富,机器学习模型能够有效处理这些高维度的信息。通过算法,可以提取和分析光谱中的特征,识别潜在的生物标志物或分子信息。在许多工作中建立的深度学习模型在模式识别和分类任务上表现出色,即使面对复杂和变化的样本,模型也能作出准确的预测^[46],为病毒种类鉴别,病毒突变株的鉴别提供了有利帮助。Li 等^[46]自组装了一种具有二维周期性金字塔结构表面拉曼增强的平台,每个金字塔的腰部位置都有能够使信号显著增强的 SERS“热点”,能有效地检测到唾液中的 SARS-CoV-2。采用基于支持向量机分析技术的光谱特征识别算法,提升平台对 SARS-CoV-2 病毒、SARS-CoV-1 病毒、细胞外泌体相关颗粒的识别能力。对 COVID-19 患者和健康对照的临床样本进行盲测,敏感度为 100%,特异度为 80%。整个样本处理和检测全过程,可以在 5 h 之内完成。

由于冠状病毒持续蔓延的主要原因是病毒不断变异,SARS-CoV-2 的表面刺突(S)蛋白的氨基酸序列发生突变,直接影响其生物学功能,导致传播增强,引发免疫逃逸效应。因此,及时发现这些突变对制定有针对性的治疗方案和实施精准防控措施至关重要。Qin 等^[47]开发了一种基于机器学习 Logistic 回归算法的无标签 SERS 检测策略,以准确识别 Beta(B.1.351/

501Y.V2)、Delta(B.1.617)、COVID-19 和 Omicron(BA.1)株,如图 3(a)所示,此方法在阳性和阴性人鼻拭子盲测中均达到 100% 的准确率。Yeh 等^[48]在 SERS 生物传感器的设计和工程上采用了三维多孔银微等离子体工程纳米组件(AgMEN)在纤维素纸上沉积的放大,采集显著的 SERS 信号,如图 3(b)所示,超灵敏检测模拟人类唾液条件下的 SARS-CoV-2 S 变体(包括野生型、Alpha、Delta 和 Omicron),通过检测 SARS-CoV-2 S 和 N 蛋白,SERS 生物传感器在检测限分别为 1 fg/mL 和 0.1 pg/mL。Mo 等^[49]实现了一种基于深度学习的冠状病毒刺突蛋白拉曼光谱分类方法,建立 5 种冠状病毒(MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2、HCoVHKU1 和 HCoV-OC43)刺突蛋白的拉曼光谱数据集,并通过神经网络模型进行分类。

另一种基于 SERS 技术的检测策略是标记检测。此策略的实施方法主要是将具有强烈拉曼信号的探针分子修饰到金属纳米粒子的表面,通过蛋白、核酸适配体等识别基团准确识别、捕获目标物,再通过检测探针分子的拉曼信号变化来间接实现对于目标物的特异性定量检测。标记 SERS 技术的优势在于可实现病毒特异性识别与定量检测。本课题组^[50]开发了一种基于表面增强拉曼光谱的横向流动免疫分析法(LFA),采用独特设计的核壳纳米颗粒,内嵌拉曼探针分子作为指示靶蛋白浓度的指标,结合 SERS 技术对 SARS-CoV-2 N 蛋白进行了灵敏、快速、灵活、定量的检测,15 min 内检测限为 0.03 ng/mL,检测范围为 10~1000 ng/mL,与传统的基于视觉检测的 LFA 相比,此方法具有更高的灵敏度。Guan 等^[51]以 SARS-CoV-2 刺突蛋白为靶点,通过捕捉底物和检测探针基于适体特异性识别来特异性检测 SARS-CoV-2 抗原,构建了一种即时 SERS 检测平台,如图 4(a)所示,使用伪病毒,无预处理的情况下,用手持拉曼光谱仪在 5 min 内检测到 SARS-CoV-2 病毒及其变异株。伪病毒的检测限为 124 TU μL^{-1} (18 fmol S 蛋白),线性范围为 250~10000 TU μL^{-1} 。此外,该方法可以特异性识别 SARS-CoV-2 抗原,而不会与其他冠状病毒或甲型流感的特异性抗原发生交叉反应。Antoine 等^[52]通过对人源单链抗体(ScFv)文库进行生物扫描,分离到结合 SARS-CoV-2 刺突蛋白的单链重组抗体片段。将 ScFvs 与磁性纳米颗粒和 SERS 纳米标记结合,形成免疫复合物并检测 SARS-CoV-2 刺突蛋白,在病毒传输介质中 30 min 的检测限为 257 fg/mL,实现了即时 SERS 免疫分析,同时检测到 B.1.1.7、B.1.351 和 B.1.617.2 刺突蛋白,但与常见的人类冠状病毒 HKU1 刺突蛋白无交叉反应。灭活的 SARS-CoV-2 全株病毒的检测浓度为 4.1×10^4 genomes/mL,比典型传染性个体的病毒载量低很多。Zhang 等^[53]采用新型油/水/油(O/W/O)三相液-液界面自组装方法制备 SERS 免疫底物,形成两层致密均匀的金纳米颗粒

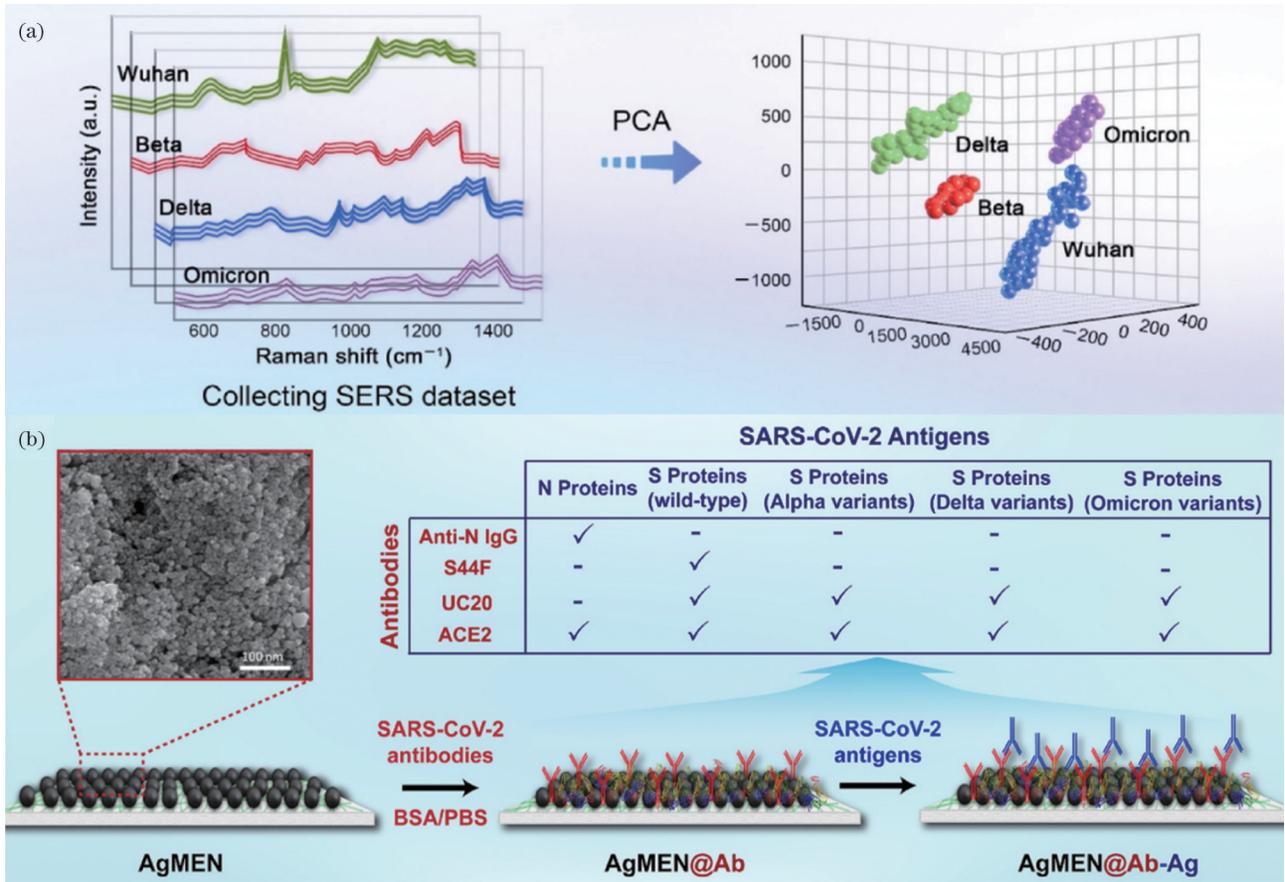


图 3 机器学习技术应用于 SARS-CoV-2 非标记检测。(a) 采用 PCA 对纯 S 蛋白标准品的 SERS 光谱进行鉴别^[47]; (b) 将三维多孔 Ag 纳米颗粒 (AgMEN) 沉积在纤维素纸上 (左), 并在表面修饰抗体 (AgMEN@Ab) (中), 通过 SERS 信号分析对应的抗原 (右)^[48]

Fig. 3 Machine learning techniques are applied to SARS-CoV-2 label-free detection. (a) Identification of pure S protein standard samples by SERS spectroscopy using PCA^[47]; (b) SERS biosensors are engineered with 3D porous Ag nanoparticle-based microplasma-engineered nanoassemblies (denoted as AgMEN) deposited on cellulose paper (left) and functionalized with antibodies (AgMEN@Ab) (center part) to detect the corresponding antigens by analyzing the SERS response (right)^[48]

膜, 通过 SARS-CoV-2 刺突抗体修饰的 SERS 免疫底物、刺突抗原蛋白和拉曼报告标记的免疫 Ag 纳米颗粒之间的免疫反应进行检测。基于 SERS 的生物传感器在磷酸盐缓冲盐条件下对 SARS-CoV-2 刺突蛋白的检测限为 0.77 fg/mL, 未处理唾液条件下检测限为 6.07 fg/mL, 对 SARS-CoV-2 病毒表现出良好的特异性和敏感性。

标记法也可以利用不同的 SERS 探针标记不同的待测物, 通过不同特征峰来鉴别病毒。Vedelago 等^[54]提出了一种通过交流电流体动力学 (ac-EHD) 开发的基于 Au - Ag 纳米盒 SERS 条形码和纳米混合的双重 SARS-CoV-2 微量检测方法, 以检测 SARS-CoV-2 的刺突 (S) 和核衣壳 (N) 结构蛋白, 提升其检测特异性, 重点探究了 Omicron 和 Delta 型变体的识别和区分, 如图 4(b) 所示。此方法可以检测到低至 20 virus/ μ L 和 50 pg/mL 的 RBD 蛋白, 并在感染和健康鼻咽拭子中清楚地识别病毒。

对典型临床样本中 SARS-CoV-2 RNA 进行鉴别, 缩短诊断时间, 实现病毒感染的早期发现尤为重要, Zhang 等^[55]提出了一种基于 SERS 活性银纳米棒

(AgNRs) 传感芯片和特殊设计的智能解锁介导的目标回收信号放大策略, 如图 5(a) 所示, 将锁定探针 (LPs)、发夹 DNA 和 SERS 标记与 SARS-CoV-2 RNA 样本在一个阵列的 SERS 传感芯片上进行杂交, 实现对 SARS-CoV-2 RNA 的识别, 执行无核酸酶解锁介导的目标循环信号扩增, 并结合 SERS 标记生成 SERS 信号。SARS-CoV-2 RNA 的 SERS 传感器可在 50 min 内得出检测结果, 其超高灵敏度可达 51.38 copies/mL。Lin 等^[56]开发了一种用于 SARS-CoV-2 RNA 定量检测的比率 SERS 传感芯片, 如图 5(b) 所示, 该方案使用了碱基互补配对机制, SERS 传感芯片内标分子 (4-MBN) 可用于定量分析时实时校准探针分子的拉曼信号, 可获得 $10^{-6} \sim 10^{-12}$ mol 的动态检测范围, 检测限低至 7.61×10^{-14} mol。Chen 等^[57]以刺突蛋白 DNA 适配体作为受体, 以自身生长的金纳米粒表面作为 SERS 检测底物, 对 SARS-CoV-2 进行敏感检测, 如图 5(c) 所示, 通过监测 Au 纳米粒表面释放的适配体 DNA 与 SARS-CoV-2 病毒粒子中的刺突蛋白之间新的结合引起的 SERS 峰强度变化, 对 SARS-CoV-2 裂解液进行了定量分析, 可在 15 min 完

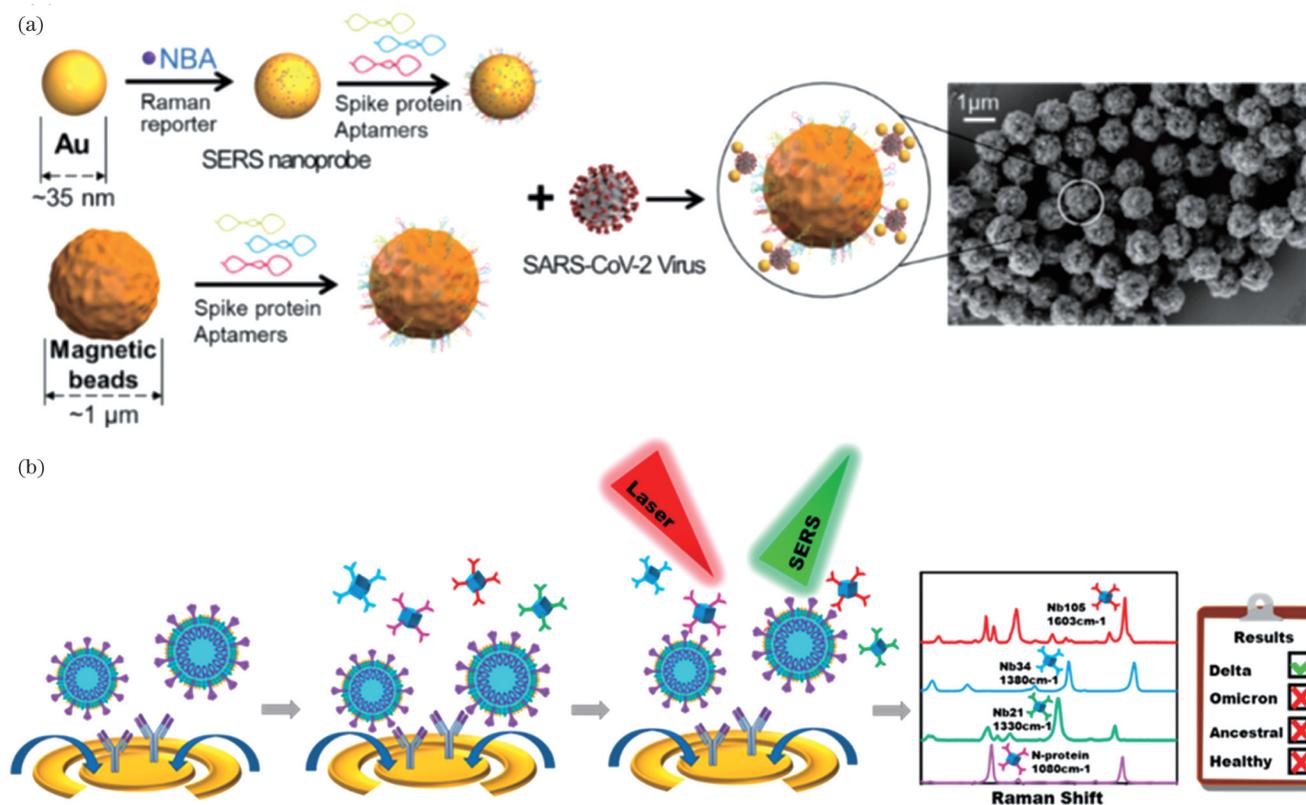


图4 SERS纳米探针应用于SARS-CoV-2标记检测与鉴别。(a)SERS纳米探针偶联的S蛋白适配体和磁珠偶联的S蛋白适配体示意图及“三明治”结构的SEM图像^[51]; (b)RBD探针用于SARS-CoV-2的SERS纳米标记捕获检测,基于拉曼光谱信号进行病毒和变异鉴定^[54]

Fig. 4 Application of SERS nanoprobes in label detection and differentiation of SARS-CoV-2. (a) Schematic of the SERS assay based on one-step aptamer recognition for rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 virus within 5 min^[51]; (b) stepwise reactions of RBD probe for SARS-CoV-2 capture and detection with SERS nanotags, for virus and variant identification based on the average Raman spectrum results^[54]

成检测,检测限小于10 PFU/mL。Yin等^[58]提出了一种由异纳米结构组成的磁响应底物,该底物控制耦合距离,对SARS-CoV-2的N基因进行超灵敏和高选择性检测。该平台能够可逆地缩短等待时间,增强SERS信号,从1 fmol到100 amol的检测限比未使用磁调制的信号提高了10倍。

SERS技术应用于病毒检测的形式并不单一,许多工作表明SERS技术结合其他检测技术,形成双模态或多模态传感,有助于提供目标物质多维的信息,技术的综合使用还有助于相互校准和验证,提高了分析的准确性和可靠性。Gao等^[59]提出了一种基于AuNPs的比色/SERS/荧光三模生物传感器,如图6(a)所示,该传感器可在40 min内快速选择性地检测病毒RNA,在所有三种模式下都实现了对飞摩尔电平的极限检测,吸光度模式下为160 fmol,荧光模式下为259 fmol, SERS模式下为395 fmol。该传感器的每一种工作模式都能够识别靶基因中的单碱基错配,从而最大限度地减少假阴性/阳性读数。Wu等^[60]开发了一种表SERS-PCR检测方法,该方法使用Au NPs内在化的Au纳米酒窝底物(Au NDS),通过减少扩增DNA所需的热循环步骤来缩短诊断时间,如图6(b)所示,基

于Au NDS的SERS-PCR体系可以在不到10个热循环步骤的情况下检测到bridge DNAs,此SERS-PCR系统集成了一个采样模块,能够通过便携式拉曼光谱仪将样本和AuNPs自动引入到Au NDS中,从而实现快速和准确的诊断。

3.2 SERS技术应用于流感病毒检测

流感,又称为季节性流感,是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病。流感病毒分为甲型(IAV)、乙型(IBV)和丙型,而甲型和乙型流感病毒通常是引起人类流感的主要原因。流感病毒具有高度变异性,尤其是甲型流感病毒,其表面的两个主要蛋白质——血凝素(HA)和神经氨酸酯氨基酸酰转移酶(NA)的不断变异^[4],使得免疫系统难以对抗。

SERS技术快速响应特性使其能够实现实时监测,有助于对流感病毒传播进行及时追踪和控制,可以通过多通道检测或者高通量的芯片设计,在短时间内完成大规模的样本筛选,适用于流感等传染病的暴发性疫情。

在非标记SERS检测流感病毒的方案当中,Tabarov等^[61]指出由于流感病毒的SERS谱不具有特定的峰,因此不能直接进行分类和检测。在缓冲环境

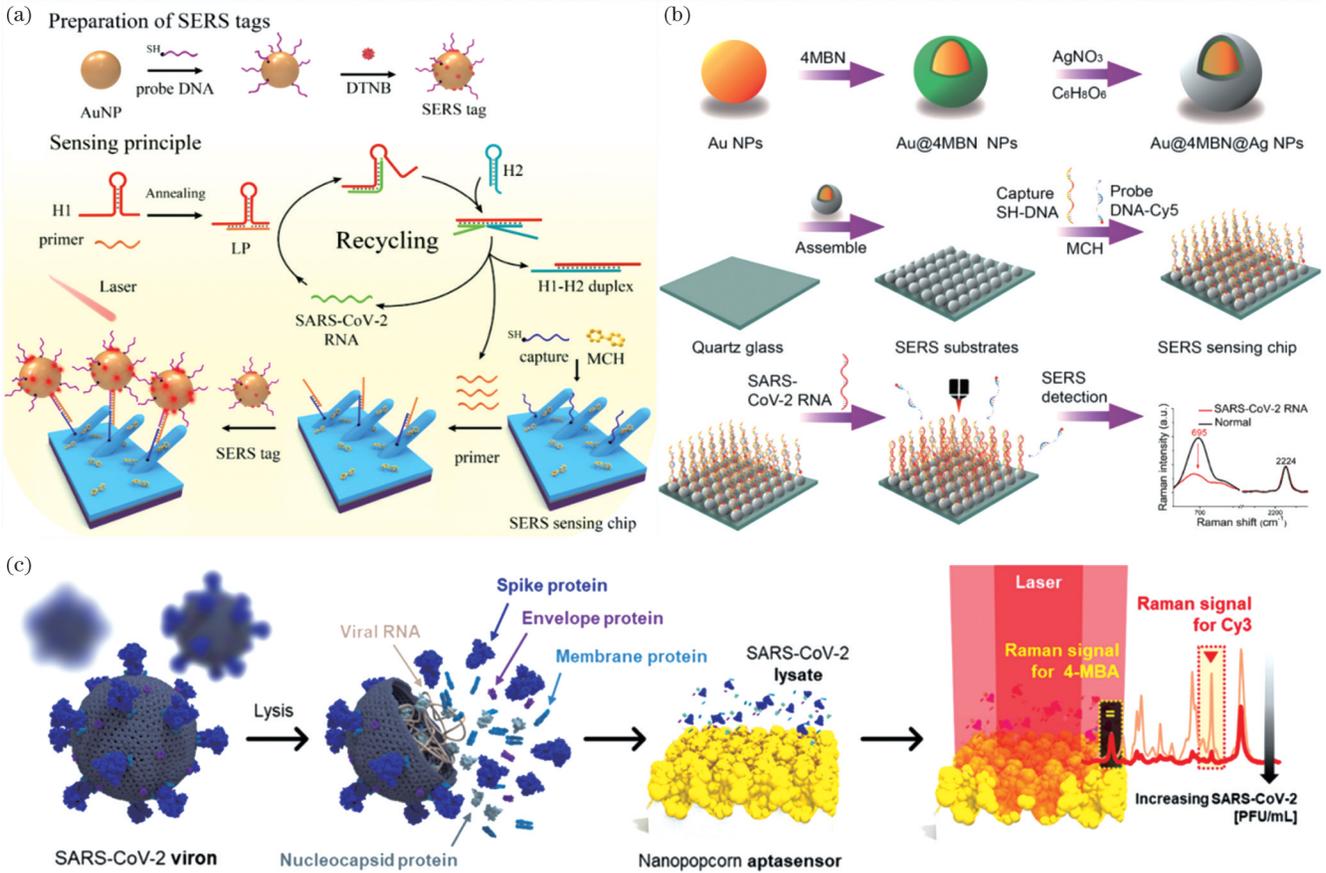


图 5 SERS 标记检测法应用于 SARS-CoV-2 病毒裂解后 RNA 和蛋白质检测。(a) SERS 标签的制备以及信号放大策略在基于 SERS 技术的 SARS-CoV-2 RNA 检测中的应用示意图^[55]; (b) Au@4MBN@Ag NPs 的制备以及二维 SERS 传感芯片的制备, 用于 SARS-CoV-2 RNA 检测的示意图^[56]; (c) 使用基于 SERS 的 aptasensor 定量评估 SARS-CoV-2 的示意图^[57]

Fig. 5 Application of SERS label detection method for the detection of RNA and proteins from SARS-CoV-2 virus lysates. (a) Schematic illustrations of the preparation of SERS tags and the signal amplification strategy for SERS detection of SARS-CoV-2 RNA^[55]; (b) preparation of Au@4MBN@Ag NPs and fabrication of two-dimensional SERS sensing chip for SARS-CoV-2 RNA detection^[56]; (c) schematic illustration of the quantitative evaluation of SARS-CoV-2 using the SERS-based aptasensor^[57]

中可应用 SERS 与机器学习技术来检测和区分甲型和乙型流感病毒, 机器学习技术(特别是支持向量机方法)使含有甲型流感和乙型流感病毒的样本在浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的 SERS 鉴别准确率达到 93%。根据 Lowry 蛋白测定法, 样品中病毒蛋白质的最低检测浓度为 $\sim 0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$, 该浓度的病原体样品的检测准确度为 84%。Gribanyov 等^[62] 提出一种胶体银纳米颗粒 (Ag NPs) 代替固态基质的 SERS 平台, 将胶体 Ag NPs 上的 SERS 技术与核酸适配体对病毒的特异性识别相结合, 在 15 min 内可实现甲型流感病毒的检测。Kim 等^[63] 报道了一种新型的 6E3 单克隆抗体, 能够识别和结合 H275Y 神经氨酸酶突变, 将其固定在金纳米板和纳米颗粒上, 能够基于 SERS 检测 H275Y 突变体 pH1N1, 利用 6E3 抗体介导的 SERS 免疫分析, 可在 10^2 plaque forming units/mL 的低浓度下检测到耐药流感病毒。

标记 SERS 方案应用于流感病毒检测的各个阶段时都具备出色的性能, Zhdanov 等^[64] 提出一种新型

的纳米银制备的 SERS 适配体传感器, 其检测限为每毫升 10^3 个甲型流感病毒颗粒, 如图 7(a) 所示, 该传感器上的 SERS 信号是由一种独特的拉曼活性染料提供的, 这种染料与病毒竞争结合到适配体的四倍体核心上。由于通过聚合膜的预过滤分离了脱靶分子, 这种适配体传感器甚至可以与生物液体等共存。该适配体传感器能检测到每毫升 $10^3 \sim 5 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒。Wang 等^[65] 建立了一种可以快速诊断 H5N1 型流感病毒的夹心免疫磁珠 SERS 方法, 如图 7(b) 所示, H5N1 流感病毒被证明与磁珠上的生物素化一抗结合, 然后与二抗结合形成免疫磁珠三明治免疫复合物 (IMBSIs), 检测限估计为 5.0×10^{-6} TCID₅₀/mL。该方法特异性好, 与 H1N1、H5N6、H9N2 无交叉反应。Kukushkin 等^[66] 提出了一种将膜过滤和 SERS 活性基质结合的检测方案, 有效地将病毒从溶液中吸附到覆盖适配体的银纳米颗粒上, 带有拉曼活性标记的甲型流感病毒适配体使待测病毒的特异性识别能力增强。只需要几分钟就可以使适配体和病毒之间

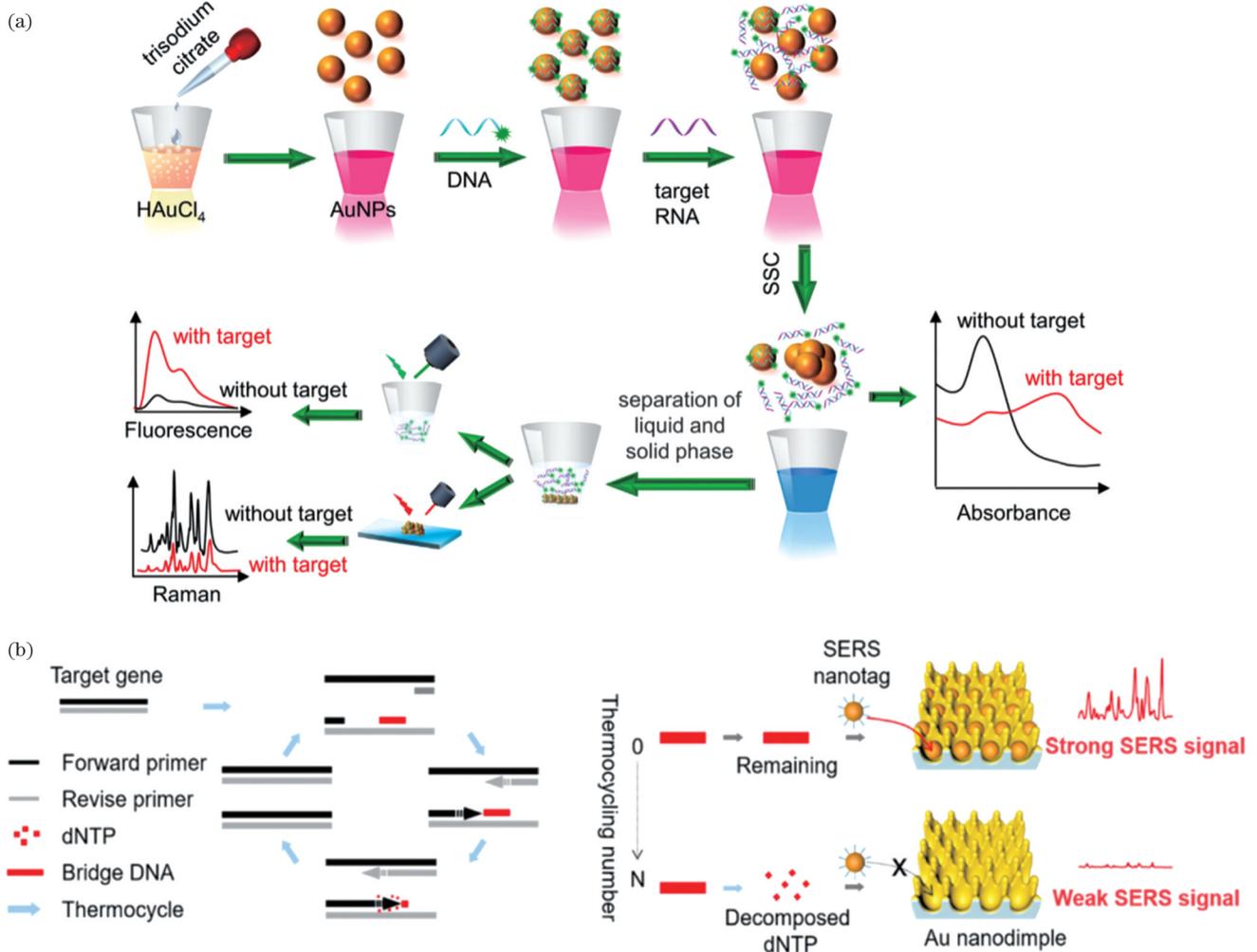


图 6 包含 SERS 技术的多模式病毒检测方案。(a)用于新冠肺炎病毒 RNA 检测三模式生物传感器原理图^[59]；(b)Bridge DNAs 的聚合酶链式反应扩增过程以及 Bridge DNAs 的 SERS 检测过程^[60]

Fig. 6 Multi-mode virus detection scheme incorporating SERS technology. (a) Schematic of the triple-mode biosensors for COVID-19 virus RNA detection^[59]; (b) PCR amplification process for bridge DNAs and SERS detections for bridge DNAs^[60]

的相互作用,检测限可低至每毫升 10 个流感病毒颗粒。

同为传播速度快且给社会带来感染疾病大流行威胁的呼吸道病毒,流感病毒和新冠病毒均有较高的传染性以及初期相似的症状,包括发热、咳嗽、乏力等,人们在对待这两种病毒的过程中可能会存在混淆。在流感季节和新冠病毒大流行期间更加复杂的情况下,需要进行区分诊断。因此,在许多工作中,对流感中的甲型流感病毒、新型冠状病毒,以及其他呼吸道疾病进行准确鉴别和同时检测是至关重要的。Lu 等^[67]开发了一种基于双模 SERS 的 LFA 条带,可以高精度诊断 SARS-CoV-2 和甲型流感病毒。将 SARS-CoV-2 和甲型流感病毒的 n 蛋白抗体固定在试验线 1 和 2 上,对每种病毒的裂解液均表现出良好的选择性。当 SARS-CoV-2 和甲型流感病毒同时检测时,其相应的检测限分别为 5.2 PFU/mL 和 23 HAU/mL。Garsuault 等^[68]同时分析了 3 种呼吸道病毒:两种冠状病毒, hCoV-229E 和 SARS-CoV-2; 一种甲型流感病

毒, H1N1。利用 SERS 和人工智能(AI)结合来区分 3 种呼吸道病毒,准确率在 95%~100% 之间,是病毒诊断的有力工具。Chen 等^[69]利用 SERS 技术准确诊断和区分严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)和甲型 H1N1 流感,如图 8(a)所示。连接到 DNA 适配体末端的拉曼报告子(Cy3 和 RRX)可以在金纳米粒底物的纳米间隙产生强的 SERS 信号。当 SARS-CoV-2 或甲型流感病毒接近金爆米花纳米粒底物时,由于相应的 DNA 适配体与病毒具有显著的结合亲和力,相应的 DNA 适配体会选择性地从底物上脱离。随着信号的强弱变化可以快速鉴别这两种呼吸道疾病。Liu 等^[70]提出了一种基于多通道表面增强拉曼散射的横向流免疫分析(SERS),使用高性能的磁性 SERS 标签,同时超灵敏检测呼吸道病毒,即甲型流感病毒(H1N1),生物样本中存在严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARSCoV-2)和呼吸道合胞病毒(RSV)。如图 8(b)所示,镀有 Fe₃O₄ NPs 的金表现出优异的化学稳定性和光学稳定性,其抗氧化性比银强,将双层拉曼

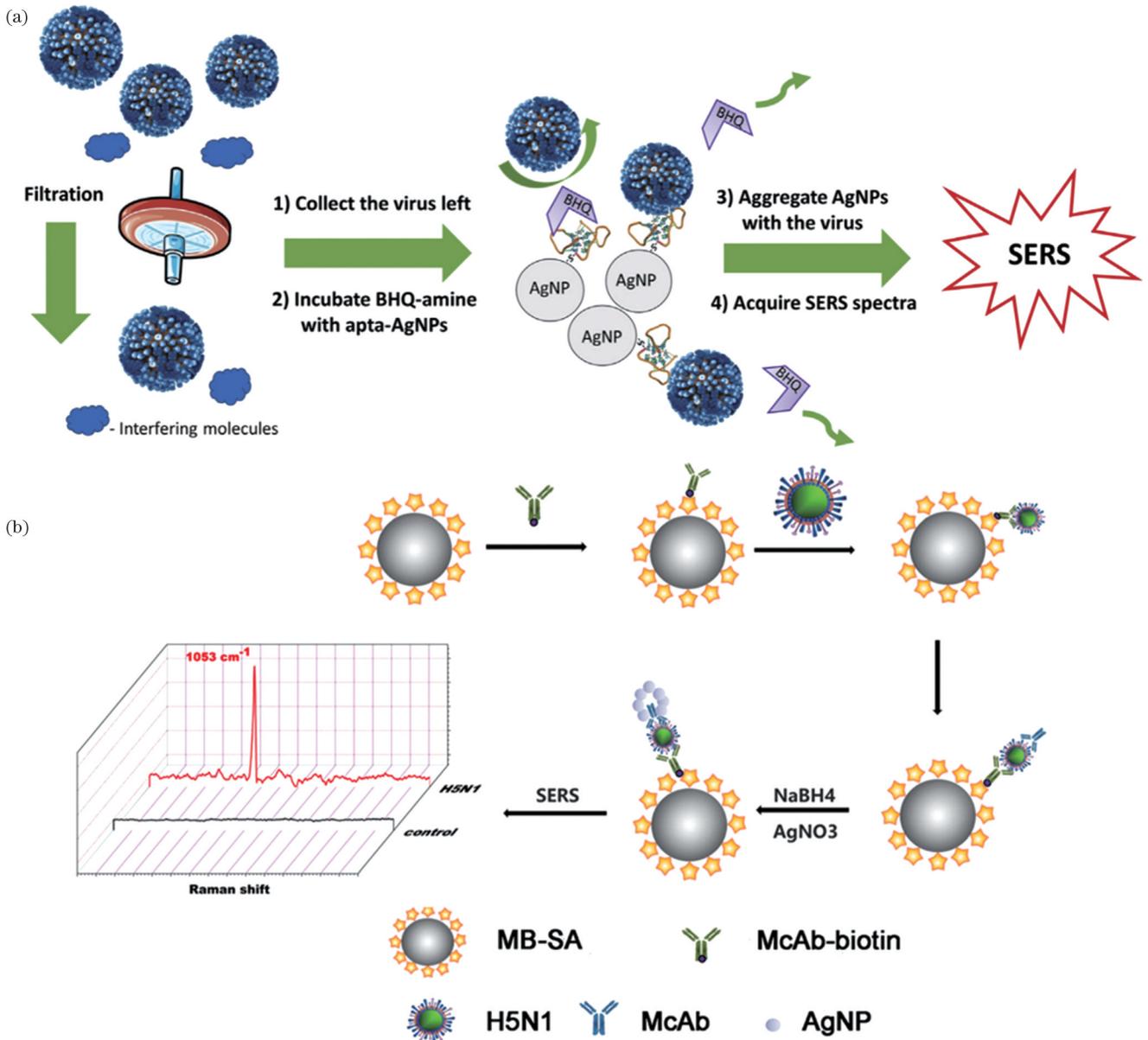


图7 SERS 标记法应用于甲型流感病毒的检测。(a)样品预处理去除杂质后提升SERS在甲型流感病毒检测方面的灵敏度^[64];

(b)IMBSIs@Ag-SERS方法用于H5N1流感病毒检测示意图^[65]

Fig. 7 SERS labeling method applied to the detection of influenza A virus. (a) Schematic diagram of using SERS assisted with pre-filtration to sensitively detect influenza A virus^[64]; (b) schematic of the IMBSIs@Ag-SERS method for H5N1 influenza virus detection^[65]

报告分子DTNB修饰在Fe₃O₄@Au MNPs上制备磁性SERS标记,提供了强烈的SERS信号和丰富的抗体结合位点。采用捕获检测方法,该方法对H1N1、SARSCoV-2和RSV的检测限分别达到85 copies/mL、8 pg/mL和8 pg/mL。Liang等^[71]报道了一种基于金核银壳双金属纳米粒子(Au@4-ATP@Ag NPs),发射SERS和光热效应(PT)的新型LFIA,命名为SERS/PT基双模LFIA(SERS/PT-dmlfia),对甲型流感病毒(IAV)、乙型流感病毒(IBV)和SARS-CoV-2(SARS-CoV-2)N蛋白的检测,拉曼信号的检测限分别为31.25 pg/mL、93.75 pg/mL和31.25 pg/mL,温差信号的检测限分别为15.63 pg/mL、187.5 pg/mL和15.63 pg/mL。此装

置用于抗原检测时不仅具有较高的敏感性、准确性和特异性,而且具有快速、简单的特点,在实验室检测、大规模筛查和家庭自检等传染病快速诊断方面具有很大的潜力。

3.3 SERS 技术应用于其他 RNA 病毒检测

HIV 是一种能攻击人体免疫系统的 RNA 病毒, HIV/AIDS 被认为是全球卫生领域的主要挑战之一。Anwar等^[72]合成并应用了新型的金纳米立方体(AuNC)来增强SERS信号,通过官能团的特定振动带来研究HIV-1DNA链,在人类随机对照DNA和HIV-1DNA中均观察到3个新的拉曼峰。在银纳米粒子(AgNPs)结合DNA的情况下,在几乎相同的位置

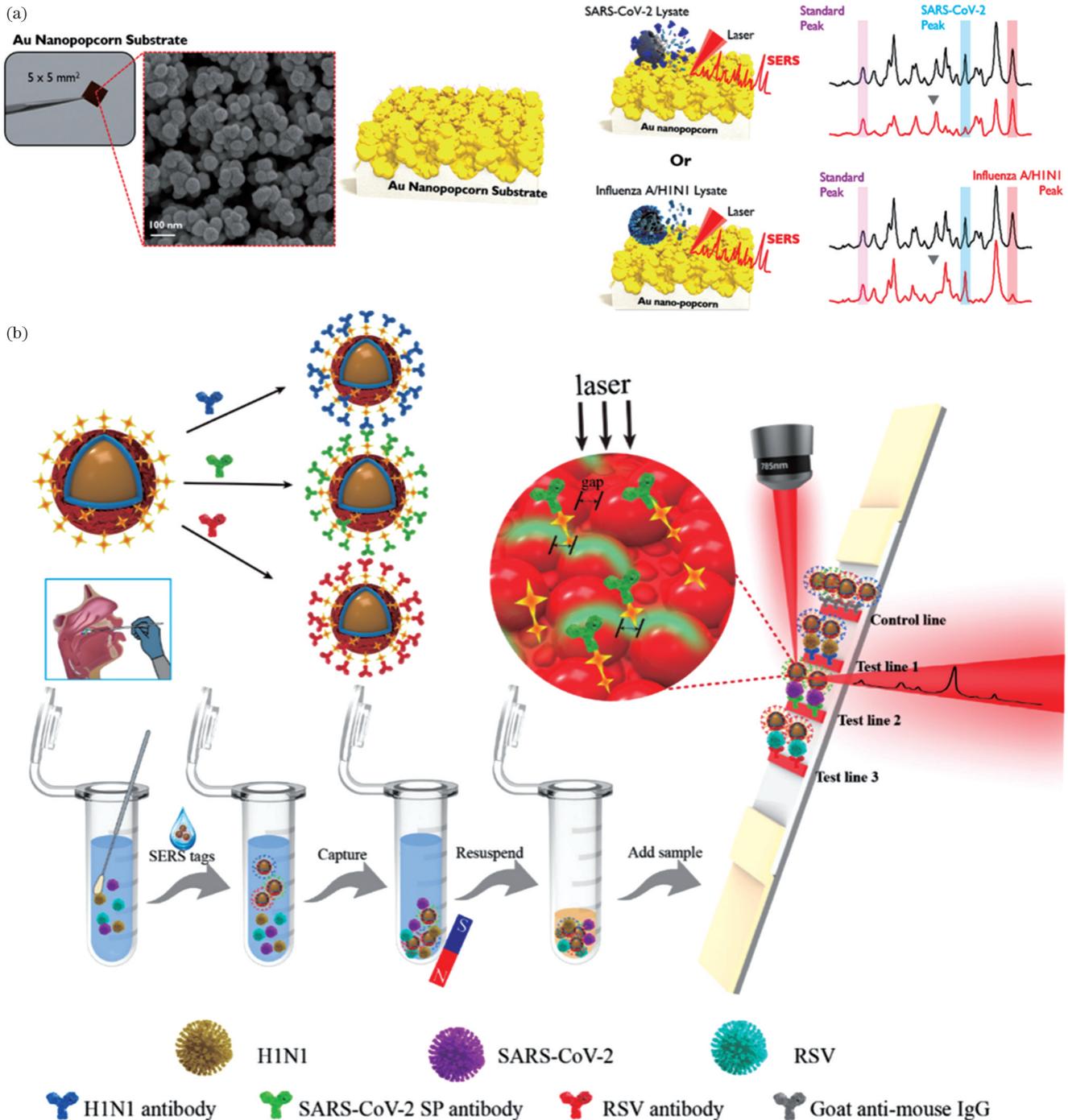


图 8 SERS 标记检测法应用于多种呼吸道病毒的检测与鉴别。(a) 双适配体修饰的金纳米爆米花 SERS 基底用于病毒检测的工作原理^[69]; (b) 采用 Fe₃O₄@Au-based SERS LFA 条同时定量检测 3 种呼吸道病毒的检测示意图^[70]

Fig. 8 SERS labeling method applied to the detection and differentiation of multiple respiratory viruses. (a) Working principle of dual aptamer-immobilized Au nanopopcorn substrate for virus assays^[69]; (b) collection of throat swab sample and operating procedure for the simultaneous quantitative detection of three respiratory viruses via the Fe₃O₄@Au-based SERS LFA strip^[70]

获得了 HIV-1 病毒的所有特征。该技术具有高灵敏度和高选择性,可进一步作为筛选全身 HIV-1 病毒颗粒的生物标志物进行研究。Yadav 等^[73]用掠射角沉积技术制备了一种高度优化的银纳米棒阵列作为 SERS 基底,如图 9(a)所示,5 种不同的 HIV-1 亚型(A、B、C、D 和 CRF02_AG)在不同浓度(10²~10⁶ copies/mL)中发现了明显的特征峰。病毒直接与银纳米棒结合,不使

用抗体或者衔接剂。纯化后的病毒被添加到水中和健康的血浆中,以捕获纯 HIV-1 峰并对数据进行进一步的确认和多元统计分析,结果表明了 SERS 平台检测和区分 HIV-1 病毒的能力,这意味着其在临床标本和分离株上的进一步验证。后续的工作当中,Yadav 等^[74]继续病毒载量定量与疾病预后判断的临床研究,使用 3 种不同类型的 SERS 衬底:单臂 Ag 纳米棒、双

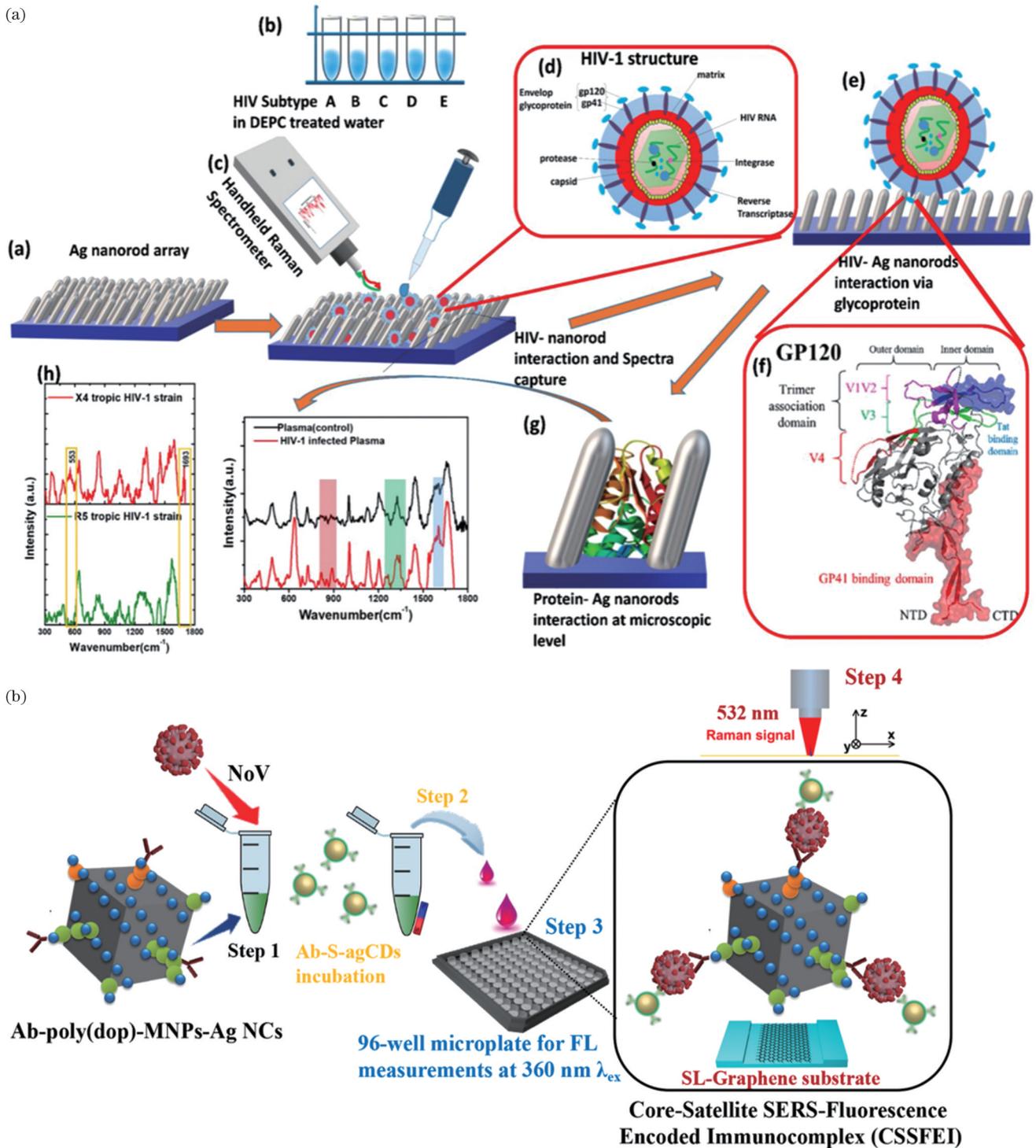


图9 SERS 技术应用于艾滋病病毒(HIV-1)病毒和诺如病毒(NoV)病毒检测。(a)用于 HIV 快速检测的手持 SERS 平台示意图^[73]；(b)分步双模式 NoV 检测^[77]

Fig. 9 SERS technology applied to the detection of human immunodeficiency virus (HIV-1) and norovirus (NoV). (a) Schematic diagram demonstrating rapid handheld SERS platform for HIV detection^[73]; (b) the stepwise dual-modality NoV detection^[77]

臂 Ag 纳米棒和 Au 溅射单臂 Ag 纳米棒, 并对 3 种衬底的数据进行比较。结果表明, Au 溅射银纳米棒具有最大的增强效应。用严格耦合波分析(RCWA)模拟研究了 3 种不同 SERS 衬底上的“热点”。为探索 SERS 平台实用性, 对属于 4 个不同 HIV-1 亚型(A、B、C 和 D)的 HIV-1 毒株对应的 SERS 谱进行研究, 结果表明

这些毒株有明显的区别, 并利用 PCA 对 SERS 谱进行统计分析, 证实 SERS 平台能够定量检测 HIV-1 病毒载量, 并根据 SERS 谱区分 HIV-1 毒株。

诺如病毒(NoV), 也称为诺如肠道病毒, 它主要通过飞沫、空气和直接接触等途径传播, 感染后可引起多种疾病, 包括手足口病、脑脊髓炎等^[75]。Achadu

等^[76]利用 NGS 的聚合物结茧和刺激响应特性,将其包裹在含有等离子体三氧化钼量子点的 SERS 纳米标签 (MoO₃-QDs) 中,开发了一种用于戊型肝炎病毒 (HEV) 或诺如病毒超灵敏免疫分析的生物传感平台。使用相应的病毒样颗粒对免疫分析进行了优化,使 HEV-LPs 和 Nov-LPs 的检测限分别达到 6.5 fg/mL 和 8.2 fg/mL。在此工作的基础上,Achadu 等^[77]从协同双模光学平台的构建入手,继续诺如病毒快速检测的工作,将新颖的双模荧光 (FL) 和 SERS 技术整合到单一探针中,如图 9(b) 所示,所研发的 FL-SER 基生物传感器依赖于新合成的硫掺杂琼脂碳点 (S-agCDs) 的双信号增强。抗原-抗体免疫反应导致诺如病毒抗体偶联的 S-agCDs 和多巴胺功能化的磁性银纳米立方体 [POLY(DOP)-MNPs-Ag NCs] 之间形成核卫星免疫复合物。采用免疫磁富集协议并在单层石墨烯基底上进行 SERS 模式,诺如病毒样颗粒的检测范围为 1 fg/mL~10 ng/mL,良好的检测下限为 0.1 fg/mL。双信号传感器的联合优势通过 FL 共聚焦成像展示,用于在 SERS 检测之前追踪粪便标本中的临床诺如病毒,检测限可达约 10 RNA copies/mL。

丙型肝炎病毒 (HCV) 是一种感染人类肝脏的 RNA 病毒,主要通过血液传播。丙肝感染可能引起急性和慢性肝炎。急性丙型肝炎是一种在感染后持续 6 个月的短期疾病,慢性丙型肝炎是一种长期疾病,与肝脏持续受损有关,导致肝细胞癌、冷球蛋白血症、肝硬化和肝纤维化^[78]。因此用于丙型肝炎病毒鉴定和定量的筛选对于疾病的控制与治疗尤为重要,而金标准检测方法,如重组免疫印迹试验 (RIBA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和聚合酶链式反应 (PCR) 等,均需要专业人员操作、成本高、用时长,而且需要特殊的设备。为探究更加简洁快速的检测方案,Kashif 等^[79]以银纳米颗粒为底物,从不同临床诊断的 HCV 阳性血清以及健康人血清中获得 SERS 谱,数据分析表明,该方法能够区分健康样本和低、中、高病毒载量组的丙型肝炎病毒样本。建立预测丙型肝炎病毒阳性样本中病毒载量的 PLSR 模型,对丙型肝炎病毒感染样本的 SERS 数据的 RMSEC 值为 0.11 log IU/mL, RMSEP 值为 0.24 log IU/mL,数据集的模型优度 (R^2) 为 0.92。Rafiq 等^[80]通过分析不同病毒载量的丙型肝炎病毒阳性样本的病毒 RNA 的聚合酶链式反应产物,建立可用于检测和定量丙型肝炎病毒载量的直接的丙型肝炎病毒的 SERS 特征。采用基于 Ag 纳米颗粒的 SERS 技术将阳性的丙型肝炎病毒样本与健康对照进行比较。用 PLSR 预测 RNA 的 VLs,可信度为 0.97,准确率为 99%。

登革热是一种由四种抗原相距较远的血清型 (DENV1-4) 登革病毒^[81]引起的蚊媒病毒病,主要通过伊蚊和埃及伊蚊传播^[82]。登革热的检测通常包括

血清学检测、分子生物学检测和病毒分离^[81]。在早期检测 DENV2 蚊子感染和预防人类感染方面,超灵敏方法有限,因此 Farokhinejad 等^[83]提出一个基于纳米的免疫分析平台,用于早期、特异和超灵敏地检测单个感染蚊子中 DENV2 分泌的非结构 1 (NS1) 蛋白生物标志物,DENV2 NS1 的检测限为 500 fg。如图 10(a) 所示,该平台使用电流体动力学驱动的纳米混合来增强纳米酵母 scFvs 对 NS1 的捕获,同时减少非特异性相互作用。利用 NS1 特定的 SERS 纳米标记实现了对捕获的 DENV2 NS1 的高灵敏度检测。该纳米技术为在单一感染蚊子中早期检测 DENV2 提供了很大便利,改善了对蚊子栖息地的准确监测,并预防了由 DENV2 传播引起的感染和严重疾病。Song 等^[84]采用定位催化夹组装 (LCHA) 和杂交链反应 (HCR) 级联信号放大策略,建立了一种高灵敏度的 DENV 基因 SERS 分析方法,如图 10(b) 所示,SERS 分析分两步进行,即级联信号放大策略的操作和将产物转移到 SERS 活性 AgNRs 阵列上进行 SERS 检测,SERS 检测的线性范围为 1 fmol~10 nmol,检测限为 0.49 fmol,具有良好的特异性、一致性和回收率。Jacob 等^[85]开发了一种用于检测临床标本中登革病毒的比色纳米传感器。该传感平台依赖于 DNA 偶联的 AuNPs 与登革热基因组 RNA 之间的特异性结合,DNA-RNA 形成异源双链结构,由于是在酸性环境中的纳米聚集,金胶的红宝石红色变成蓝色,这可以用肉眼或测量吸光度来检测。DNA 探针的设计是为了结合在所有四种登革热血清型中都能识别的基因组 RNA 保守区。以登革病毒 1 型 (DENV1) 作为病毒检测的框架,所设计的纳米传感器具有良好的特异性和选择性,检测限为 1 pg/ μ L (每次反应为 $\sim 1.66 \times 10^6$ RNA copies),包括提取步骤在内的分析时间约为 1 h。

与登革病毒同为黄病毒科的寨卡病毒^[86]、西尼罗河病毒^[87],作为主要流行病在人类群体中频繁暴发,已造成严重的健康威胁和巨大的经济损失^[88]。Tripathi 等^[86]在玻璃盖片上涂覆银纳米岛,并将其用作创建 SERS 传感平台的表面。银纳米岛具有很强的等离子体活性和良好的导电特性,可应用于寨卡病毒检测。该传感器的检测限为 0.11 ng/mL,线性范围为 5~1000 ng/mL。Jia 等^[88]研制了一种便携式 SERS-侧向流动免疫分析 (LFIA) 检测器,用于西尼罗病毒非结构蛋白 1 (NS1) 和实际样品的自动、高灵敏检测。利用双层拉曼分子标记的 Au@Ag 纳米粒子 (Au@Ag NPs) 作为 SERS 标签,对西尼罗河病毒 NS1 蛋白的检测下限为 0.1 ng/mL,对灭活的西尼罗河病毒粒子的检测限为 0.2×10^2 copies/ μ L,灵敏度与荧光定量逆转录聚合酶链式反应方法相当。所制备的 SERS-LFIA 对西尼罗河病毒具有较高的敏感性和较好的特异性,具有临床应用价值。

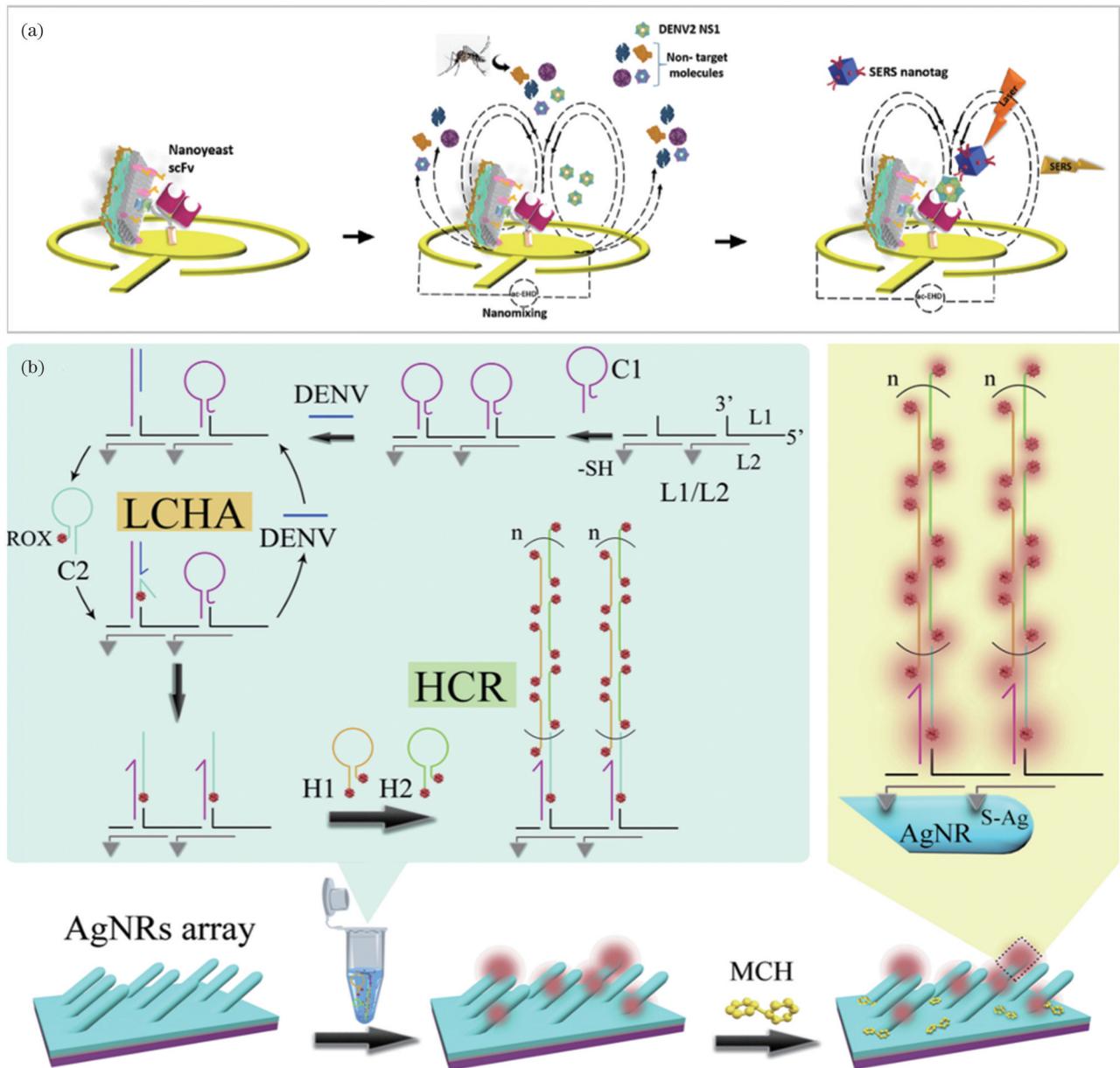


图 10 SERS 技术应用于登革热病毒(DENV)的检测。(a)整合纳米酵母单链抗体亲和探针和基于纳米盒的 SERS 纳米标签,在单个感染蚊子样本中检测 DENV2 NS1 的示意图^[83]; (b)通过 LCHA 和 HCR 的级联无酶信号放大策略进行 DENV 基因的 SERS 分析示意图^[84]

Fig. 10 SERS technology applied to the detection of dengue virus (DENV). (a) Schematic of platform for DENV2 NS1 detection in a single infected mosquito sample with the integration of nanoyeast scFvs affinity probes and nanobox-based SERS nanotags^[83]; (b) schematic illustration of SERS assay of DENV gene via a cascade enzyme-free signal amplification strategy of LCHA and HCR^[84]

4 SERS 技术检测 DNA 病毒

DNA 病毒是一类以 DNA 作为遗传物质的病毒, 这些病毒使用依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶进行复制, 使 DNA 病毒能够在感染期间同时攻击人类的细胞和代谢过程, 使感染情况更加复杂^[2]。DNA 病毒包含肝炎 DNA 病毒、痘病毒、疱疹病毒、腺病毒等^[89], 许多种 DNA 病毒均具有癌化细胞的能力, 例如 EB 病毒、乙肝病毒等^[90]。

面对 DNA 病毒的感染与传播, SERS 技术的应用

使检测方案更加快速准确, 同时有望为病毒早期诊断和治疗提供有力的支持。乙肝病毒是一类小 DNA 病毒的原型, 它能感染肝脏的主要细胞——肝细胞^[91], 对于乙肝病毒的抗原检测, Kamińska 等^[92]提出了检测人血浆中的乙肝病毒抗原 (HBs) 的 SERS 方法, 如图 11(a) 所示, 微流控装置中加入了一种新的活性很强的拉曼标志物碱性品红 (FC) 和一种独特的 SERS 活性底物, 并具有结合抗体和金纳米结构的能力。用品红标记的免疫金纳米花可以将抗原和抗体固定在以 Au-Ag 包裹的 GaN 表面的 SERS 活性基底上, 形成三明治结构。

对乙肝病毒抗原的最低检测下限为 0.01 IU/mL。该方法的平均相对标准偏差(RSD)小于 10%。在乙肝病毒检测的方案中,反式激活的 CRISPR-Cas 系统在核酸检测中表现出了良好的敏感性和特异性,Du 等^[93]开发了一种基于无扩增的病毒 DNA 生物传感器的诊断方法,如图 11(b)所示,这种方法可以通过改变 crRNA 序列来特异性地识别靶点。此外,通过对病毒 DNA 的定量检测可以确定疾病的潜伏期和发展。该系统可以在 50 min 内基于 CRISPR/Cas12a 的生物传感器快速、简单和灵敏地检测乙肝病毒核酸,检测范围为 0.1 pmol~1 nmol。Batool 等^[94]则采用 SERS 对乙肝病毒感染者和健康人的 DNA 进行聚合酶链式反应产物分析,对乙肝病毒阳性样本和健康样本进行 SERS 数据集的 PCA 进一步阐明了疾病样本和健康样本的区别。用 PLSDA 进一步检验分类的有效性,其敏感性和特异性分别为 89% 和 98%。将未知病毒载量的 SERS 光谱数据作为盲样本,构建了预测乙肝病毒阳性样本中病毒载量的 PLSR 模型。PLSR 模型的均方根误差为 0.2923, R^2 为 0.9031,保证了模型的有效性。

猴痘(MPX)是一种由猴痘病毒 MPXV 引起的人畜共患病,会引起一种类似天花的疾病。2022 年,MPX 的地方病状态更新为全球暴发,并被宣布为全球卫生紧急情况^[95]。临床症状如发烧、肌肉和头痛、淋巴结肿大和皮疹是第一步诊断的指标^[95]。根据临床体征,常规聚合酶链式反应或实时定量聚合酶链式反应等实验室标准的传统诊断方法,目前已不能满足 MPXV 感染早期快速检测的需要。Zhang 等^[96]试图在不需设计特定探针的情况下捕捉 MPXV 基因组和多个抗原蛋白的特征指纹,使用与碘离子孵育和与钙离子聚集的银纳米颗粒作为底物,结合聚合酶链式反应来识别血清中 4 种不同 MPXV 蛋白抗原的 SERS 谱。可在 2 min 内检测到低至 5 ng/mL 的 MPXV 蛋白和低至 100 copies/mL 的 MPXV 核酸;在 5 min 内识别和区分血清中不同蛋白质的 SERS 光谱,说明此方案可以在生物背景中准确地鉴定 MPXV 蛋白抗原。Yu 等^[97]研究并提出了一种比色/SERS 双信号共增强免疫层析分析(ICA)方法,如图 11(c)所示,MoS₂片的化学增强效应与 Au-Au 热点的电磁增强效应相结合,大

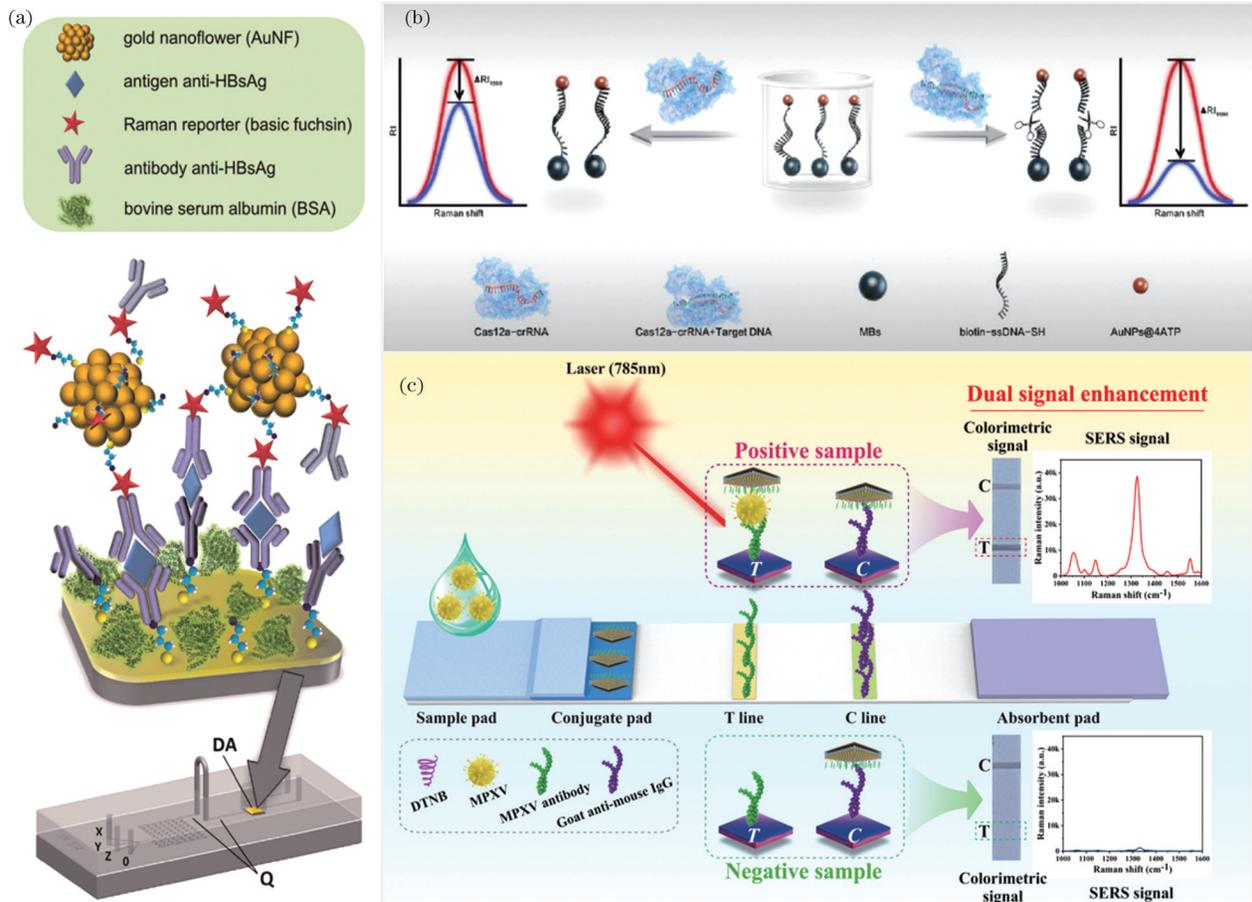


图 11 SERS 技术用于乙肝病毒(HBV)、猴痘病毒(MPXV)等 DNA 病毒的检测。(a)微流控器件与基于 Au-Ag 涂层 GaN 表面的 SERS 活性衬底的集成示意图^[92]; (b)CRISPR/CAS12a-SERS 原理分析示意图^[93]; (c)比色-SERS 双模 ICA 检测 MPXV 的示意图^[97]

Fig. 11 SERS technology used for the detection of DNA viruses such as hepatitis B virus(HBV) and monkeypox virus(MPXV). (a) Schematic illustration showing the integration of a microfluidic device with the SERS-active substrate based on Au-Ag coated GaN surface^[92]; (b) schematic diagram of CRISPR/Cas12a-SERS principle analysis^[93]; (c) the principle of MPXV detection by colorimetric-SERS dual-mode ICA^[97]

大提高了薄膜状双信号标签($\text{MoS}_2@\text{Au-Au}$)的 SERS 活性, $\text{MoS}_2@\text{Au-Au}$ 的引入大大拓宽了现有免疫分析方法的应用范围,其中,比色信号支持目标病毒的快速识别,SERS 允许 MPXV 的定量检测,检测下限分别为 0.20 ng/mL 和 0.002 ng/mL。对实际样品的高准确度检测可以在 20 min 内完成。

爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)感染全球约 90% 的成年人^[98],主要通过唾液传播,感染该病毒可能导致鼻咽癌和淋巴瘤,与大多数急性病毒性疾病如流感不同,有症状的原发 EBV 感染的潜伏期异常长,持续约 6 周^[98-99],一旦感染,在某些条件下,EBV 可以重新激活^[98],因此在临床医学上有必要对 EBV 进行高灵敏度的检测。Tiwari 等^[100]研究了两种可能的现象,一种是细胞对病毒附着和入侵的反应,另一种是病毒复制后从宿主细胞中流出。这些变化与感染和未感染细胞中特定生物分子相关的独特拉曼光谱相对应。Sun 等^[101]设计并制作了一种基于 TMB 显色单元和拉曼检测单元的微流控芯片,实现了 EBV 抗体生物标志物的可视化定量检测。该传感器由聚苯乙烯/金纳米粒子(PS/AuNPs)微球阵列在石英衬底上组成,通过 PS 微腔的光场与 AuNPs 的等离子激元的协同耦合,初始 SERS 信号被放大到纯 AuNPs 的 10 倍。可以在 TMB 颜色的辅助下进行视觉预测,并可以获得动态线性范围为 $10^{-1}\sim 10^5$ pg/mL 和低至 0.045 pg/mL 的表面增强拉曼光谱响应。单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)和爱泼斯坦-巴尔病毒属于疱疹病毒家族中已知的 9 种人类疱疹病毒类型^[102],Pezzotti 等^[103]目前对疱疹病毒的拉曼光谱研究证实了 HSV-1 和 EBV 在分子水平上多样化的一些基本特征,PCA 后能够通过拉曼光谱清楚地区分 EBV 和 HSV-1,从而为快速检测奠定了基础。

腺病毒是一种大型 DNA 病毒^[104],超过 80 种不同类型的腺病毒(ADV)通过呼吸道、眼部或胃肠道感染人类,它们会引起急性临床症状,或在体液和细胞免疫下持续存在。免疫抑制的人有死于 ADV 感染的风险^[103,105]。因此在病毒感染监测和控制系统中,在早期阶段快速准确地检测和识别病原体是至关重要的。Chang 等^[106]将具有不同压痕深度的倒三角形 Au 纳米腔均匀地排列形成病毒定性检测的衬底。底物能够将大小相当的靶病毒携带到纳米腔中,作为一个整体,纳米腔发挥其活性,形成表面增强的拉曼散射。通过底物的电磁感应效应,可以将病毒与其表面的氨基酸区分开来。脑心肌炎病毒或腺病毒的检测浓度为 10^6 PFU/mL,流感病毒的检测浓度为 10^4 PFU/mL,该底物可用于目标病毒的快速筛选检测。Kukushkin 等^[107]研制了一种多路光刻 SERS 适体传感器,该传感器可以在 17 min 内同时检测多种呼吸道病毒。4 个标记的适体被锚定在 4 个 SERS 区的金属表面,捕获的病毒影响标记的 SERS 信号,该传感器能够通过一步识别在一次实验中解码 SARS-CoV-2、甲型流感病毒、

呼吸道合胞病毒和腺病毒的混合物。Zhang 等^[37]提出了一种新的增强型底物,可用于呼吸道病毒的 SERS 检测。硼氢化钠将银离子还原成簇状银纳米颗粒,消除了传统柠檬酸盐还原剂的无序峰信号,同时获得了 SARS-CoV-2、人 7 型腺病毒、H1N1 病毒等多种呼吸道病毒的指纹图谱和浓度依赖曲线,具有良好的线性关系。结合线性判别诊断分析(LDA),可在 2 min 内在血清和唾液中鉴定出这 3 种病毒。

近几年 CRISPR/Cas-SERS 平台的应用也为 SERS 技术在病毒检测领域提供了更为灵敏和快速的检测方案。常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白系统(CRISPR/Cas)技术是一种基因编辑技术,以其灵敏度、特异性、高碱基分辨率和对核酸识别的可编程性等特点,被重新用于分子诊断,为生物传感领域开辟了一条新的道路^[108]。将 SERS 技术与之相结合可以将核酸信号灵活地转换放大为 SERS 信号^[109]。正如上述图 11(b)的工作所示,Du 等^[93]正是利用此平台检测 HBV 病毒的 DNA。除此之外,Su 等^[110]设计了 CRISPR/Cas12a-SERS 新型 SERS 基因检测平台,在 40 min 内实现了血清和伪病毒中人乳头瘤病毒(HPV)基因 HPV 16 和 HPV 18 的高灵敏度检测,该 CRISPR/Cas-SERS 平台检测灵敏度可达到 pmol。同时该课题组^[111]基于 CRISPR/dCas9 技术和酶催化扩增反应,建立了 SERS 检测方法,实现了对低量 HPV 基因的简洁、快速检测。如图 12(a)所示,CRISPR/dCas9/sgRNA 复合物被固定在磁珠上,可以精确捕获目标 DNA 序列,对 HPV 基因表现出高选择性,实验中 HPV 16 DNA 的检测浓度范围为 30~190 ng,此传感检测方法能够满足 ng 水平的病毒 DNA 检测,可以简单地通过改变 sgRNA 序列来应用于其他靶 DNA。Wang 等^[112]采用 SERS 技术结合 CRISPR/Cas12a 系统对非洲猪瘟病毒(ASFV)进行无扩增基因检测。采用两种信号增强策略,提高液相检测灵敏度并达到调频级。一是 Cas12a 蛋白的无限反分裂功能,二是磁诱导收集探针,可以收集溶液到激光光斑的分析物,并提供大量 SERS 热点。对目标基因的检测限为 100 nmol~10 fmol,无需基因扩增步骤。该传感方法实现了血清系统中 ASFV 基因和病毒样本中提取的核酸的 SERS 检测,具有较高的灵敏度和选择性,相对标准偏差 < 8%。

CRISPR/Cas-SERS 平台也在一些工作中被应用于 RNA 病毒的检测,Liang 等^[113]开发了基于无扩增 SERS 的 CRISPR 检测 SARS-CoV-2 的诊断平台,节省了核酸扩增时间,该无扩增平台可在 30~40 min 实现检测鼻咽拭子标本($n=112$)中提取的 SARS-CoV-2 衍生核酸的检测。Ma 等^[109]提出了一种能够在单支血管中超灵敏、超快速、准确、便携地检测 SARS-CoV-2,且无扩增和抗干扰的方案,通过定制一种巧妙的容器,可以将 RNA 反转录、Cas12a 反切、SERS 纳米探针交

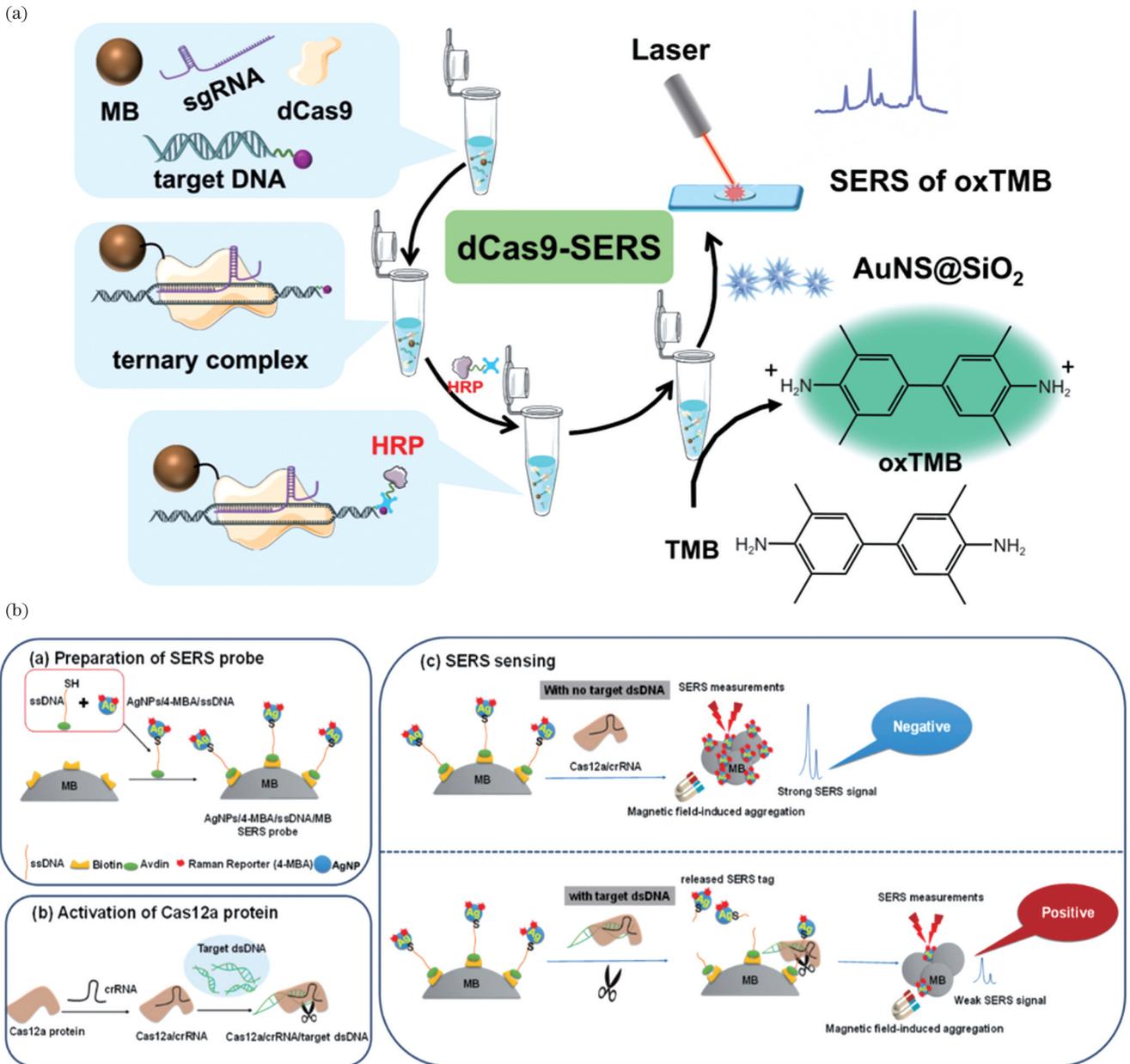


图 12 CRISPR/Cas-SERS 平台应用于病毒遗传物质的检测。(a) 基于 CRISPR/ dCas9 的 SERS 检测方法, 辅助 HRP 催化并放大信号的基因检测示意图^[111]; (b) 无扩增检测 ASFV dsDNA 的 CRISPR/Cas12a-SERS 检测示意图^[112]
 Fig. 12 CRISPR/Cas-SERS platform applied to the detection of viral genetic material. (a) Schematic diagram of the gene detection by using the CRISPR/dCas9-based SERS method, assisted with HRP-Catalyzed signal amplification^[111]; (b) schematic diagram of the proposed CRISPR/Cas12a-SERS platform for amplification-free ASFV dsDNA detection^[112]

联等步骤集成到一个单独的处理容器中, 整个检测过程在 45 min 之内完成, 该生物测定法检测灵敏度为 200 copies/mL, 检测限为 1.9 copies/mL。

5 基于 SERS 技术便携式拉曼检测设备的应用

随着技术的进步, 拉曼仪器的小型化、便携化无疑极大地推动了 SERS 技术即时即地检测^[114]。point-of-care testing (POCT) 技术是指在患者的就诊地点进行的实时、便捷、即时的医学检测, SERS 检测通常只需要极小的样本量, 这与 POCT 的理念相契合。SERS 检测结

合便携式拉曼仪器, 能够在短时间内提供高灵敏度的分析结果。这使得在患者就诊的地点, 如医疗机构或临床现场, 能够即时获取检测结果, 有助于医生更迅速地作出医学决策。便携式拉曼仪器通常小巧轻便, 易于携带, 能够在不同的医疗场景中方便地进行 SERS 检测。此外, SERS 技术的操作相对简单, 可由非专业人员进行, 使其在 POCT 应用中更具可行性。

在现有的许多研究中, 将便携式拉曼光谱仪作为应用场景拓展的工具基础, 基底结构的模式也随之更加稳定, 样式也更加丰富。整体的检测方案也越发完善, 更加凸显鉴别准确、制备简单、操作便捷、灵敏度

高、重复性好等优势。Kaladharan 等^[115]提出一种新型的基于一锅 SERS 的免疫分析方法,使用便携式拉曼光谱仪,无需进行任何洗涤过程,即可检测 SARS-CoV-2。如图 13(a)所示,SERS 免疫分析设计为常规的数字多功能光盘(DVD)底物与拉曼报告标记的银

纳米颗粒相结合,以实现双重锚制效果。在 20 min 的时间内,SERS 平台对 SARS-CoV-2 刺突蛋白和病毒样颗粒蛋白在磷酸盐缓冲盐水中的检测下限高达 50 pg/mL,在未经处理的唾液中添加 VLP 蛋白的检测限为 400 pg/mL,结合便携式拉曼装置可实现具有高

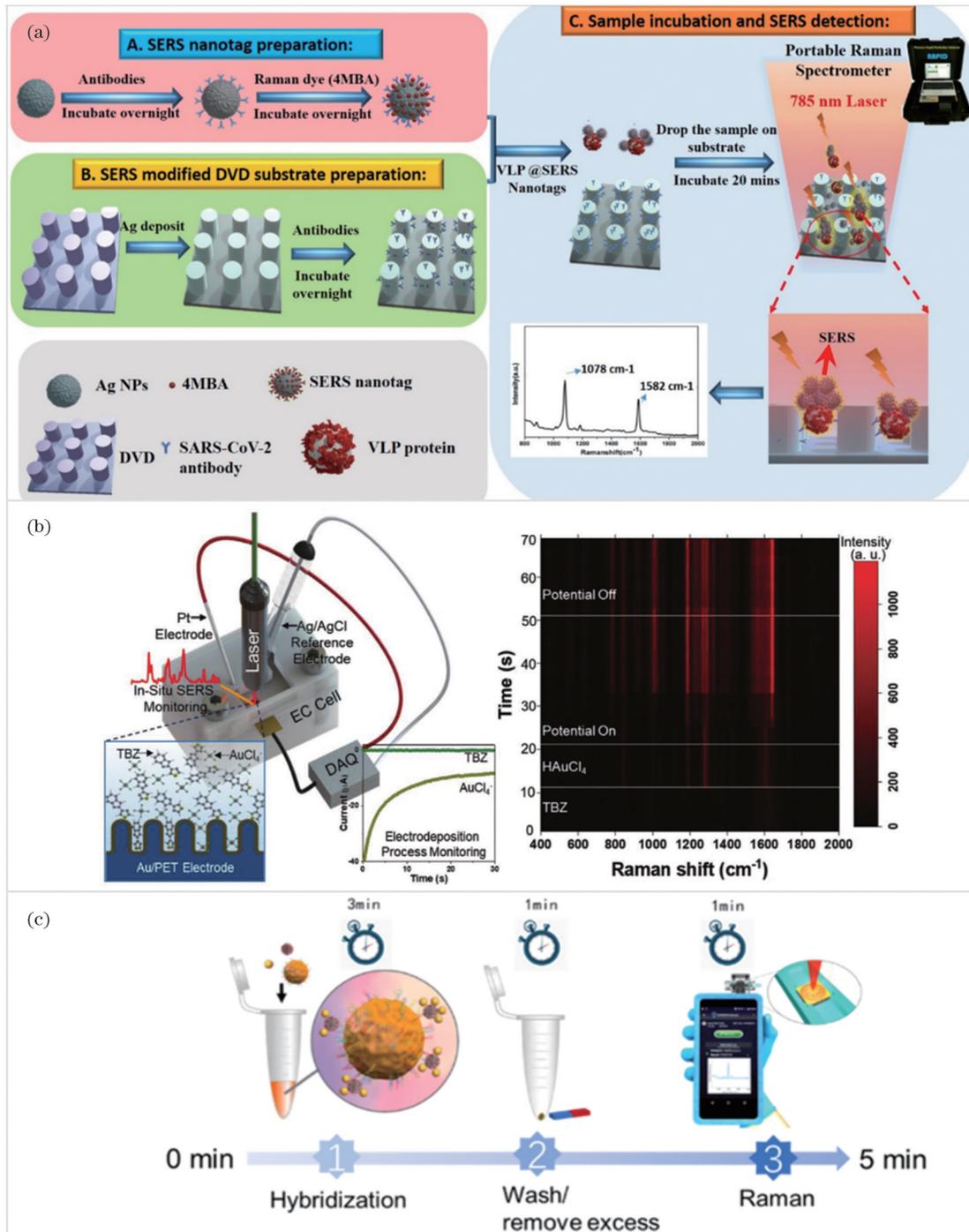


图 13 便携式拉曼光谱仪设备应用于 SERS 病毒检测方案。(a) 基于 SERS 的免疫分析平台(配合使用便携式拉曼光谱仪)^[115]; (b) 基于金电沉积纳米结构的 SERS 技术用于检测甲流病毒 H1N1^[116]; (c) 一步法适配体识别技术结合手持式拉曼光谱仪,可在 5 min 内快速即时检测 SARS-CoV-2 病毒^[51]

Fig. 13 Portable Raman spectrometer devices applied to SERS virus detection schemes. (a) Schematic illustration of SERS based immunoassay platform(with a portable Raman spectrometer)^[115]; (b) schematic diagram of the detection of influenza A virus H1N1 by SERS and gold electrodeposition nanostructure^[116]; (c) schematic diagram of a SERS detection method based on one-step aptamer identification using a portable Raman spectrometer for rapid and point-of-care detection of SARS-CoV-2 virus in less than 5 minutes^[51]

灵敏度的快速检测。Ansah 等^[116]通过在三维 Au 纳米阵列上原位电化学合成三维等离子体-探针分子复合皮肤层来快速、超灵敏地直接检测化学物质和生物大分子(即被包裹的病毒),分层复杂结构的小分子和大型甲型流感病毒(H1N1)作为一个结构基元,通过金的电沉积形成 Au-病毒纳米复合结构,从而原位形成 SERS 的热点。如图 13(b)所示,光学便携式探针光谱仪系统同步进行电沉积和 SERS 测量,为化学和生物医学应用提供了高灵敏度和快速无标记的直接检测的通用平台。Pramanik 等^[117]开发了一种新型的抗尖峰抗体附着金纳米颗粒,用于病毒的快速诊断和抑制。抗体结合的 GNPs 可以通过简单的比色变化用于肉眼检测新冠肺炎病毒抗原或假性 SARS-CoV-2,在 5 min 内肉眼即可检测到 1 ng/mL 的抗原。使用便携式拉曼分析仪,抗体和 4-氨基硫酚修饰的纳米金表面增强拉曼光谱探针即使在浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的情况下也能够检测到新冠肺炎抗原,最低检测限为每毫升 18 个病毒颗粒。

在上述提及的许多工作中也选择便携式拉曼光谱仪作为检测仪器,为 SERS 检测平台的应用提供了更丰富的场景和适用范围,如 Lai 等^[50]的 SERS-LFA 方法即使用便携式设备,使得检测过程变得更加方便、简单。SERS-LFA 可能成为一种变革性的技术,并以其敏感、定量、方便、快速、和用户友好的特点成为 POCT 理想的检测形式。如图 13(c)所示,Guan 等^[51]应用便携式拉曼光谱仪能够在其研发的 SERS 平台上在 5 min 内完成对 SARS-CoV-2 无预处理快速现场诊断检测。在口咽拭子样本盲测中,通过手持拉曼光谱仪即时区分阳性和阴性拭子样本时,OSARRA 的灵敏度为 95%,特异性为 100%。Jia 等^[88]所制备的 SERS-LFIA 试条对西尼罗河病毒具有较高的敏感性和较好的特异性,便携式 SERS-LFIA 检测器实现了 SERS-LFIA 试条的自动和快速检测。Gribanyov 等^[62]在甲流病毒的检测过程中,通过适配子增强流感血凝素的特异性,通过 SERS 衬底技术的优化提升灵敏度,分析时间短且样品制备简单,结合便携式拉曼仪器归类为快速诊断试验。Sun 等^[101]的基于 PS/AuNPs 微球阵列作为活性底物的便携式 SERS 微流控芯片,用于定量检测靶标 EBV IgG,结合商用便携式拉曼系统,可以快速准确地现场诊断疾病,解决了 POCT 性能和灵敏度之间的长期权衡问题,为实现通用微芯片在家庭中进行疾病早期筛查提供了可能性。

RNA 病毒检测方案具体参数见表 1, DNA 病毒检测方案具体参数见表 2。

6 总结与展望

近年来以 SARS-CoV-2 为首大规模传播的流行性病毒让全世界的目光集中在快精准的病毒检测和诊断研究中,而 SERS 技术凭借其超高检测灵敏度和较短的检测时长在病毒检测方面表现出了巨大的应

用潜力。本文主要概述了 SERS 技术在近三年病毒检测领域的应用进展。SERS 技术在病毒检测中的效能受到多个关键因素的影响,包括增强基底的设计、激发条件、标记物和分析物特性、检测设备,以及数据分析等因素进步^[6],提高检测速度以及灵敏度,降低检测复杂度以便更高效地检出病毒,是该技术的目标与方向。

在非标记检测方面,由于待测目标物自身的拉曼信号微弱,因此寻求高增强因子的基底成为关键。目前 SERS 技术的进展和方向主要集中在设计具有强增强因子基底、创新基底的功能化修饰,包括纳米基底形态修饰,如金字塔型、漏斗型、丛林型、阵列型等、分子印迹技术、表面化学修饰的蛋白和核酸适配体的应用,以实现对待测目标的富集、识别和分析^[118]。而在病毒种类鉴别、病毒亚型鉴别的过程中,针对不同类别病毒成分相似导致的光谱信号差异较小的问题,强大的机器学习方法和深度学习方法的使用显得尤为重要。当 SERS 技术结合支持向量机、主成分分析、随机森林、逻辑回归特征选择法等机器学习方法处理大量非标记 SERS 信号时,可提高对复杂样本的分析和识别的准确性。目前的大量工作只单一侧重于对病毒光谱的分析鉴别,不同的研究中对同一物质的 SERS 信号的检测结果仍然存在显著差异,缺少检测的标准化和大量数据的统计归纳。而深度学习技术的应用可分析处理大规模数据集,包括用于提取 SERS 信号谱峰强度和位置等复杂特征,有助于卷积神经网络(CNN)和深度神经网络(DNN)在 SERS 分析技术中的发展,推动基于深度学习的病毒 SERS 光谱数据库的建立。

对于标记检测而言,SERS 技术在标记分子物质种类的发掘应用、免疫反应方面,特别是对具有强烈信号的探针的研发已取得一定进展。未来的工作方向包括发展更多样化、功能化的 SERS 探针,以实现多种病毒的联合检测。为提高 SERS 检测效率、结果准确度,降低检测极限,寻找具有强烈信号且光学非干扰的 SERS 探针分子至关重要。设计并使用信号处于静默区($1800\sim 2800\text{ cm}^{-1}$)的拉曼探针分子就是一种理想的检测方案,可以避免内源性生化分子信号(位于 $300\sim 1800\text{ cm}^{-1}$)的信号干扰,提升检测的可靠性和准确性。此外,在标记检测模型的设计中,可引入内标分子对信号进行实时、动态的校准,有助于避免检测环境和激光功率波动带来的检测误差,从而提高检测的可靠性。

随着小型拉曼检测装置的发展,SERS 技术的应用场景已不再局限于配备大型拉曼检测仪器的专业实验室。SERS 技术在便携式甚至手持式拉曼设备的支持下,可为大规模的病毒 POCT 检测提供有力的工具。在检测流程的设计中,根据病毒检测时效性的需求,进一步精简样品处理过程,缩短检测时间,还需考虑使非专业人员操作的可行性与易用性。为应对复杂的病毒流行大环境,设计具有多重病毒检测功能的集

成化微型检测芯片,配合小型拉曼检测装置是未来病毒 POCT 检测的理想形态。另外,可尝试将 SERS 技术其他检测技术相结合,如化学分离技术、生物捕获技术、比色技术、机器学习、深度学习、人工智能等方案,充分发挥各项技术优势,在未来开拓创新出集样品处

理、检测、分析、统计、结果传输与显示为一体的拉曼分析设备,满足不同领域的现场和实时测试需求。我们相信 SERS 技术配合小型化的拉曼装置将为病毒筛查、分型、感染监测、感染预后等方面提供一种简便、高效、精准的光学 POCT 检测新方法。

表 1 RNA 病毒检测方案对照表

Table 1 Comparison table of RNA viral detection protocols

Label method	Type of virus	Virus species	SERS platform	Target	Dynamic range	Methods used	Sample solution	Time	LoD	Reference
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	gold-nanoneedles array	S-protein		PCA & DA	saliva urines	5 min	80 copies/mL	[36]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	SERS-active surfaces	S-protein			PBS		<1 pg/mL	[39]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	Au nanoplate film/MgF2/Au mirror/glass	S-protein	1.25×10^{-6} – 4.7×10^{-3} g/mL	VTM, PCA, PLS-DA	saliva		2.8×10^{-11} g/mL	[40]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2 Omicron	Ag platform	ssRNA			PBS			[41]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2 influenza A H1N1	metal-insulator-metal nanostructures	S protein HA protein		PCA random forest algorithm	saliva	25 min	10^3 copies/mL	[42]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	GAgNPs paper sensor	S-protein			saliva	2 min	2.4 pg/ μ L	[43]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	spherical SnS ₂ structure	S protein RNA	10 – 10^{10} copies/mL	PCA	saliva, stool, urine, blood, items	5 min	80 copies/mL	[44]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	Cu ₂ O nanoarray	RNA	100 – 10^6 copies/mL		respiratory swab RNA extracts	5 min	80 copies/mL	[45]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2 Beta,Delta, Wuhan, Omicron	Ag INPs	S protein		PCA, logistic regression algorithm	saliva nasal swab	15 min		[47]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-1 SARS-CoV-2	Au nano-pyramids	single-particle		LDA, HCA Modle training	saliva	5 h		[46]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2 wild-type, Alpha, Delta, Omicron	3D porous AgMEN	S protein N protein	1.0 fg/mL– 1 mg/mL 1.0 pg/mL– 1 mg/mL 1.0 pg/mL– 1 mg/mL		saliva		1.0 fg/mL 1000 fg/mL 100 fg/mL	[48]
Label free	RNA virus	MERS-CoV SARS-CoV SARS-CoV-2 HCoVHKU1 HCoV-OC43	Ag-coated Si substrates	S-protein		MLP	PBS			[49]

续表

Label method	Type of virus	Virus species	SERS platform	Target	Dynamic range	Methods used	Sample solution	Time	LoD	Reference
4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2	Ag-LFA	N-protein	10–1000 ng/mL		saliva	15 min	0.03 ng/mL	[50]
Nile BlueA	RNA virus	SARS-CoV-2	Magnetic beads	viral particles	250–10000 TU/ μ L		PBS, swab samples	5 min	124 TU/ μ L	[51]
GNPs	RNA virus	SARS-CoV-2	magnetic nanoparticles	S-protein	4.1×10^4 genomes/mL		saliva	30 min	257 fg/mL	[52]
4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2	Au NPs	S-protein	1 fg/mL–1 ng/mL 10 fg/mL–10 ng/mL		PBS saliva serum blood		0.77 fg/mL 6.07 fg/mL 7.60 fg/mL 0.10 pg/mL	[53]
MMC DTNB TFMBA MBA	RNA virus	SARS-CoV-2 Delta, Omicron	Au–Ag nanobox-based SERS barcodes	S protein N protein			nasal swab		20 virus/ μ L or 50 pg/mL	[54]
DTNB	RNA virus	SARS-CoV-2	Ag NRs	RNA	10^2 – 10^6 copies/mL		PBS	50 min	51.38 copies/mL	[55]
4-MBN	RNA virus	SARS-CoV-2	Au@4MBN@Ag NPs	RNA	10^{-6} – 10^{-12} M		PBS	10 min	7.61×10^{-14} mol	[56]
4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2	Au nanopopcorn	S-protein	0–1000 PFU/mL		PBS	15 min	10 PFU/mL	[57]
DTNB	RNA virus	SARS-CoV-2	AuNP-rGO-SW	N-protein	1 fmol–100 amol		PBS		1 fmol	[58]
Label free	RNA virus	SARS-CoV-2	Au NPs	RNA	160 fmol–1 nmol	Colorimetric fluorescenc	PBS	40 min	395 fmol	[59]
MGIT C	RNA virus	SARS-CoV-2	Au NDs	RdRp genes		SERS-PCR	PBS		–	[60]
Label free	RNA virus	Influenza A Influenza B	Ag NPs	viral particles		SVM	PBS		0.05 μ g/mL	[61]
Label free	RNA virus	Influenza A	Ag NPs	viral particles	2×10^5 – 2×10^6 VP/mL		PBS	15 min	2×10^5 VP/mL	[62]
Label free	RNA virus	Influenza A	Ag NPs	viral particles	10^3 – 5×10^{10} virus Particles/mL		PBS		10^3 particles/mL	[64]
Label free	RNA virus	Influenza A H5N1	IMBSIs@Ag	viral particles			PBS		5.0×10^6 TCID ₅₀ /mL	[65]
Cy3	RNA virus	Influenza A	Ag NPs	viral particles			PBS		10 VP/mL or 2 VP/mL per probe	[66]
MGIT C	RNA virus	Influenza A SARS-CoV-2	Au NPs	N-protein	8064 HAU/mL 50–1000 PFU/mL		nasopharyngeal samples		23 HAU/mL 5.2 PFU/mL	[67]
Label free	RNA virus	Influenza A SARS-CoV-2 hCoV-229E	Gold particles	viral particles		AI, RVM, PCA	PBS			[68]
Cy3 RRR 4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2 Influenza A	Au nanopopcorn substrate	S-Protein hemagglutinin	0.32–200 PFU/ml 0.13–80.6 HAU/mL		PBS	15 min	0.62 HAU/mL 0.78 PFU/mL	[69]

Label method	Type of virus	Virus species	SERS platform	Target	Dynamic range	Methods used	Sample solution	Time	LoD	Reference
DTNB	RNA virus	influenza A SARS-CoV-2 RSV	Fe ₃ O ₄ @Au core - shell MNPs	viral antigen			throat swab samples	15 min	85 copies/mL 8 pg/mL 8 pg/mL	[70]
4-ATP	RNA virus	influenza A influenza B SARS-CoV-2	Au ^{4-ATP} @Ag NPs	N-protein		Photothermal effect	pharyngeal swab samples	<20 min	31.25 pg/mL 93.75 pg/mL 31.25 pg/mL	[71]
Label free	RNA virus	HIV	Au NCs	HIV-1 DNA			Millipore water			[72]
Label free	RNA virus	HIV(A,B,C,D, CRF02_AG)	Ag nanorods	viral particles	10 ² - 10 ⁶ copies/mL	PCA	plasma			[73]
Label free	RNA virus	HIV(A,B,C,D)	Au sputtered Ag nanorods	viral particles		PCA	plasma			[74]
MoO ₃ -QDs	RNA virus	HEV, NoV	nanogels (NGs)	viral particles	10 ² - 10 ⁸ copies/mL		PBS		6.5 fg/mL 8.2 fg/mL	[76]
S-agCDs	RNA virus	NoV	Poly(DOP)-MNP-Ag NCs	viral particles	1 fg/mL- 1 ng/mL	FL-SER	PBS	5 min	10 RNA copies/mL	[77]
Label free	RNA virus	HCV	Ag NPs	viral particles		PLSR, RMSECV, R ²	serum			[79]
Label free	RNA virus	HCV	Ag NPs	RNA		PLSR, PCA	serum			[80]
Label free	RNA virus	DENV-2	NANOBOX	DENV2-NS1			PBS			[83]
Label free	RNA virus	DENV	Ag NRs array	RNA	1 fmol-10 nmol		serum		0.49 fmol	[84]
Label free	RNA virus	DENV	Au NPs	RNA	-		serum		1 pg/μL	[85]
Label free	RNA virus	Zika virus	Ag NIs	Zika antigen	5-1000 ng/mL		PBS		0.11 ng/mL	[86]
Label free	RNA virus	WNV	Au@Ag NPs	WNV-NS1 inactivated WNV virions			PBS		0.1 ng/mL 0.2 × 10 ² copies/μL	[88]
Label free	RNA virus	EMCV influenza A	triangular Au nano-cavities array	virus particles			PBS		10 ⁶ PFU/mL 10 ⁴ PFU/mL	[106]
4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2	DVD	VLP protein S-Protein	100 pg/mL- 1000 ng/mL		PBS saliva	20 min	50 pg/mL 400 pg/mL	[115]
4-ATP	RNA virus	SARS-CoV-2	Au NPs	virus particle S-Protein			PBS	5 min	18 Vp/mL 4 pg/mL	[117]
4-ATP	RNA virus	SARS-CoV-2	SERS-CRISPR/Cas12a	SARS-CoV-2 N gene			nasopharyngeal swab samples	40 min	1 fmol	[113]
4-MBA	RNA virus	SARS-CoV-2	CRISPR/Cas12a-OVER-SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 gene			nasopharyngeal swab samples	45 min	1.9 copies/mL	[109]

续表

Label method	Type of virus	Virus species	SERS platform	Target	Dynamic range	Methods used	Sample solution	Time	LoD	Reference
Cy3	RNA virus	SARS-CoV-2 influenza A RSV	Si substrates	antigens			Nasal swabs	17 min		[95]
Label free	RNA virus DNA virus	SARS-CoV-2 influenza A	clustered silver nanoparticles	virus particle		LDA	PBS saliva		10 PFU/test	[51]

表 2 DNA 病毒检测方案对照表
Table 2 Comparison table of DNA viral detection protocols

Label method	Type of virus	Virus species	SERS platform	Target	Dynamic range	Methods used	Sample solution	Time	LoD	Reference
FC	DNA virus	HBV	GaN/Au-Ag SERS substrate	HBsAg	0.0125–60 IU/ml		plasma		0.01 IU/mL	[92]
4-ATP	DNA virus	HBV	Au NPs@4-ATP	HBV DNA	1 pmol–1 nmol	PCA	serum	50 min	0.67 pM	[93]
Label free	DNA virus	HBV	Ag NPs	HBV DNA		PCA, PLS-DA	Blood			[94]
Label free	DNA virus	MPXV	Ag@cit	M1R proteins		PCA	serum		100 copies/mL	[96]
DTNB	DNA virus	MPXV	MoS ₂ @Au-Au	MPXV antigens	100–0.01 ng/mL	colorimetry	throat swab specimens	<20 min	0.002 ng/mL	[97]
Label free	DNA virus	EBV		RBV Infection		PCA, Mann-Whitney U test, IPA, IPKB	Glial Cells			[100]
R6G TMB	DNA virus	EBV	PS/Au NPs	EBV IgG	10 ⁻¹ –10 ⁵ pg/mL		blood	10 min	0.045 pg/mL	[101]
Label free	DNA virus	HSV-1, EBV	nanoparticles	antigens		PCA	cell confluence			[103]
Label free	DNA virus	Adenovirus	triangular Au nano-cavities array	virus particles			PBS		10 ⁶ PFU/mL	[106]
Cy3	DNA virus	Adenovirus	Si substrates	antigens			Nasal swabs	17 min		[95]
Label free	DNA virus	Adenovirus 7	clustered silver nanoparticles	virus particle		LDA	PBS, saliva		10 PFU/test	[51]
MBN	DNA virus	HPV	CRISPR/Cas-SERS platform	HPV 16/18 dsDNA	6.72 × 10 ⁻¹² mol–6.72 × 10 ⁻⁷ mol		serum	40 min		[110]
TMB	DNA virus	HPV	CRISPR/dCas9-SERS AuNC@SiO ₂	HPV 16 pseudovirus genes	30 ng–190 ng		H ₂ O			[111]
4-MBA	DNA virus	ASFV	CRISPR/Cas1 2a-SERS platform	ASFV dsDNA	100 nmol–10 fmol		serum	2 h	10 fmol	[112]

参 考 文 献

- [1] Kirtane A R, Verma M, Karandikar P, et al. Nanotechnology approaches for global infectious diseases[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(4): 369-384.
- [2] Durmuş S, Ülgen K Ö. Comparative interactomics for virus-human protein-protein interactions: DNA viruses versus RNA viruses[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(1): 96-107.
- [3] Savinon-Flores F, Méndez E, López-Castaños M, et al. A review on SERS-based detection of human virus infections: influenza and coronavirus[J]. *Biosensors*, 2021, 11(3): 66.
- [4] Morens D M, Fauci A S. Emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19[J]. *Cell*, 2020, 182(5): 1077-1092.
- [5] Xiao M, Tian F, Liu X, et al. Virus detection: from state-of-the-art laboratories to smartphone-based point-of-care testing[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(17): e2105904.
- [6] Lukose J, Barik A K, Mithun N, et al. Raman spectroscopy for viral diagnostics[J]. *Biophysical Reviews*, 2023, 15(2): 199-221.
- [7] Lin C Y, Hwang D, Chiu N C, et al. Increased detection of viruses in children with respiratory tract infection using PCR[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(2): 564.
- [8] Liu S Q, Li X, Deng C L, et al. Development and evaluation of one-step multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2018, 90(3): 389-396.
- [9] Ou T P, Yun C, Auerswald H, et al. Improved detection of dengue and Zika viruses using multiplex RT-qPCR assays[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 282: 113862.
- [10] Bustin S A, Nolan T. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 3004.
- [11] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1931.
- [12] Cassidy A, Parle-McDermott A, O'Kennedy R. Virus detection: a review of the current and emerging molecular and immunological methods[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 637559.
- [13] Sitjar J, Liao J D, Lee H, et al. Detection of live SARS-CoV-2 virus and its variants by specially designed SERS-active substrates and spectroscopic analyses[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1256: 341151.
- [14] 徐厚祥, 徐彬, 熊吉川, 等. 表面等离子体共振和局域表面等离子体共振技术在病毒检测领域的研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(15): 1507401.
- Xu H X, Xu B, Xiong J C, et al. Research progress of surface plasmon resonance and local surface plasmon resonance in virus detection[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(15): 1507401.
- [15] Wang Y Q, Yan B, Chen L X. SERS tags: novel optical nanoprobes for bioanalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(3): 1391-1428.
- [16] Pérez-Jiménez A I, Lyu D Y, Lu Z X, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments [J]. *Chemical Science*, 2020, 11(18): 4563-4577.
- [17] Sharma B, Frontiera R R, Henry A I, et al. SERS: materials, applications, and the future[J]. *Materials Today*, 2012, 15(1/2): 16-25.
- [18] Porter M D, Lipert R J, Siperko L M, et al. SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 1001-1011.
- [19] Wang Z Y, Zong S F, Wu L, et al. SERS-activated platforms for immunoassay: probes, encoding methods, and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(12): 7910-7963.
- [20] 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.
- [21] Pilot R, Signorini R, Durante C, et al. A review on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Biosensors*, 2019, 9(2): 57.
- [22] Payne T D, Klawa S J, Jian T Y, et al. Catching COVID: engineering peptide-modified surface-enhanced Raman spectroscopy sensors for SARS-CoV-2[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(9): 3436-3444.
- [23] Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [24] Itoh T, Procházka M, Dong Z C, et al. Toward a new era of SERS and TERS at the nanometer scale: from fundamentals to innovative applications[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(4): 1552-1634.
- [25] Das R S, Agrawal Y K. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2011, 57(2): 163-176.
- [26] 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.
- [27] Jeanmaire D L, Duynes R P V. Surface Raman spectroelectrochemistry: part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1977, 84(1): 1-20.
- [28] Kudelski A. Raman spectroscopy of surfaces[J]. *Surface Science*, 2009, 603(10/11/12): 1328-1334.
- [29] Cialla D, März A, Böhme R, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(1): 27-54.
- [30] Bell S E J, Charron G, Cortés E, et al. Towards reliable and quantitative surface-enhanced Raman scattering (SERS): from key parameters to good analytical practice[J]. *Angewandte Chemie: International Ed. in English*, 2020, 59(14): 5454-5462.
- [31] Yang B, Jin S L, Guo S, et al. Recent development of SERS technology: semiconductor-based study[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(23): 20101-20108.
- [32] Louten J. *Essential human virology*[M]. New York: Academic Press, 2016: 19-29.
- [33] Sanjuán R, Nebot M R, Chirico N, et al. Viral mutation rates[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(19): 9733-9748.
- [34] Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [35] Loeffelholz M J, Tang Y W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 747-756.
- [36] Yang Y, Peng Y S, Lin C L, et al. Human ACE2-functionalized gold "virus-trap" nanostructures for accurate capture of SARS-CoV-2 and single-virus SERS detection[J]. *Nano-Micro Letters*, 2021, 13: 109.
- [37] 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]. *Sensors and Actuators B, Chemical*, 2022, 359: 131568.
- [38] Marques A C, Pinheiro T, Morais M, et al. Bottom-up microwave-assisted seed-mediated synthesis of gold nanoparticles onto nanocellulose to boost stability and high performance for SERS applications[J]. *Applied Surface Science*, 2021, 561: 150060.
- [39] Sarychev A K, Sukhanova A, Ivanov A V, et al. Label-free detection of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein at physiologically relevant concentrations using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Biosensors*, 2022, 12(5): 300.
- [40] Wu P, Luo X J, Xu Y H, et al. Long-range SERS detection of the SARS-CoV-2 antigen on a well-ordered gold hexagonal nanoplate film[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(50): 17541-17550.
- [41] Leonardi A A, Sciuto E L, Lo Faro M J, et al. Molecular fingerprinting of the omicron variant genome of SARS-CoV-2 by SERS spectroscopy[J]. *Nanomaterials*, 2022, 12(13): 2134.
- [42] Paria D, Kwok K S, Raj P, et al. Label-free spectroscopic SARS-CoV-2 detection on versatile nanoimprinted substrates[J]. *Nano*

- Letters, 2022, 22(9): 3620-3627.
- [43] Ramachandran K, Daoudi K, Columbus S, et al. Facile, Flexible, Fast': highly sensitive and Low-cost paper sensor for real time spike protein sensing with SERS[J]. *Materials Science and Engineering: B*, 2022, 286: 115984.
- [44] Peng Y S, Lin C L, Li Y Y, et al. Identifying infectiousness of SARS-CoV-2 by ultra-sensitive SnS₂ SERS biosensors with capillary effect[J]. *Matter*, 2022, 5(2): 694-709.
- [45] Feng E D, Zheng T T, He X X, et al. Plasmon-induced charge transfer-enhanced Raman scattering on a semiconductor: toward amplification-free quantification of SARS-CoV-2[J]. *Angewandte Chemie: International Ed. in English*, 2023, 62(38): e202309249.
- [46] Li T Y, Srivastava S, Liu J, et al. Label-free SARS-CoV-2 detection platform based on surface-enhanced Raman spectroscopy with support vector machine spectral pattern recognition[J]. *Engineered Science*, 2023, 23: 862.
- [47] Qin J W, Tian X D, Liu S Y, et al. Rapid classification of SARS-CoV-2 variant strains using machine learning-based label-free SERS strategy[J]. *Talanta*, 2024, 267: 125080.
- [48] Yeh Y J, Le T N, Hsiao W W W, et al. Plasmonic nanostructure-enhanced Raman scattering for detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and spike protein variants[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1239: 340651.
- [49] Mo W B, Wen J X, Huang J L, et al. Classification of coronavirus spike proteins by deep-learning-based Raman spectroscopy and its interpretative analysis[J]. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2023, 89(6): 1203-1211.
- [50] Lai S X, Liu Y, Fang S B, et al. Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antigen using surface-enhanced Raman spectroscopy-based lateral flow immunosensor[J]. *Journal of Biophotonics*, 2023, 16(7): e202300004.
- [51] Guan P C, Zhang H, Li Z Y, et al. Rapid point-of-care assay by SERS detection of SARS-CoV-2 virus and its variants[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(51): 17795-17802.
- [52] 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.
- [53] 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]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 190: 113421.
- [54] Vedelago C, Li J R, Lowry K, et al. A multiplexed SERS microassay for accurate detection of SARS-CoV-2 and variants of concern[J]. *ACS Sensors*, 2023, 8(4): 1648-1657.
- [55] Zhang J J, Miao X P, Song C Y, et al. Non-enzymatic signal amplification-powered point-of-care SERS sensor for rapid and ultra-sensitive assay of SARS-CoV-2 RNA[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 212: 114379.
- [56] Lin X L, Weng Y L, Liu Y, et al. Ratiometric SERS sensing chip for high precision and ultra-sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024, 399: 134803.
- [57] Chen H, Park S G, Choi N, et al. Sensitive detection of SARS-CoV-2 using a SERS-based aptasensor[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(6): 2378-2385.
- [58] Yin B H, Ho W K H, Zhang Q, et al. Magnetic-responsive surface-enhanced Raman scattering platform with tunable hot spot for ultrasensitive virus nucleic acid detection[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(3): 4714-4724.
- [59] Gao Y K, Han Y K, Wang C, et al. Rapid and sensitive triple-mode detection of causative SARS-CoV-2 virus specific genes through interaction between genes and nanoparticles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1154: 338330.
- [60] Wu Y X, Dang H J, Park S G, et al. SERS-PCR assays of SARS-CoV-2 target genes using Au nanoparticles-internalized Au nanodimple substrates[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 197: 113736.
- [61] Tabarov A, Vitkin V, Andreeva O, et al. Detection of A and B influenza viruses by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy and machine learning[J]. *Biosensors*, 2022, 12(12): 1065.
- [62] Gribanyov D, Zhdanov G, Olenin A, et al. SERS-based colloidal aptasensors for quantitative determination of influenza virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1842.
- [63] Kim H, Kang H, Kim H N, et al. Development of 6E3 antibody-mediated SERS immunoassay for drug-resistant influenza virus[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 187: 113324.
- [64] Zhdanov G, Nyhrikova E, Meshcheryakova N, et al. A combination of membrane filtration and raman-active DNA ligand greatly enhances sensitivity of SERS-based aptasensors for influenza a virus[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 937180.
- [65] Wang X W, Li S, Qu H, et al. SERS-based immunomagnetic bead for rapid detection of H5N1 influenza virus[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2023, 17(3): e13114.
- [66] Kukushkin V, Kristavchuk O, Andreev E, et al. Aptamer-coated track-etched membranes with a nanostructured silver layer for single virus detection in biological fluids[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 10: 1076749.
- [67] Lu M D, Joung Y, Jeon C S, et al. Dual-mode SERS-based lateral flow assay strips for simultaneous diagnosis of SARS-CoV-2 and influenza a virus[J]. *Nano Convergence*, 2022, 9(1): 39.
- [68] Garsault D, El Messaoudi S, Prabakaran M, et al. Detection of several respiratory viruses with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy coupled with Artificial Intelligence[J]. *Clinical Spectroscopy*, 2023, 5: 100025.
- [69] Chen H, Park S K, Joung Y, et al. SERS-based dual-mode DNA aptasensors for rapid classification of SARS-CoV-2 and influenza A/H1N1 infection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 355: 131324.
- [70] Liu Z Z, Wang C W, Zheng S, et al. Simultaneously ultrasensitive and quantitative detection of influenza A virus, SARS-CoV-2, and respiratory syncytial virus via multichannel magnetic SERS-based lateral flow immunoassay[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2023, 47: 102624.
- [71] Liang J J, Wu L, Wang Y Q, et al. SERS/photothermal-based dual-modal lateral flow immunoassays for sensitive and simultaneous antigen detection of respiratory viral infections[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 389: 133875.
- [72] Anwar S, Khawar M B, Ovais M, et al. Gold nanocubes based optical detection of HIV-1 DNA via surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2023, 226: 115242. [PubMed]
- [73] Yadav S, Senapati S, Desai D P, et al. Portable and sensitive Ag nanorods based SERS platform for rapid HIV-1 detection and tropism determination[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2021, 198: 111477.
- [74] Yadav S, Senapati S, Kulkarni S S, et al. A SERS based clinical study on HIV-1 viral load quantification and determination of disease prognosis[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 2023, 239: 112629.
- [75] Winder N, Gohar S, Muthana M. Norovirus: an overview of virology and preventative measures[J]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2811.
- [76] Achadu O J, Abe F, Li T C, et al. Molybdenum trioxide quantum dot-encapsulated nanogels for virus detection by surface-enhanced Raman scattering on a 2D substrate[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(24): 27836-27844.
- [77] Achadu O J, Abe F, Hossain F, et al. Sulfur-doped carbon dots@polydopamine-functionalized magnetic silver nanocubes for dual-modality detection of norovirus[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 193: 113540.
- [78] Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C[J]. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 2012, 26(4): 401-412.
- [79] Kashif M, Majeed M I, Hanif M A, et al. Surface Enhanced

- Raman Spectroscopy of the serum samples for the diagnosis of Hepatitis C and prediction of the viral loads[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 242: 118729.
- [80] Rafiq S, Majeed M I, Nawaz H, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for analysis of PCR products of viral RNA of hepatitis C patients[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 259: 119908.
- [81] Sang S W, Yue Y J, Wang Y G, et al. The epidemiology and evolutionary dynamics of massive dengue outbreak in China, 2019 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1156176.
- [82] Wiwanitkit V. Concurrent malaria and dengue infection: a brief summary and comment[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2011, 1(4): 326-327.
- [83] Farokhinejad F, Li J R, Hugo L E, et al. Detection of dengue virus 2 with single infected mosquito resolution using yeast affinity bionanofragments and plasmonic SERS nanoboxes[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(41): 14177-14184.
- [84] Song C Y, Zhang J J, Liu Y, et al. Highly sensitive SERS assay of DENV gene via a cascade signal amplification strategy of localized catalytic hairpin assembly and hybridization chain reaction [J]. *Sensors and Actuators B, Chemical*, 2020, 325: 128970.
- [85] Jacob S S, Lukose J, Bankapur A, et al. Micro-Raman spectroscopy study of optically trapped erythrocytes in malaria, dengue and leptospirosis infections[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 858776.
- [86] Tripathi M N, Jangir P, Aakriti, et al. A novel approach for rapid and sensitive detection of Zika virus utilizing silver nanoislands as SERS platform[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 302: 123045.
- [87] Masmejan S, Musso D, Vouga M, et al. Zika virus[J]. *Pathogens*, 2020, 9(11): 898.
- [88] Jia X F, Liu Z Z, Peng Y J, et al. Automatic and sensitive detection of West Nile virus non-structural protein 1 with a portable SERS-LFIA detector[J]. *Mikrochimica Acta*, 2021, 188(6): 206.
- [89] Kaján G L, Doszpoly A, Tarján Z L, et al. Virus-host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2020, 88(1): 41-56.
- [90] Schiller J T, Lowy D R. An introduction to virus infections and human cancer[J]. *Recent Results in Cancer Research*, 2021, 217: 1-11.
- [91] Seeger C, Mason W S. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. *Virology*, 2015, 479/480: 672-686.
- [92] Kamińska A, Witkowska E, Winkler K, et al. Detection of Hepatitis B virus antigen from human blood: SERS immunoassay in a microfluidic system[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 66: 461-467.
- [93] Du Y W, Ji S F, Dong Q Y, et al. Amplification-free detection of HBV DNA mediated by CRISPR-Cas12a using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1245: 340864.
- [94] Batool F, Nawaz H, Majeed M I, et al. SERS-based viral load quantification of hepatitis B virus from PCR products[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 255: 119722.
- [95] Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaed M, et al. Monkeypox (mpox) virus: classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2023, 16(4): 531-541.
- [96] Zhang Z, Jiang H, Jiang S, et al. Rapid detection of the monkeypox virus genome and antigen proteins based on surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(29): 34419-34426.
- [97] Yu Q, Li J X, Zheng S, et al. Molybdenum disulfide-loaded multilayer AuNPs with colorimetric-SERS dual-signal enhancement activities for flexible immunochromatographic diagnosis of monkeypox virus[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 459: 132136.
- [98] Dunmire S K, Verghese P S, Balfour H H, Jr. Primary Epstein-Barr virus infection[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2018, 102: 84-92.
- [99] Houen G, Trier N H. Epstein-Barr virus and systemic autoimmune diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 11: 587380.
- [100] Tiwari D, Jakhmola S, Pathak D K, et al. Temporal in vitro Raman spectroscopy for monitoring replication kinetics of Epstein-Barr virus infection in glial cells[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(45): 29547-29560.
- [101] Sun J L, Wang R, Wang L, et al. Visual/quantitative SERS biosensing chip based on Au-decorated polystyrene sphere microcavity arrays[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 388: 133869.
- [102] McGeoch D J, Rixon F J, Davison A J. Topics in herpesvirus genomics and evolution[J]. *Virus Research*, 2006, 117(1): 90-104.
- [103] Pezzotti G, Ohgitali E, Imamura H, et al. Raman multi-omic snapshot and statistical validation of structural differences between herpes simplex type I and Epstein-Barr viruses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15567.
- [104] Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N, et al. Adenovirus structure: what is new? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5240.
- [105] Greber U F, Flatt J W. Adenovirus entry: from infection to immunity[J]. *Annual Review of Virology*, 2019, 6(1): 177-197.
- [106] Chang C W, Liao J D, Shiao A L, et al. Non-labeled virus detection using inverted triangular Au nano-cavities arrayed as SERS-active substrate[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 156(1): 471-478.
- [107] Kukushkin V, Ambartsumyan O, Subekin A, et al. Multiplex lithographic SERS aptasensor for detection of several respiratory viruses in one pot[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(9): 8081.
- [108] Yin L J, Man S L, Ye S Y, et al. CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 193: 113541.
- [109] Ma L, Zhang W L, Yin L J, et al. A SERS-signalled, CRISPR/Cas-powered bioassay for amplification-free and anti-interference detection of SARS-CoV-2 in foods and environmental samples using a single tube-in-tube vessel[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 452: 131195.
- [110] Su A L, Liu Y, Cao X M, et al. A universal CRISPR/Cas12a-mediated AuNPs aggregation-based surface-enhanced Raman scattering (CRISPR/Cas-SERS) platform for virus gene detection [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 369: 132295.
- [111] Su A L, Liu Y, Cao X M, et al. Direct virus gene detection: a CRISPR/dCas9-mediated surface-enhanced Raman scattering strategy with enzyme-catalyzed signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(14): 5927-5936.
- [112] Wang H M, Su A L, Bao C X, et al. A CRISPR/Cas12a-SERS platform for amplification-free detection of African swine fever virus genes[J]. *Talanta*, 2024, 267: 125225.
- [113] Liang J J, Teng P J, Xiao W, et al. Application of the amplification-free SERS-based CRISPR/Cas12a platform in the identification of SARS-CoV-2 from clinical samples[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 273.
- [114] Wang W, Ma P Y, Song D Q. Applications of surface-enhanced Raman spectroscopy based on portable Raman spectrometers: a review of recent developments[J]. *Luminescence*, 2022, 37(11): 1822-1835.
- [115] Kaladharan K, Chen K H, Chen P H, et al. Dual-clamped one-pot SERS-based biosensors for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 using portable Raman spectrometer[J]. *Sensors and Actuators B, Chemical*, 2023, 393: 134172.
- [116] Ansah I B, An T, Yang J Y, et al. Electrochemical synthesis of 3D plasmonic-molecule nanocomposite materials for in situ label-free molecular detections[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2021,

- 8(21): 2101201.
- [117] Pramanik A, Gao Y, Patibandla S, et al. The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles[J]. *Nanoscale Advances*, 2021, 3(6): 1588-1596.
- [118] 刘凤翔, 张礼豪, 黄霞. 拉曼光谱技术在肿瘤诊断中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617016.
- Liu F X, Zhang L H, Huang X. Application of Raman spectroscopy in cancer diagnosis[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617016.

Research Progress on Epidemic Virus Detection Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Liu Yi, Wang Nan, He Shaohua, Zhang Jun, Feng Shangyuan, Lin Duo*

Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China

Abstract

Significance Viruses are the primary cause of many infectious diseases, including influenza, high-mortality lower respiratory tract infections, diarrhea, tuberculosis, HIV infection, dengue fever, hepatitis B, and more. These diseases can cause severe damage to various systems in the human body and can even lead to life-threatening conditions. The outbreak of infectious viruses poses a significant challenge to public healthcare systems. Early and accurate virus diagnosis is crucial in preventing virus spread, especially in the absence of specific vaccines or effective medications. Existing traditional detection methods often require complex equipment and the expertise of skilled operator. Hence, it becomes challenging to conduct large-scale testing in rapidly spreading virus-infected areas.

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) technology is an ultra-sensitive vibrational spectroscopy technique, which is used to detect plasmonic nanostructures on the surface or near-surface molecules. Due to its fast response, strong specificity, and non-invasive detection characteristics, SERS has been widely used in surface and interface studies, chemical and biosensors, biomedical monitoring, trace analysis, electrochemical reactions, and catalytic reactions. Specifically, in virus detection, it exhibits extremely high detection sensitivity, enabling rapid and accurate detection of minute virus particles. Based on the analysis of virus spectral features, SERS technology can differentiate between different types of viruses, including subtypes and variants. This high specificity leads to a unique advantage in virus tracing, classification, and epidemiological research, which is crucial for the rapid screening of early virus infections and facilitating timely medical intervention. This review systematically summarizes the research progress and potential applications of SERS technology in virus detection over the past two years, considering factors such as the genetic material of the virus, virus types, and the extent of impact (Fig. 1).

Progress Initially, this study categorizes viruses based on their genetic material, focusing on recent efforts to detect RNA and DNA viruses that threaten human life and health. It offers a comprehensive analysis of both labeled and label-free SERS techniques for detecting these virus types. For RNA viruses, such as SARS-CoV-2, the influenza virus, HIV, and DNA viruses, such as HBV and HPV, label-free detection methods require SERS technology to realize enhanced performance in signal amplification of the detection substrate for direct detection of natural biomolecules without amplification. Notable examples include the trap structure introduced by Yang et al., the nano-flexible substrate by Paria et al., and the semiconductor application by Peng et al., which broaden the application scope of SERS technology. In the realm of SERS signal processing, particularly when combined with machine learning techniques, there is a significant advantage in extracting and analyzing spectral features for identifying potential biomarkers or molecular details in complex and varied samples. The creation of sensitive SERS biological probes in labeling methods is especially critical. Accurately tagging target molecules with Raman signal molecules greatly increases the specificity of the detection platform. For example, Guan et al. employed substrate capture and specific recognition probes for detecting the SARS-CoV-2 antigen, while Su et al. developed SERS labels integrated with CRISPR/Cas technology for the non-amplified detection of target genes. Moreover, the miniaturization and portability of Raman instruments, propelled by technological advancements, are steering SERS toward field applications and real-time analysis, aligning perfectly with the point-of-care testing (POCT) concept. This foundation supports the study's summary of various initiatives that combine SERS technology with portable Raman instruments. It concludes by offering a summary and outlook on optimization strategies and the current challenges facing the application of SERS technology in virus detection and various POCT settings.

Conclusions and Prospects The efficacy of SERS technology in virus detection hinges on several critical factors, such as the design of the enhancement substrate, excitation conditions, the properties of labels and analytes, detection devices, and data analysis techniques. The primary aim is to enhance detection speed and sensitivity while simplifying the detection process for more efficient virus identification. To navigate the intricate challenges posed by viral outbreaks, the development of integrated micro-detection chips capable of identifying multiple viruses, paired with compact Raman detection devices, stands as the ideal approach for future POCT of

viruses. Furthermore, investigating the integration of SERS technology with other detection methods—such as chemical separation, biological capture, colorimetry, and advanced computational approaches like machine learning, deep learning, and artificial intelligence—can maximize the benefits of diverse technologies. This integration promises the creation of innovative Raman analysis devices that consolidate sample processing, detection, analytical processing, statistical analysis, result dissemination, and display functionalities, catering to the on-site and real-time testing demands across various sectors. We expect that merging SERS technology with compact Raman instruments will usher in a convenient, efficient, and precise optical POCT method for virus screening, classification, infection tracking, and prognosis forecasting.

Key words medical optics; surface-enhanced Raman spectroscopy; virus detection; biosensors; nanophotonics; nanomedicine