

# 单分子计数免疫分析

苏玉婷, 盖宏伟\*

江苏师范大学化学与材料科学学院, 江苏 徐州 221116

**摘要** 免疫分析是现代医学不可或缺的分析手段。现阶段的免疫技术大多存在检测限高、灵敏度低、复杂体系中可靠性差等问题,难以满足精准医疗的要求。单分子计数免疫分析也称为数字免疫分析,可通过计量免疫复合体个数进行定量,是一种超高灵敏免疫分析技术,能够满足重大疾病早期检测、血液中稀少抗原检测等高灵敏检测的需求。对单分子计数免疫分析的基础理论、分类方法、具体应用进行了介绍,重点阐述了国内外单分子计数免疫分析领域的研究现状,并对该免疫分析技术应用于医学临床诊断的前景进行了展望。

**关键词** 医用光学与生物技术; 单分子; 数字分析; 免疫分析; 光学检测

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617011

## Single Molecule Counting Immunoassay

Su Yuting, Gai Hongwei\*

*School of Chemistry and Materials Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China*

**Abstract** Immunoassay is an indispensable analytical method in modern medicine. At present, most immune technologies have the problems such as high detection limit, low sensitivity, and poor reliability in complex systems, which are difficult to meet the requirements of precision medicine. Single molecule immunoassay, also known as digital immunoassay, can quantify by measuring the number of immune complexes. It is an ultrahigh sensitive immunoassay technology, which can meet the needs of high sensitive detection such as early detection of major diseases and detection of rare antigens in blood. This paper introduces the basic theory, classification methods and specific applications of single molecule immunoassay, focuses on the research status in the field of single molecule counting immunoassay at home and abroad, and discusses the prospects of the applications of this immunoassay technology in medical clinical diagnosis.

**Key words** medical optics and biotechnology; single molecule; digital assays; immunoassays; optical detection

## 1 引言

精准医疗自提出以来就被认为是第三次医学革命和现代医学的发展方向,其核心由精准诊断和精准治疗构成。精准诊断是精准治疗的前提和基础,也是精准医疗的技术支撑和重要保障<sup>[1]</sup>。血液中蛋白质含量的精准测量技术是实现精准诊断不

可或缺的重要手段之一。蛋白质生物标志物是疾病发生、发展过程中表达量发生变化的生物分子,对疾病的早期诊断和预防起着重要的作用。目前,免疫分析是临床上广泛使用的蛋白质检测方法,能够在短时间内准确检测特定抗原或抗体分子,在肿瘤标志物检测、预后监测、药物分析等领域已被广泛使用<sup>[2-4]</sup>。

收稿日期: 2021-12-24; 修回日期: 2022-01-25; 录用日期: 2022-01-27

基金项目: 国家自然科学基金(22174056)、江苏省高校优秀科技创新团队

通信作者: \*gai@jsnu.edu.cn

免疫分析是一种化学测量方法,利用抗原与抗体之间的特异性反应识别待测分子,进而利用试剂使识别出的待测分子产生信号进行定量分析。待测分子可以是抗原,也可以是抗体。免疫分析最早由美国科学家 Berson 和 Yalow<sup>[5]</sup>发明,1977 年 Yalow 因此获得诺贝尔医学奖。到目前为止,免疫分析经过 50 多年的发展,分析模式多种多样,分析类型层出不穷,而且仍有新的方法不断产生。传统的免疫分析通过测量待测样品宏观信号的强度变化与目标分子浓度的关系进行定量,这类方法灵敏度普遍不高,检测限一般在  $10^{-9} \sim 10^{-12}$  mol/L。虽然对于已经发生明显症状的疾病诊断十分有效,但难以满足重大疾病早筛、神经障碍早诊、心血管疾病早检等需求。在重大疾病的早期阶段,血液中抗原浓度在  $10^{-15}$  mol/L 级别甚至更低,常规免疫分析根本测量不到,更不必说精准测量。比如前列腺癌术后患者的前列腺特异抗原(PSA)质量浓度为  $0.1 \sim 100 \times 10^{-12}$  g·mL<sup>-1[6-7]</sup>;HIV 早期患者的 p24 抗原质量浓度为  $0.01 \sim 10 \times 10^{-12}$  g·mL<sup>-1[8-9]</sup>;阿尔茨海默相关的  $\beta$ -样淀粉蛋白最低质量浓度为  $0.3 \times 10^{-12}$  g·mL<sup>-1[10]</sup>,这样的低浓度都是传统免疫分析技术难以企及的范围。

单分子检测是在单分子水平上通过生物分子的构象变化、动力学、分子之间相互作用以及对单个分子进行操纵等方式进行检测,是一种适用于单分子水平上探求分子的基本物理和化学原理的独特技术,它提供了宏观测量无法实现的卓越灵敏度和高分辨率<sup>[11]</sup>。早期主要应用于生物物理学的大分子结构变化研究和分析化学的毛细管电泳分离检测中,后来逐渐发展为单分子传感。单分子检测

与免疫分析相结合产生了单分子免疫分析。没有采用计数定量方式的单分子免疫分析研究<sup>[12]</sup>不在本文讨论范围内。

本文将单分子计数免疫分析技术按照非均相、均相和软离散、硬离散进行交叉分类,综述其研究现状,重点阐述单分子计数在免疫分析中的应用和代表性工作,并对该免疫分析技术在生命科学领域中的发展前景进行分析和展望。

## 2 单分子计数免疫概要

### 2.1 单分子计数免疫基本概念

单分子计数免疫是一种以计量免疫复合体分子个数进行定量免疫分析的技术,也就是以逐个分子计数的方式统计免疫复合体的数量。与此相比,常规免疫分析利用免疫复合体的信号强度进行定量,信号强度的波动影响分子识别的准确性。在宏观体系中,信号强度值的大小随着样本分子含量连续变化,所以常规免疫分析记录的是连续信号,也可以说是模拟信号。而逐个分子计数的信号是离散信号。在信息技术中,信号离散化是数字信号的基础与前提,因此单分子计数免疫分析也称为数字免疫分析,其主要特征就是灵敏度极高,检测限至少是常规免疫分析技术的 1/1000,可以达到单分子检测水平<sup>[13]</sup>。单分子计数免疫分析能够满足肿瘤早期检测、血液中稀少抗原检测等高灵敏检测的需求,是近些年免疫分析的前沿技术,被认为是下一代免疫技术<sup>[14-15]</sup>。

如图 1(a)所示,单分子计数免疫分析按照操作过程可以分为 4 个主要单元操作,即形成免疫复合体、离散、识别和计数。

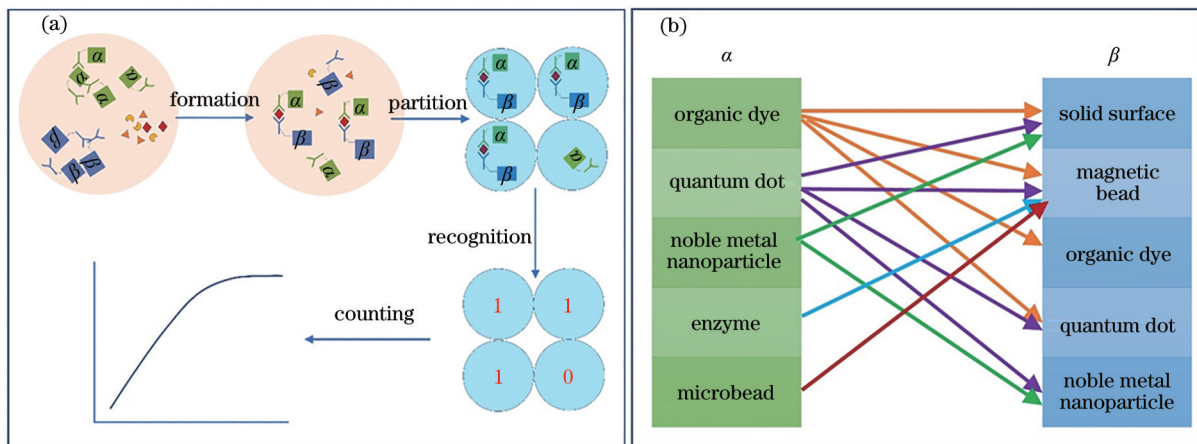


图 1 数字免疫分析。(a)一般流程;(b)偶联标记分类组合

Fig. 1 Digital immunoassay. (a) General flow; (b) classification and combination of coupled markers

形成免疫复合物是捕获目标抗原的过程,捕获效率的高低决定了形成免疫复合物的数量,与所开发方法的检测限高低密切相关。目前看来,单分子计数免疫分析形成的免疫复合物均为三明治夹心结构,即捕获抗体-抗原-检测抗体形式。在捕获抗体和检测抗体一方和双方上均可以偶联所需要的功能标签,如图 1(b)中的  $\alpha$  和  $\beta$ 。比如需要检测功能,则在检测抗体上连接荧光标签, $\alpha$  可以是染料、量子点、酶等;需要分离功能,则在捕获抗体上偶联磁珠标签, $\beta$  可以是磁珠、界面等。图 1(b)中  $\alpha$  和  $\beta$  之间的连接线代表已经报道过的偶联方式组合。

离散是将免疫复合物分子在空间或时间上形成可区分、可计数、可统计的分散状态,是数字免疫分析的关键技术。离散分为硬离散和软离散两大类:硬离散是指利用相界面隔离的微空间将目标分子分散成单个分子的技术,主要包括微孔阵列离散和液滴离散。在硬离散条件下,分子与分子之间由两相界面隔离;软离散是在没有实体微空间情况下目标分子形成了不重叠的分散状态,分子与分子之间是连续相,分为时间离散和空间离散。硬离散起到浓缩效应和分离效应。对于  $10^{-15}$  mol/L 浓度的样品,如果将单个分子离散到  $10 \mu\text{L}$  尺度的液滴中,在这个微空间中,样品浓度为  $10^{-12}$  mol/L 范围,检测难度大大降低。基质分子被离散到微空间中,使得每个微空间中的基质分子总量减少,样品分子与基质分子的比值增大,降低基质噪声,提高检测效果。软离散方法相对简单,但缺乏可控性,大多数空间软离散面临着进样的免疫复合物不能全部沉积离散的问题。

识别是指利用光、电、磁学等方法,将目标分子产生的信号与背景和干扰分子的信号进行区分检测。理想的识别方法既能从干扰物质和游离探针中准确地识别出免疫复合物,又能识别出特异性结合和非特异性结合。

计数是数字免疫分析的定量方式,避免了宏观信号的波动带来的误差。定量准确度和定量方式受到抗原捕获效率、免疫复合物离散封装效率、识别效率的影响。当离散封装效率达到 100% 时,若阳性区间中不可区分单个免疫复合物,利用泊松分布阴性比率可以绝对定量;若可区分,则可以统计免疫复合物个数。当离散封装效率不能达到 100% 时,通过利用阳性区间中免疫复合物个数建立标准曲线进行定量。

## 2.2 单分子计数免疫发展历程

单分子计数免疫分析,最早可以回溯到单分子毛细管电泳阶段,以电泳淌度的不同区分免疫复合物和游离抗体,在电泳分离的同时完成单分子检测<sup>[16-17]</sup>;2006年, Singulex 公司报道了商品名为 Erenna 的单分子计数免疫分析仪,开启了数字免疫分析的商品化阶段;数字酶免疫分析概念由 Quanterix 公司在 2010 年提出,创立了阵列微孔离散单个酶标免疫复合物的方法,将硬离散思路引入了单分子计数免疫分析中<sup>[18-19]</sup>;2015年,液滴离散法被提出并广泛应用,使用微流控液滴对免疫复合物进行离散,可以实现对免疫复合物的完全装载<sup>[20-21]</sup>;2016年, Akama 等<sup>[22]</sup>提出酶催化沉积的时间软离散法,信号标签沉积在形成免疫复合物的磁珠上,不需要复杂的液滴生成设备,采用传统的流式细胞术可实现对信号的实时检测;2018年,本文作者提出利用量子点标记的均相软离散数字免疫分析法,利用双色标记空间重叠和量子点的光谱蓝移不同步性区分免疫复合物和单个游离量子点<sup>[23-24]</sup>;同年,粒子扩散识别法被报道,免疫复合物通过分子链被连接在反应器底部,粒子在有限的空间内表现出特征性的布朗运动,能有效识别结合的免疫复合物、无抗原粒子的自由扩散或非特异性结合<sup>[25-27]</sup>;2019年, Chen 等<sup>[28]</sup>报道了气泡识别法,使用铂纳米颗粒 (PtNP) 催化过氧化氢产生的微泡来可视化蛋白质分子,进行单个免疫复合物的检测分析;2020年,本文作者利用蒸干沉积微球标记,结合网格辅助多帧成像实现了 100% 离散定量<sup>[29]</sup>;2020年, Chatterjee 等<sup>[30]</sup>提出单分子荧光变化,均相识别特异性结合和非特异性结合,荧光检测探针与固定化靶分子瞬时和可逆结合,这种单分子水平上的重复结合被检测,以生成动力学指纹,从而以高置信度区分特异性结合(目标分子)和非特异性结合;2021年, He 等<sup>[31-32]</sup>提出利用纳米孔的时间离散法,易于识别的 DNA 纳米结构通过数字纳米孔,作为目标蛋白质存在(“1”)或不存在(“0”)的信号;2021年, Mecwins 公司宣称利用金纳米颗粒标记商品化仪器;2021年,本文作者提出用低数值孔径物镜实现数字免疫分析,借助微球透镜的增强作用,在  $20\times$  的物镜下即可检测到作为目标物标签的单个量子点<sup>[33]</sup>。

## 2.3 定量方法

单分子计数免疫分析中主要有两种定量方式:一是绝对定量,基于泊松分布概率函数计算浓度;

二是计数定量,预先构建标准曲线,计量免疫复合体的个数进行定量。

### 2.3.1 绝对定量

绝对定量不需要标准曲线,直接通过泊松分布公式计算而得,只要统计出阴性离散空间的比例即可,方法简单,适用于待测量的目标分子全部参与离散且被检测,也就是离散效率必须为 100%。然而大多数离散方法无法达到这一效率。微孔阵列离散过程中,大约 50% 的磁珠进入微孔,未进入微孔的磁珠被清洗去除,离散效率为 50% 左右。软离散中样品分子沉积到基底的效率等同于离散效率,与基底性质和采用的沉积方法有关,也难以做到 100% 沉积。液滴离散是能够做到完全离散的方法之一,数字液滴聚合酶链式反应(PCR)就是采用泊松分布概率计算的绝对定量方法。

泊松分布定量方法如下:

数字免疫分析的离散过程是将  $m$  个样品分子分装到  $n$  个微空间的过程。每个微空间中的平均分子个数( $\lambda$ )与样品浓度( $C$ )和微空间个数( $n$ )相关。 $\lambda$  是未知量,只要估计出  $\lambda$  就可以计算出样品浓度。

$$\lambda = \frac{m}{n} = CV_d N_A, \quad (1)$$

式中: $V_d$  为微空间的体积; $N_A$  为阿伏加德罗常数。

假设样品分子在离散过程中必然被分装到微空间中,不存在未进入微空间的分子,即封装效率为 100%,则特定微空间中能否分装到目标分子,能分装到几个目标分子都是随机发生的。当分子数  $m$  足够大时,符合大数定律,离散过程可以用统计分布描述。统计学中, $m$  次独立重复的试验,每次试验事件发生的概率为  $p$ ,事件发生  $k$  次的概率分布为二项分布。在数字免疫离散分装过程中,将目标分子分装到微空间中为独立试验中发生的事件,试验重复次数为分子总数  $m$ ,每个目标分子分装到指定微空间的概率为  $1/n$ ,在指定微空间中分装到  $k$  个分子的概率分布  $P(k)$  符合二次分布:

$$P(k) = \binom{m}{k} p^k q^{m-k}, \quad 0 \leq k \leq m, \\ \binom{m}{k} = \frac{m!}{(m-k)! k!}, \quad p = \frac{1}{n}, \quad q = 1 - p, \\ \mu = mp = \lambda, \quad \sigma^2 = mpq, \quad (2)$$

式中:期望值  $\mu$  是每个空间中分子个数也就是  $\lambda$ ,当  $m$  足够大, $p$  足够小(也就是  $n$  足够大)时,二项分布收敛于泊松分布; $\sigma^2$  为泊松分布的方差。一般认为当  $m \geq 20, p \leq 0.05$  时,二项式分布近似为泊松分

布。指定微空间中包含的目标分子个数为随机变量( $X_m$ ),其统计分布符合泊松分布:

$$P(X_m = k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!}, \\ \mu = \sigma^2 = \lambda. \quad (3)$$

当微空间不含样品分子时,

$$k = 0, \quad P(0) = e^{-\lambda}, \\ \ln[P(0)] = -\lambda. \quad (4)$$

结合(1)式可以算出样品浓度  $C$ ,

$$C = \frac{\lambda}{N_A V_d} = -\frac{\ln[P(0)]}{N_A V_d}. \quad (5)$$

离散空间数  $n$  是一个重要参数。在免疫复合体数量确定时, $n$  影响每个空间中的分子数分布。假设将 50000 个免疫复合体,全部分装到离散空间(40 pL)中。需要注意的是,离散空间总数不同,意味着样品体积不同(样品体积为总离散空间数与每个空间体积的乘积),也即样品浓度不同。当离散空间为 20000 个时,每空间期望分子个数为 2.5(50000/20000=2.5)。按照泊松分布,由(2)式计算得  $P(0)=0.0821$ ,代入(4)式计算  $\lambda$  为 2.4998,与期望值非常相符;当离散空间为 50000 个时,每空间期望分子数为 1。计算得  $P(0)=0.368$ ,代入(4)式计算  $\lambda$  为 0.9996,与期望值也非常相符。离散空间越多,阴性空间的概率越大。

理论上,最少要有一个阴性离散空间,以保证  $P(0) \neq 0$ ,否则无法计算样品浓度。在这个前提下,离散空间总数不必一定大于样品分子数,也不必保证每个空间中只有一个目标分子。当然阴性空间数量如果太小的话,微小的测量波动都将大幅度影响定量结果,不利于准确测量。

对于未知样品,浓度由(1)式和(4)式计算而得,其中的  $P(0)$  通过阴性离散空间数与离散空间总数的比值而得。绝对定量检测的理论上限为  $1/n$ ,下限为  $(n-1)/n$ ,空间总数越多,动态范围越宽。但当样品浓度接近检测范围的两端时,阴性空间的微小变化都将大幅度影响定量结果。因此,通常将理论动态范围的 60% 视为实际动态范围,一般在 2~3 个数量级。为了扩大动态范围,将模拟信号和数值信号联用。目标分子含量低的时候,分子密度低,单个分子能够区分,采用计数定量;目标分子浓度高时,分子重叠,不能区分单个分子,无法计数。以单位区域或单个磁珠或单次信号的强度进行定量,动态范围扩大到 6~8 个数量级<sup>[34-36]</sup>。

### 2.3.2 计数定量

泊松分布计算定量的方式不需要标准曲线,简单易行,然而要求所有待测目标分子皆参与离散。这个条件并不容易满足,只有在用液滴离散和软离散蒸干的时候才能满足。大部分情况下,离散效率达不到 100%。这时,可采用阳性粒子计数的方式定量。这也是大多数单分子计数免疫采用的定量方式,包括微孔阵列离散的数字免疫。

在微孔阵列硬离散免疫中,绘制标准曲线和测量未知浓度时,测量结果的分析流程如下:

第一步:测量出不同浓度标准样品阳性微孔总数;

第二步:各浓度下微孔总数减去背景假阳性微孔数;

第三步:计算阳性微孔比例: $P(\text{active})$ ;

第四步:计算阴性微孔概率: $1-P(\text{inactive})$ ;

第五步:根据泊松分布公式计算每个磁珠上酶分子个数 $\lambda$ ;

第六步:横坐标为浓度,纵坐标为每个磁珠上酶分子个数 $\lambda$ ,绘制标准曲线。

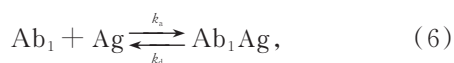
软离散免疫分析时,在鉴定检测信号(阳性信号)来自单个免疫复合物后,直接统计不同浓度下的阳性信号数,即可绘制标准曲线。

### 2.4 免疫结合理论

传统观点认为,免疫分析的检测动态范围在以平衡解离常数为中心的 81 倍内,即  $K_D/9 \sim 9K_D$ <sup>[37]</sup>。典型的抗原抗体相互作用的  $K_D$  约为  $1 \times 10^{-9}$  mol/L。 $K_D$  小于  $10 \times 10^{-9}$  mol/L 认为是高亲和, $K_D$  大于  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 是低亲和。定量范围即为  $111 \times 10^{-12}$  mol/L 到  $9 \times 10^{-9}$  mol/L。因此,认为  $K_D$  越小越有利于降低检测限。然而,大量的研究表明免疫分析的检测范围可以远远低于  $K_D$ , 数字免疫分析技术甚至可以检测到  $10^{-18}$  mol/L 水平的目标分子<sup>[18, 38]</sup>。能否可靠地检测到远远低于  $K_D$  的抗原分子浓度是一个容易产生的疑问。为了释疑,需要从理论上解决两个问题:1)热力学问题:超低抗原浓度下能否形成免疫复合物,以及形成足够数量的免疫复合物;2)动力学问题:超低浓度的抗原分子,免疫反应时间是否满足实际检测的需求。

#### 2.4.1 免疫热力学

从最简单的免疫反应开始讨论。



式中: $\text{Ab}_1$ 为捕获抗体; $\text{Ag}$ 为抗原; $\text{Ab}_1\text{Ag}$ 为免疫复

合体; $k_a$ 为结合反应速率常数; $k_d$ 为解离反应速率常数。

根据质量作用定律(the law of mass action),

$$K_D = \frac{[\text{Ab}_1][\text{Ag}]}{[\text{Ab}_1\text{Ag}]}, \quad (7)$$

式中: $K_D$ 为平衡解离常数, mol/L;  $[\text{Ab}_1]$ 、 $[\text{Ag}]$ 、 $[\text{Ab}_1\text{Ag}]$ 分别为捕获抗体浓度、抗原浓度、免疫复合物的浓度。

$$[\text{Ab}_1] = [\text{Ab}_1]_0 - [\text{Ab}_1\text{Ag}], \quad (8)$$

式中, $[\text{Ab}_1]_0$ 为捕获抗体起始浓度。将(8)式代入(7)式中,得

$$K_D = \frac{([\text{Ab}_1]_0 - [\text{Ab}_1\text{Ag}])([\text{Ag}]_0 - [\text{Ab}_1\text{Ag}])}{[\text{Ab}_1\text{Ag}]}, \quad (9)$$

整理得

$$[\text{Ab}_1\text{Ag}]^2 - (K_D + [\text{Ag}]_0 + [\text{Ab}_1]_0)[\text{Ab}_1\text{Ag}] + [\text{Ab}_1]_0[\text{Ag}]_0 = 0, \quad (10)$$

(10)式是一个一元二次方程,可解出 $[\text{Ab}_1\text{Ag}]$ 与抗原浓度的关系。

大多数免疫分析中  $K_D$  为  $10^{-9}$  mol/L, 抗体初始浓度为  $10^{-9}$  mol/L, 在  $100 \mu\text{L}$  溶液中,  $1 \times 10^{-18}$  mol/L 的抗原(抗原分子数 60), 可形成 30 个免疫复合物, 捕获效率为 50%。抗体初始浓度提高到  $10^{-6}$  mol/L, 捕获率接近 100%。说明在抗原极低情况下, 可以形成足够检测的免疫复合物。

#### 2.4.2 免疫反应动力学

免疫反应动力学研究的是形成免疫复合物的速率。从最简单的情形分析入手, 由(8)式可得

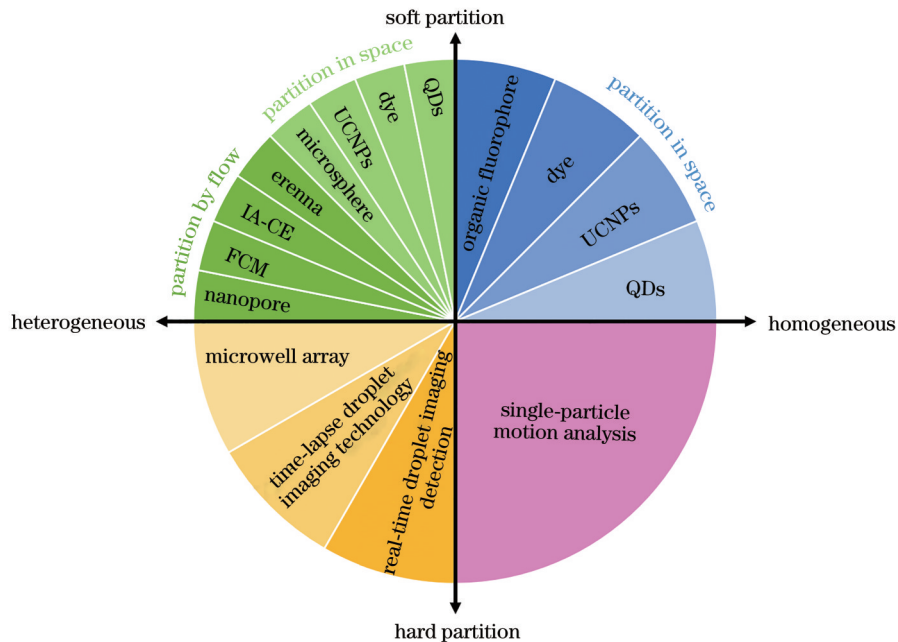
$$\frac{\partial [\text{Ab}_1\text{Ag}]}{\partial t} = k_a([\text{Ab}_1]_0 - [\text{Ab}_1\text{Ag}])([\text{Ag}]_0 - [\text{Ab}_1\text{Ag}]) - k_d[\text{Ab}_1\text{Ag}], \quad (11)$$

(11)式在反应动力学常数已知时, 通过设定抗体、抗原的浓度可得到免疫复合物浓度与反应时间的关系。假设抗体浓度为  $2.3 \times 10^{-9}$  mol/L, 抗原浓度为  $1 \times 10^{-15}$  mol/L, 在 1000 s (17 min) 的反应时间后, 对于  $k_a = 10^6$  (mol·L)<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, 捕获效率在 67%~89% 之间。对于  $k_a = (10^5 \text{ mol} \cdot \text{L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $10^4$  (mol·L)<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, 捕获效率分别为 20% 和 2.3%。对于  $1 \times 10^{-15}$  mol/L 的抗原溶液, 反应 1000 s 后, 意味着生成了  $0.023 \times 10^{-15}$  mol/L 的免疫复合物, 也就是  $23 \times 10^{-18}$  mol/L, 处于数字免疫分析的检测限之上<sup>[39]</sup>。

### 3 单分子计数免疫分析的分类

“三明治”式结构是最灵敏、最特异的免疫分析形式,分析物由一种抗体捕获,并通过第二种抗体的结合进行检测,后者通常与酶显试剂或具有优良光学性质的纳米颗粒结合,用于信号放大检测。在单分子分析中,根据信号标签性质的不同,需要不同的离散方式,例如酶作为信号标签时,通

常采用硬离散方式进行分离,以防止产物的扩散。纳米颗粒作为信号时,采用软离散的方式即可对单个信号进行识别。根据检测前是否需要洗涤游离的信号标签可将单分子计数免疫分析分为非均相免疫和均相免疫。如图 2 所示,以非均相免疫和均相免疫作为横轴,以软离散和硬离散作为纵轴,将现有的单分子计数免疫分析方法归类到 4 个象限中。



QDs: quantum dots, UCNPs: upconversion nanoparticles, IA-CE: immunoaffinity capillary electrophoresis, FCM: flow cytometry

图 2 单分子计数免疫分析方法分类方式示意图

Fig. 2 Schematic diagram of classification methods of single molecule counting immunoassay

#### 3.1 非均相免疫分析

非均相免疫是在检测之前,将游离的信号标签洗去,只需对识别到的信号计数即可,这种方法需要多次孵育和洗涤,操作过程复杂,但降低了背景信号,数据处理简单便捷。

##### 3.1.1 非均相软离散

软离散如前文所述分为空间上的离散和时间上的离散。

##### 3.1.1.1 空间上的离散

空间上的离散通常是指样品在不受空间限制的条件下自由离散在载玻片上,进行成像计数。标记探针主要包括量子点、微球、染料和上转换粒子。Zhang 等<sup>[33]</sup>利用微球透镜的增强作用,开发了低倍镜头观测单个量子点的方法[图 3(a)]。将捕获抗体修饰在玻璃基板上用于捕获抗原,与量子点修饰的检测抗体形成免疫夹心复合物,洗去游离的量子

点后,在沉积层上方分散钛酸钡玻璃珠的悬浮液进行成像。该方法只需用 20× 镜头即可实现对单个目标物的计数,具有小型化和与便携式显微镜集成的潜力。

大多数的蛋白质计数方式通常是随机地对目标信号的一小部分进行计数,这造成了相当大的信息损失,并限制了超低浓度蛋白质分析的准确性和精密度。因此,分析和计数更多的目标分子有利于得到更低的检测限。Zhang 等<sup>[29]</sup>提出了一种非随机和超灵敏的蛋白质计数方法,使用微球做信号标签,对所有目标分子进行计数检测[图 3(b)]。通过结合多轮蒸发诱导的颗粒沉降、网格辅助多帧成像,准确计数了所有免疫复合物上洗脱微球的数量,这种绝对定量的方式实现了对癌胚抗原(CEA)  $10^{-18}$  mol/L 范围的检测。Macdonald 等<sup>[40]</sup>开发了样品重新加载的方法,利用链霉亲和素-生物素反应的

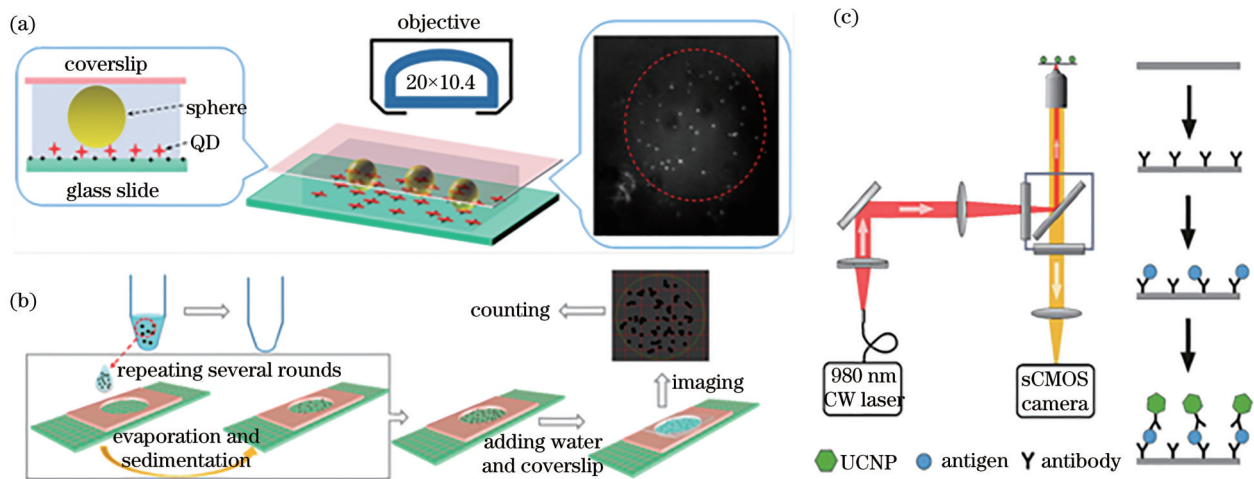


图 3 采用空间离散方式计数分子的示意图。(a)玻璃微珠放大单量子点成像设置示意图;(b)洗脱的粒子离散在载玻片上进行网格成像计数;(c)上转换显微镜的方案及其免疫分析示意图<sup>[29,33-34]</sup>

Fig. 3 Schematic diagram of counting molecules in spatial discrete mode. (a) Schematic diagram of glass bead amplified single quantum dot imaging setting; (b) eluted particles are dispersed on the slide for grid imaging counting; (c) scheme of upconversion microscopy and schematic diagram of immunoassay<sup>[29,33-34]</sup>

高亲和力将尽可能多从复合物上洗脱的染料分子浓缩到检测装置中,成功证明了表面捕获量与加载次数的正比关系。

上转换纳米颗粒(UCNPs)由无机基质加稀土掺杂离子组成,近红外激发(980 nm)下 UCNPs 的反斯托克斯发射可防止自发荧光,最大限度地减少光散射,从而能够在无光学背景干扰的情况下检测分析物。Farka 等<sup>[34]</sup>开发了一种数字夹心免疫分析法[图 3(c)],使用一种二氧化硅涂层的 UCNPs 用作光学无背景发光标签,计数了单个前列腺特异性抗原(PSA)分子,检测限为  $1.2 \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 3 个数量级的广泛动态范围。然而,在该检测方法中,由于 UCNPs 结合物的非特异性表面结合和空间受限导致 PSA 捕获效率低,限制了 PSA 低浓度时的检测灵敏度,Mickert 等<sup>[41]</sup>设计了一个新的单分子上转换连接免疫吸附试验(ULISA)方案,通过聚乙二醇连接的链霉亲和素修饰的 UCNPs (SA-PEG-UCNPs) 替换抗体二氧化硅 UCNPs,表面结合聚乙二醇(PEG)的空间位阻和排斥效应减少了非特异性结合,链霉亲和素和生物素的极高亲和力确保了与检测抗体的有效结合,检测限提高到了  $23 \times 10^{-15} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3.1.1.2 时间上的离散

时间上的离散是指目标信号以时间先后的顺序被检测计数,Todd 等<sup>[42]</sup>提出了 Erenna 单分子检测平台,染料标记的检测抗体通过直径为  $100 \mu\text{m}$  的

毛细管,在激发光的照射下发出荧光,通过共焦显微镜镜头和光子探测器测量,该方法在孵育 15 min 的情况下,可检测到  $0.6 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的心肌肌钙蛋白(cTnI)。Erenna 免疫分析系统使用  $100 \mu\text{L}$  样品在 1~2 h 的孵育下对蛋白的检测限为  $10 \sim 100 \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以上数据证明了 Erenna 免疫分析系统的应用潜力,值得进一步研究。

免疫分析与流式细胞术和毛细管电泳的结合也是近年来研究的热点。Akama 等<sup>[22]</sup>采用了传统流式细胞术(FCM)的检测方式(图 4),使用辣根过氧化物酶(HRP)做信号标签,与底物酪酰胺进行反应生成的酪酰胺自由基沉积在免疫复合物的微珠上,将微珠分散在磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,使用流

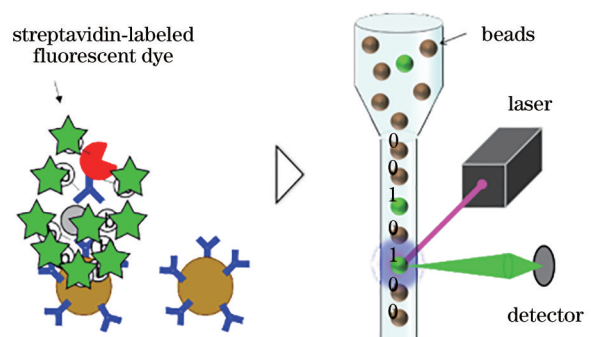


图 4 酪酰胺自由基沉积到带有标记 HRP 的珠子上,通过 FCM 对珠子进行数字计数<sup>[22]</sup>

Fig. 4 Tyramide radicals are deposited on beads labeled with HRP, and beads are counted digitally by FCM<sup>[22]</sup>

式细胞仪进行分析计数。这种方法不需要复杂的设备,而且由于其稳定性和可靠性也可以广泛应用于临床中。

免疫亲和毛细管电泳(IA-CE)是一种结合了免疫捕获和毛细管电泳分离的混合技术,根据免疫萃取和毛细管电泳过程是否分离可以分为离线和在线两种模式,相比于离线,在线联用具有试剂用量小、自动化以及能检测全部组分等优点,因此是目前研究的热点。Chen等<sup>[43]</sup>开发了基于磁性颗粒的在线 IA-CE 法,通过磁力吸引的方式富集修饰的磁珠,与 IgE 以及荧光标记的抗人 IgE 抗体形成免疫复

合物,加入酸性缓冲液洗脱免疫复合物后通过毛细管区带电泳进行分离,用激光诱导荧光(LIF)对标记的抗体进行检测(图 5),此方法的检测限为  $2.4 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Wellner等<sup>[44]</sup>将毛细管电泳系统与微芯片技术结合,捕获的分析物在电洗脱后进行标记并进入芯片,在芯片分离通道中,分析物在大约 2 min 内被解析为单独的峰,通过在线 LIF 检测和整合每个峰下的面积,实现对每个峰的定量。微芯片毛细管电泳具有制备廉价、可一次性使用和减少试剂和溶剂消耗等优点,在开发适用于珍贵样本的新分析技术方面具有很大的潜力。

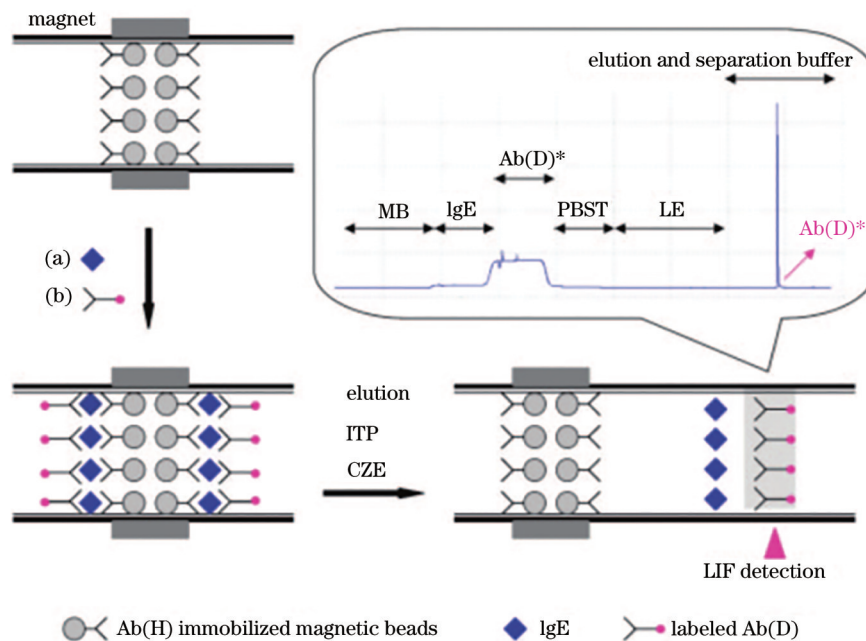


图 5 IgE 在线夹心免疫分析与 CE/LIF 检测的示意图和典型电泳图<sup>[43]</sup>

Fig. 5 Schematic procedure and typical electropherogram of online sandwich immunoassay of IgE coupled with CE/LIF detection<sup>[43]</sup>

近年来,基于电化学技术的纳米孔已经发展成为实现蛋白质测序的一种强有力的方法,因为它们可以提供纳米受限空间和可设计的单分子传感界面,从而实现蛋白质分析的高时空分辨率和最终灵敏度。He等<sup>[31]</sup>基于固态纳米孔全电子传感器提出了一种数字免疫分析方案(图 6),能够可靠地量化复杂生物流体中目标蛋白的浓度。以 DNA 链为免疫复合体的信号探针,将两段游离的线性双链 DNA 尾连接成哑铃状,电纳米孔将信号转换为数字计数,未配对探针在单分子基础上被分类为“0”,哑铃被分类为“1”,通过测量促甲状腺激素(TSH)的浓度证明了该方法的实用性。目前,对纳米孔应用的研究还在不断发展,基于纳米孔更稳定、更灵敏的

数字免疫方式有望应用于临床。

### 3.1.2 非均相硬离散

硬离散是指物理空间上的分隔,通常分为阵列和液滴两种,任何一种分隔方式都能够达到  $\mu\text{L}$  级的分区空间。与软离散方式相比,硬离散将每个目标物在空间上分隔开,尤其是酶分子做信号标签时,可以将酶产生的荧光团限制在极小的体积中,保证荧光产物分子的局部高浓度,避免了信号扩散带来的假阳性对准确度的影响。

#### 3.1.2.1 微孔阵列

第一种硬离散方式是微孔阵列,在微孔阵列中免疫复合物被物理分离成单独的隔间,并且仅在含有目标复合物的微孔中观察到阳性信号。微孔数



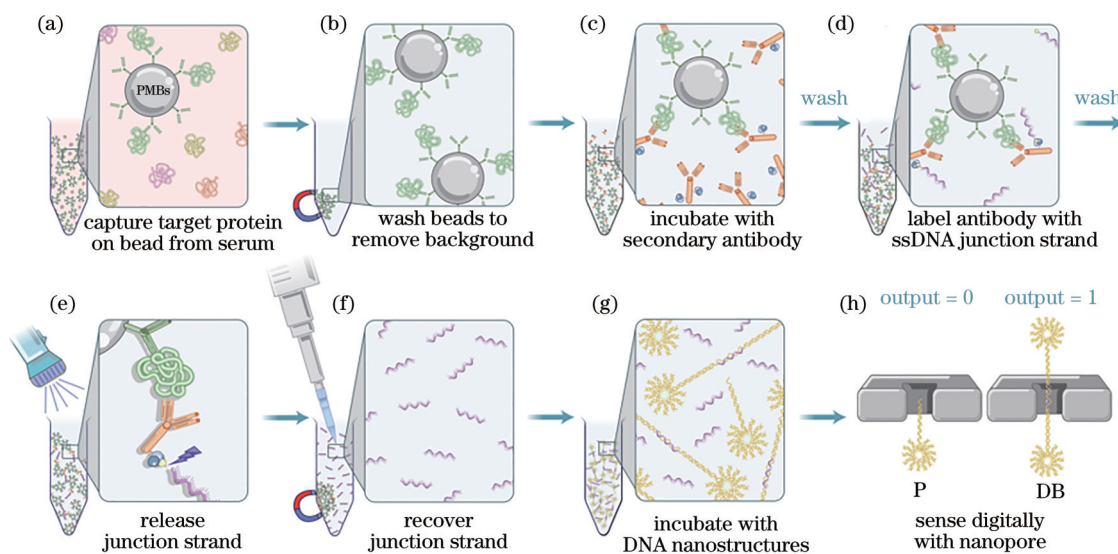


图 6 纳米孔电检测数字免疫分析工作流程示意图。(a)~(c)与抗体结合的顺磁珠(PMBs)有效捕获血清样本中的特异性靶蛋白,并与二级抗体进行孵育;(d)免疫三明治结构与生物素化的 ssDNA 连接链一起孵育;(e)再次清洗后,将溶液暴露于紫外线下以释放 ssDNA 连接链;(f)移液管回收含有连接链的上清液;(g)组装哑铃状 DNA 纳米结构;(h)数字纳米孔传感,用于确定哑铃探针的比例<sup>[31]</sup>

Fig. 6 Schematic illustration of digital immunoassay workflow with nanopore electrical detection. (a)~(c) Paramagnetic beads (PMBs) conjugated with antibodies efficiently capture specific target protein in serum sample and incubate with secondary antibody; (d) immuno-sandwich structure is incubated with biotinylated ssDNA junction strand; (e) following another wash, solution is exposed to UV light to release junction strand; (f) pipette recovers the supernatant containing connecting chain; (g) dumbbell-like DNA nanostructure is assembled; (h) digital nanopore sense used to determine fraction of probes to dumbbells<sup>[31]</sup>

量的扩展能够提高检测的动态范围,可通过使用光刻和微加工工艺使孔小型化来实现数量的扩大。例如,光刻和硅蚀刻已用于制作数字酶联免疫吸附测定(ELISA)的孔,孔的容量可达到 $10^{-15}$  L 级别。还可以通过对聚二甲基硅氧烷(PDMS)或塑料进行微模压来制造腔室阵列,也可以使用软光刻的变体在其他材料中制造<sup>[45]</sup>。

Rissin 和 Walt 等<sup>[46]</sup>在 2006 年通过蚀刻光纤束制备了 fs 级反应阵列,并展示了利用生物素-链霉素和素结合在飞秒激光阵列上捕获和检测 $\beta$ -半乳糖苷酶的单个分子的能力。2010 年,Rissin 等<sup>[18]</sup>基于先前的工作开发了单分子阵列,用于检测单酶标记的蛋白质。在 $2.7 \mu\text{m}$ 的磁珠上形成免疫夹心复合物,用酶标记,在荧光酶底物存在的情况下,将其加载在阵列中,使每个珠被密封在飞秒级体积的反应室中。具有酶标记免疫复合物的微孔产生高浓度的荧光产物,通过使用标准显微镜光学系统获取阵列的延时荧光图像,可以区分酶标记的免疫复合物珠(“on”)和与无修饰珠子(“off”),通过计数荧光孔的数量,确定分析物的浓度。对 PSA 的检测限为

$14 \times 10^{-15} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2013 年,Rissin 团队<sup>[19]</sup>利用单分子阵列实现了基于单分子计数的蛋白质多重检测方法。不同的荧光染料标记磁珠,分别修饰不同的蛋白质抗体,用于形成免疫复合物。将微珠与酶底物混合,装入到飞秒激光阵列中(图 7),进行荧光成像,通过珠子荧光辨别蛋白质的种类,酶信号识别免疫复合体生成与否。作者使用这种方法同时检测了血浆中的 4 种细胞因子,提供了使用数字 ELISA 对 4 种蛋白质进行复合检测的初步证明。Song 等<sup>[47]</sup>也使用了荧光染料标记磁珠以区分不同目标物的方法进行多重免疫分析,与 Rissin 等<sup>[19]</sup>不同的是,他们将阵列平台与卷积神经网络(CNN)计算机算法结合,改善了由于局部油封失败导致的光信号串扰引起的错误计数问题,在高通量下实现了图像特征(如微孔、珠子、背景)的自主分析。基于阵列在单分子分析中的优越性,有研究者将其与竞争性免疫分析结合用于小分子的检测——唾液中皮质醇和人血清样本中 PGE2<sup>[48]</sup>,比传统 ELISA 的灵敏度高约 50 倍。

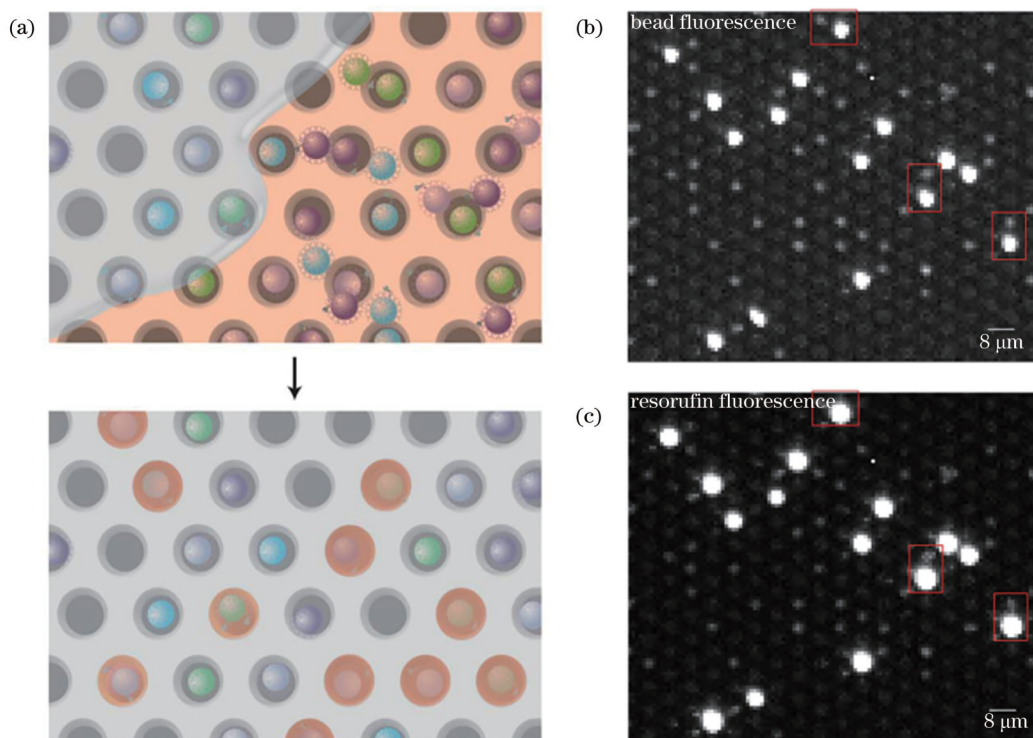


图7 基于单分子计数的蛋白质多重检测方法示意图。(a)复合物加载到阵列中,用油密封;(b)对珠子荧光进行扫描成像;(c)对酶催化荧光进行扫描成像<sup>[19]</sup>

Fig. 7 Schematic diagram of protein multiple detection method based on single molecule counting. (a) Composite is loaded into array and sealed with oil; (b) scanning imaging of bead fluorescence; (c) scanning imaging of enzyme catalyzed fluorescence<sup>[19]</sup>

前文中涉及到的多种阵列结构,无论是使用PDMS还是光纤束进行制备,都需要将微阵列紧密地封装,这要求操作者具有精确的控制和熟练的技能,而使用油包水的结构可以消除这些缺点。例如, Kim等<sup>[49]</sup>在亲水性玻璃衬底上制备了疏水性微孔结构,得到了微孔内外亲疏水性不同的飞秒阵列,由于微孔底部的亲水结构,酶标记的复合物珠子和底物溶液被固定在孔中。这种阵列结构的制备不仅操作简便,而且通过连续注入复合物混合溶液和氟化油、调整注入珠的数量和控制沉降时间,能有效提高珠子的捕获效率,检测限为 $2 \times 10^{-18}$  mol/L。

依赖荧光发光区分阳性信号和阴性信号的方法需要高分辨率荧光显微镜系统,Chen等<sup>[28]</sup>开发了一种使用可视化蛋白质分子的方法,不需要额外的光学系统来过滤激发和发射光。用铂纳米颗粒(PtNP)作为信号标签催化 $H_2O_2$ 产生气泡,通过使用智能手机摄像头即可观察到微孔中氧气的聚集,微气泡的“是/否”状态在数字上表示微孔中三明治复合物存在的“是/否”状态,该方法对前列腺切除术后PSA监测的检测限为 $2.1 \times 10^{-15}$  mol/L( $0.060 \times 10^{-12}$  g·mL<sup>-1</sup>)。

捕获和分析尽可能多的微珠能够提高检测的灵敏度,然而对于阵列结构,隔离珠子仍是一项挑战,在已经商业化的Simoa HD-1分析仪中,珠子通过重力被加载隔离,但只有5%的总分析珠被分离和分析。研究者们为提高阵列中珠子的加载率,开发出了许多的方法,Huang等<sup>[50]</sup>开发了一种用于免疫磁性单细胞捕获的微流控微孔装置,通过施加磁力可以提高顺磁珠的加载效率,获得了较高的单粒子捕获效率(62%)和纯度(99.6%)。其他人使用了电场<sup>[51]</sup>,并显示出了珠加载效率的提高。

### 3.1.2.2 液滴

硬离散中的第二种分配方式是利用油中的液滴乳液。相比于机械制造的阵列对超灵敏诊断分析的可扩展性和灵活性造成的固有限制,微流控芯片制造简单,液滴吞吐量高且大小可控,具有更大的灵活性。单分散液滴可以使用微流控T形结构,其中一股水流与一股油流相结合,或通过流动聚焦交叉几何形状,一股水流与两股正交的油流相结合。油应具有高稳定性和低溶解度,以防止反应物在反应器之间扩散;通常,选择氟碳油作为反应的连续相。稳定的液滴生成需要添加表面活性剂以

降低水-油两相的界面张力,防止液滴粘附在通道壁上,还可以稳定水-油界面并防止液滴聚集。与此同时,必须优化表面活性剂,使其不会干扰分析,并防止小生物分子扩散到油中。

Tian 等<sup>[21]</sup>设计了流动聚焦的微流控芯片,具有  $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光底物荧光素 2- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(FDG)两个入口,避免了预混合产生的荧光背景。捕获抗体修饰的珠子与甲胎蛋白(AFP)以及检测抗体进行传统的 ELISA 反应后离心,用定量的  $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal, S $\beta$ G)修饰检测抗体,洗出未结合的酶分子注入微流控芯片与 FDG 混合生成微滴。将微滴收集到微量滴定板中进行数字计数,

基于泊松分布,计算出游离的 S $\beta$ G,从而对 ELISA 系统中的 AFP 进行定量,通过间接检测,可在  $10^{-15}$  mol/L 水平上检测 AFP。

LINE1/ORF1 蛋白是一种潜在的生物标志物,由于其含量极低,从未被检测到。Cohen 等<sup>[52]</sup>开发了一种基于数字 ELISA 和液滴微流控技术的超灵敏蛋白质检测方法——数字液滴 ELISA (ddELISA)(图 8),将酶标记的免疫复合物与底物混合后先生成  $10^{-12}$  L 大小的液滴,再加载到成像室中形成液滴阵列,以减小珠子的损失,捕获高百分比的珠子进行分析,这种先液滴后阵列的方式提高了检测的灵敏度,检测限提高到了  $10^{-18}$  mol/L 水平。

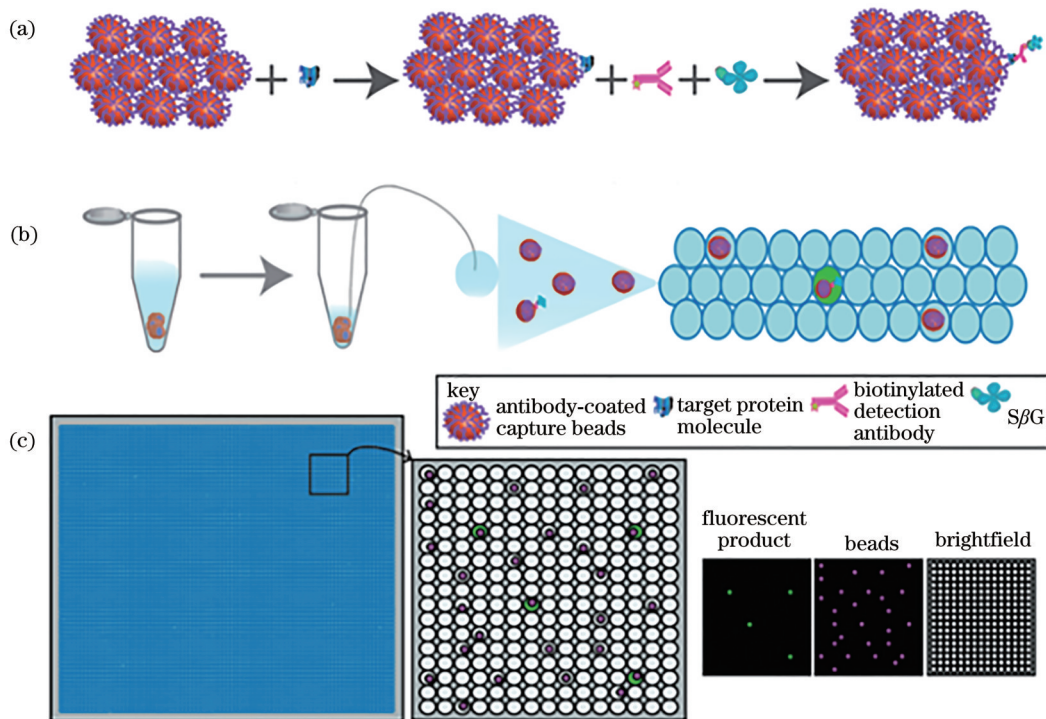


图 8 基于数字 ELISA 和液滴微流控计数的蛋白检测方法。(a)基于珠粒的三明治免疫分析,抗体包被的顺磁珠与目标蛋白质分子结合,然后添加生物素化检测抗体和 S $\beta$ G 结合到靶蛋白分子,形成酶标记的免疫复合物;(b)将复合物分装入液滴,根据泊松统计,大多数液滴将没有免疫复合物,而一部分液滴将只有一个免疫复合物;(c)将液滴加载入腔室中,形成液滴阵列,并进行成像<sup>[52]</sup>

Fig. 8 Protein detection method based on digital ELISA and droplet microfluidic counting. (a) Bead-based sandwich immunoassay, antibody coated paramagnetic beads bind to target protein molecules, and then biotinylated detection antibody and S $\beta$ G binds to target protein molecules to form enzyme labeled immune complexes; (b) complexes are divided into droplets. According to Poisson statistics, most droplets will have no immunocomplex, while some droplets will have only one immunocomplex; (c) droplets are loaded into chamber to form a droplet array and imaged<sup>[52]</sup>

使用酶做信号标签通常需要培养一定时间,才能检测到相应的信号并进行后续操作,为此,研究者们设计了多种形式的微流控通道集液滴的生成与检测为一体,实现了对液滴的实时检测。

2013年,Shim 等<sup>[53]</sup>设计了一种多层微流控装置

结构,能够在高达 1.3 MHz 的频率下生成和操纵高度单分散的  $10^{-15}$  L 级液滴。由于液滴体积仅有  $8.6 \times 10^{-15}$  L,单酶分子催化的液滴信号能在几分钟内被观察到,在捕获区内对液滴进行成像后,通过施加和释放外部压力重新加载新生成的飞秒液滴。

由于液滴产生的频率极高,该过程仅需约 10 s,因此不限制重复分析的速率。该装置通过检测缓冲液中前列腺癌的生物标志物 PSA 得到验证,缓冲液浓度低至  $46 \times 10^{-15}$  mol/L。

2019 年, Zhang 等<sup>[54]</sup>构建了一个包含 T 形结构的微滴芯片(图 9),在流动聚焦处生成液滴,通过 T 形连接通道分裂成两种不同尺寸的子液滴,较小的子液滴进入侧通道在 15  $\mu\text{m}$  宽的检测区被逐个识别。通过该方法准确定量了 3 种大小不同的荧光微

球和形状异质性较大的细菌(大肠杆菌 DH5 $\alpha$ -pDsRed)。同年, Yelleswarapu 等<sup>[55]</sup>开发了一个光流体平台,即并行微流控液滴发生器( $\mu\text{MD}$ ),实现了对目标分子多重、实时的检测(图 10)。 $\mu\text{MD}$  包含 dELISA 的完整工作流程,采用时域编码的手机成像实现了液滴信号的快速检测。他们采用不同荧光染料颜色编码的微球以及酶信号标签作为目标物的双重信号,同时测量了两种目标物(IL6 和 GF-CSF),检测限低至  $0.004 \times 10^{-12}$  g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

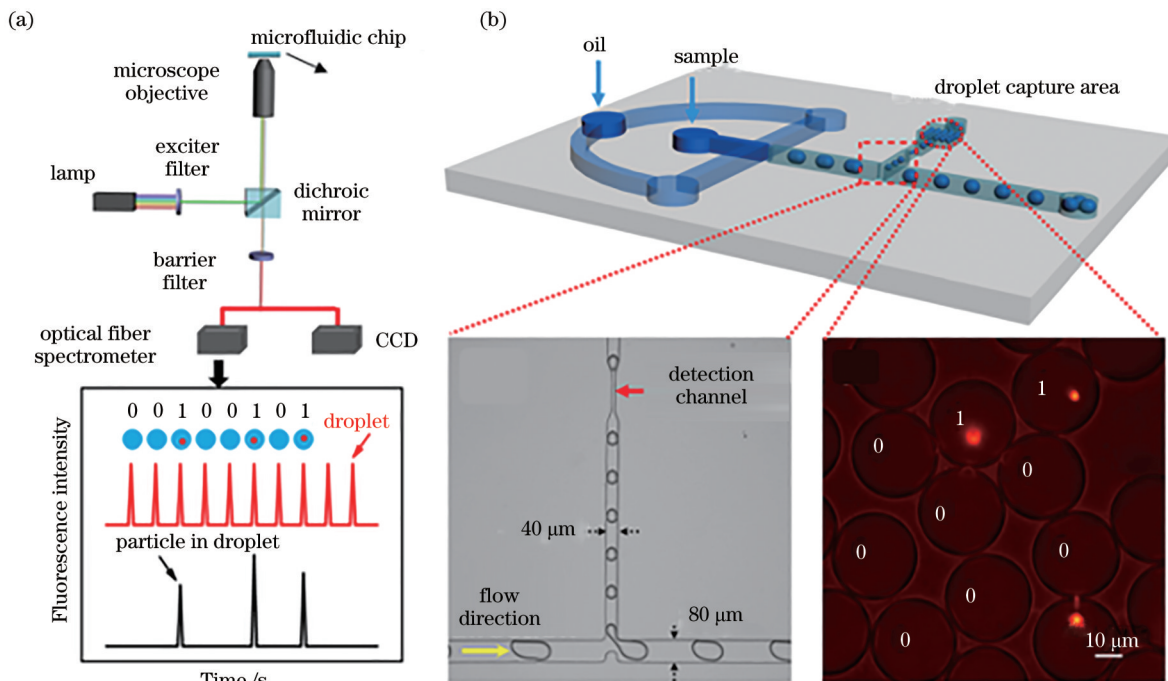


图 9 粒子计数系统及 T 形微滴芯片示意图。(a) 基于微滴的数字单粒子计数系统的示意图; (b) 引入 T 形连接通道的芯片以及液滴分裂过程的示意图<sup>[54]</sup>

Fig. 9 Schematic diagram of particle counting system and T-shaped droplet chip. (a) Schematic diagram of digital single particle counting system based on droplet; (b) schematic diagram of chip with T-shaped connection channel and droplet splitting process<sup>[54]</sup>

相比于先前的工作,液滴的即时检测大大缩短了检测时间,虽然与超灵敏蛋白质检测的最新技术相比,这种方法没有显示出更高的灵敏度,但是为未来实现生物标志物准确、快速的检测提供了基础。

### 3.2 均相免疫分析

大多数已报道的单分子计数免疫分析属于非均相分析,需要多个孵育步骤完成样品中目标分子的结合、检测抗体的结合和酶反应过程,也需要多个分离步骤去除样品中的干扰分子,去除过量的检测抗体。随着待测组分分数增加,孵育、结合、洗涤步骤相应增多,条件要求更复杂,积累误差增加,导致

测量结果难以精准控制。均相免疫分析只需将样品与标记好信号探针的捕获抗体和检测抗体在溶液中混合反应即可,无需分离去除未结合的游离抗体。比较而言,均相免疫分析更具优势:1) 抗原抗体结合发生在溶液中,扩散距离小,孵育时间短,反应完成速度快;不需要洗涤步骤,整体分析时间缩短;2) 由于没有洗涤步骤,弱相互作用的结合体系也能用于分析,分析范围更广;3) 一步混合就能得到测量结果,累积误差少,测量准确性高。另外,结合反应发生在溶液中而不是固体表面,减小了蛋白构象变化引起的变性可能性,也有助于提高测量准确性;4) 易于检测仪器的自动化及进一步开发床边

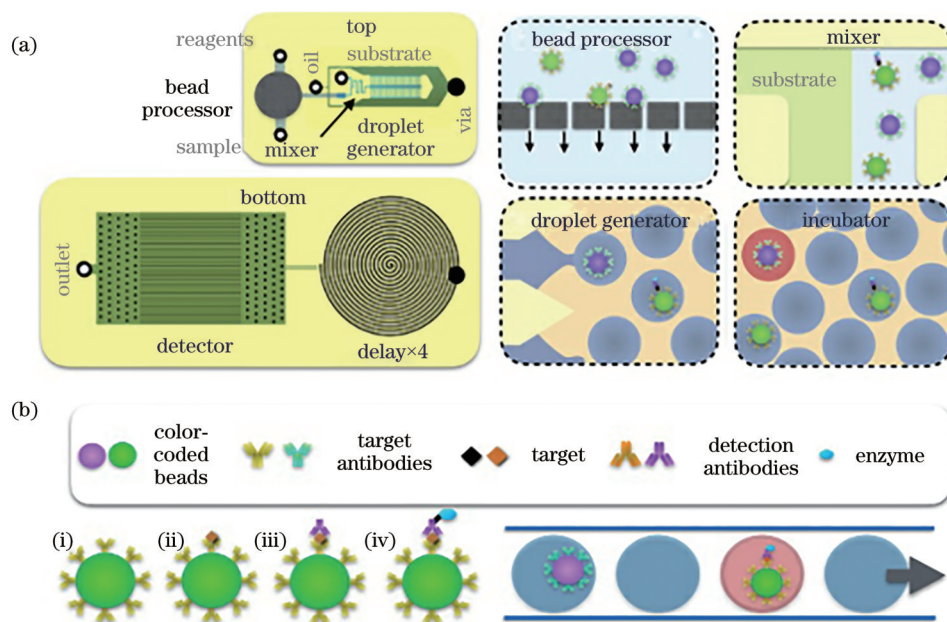


图 10 并行微流控液滴发生器示意图及实时检测过程。(a)  $\mu$ MD 芯片的俯视图和底视图,显示了  $\mu$ MD 模块上液滴生成、孵育的过程;(b)单个珠粒被封装成液滴,对捕获目标蛋白的液滴进行读取的过程<sup>[55]</sup>

Fig. 10 Schematic diagram of parallel microfluidic droplet generator and real-time detection process. (a) Top view and bottom view of  $\mu$ MD chip, which shows process of droplet generation and incubation on  $\mu$ MD; (b) process that individual beads are encapsulated into droplets and read out if they have captured a single target protein<sup>[55]</sup>

个体化诊断仪器;5)有利于加快生物标志物从实验室研究到临床应用的筛选过程。理论上,均相免疫分析灵敏度高于非均相免疫分析。因为分离和洗除步骤不利于结合反应,洗除过量反应物使结合反应平衡向解离方向移动,减少免疫复合物,降低灵敏度。然而,均相免疫分析没有去除标记探针,提高了检测的背景,又降低了灵敏度。两相抵消,目前的均相免疫分析的灵敏度比非均相免疫分析要低 1~2 个数量级。

实现均相免疫分析的关键在于建立免疫复合物与抗体之间的可检测差异。在反应体系中,游离的检测抗体有信号探针,免疫复合物上也有信号探针,在没有分离的前提下,如何识别出二者的区别,是均相免疫分析中检测出免疫复合物的关键。

### 3.2.1 均相软离散

均相免疫分析不需要洗涤游离的信号标签,因此是否形成复合物需要通过不同的信号来进行识别,在软离散形式中,通常使用纳米颗粒、荧光分子等不易扩散的物质作为信号标签,并基于其优良的光学性质衍生出了许多单分子计数方法。

量子点(QD)是荧光半导体纳米晶体,可以通过改变纳米晶体尺寸调节发射波长。与传统的荧光团相比,量子点具有宽的激发光谱和窄的发射光

谱,有更好的光稳定性,更容易检测到单个量子点<sup>[56-57]</sup>。2018年,Liu等<sup>[24]</sup>基于双色标记空间重叠开发了QD标签的夹心免疫分析法[图11(a~c)]。检测抗体和捕获抗体分别用不同发射波长的QD(QD 655红色、QD 565绿色)修饰,免疫反应后离散在载玻片上,通过荧光显微镜计数黄点的数量。同年,本文作者<sup>[23]</sup>还利用QD聚集体的一级衍射条纹由于异步蓝移而分裂的特点实现了 $10^{-15}$  mol/L水平上的蛋白质检测[图11(d~f)]。2021年,本文作者又提出了一种基于光谱成像的多元均相免疫分析方法,同时检测了两种肿瘤生物标记物:癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白(AFP)<sup>[58]</sup>。CEA诱导的免疫复合物含有QD655和QD585,并在基于透射光栅的显微成像下通过双色QD聚集体的两条一级条纹进行识别。AFP诱导的免疫复合物用QD585聚集体标记,并通过相同颜色的QD聚集体的光谱蓝移模式进行鉴定。这种方法对AFP和CEA的检测限分别为 $0.02 \times 10^{-12}$  mol/L和 $0.10 \times 10^{-12}$  mol/L。

上转换纳米颗粒是前文中介绍过的无光学背景的优秀纳米粒子,Li等<sup>[59]</sup>基于上转换纳米颗粒设计了一种简单而灵敏的三明治型单颗粒计数(SPE)免疫分析法,用于定量检测PSA。该设计基于上转换纳米颗粒(UCNP)和金纳米颗粒(GNP)

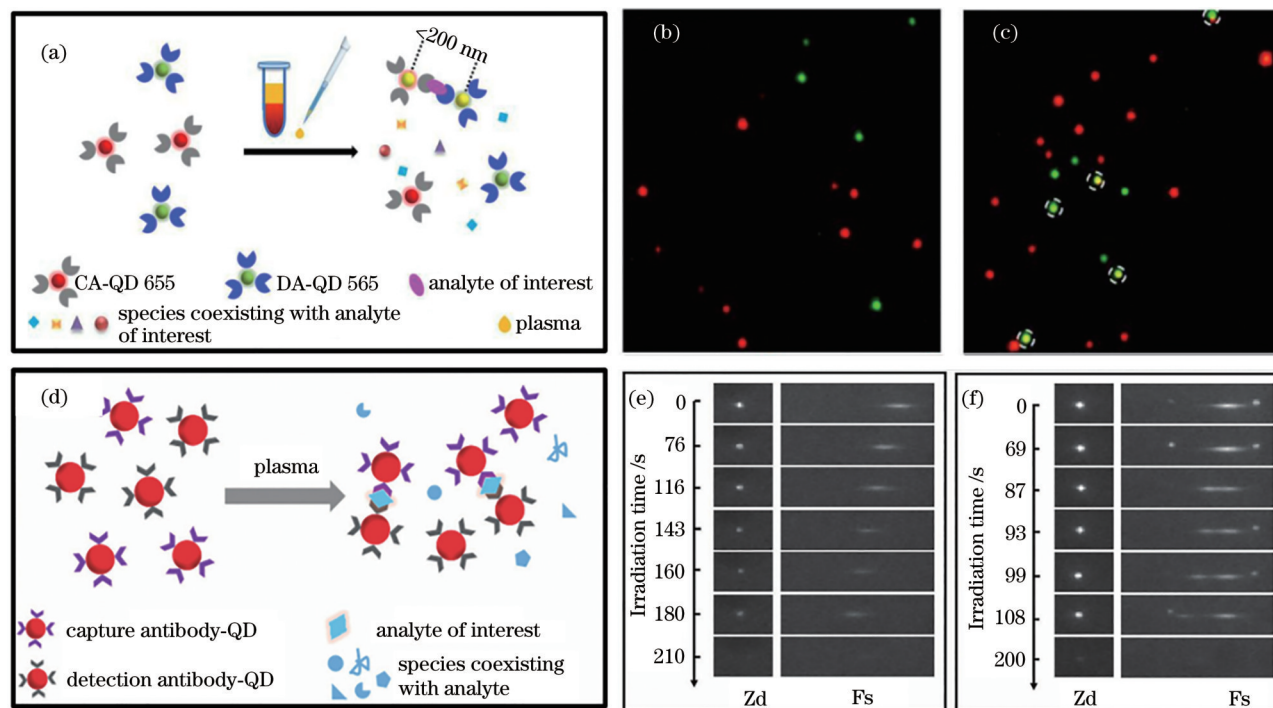


图 11 基于量子点自身性质开发的单分子免疫分析法。(a) 双色空间“叠加”均相免疫分析原理图；(b)~(c) 未形成免疫复合物的单个量子点放大时呈现本身的红色或绿色，共轭量子点呈黄色；(d) 同种量子点做标签的聚集免疫分析示意图；(e) 单个量子点的典型光谱蓝移；(f) 聚集量子点的典型光谱蓝移<sup>[23,24]</sup>

Fig. 11 Single molecule immunoassay based on properties of quantum dots. (a) Schematic diagram of two-color spatial "overlay-based" homogenous immunoassay; (b)~(c) a single quantum dot that does not form an immunocomplex shows itself in red or green when amplified, and a conjugated quantum dot shows itself in yellow; (d) schematic diagram of aggregation immunoassay with the same kind of quantum dots as labels; (e) typical spectral blue shifts of single quantum dots; (f) typical spectral blue shifts of aggregated quantum dots<sup>[23,24]</sup>

之间的发光共振能量转移 (LRET)。由于绿色上转换发光光谱与 50 nm 金纳米粒子的吸收光谱强烈重叠,因此在免疫复合物形成后,UCNP 和 GNP 距离足够近时,二者发生 LRET,强烈猝灭了 UCNP 发光。因此,通过对载玻片表面靶向荧光粒子的统计计数,能够准确测定溶液中抗原的数量。该方法的检测限在缓冲液中为  $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L,在血清中为  $2.3 \times 10^{-12}$  mol/L。

Wu 等<sup>[60]</sup>开发了一种简单的单分子计数策略,即滴注单分子分析 (dSimoa),通过提高采样效率和简化工作流程,可以对更多的目标分子进行计数。单个三明治免疫复合物包括:1) 捕获抗体包被的磁珠;2) 目标分子 IL-10 或 IL-1 $\beta$ ;3) 链霉亲和素 DNA 标记的生物素化的捕获抗体。反应结束后,DNA 链在聚合酶作用下与 ATTO 647N 染料进行滚环扩增 (RCA),以产生附着于每个免疫复合物的长凝聚体,使带有完整免疫复合物的珠子上产生局部荧光信号。RCA 后,将珠子浓缩滴到显

显微镜载玻片上,使其干燥以形成单层膜。单个目标分子通过对膜的荧光成像和对“开”和“关”珠的信号进行计数。

在蛋白质生物标记物的定量中,常用的免疫分析法通常会受到具有高亲和力的特异性抗体的可用性以及抗体与分析表面的显著非特异性结合的限制。为了解决现有生物标志物检测方法的缺陷,一种无扩增方法——平衡泊松采样单分子识别 (SiMREPS) 被开发,用于检测具有任意高特异性和单分子敏感性的多种生物标志物<sup>[61]</sup>。基于该方法,Chatterjee 等<sup>[30]</sup>使用具有高亲和力的捕获抗体和具有低亲和力的检测抗体,利用荧光检测探针与固定化目标分子的瞬时可逆结合,生成了由单分子荧光显微镜检测的动力学指纹 (图 12)。通过对这些动力学指纹的分析,几乎可以完全区分与目标分子的特异性结合和任何非特异性结合。动力学过滤将假阳性降低到基本为零,同时保留了大多数真阳性,证明了通过动力学指纹检测单分子蛋白质的

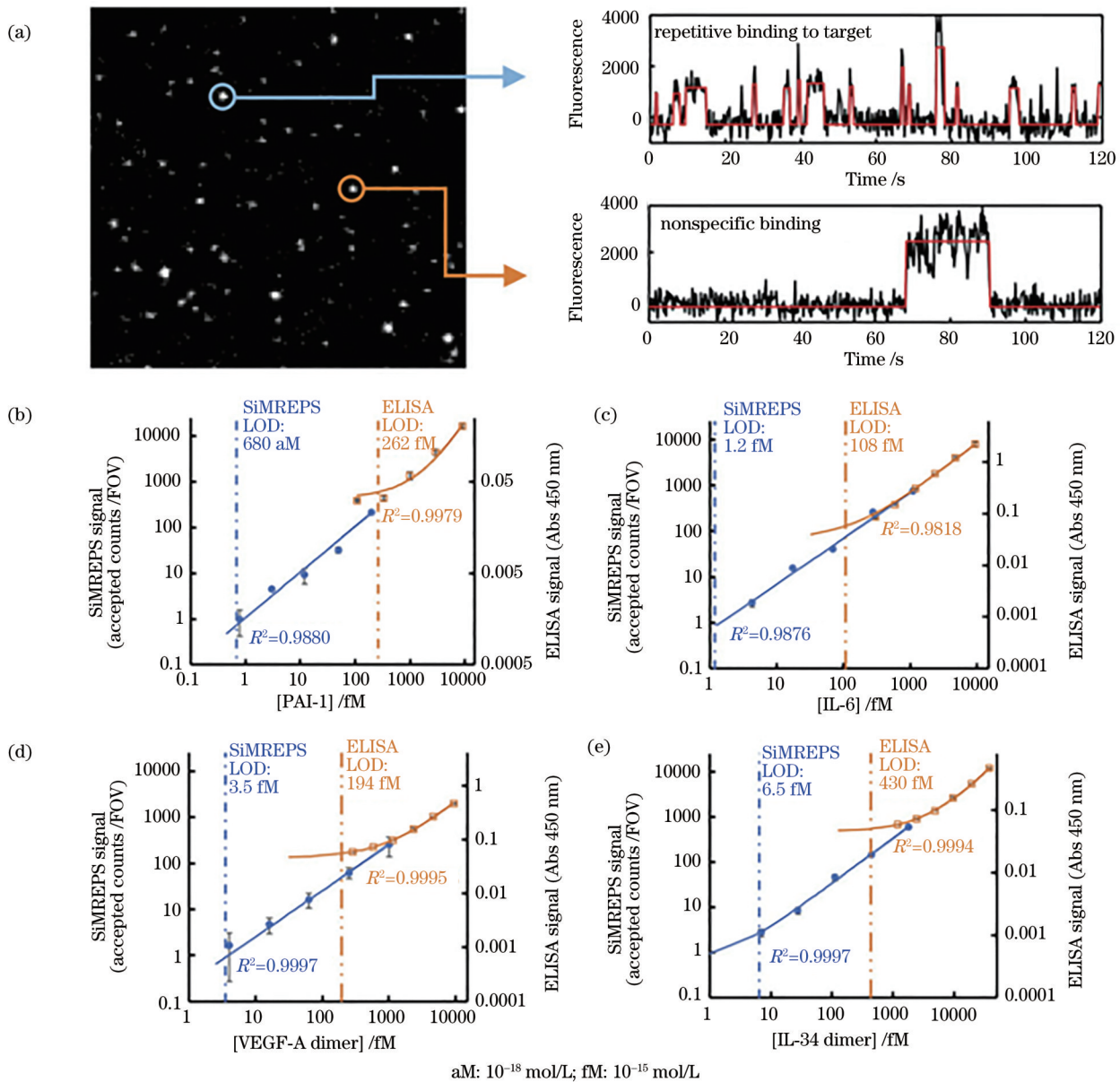


图 12 动力学指纹示意图及 SiMREPS 和 ELISA 方法检测限的比较。(a) 单个荧光探针结合在成像表面或其附近的位置处的明亮斑点, 代表性的动力学指纹表明重复结合到同一抗原分子(顶部)和非特异性结合, 通常重复性较小(底部); (b)~(e) 使用单分子动力学指纹对 4 个蛋白质靶点进行定量, 夹心 ELISA 分析产生的 LOD 比相应的 SiMREPS 高 55~383 倍<sup>[30]</sup>  
 Fig. 12 Schematic diagram of kinetic fingerprint and comparison of detection limits between SiMREPS and ELISA. (a) Bright puncta at locations where single fluorescent probes are bound at or near the imaging surface, and representative kinetic fingerprints show repeated binding to the same antigen molecule (top) and nonspecific binding, usually with less repeatability (bottom); (b)~(e) quantification of four protein targets using single molecule kinetic fingerprints. LODs yielded by sandwich ELISA assays are 55- to 383-fold higher than those of corresponding SiMREPS<sup>[30]</sup>

高度特异性。他们将 SiMREPS 与 ELISA 两种方法对比, SiMREPS 分析显示出对分析物浓度的线性相关性, 检测限 (LOD) 范围为  $680 \times 10^{-18}$  mol/L 至  $6.5 \times 10^{-15}$  mol/L, 大大低于相应 ELISA 观察到的  $108 \sim 430 \times 10^{-15}$  mol/L 的检测限。

### 3.2.2 均相硬离散

Akama 等<sup>[27]</sup>开发了一种用于高灵敏度数字均

相非酶联免疫分析的多参数单粒子运动分析方法 (digital Ho-Non ELISA)。染料修饰的磁珠与抗原反应后被磁力拉入  $10^{-15}$  L 阵列中, 用油密封, 当磁珠携带目标抗原时, 会与阵列中 PEG 分子链连接的抗体结合, 采用均方根偏差 (RMSD) 分析评估珠子的布朗运动。该实验中结合点由抗原和抗体之间的特异性反应或磁珠上抗体和反应器表面抗体之

间的非特异性反应形成,免疫复合物珠子与底部只通过一个 PEG 链连接,显示出圆形运动模式,双链连接的珠子显示出运动模式的极化线性形状,3 个或更多链连接的珠子呈现点状运动模式。因此,运动模式的形状可以准确区分目标特定信号和非特定信号。这种多参数分析能够只计算单链连接的珠子,而不计算多链连接珠子,从而提高检测限。Akama 等<sup>[26]</sup>在此基础上还实现了多重均相免疫分析,捕获抗体与荧光染料标记的磁性纳米珠的光学

亚群反应并特异性捕获靶抗原分子(图 13)。然后,这些磁珠被磁力拉入飞秒级反应阵列,通过不同特征的布朗运动区分特异或非特异性结合。对 PSA 和 IL6 的检测限分别为  $0.060 \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.042 \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这种新的分析方法可以提高检测限,但尚未实现对目标阳性珠和目标阴性珠的精准识别,因此,评估参数需要进一步优化。由于大量信息是从图像中获取的,因此通过计算机处理并进行分类可能是一种更好的方法。

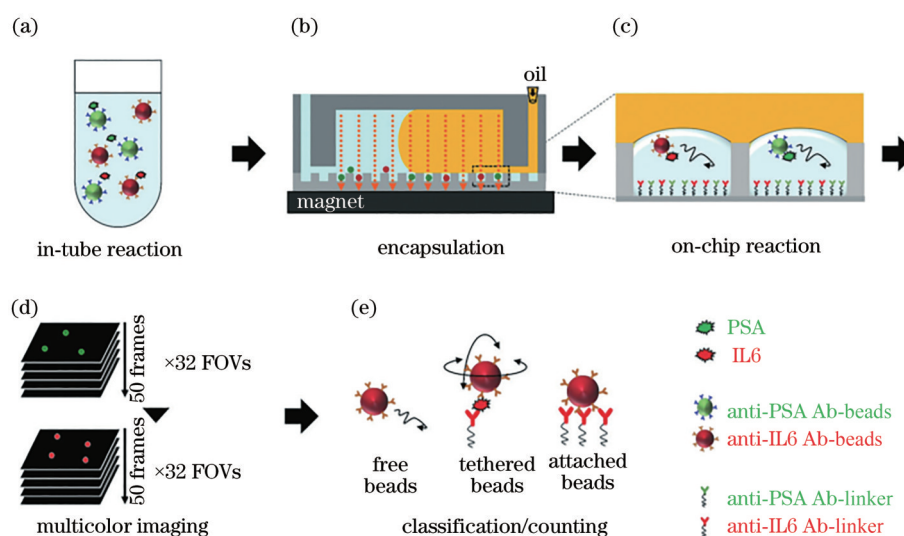


图 13 用于检测两种生物标记物的多路数字均匀非酶联免疫分析示意图。(a)靶分子分别被抗体包裹的磁性纳米珠的亚群捕获;(b)磁珠被磁力(橙色箭头)拉入反应器,用油密封;(c)珠子上的目标分子与修饰到反应器表面的抗体反应;(d)以 10 ms 的时间分辨率获得荧光图像;(e)珠子运动分为 3 种模式,拴系的粒子以数字方式计数为目标阳性珠子<sup>[26]</sup>

Fig. 13 Schematic illustration of multiplexed digital Ho-Non ELISA for detection of two types of biomarkers. (a) Target molecules are respectively captured by each subpopulation of antibody-coated magnetic nanobeads; (b) beads are pulled into reactors by magnetic force (orange arrow), followed by injection of oil to seal reactors; (c) target molecules on beads reacted with each antibody modified to reactor surface; (d) fluorescence images are obtained at 10 ms time; (e) bead motions are classified into three patterns and tethered particles are counted digitally as target-positive beads<sup>[26]</sup>

## 4 主要应用

### 4.1 肿瘤标志物的检测

恶性肿瘤也称为癌症,是全球主要的公共卫生问题,也是死亡率非常高的疾病之一。肿瘤标志物在风险评估、筛查、鉴别诊断、预后判断、治疗反应预测和疾病进展监测中发挥着重要作用<sup>[62]</sup>。最近的研究表明,单分子检测在对肿瘤标志物的检测中显示出了巨大的应用潜力。

碱性磷酸酶(ALP)是一种重要的生物标志物,血液中高水平的ALP可提示肝癌和骨肉瘤疾病的发生。Wu等<sup>[63]</sup>建立了数字单分子电化学检测法,在实验室环境下对ALP的检测限为  $1 \times 10^{-18} \text{ mol/L}$ ,使

用该方法对复杂环境中癌细胞(肝癌细胞、乳腺癌细胞及正钒酸钠的混合物)的酶含量进行检测,仅在肝癌细胞中检测到ALP浓度升高,证明了单分子电化学检测法的临床适用性。检测ALP的不同同型能准确地判断患者的疾病,但目前的临床血液检测只能检测ALP的总浓度,无法区分ALP的同型。Jiang等<sup>[64]</sup>通过基于微阱阵列的数字ELISA平台解决了这一问题(图14),他们分析了孕妇、肝病患者以及低磷酸酶血症患者血清中ALP同型的分布情况,得到了样本中不同ALP同型的绝对和相对数量,通过与健康样本的对比,成功区分了不同健康状况的患者。

外泌体是由细胞分泌的直径为40~100 nm的



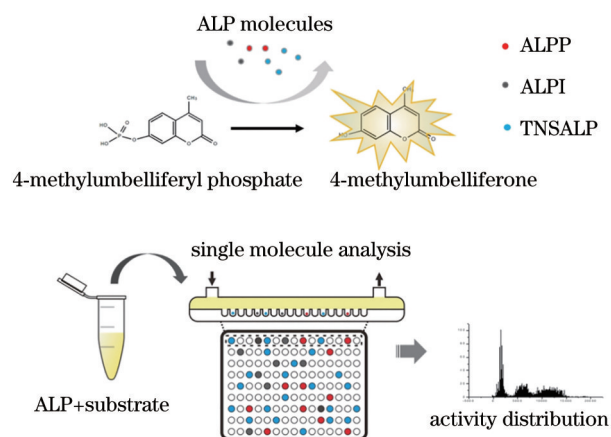


图 14 基于单分子阵列测定 ALP 的同型<sup>[64]</sup>

Fig. 14 Single molecule analysis determines isozymes of ALP<sup>[64]</sup>

囊泡,它们携带来自母体细胞的大量分子信息,内含有特定的蛋白质、脂质、细胞因子或遗传物质,在细胞间的通信中起着至关重要的作用。因此,从肿瘤组织脱落的外泌体分子可以被识别为潜在的生物标志物,用于癌症诊断。Liu 等<sup>[20]</sup>开发了一种基于液滴的单外泌体计数免疫分析方法,命名为数字液滴外泌体酶联免疫吸附试验(ExoELISA)。该研究成功对乳腺癌报告蛋白 GPC-1 进行了绝对定量,检测限达到  $10^{-17}$  mol/L,并通过从多种外泌体亚群蛋白标记物中提取 GPC-1,证实了该方法的高度特异性。在疾病(尤其是癌症)的早期阶段,一些仅由肿瘤细胞分泌的外泌体亚群非常小,该方法有望检测到极低丰度的外泌体。Morasso 等<sup>[65]</sup>基于单分子阵列技术(Simoa)开发了检测抗 CD9 和抗 CD63 抗体分析法用于乳腺癌外泌体的识别,Simoa 分析允许直接检测血浆中外泌体水平,无需任何事先处理。Wei 等<sup>[66]</sup>利用 Simoa 开发了细胞外囊泡免疫分析法,该研究设计的 CD9-CD63 和 Epcam-CD63 两种抗体对能特异性检测细胞外囊泡,而不检测高敏感性的游离蛋白。该检测方法可区分癌性和非癌性的血浆样本,与健康 and 良性对照组相比,结直肠癌患者的 CD9-CD63 和 Epcam-CD63 信号最高。这两种检测均显示出对结直肠癌的优越诊断性能。

几乎所有癌症患者的诊断和治疗都离不开生物标志物,目前临床上使用的肿瘤标志物及其检测方法依然不能达到较高的灵敏度,面对这些问题,单分子分析法具有更大的筛查潜力,有望应用于临床。

## 4.2 神经性疾病的检测

免疫介导的中枢神经系统炎症性疾病(CNS)是一类神经系统疾病,其炎症和/或脱髓鞘是由中枢神经系统抗原特异性的细胞和体液免疫反应引起的。这些疾病包括多发性硬化症(MS)、视神经脊髓炎(NMOSD)和急性播散性脑脊髓炎等<sup>[67]</sup>。

MS 是中枢神经系统脱髓鞘疾病中最常见的疾病,患者以青、中年居多。Cantó 等<sup>[68]</sup>采用高灵敏度的 Simoa 对 607 名 MS 患者血清中神经丝轻链(NFL)的水平进行检测,发现病情恶化患者的 NFL 水平显著高于病情稳定的患者,证实了 NFL 与 MS 疾病活动的临床和影像学测量相关,显示了通过该生物标志物检测 MS 的潜力。Verberk 等<sup>[69]</sup>用 Simoa、Luminex 分析法测量了 76 例 MS 患者血清中的神经丝重链(NfH),商用 Simoa 分析可检测到所有样本中的 NfH,Luminex 检测法只能检测 61% 的样本中的 NfH,由此可见,相比于其他的检测方法单分子分析在低丰度蛋白的检测中更有优势。

NMOSD 是一种严重的神经炎症综合征,主要影响视神经、脊髓和脑干,视神经炎和纵向延伸的长节段横贯性脊髓炎是临床特征表现,复发率和致残率都非常高。Schindler 等<sup>[70]</sup>通过 Simoa 评估了 33 例阳性 NMOSD 患者体内的血清胶质纤维酸性蛋白(sGFAP)和血清神经丝轻链(sNFL)含量,在 4.25 a 的中位观察期内,记录了所有患者的发病情况。发现 NMOSD 患者 sGFAP 含量高于健康对照组和 MOGAD(抗髓鞘少突胶质细胞糖蛋白免疫球蛋白 G 抗体相关疾病)对照组,而 sNFL 在各组之间没有显著差异,且临床残疾评分越高的患者,sGFAP 含量越高,初步证明了对于临床缓解期即症状较轻的患者,sGFAP 能作为疾病严重程度的判断依据。与 Schindler 等一样,Chang 等<sup>[71]</sup>的实验结果也证实了 sNFL 和 sGFAP 水平与阳性 NMOSD 和 MOGAD 患者的疾病严重程度相关。

阿尔茨海默病(AD)是一种表现为认知障碍的神经退行性疾病,老年人是多发群体,在临床上除了认知障碍,还有许多共发的疾病。 $\beta$ -淀粉样蛋白变性的生物标志物可帮助诊断 AD,Song 等<sup>[72]</sup>利用 Simoa 技术的数字 ELISA 对  $A\beta_{1-42}$  进行检测,与商业 Quanterix 试剂盒分析之间的临床样本结果比较(图 15),相关性良好,检测限为  $0.3 \times 10^{-12}$  g·mL<sup>-1</sup>。Mattsson<sup>[73]</sup>和 Lewczuk<sup>[74]</sup>等利用 Simoa 证明了 NFL 也可被视为 AD 的神经退行性变生物标志物。此

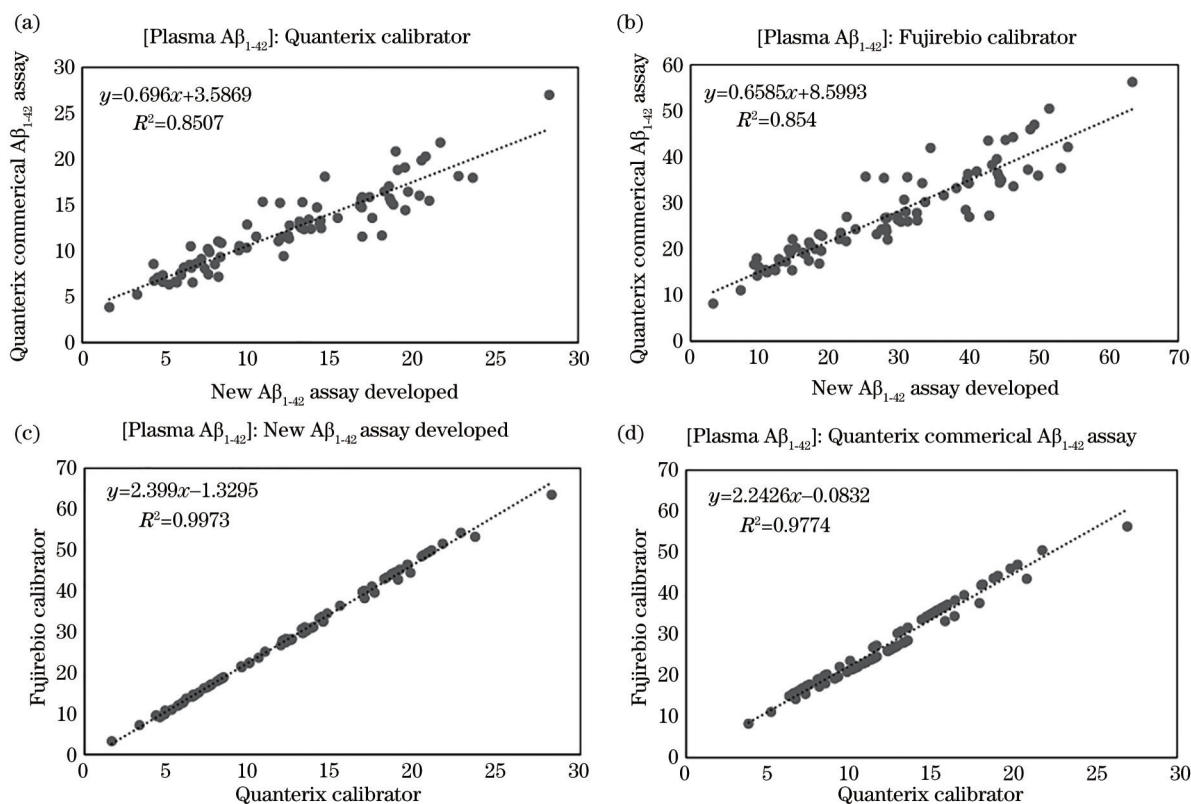


图 15 (a), (b) 使用两种不同的  $A\beta_{1-42}$  分析 (文献中使用的方法或 Quanterix 商用试剂盒分析) 进行样品分析和 (c), (d) 使用两种不同的  $A\beta_{1-42}$  肽标准品 (Quanterix 或 Fujirebio) 进行校准时, 临床样品中测得的淀粉样  $\beta_{1-42}$  肽 ( $A\beta_{1-42}$ ) 浓度的相关性<sup>[72]</sup>

Fig. 15 Correlations of measured amyloid- $\beta_{1-42}$  peptide ( $A\beta_{1-42}$ ) concentrations in clinical samples (a), (b) when using two different  $A\beta_{1-42}$  assays (methods used in literatures or Quanterix commercial kit assay) for sample analysis and (c), (d) when using two different  $A\beta_{1-42}$  peptide standards (Quanterix or Fujirebio) for calibration<sup>[72]</sup>

外, Wolf 等<sup>[75]</sup>采用 Simoa HD-1 分析仪平台以及 Simoa 试剂盒等单分子分析方式对 AD 患者血清中的总 tau、NfL、 $A\beta_{40}$  和  $A\beta_{42}$  蛋白进行定量分析, 研究发现当血液中 NFL 水平升高且  $A\beta_{42}$  水平降低时, 患者和对照组表现出明显差异, 证明了 NFL 和  $A\beta_{42}$  的定量检测结果可联合诊断 AD 的发生以及潜在风险。

帕金森病 (PD) 是表现为运动障碍的神经退行性疾病, 发病率仅次于 AD。主要是由于脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡和含有错误折叠的  $\alpha$ -突触核蛋白的路易体沉积, 因此对  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ Syn) 的检测对 PD 的诊断尤为重要。目前临床采用正电子发射计算机断层显像 (PET-CT) 对 PD 进行诊断, 不仅价格高昂, 而且对不典型的 PD 诊断准确性欠佳<sup>[76]</sup>。Ng 等<sup>[77]</sup>用超灵敏单分子计数测量了 221 名受试者 (51 名对照组, 170 名 PD) 血浆中的  $\alpha$ Syn, 证明了 PD 患者 ( $15.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和健康对照者 ( $13.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 之间的平均  $\alpha$ Syn 水平存在显著差异。Bhumkar 等<sup>[78]</sup>开发了一种一步、非震荡、温度依

赖性扩增分析方法与单分子检测相结合, 能够在 5 h 内检测缓冲液中  $1 \times 10^{-15} \text{ mol/L}$  的  $\alpha$ Syn 聚集体, 并以此区分 PD 患者和健康对照组。O'Bryant 等<sup>[79]</sup>使用电化学发光和 Simoa 平台分析了 150 名患者 (50 名 PD 患者、50 名其他神经退行性疾病患者和 50 名健康对照) 的血浆样本, 第一步蛋白质组图谱分析将神经退行性疾病与对照组区分开, 诊断准确率为 94%。第二步蛋白质组图谱分析将 PD 病例与其他神经退行性疾病区分开来, 诊断准确率为 98%, 高于现有的临床诊断水平。

目前, 用于检测神经性疾病标志物的单分子平台还在不断开发, 相关疾病的诊断、治疗将被大大推动。

#### 4.3 在其他疾病中的应用

单分子计数免疫分析在传染性疾病、心血管疾病的诊断中也得到了广泛应用。新型冠状病毒 (COVID-19) 肆虐全球, 成为目前时刻伴随着人类的流行性疾病, 准确的诊断已成为目前防治的有效途径。Gao 等<sup>[80]</sup>报道了一种机器学习辅助微流控纳米

等离子体数字免疫分析法,检测了 40 份 COVID-19 重症患者的人血清标本,在广泛的动态范围内同时对 6 种细胞因子进行了快速分析,检测限为  $10^{-12} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Norman 等<sup>[81]</sup>开发了基于荧光检测的多重 Simoa 检测法,对 SARS-CoV-2(新型严重急性呼吸系统综合冠状病毒 2)的免疫球蛋白 G (IgG)、IgM 和 IgA 与 4 种病毒靶点的 12 种结合进行量化,这种方法动态范围跨越 4 个数量级,并且只需要小于  $1 \mu\text{L}$  的血浆样本量即可进行检测。

急性心肌梗死(AMI)是猝死率很高的疾病,心肌肌钙蛋白 I(cTnI)作为 AMI 诊断的“金标准生物标志物”,能为医生提供相应治疗所需信息。Wang

等<sup>[82]</sup>利用差分成像法提出了无需洗涤的一步数字免疫法,该方法在 10 min 的检测时间内对 cTnI 的检测限为  $5.7 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Jing 等<sup>[83]</sup>报道了一种基于梯度的数字免疫分析方法,设计了一个具有 4 个分区的微流控通道(图 16),通道底部通过聚赖氨酸用捕获抗体功能化,注入  $1 \mu\text{L}$  样品通过分区依次进行免疫反应,最后通过光学成像计数结合到不同测试区的金纳米颗粒(免疫反应的信号标签),分区之间的差异计数可消除背景和非特异性结合。该研究的检测限为  $6.2 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,将其用于检测 15 名患者的 41 份临床血浆样本,检测 cTnT 浓度的变化与临床结果呈良好的线性相关性。

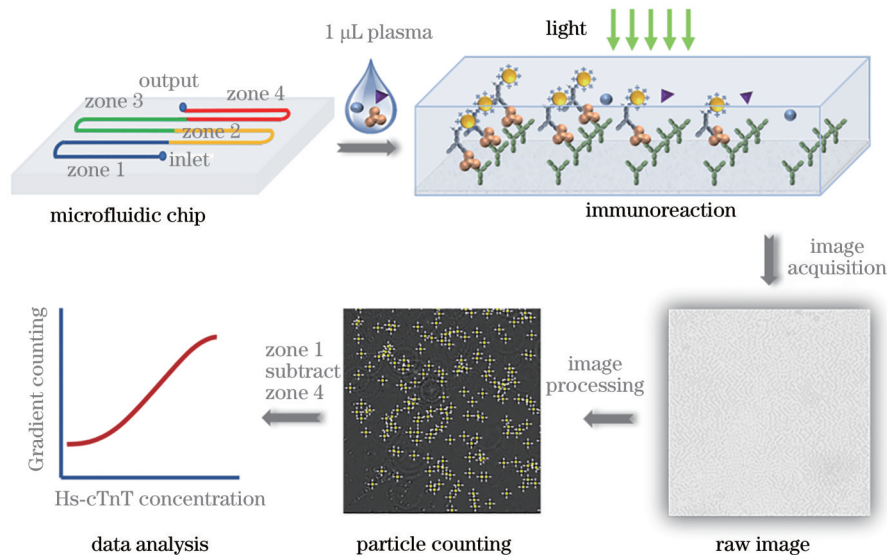


图 16 基于梯度的数字免疫分析流程<sup>[83]</sup>

Fig. 16 Workflow of gradient based digital immunoassay<sup>[83]</sup>

干燥综合征(SS)是自身免疫功能紊乱累及外分泌腺体导致的疾病,除局部症状之外,还会引起其他器官的免疫性损伤。I型干扰素(IFN-I)是几种系统性自身免疫性疾病(SAD)众所周知的病理生理学特征,具有抗病毒和免疫调节特性,然而 IFN-I 亚型的多样性和低含量使得通过常规技术(如 ELISA)对生物样品中 IFN-I 蛋白进行定量变得复杂,超灵敏 Simoa 技术的发展促进了 IFN 亚型蛋白水平的直接测量。Huijser 等<sup>[84]</sup>研究发现,原发性 SS 患者血清中 IFN- $\alpha 2$  水平高于健康对照组,与血液中干扰素刺激基因(ISG)的表达呈正相关。与 ELISA 相比,使用 Simoa 进行 IFN- $\alpha 2$  测量的重现性更好。

目前,基于单分子计数免疫分析不断发展的高灵敏度,越来越多难以发现的标志物被检测到,但大多数还停留在实验室阶段,未应用于临床,相信

在不久的将来,单分子检测技术能应用于临床诊断和治疗,为更多的病人带来希望。

## 5 总结与展望

在过去的 10 年中, Simoa<sup>[85]</sup> 和 Erenna<sup>[86]</sup> 等平台已经开发了单分子检测技术,这些技术大多是基于三明治免疫结构的分析,通过在  $10^{-15} \text{ mol/L}$  阵列(Simoa)中执行酶放大步骤或在毛细管流下对洗脱探针进行荧光检测(Erenna),实现了蛋白质分析物  $10^{-18} \text{ mol/L}$  水平上的检测限。虽然两种平台都已经证明了在实验室环境中检测超灵敏蛋白质的价值,但它们也都面临着许多新的问题, Simoa 需要笨重的光学元件和流体处理,不适合便携式使用; Erenna 检测窗口小易堵塞且对操作环境要求高,这些问题都限制了检测灵敏度的提高。

提高灵敏度的另一个挑战是提高采样效率和计数更多的目标分子。重力沉积、磁力吸引以及电场等方法已经被开发用于提高珠子的加载效率,也有研究者将目标珠子洗脱并进行绝对定量,但处理过程相对复杂。为了应对上述挑战,微流控集成系统被设计开发<sup>[54-55]</sup>,连续微流控液滴系统不仅能够分析更多的分区(>100万),还能减少免疫复合物在分区过程中造成的损失,且微流控系统允许多路复用,以实现尽可能多的目标单分子的检测。

在计数尽可能多的目标分子的基础上,实现快速灵敏的检测是目前单分子研究的热点,如前文所提到的,已经有研究者使用微流控集成系统实现了单个或多个目标分子的实时检测,但与现有的其他单分子分析方法相比,灵敏度远远不够。尽管存在以上挑战,单分子分析也正在代替传统的检测方式应用于临床,为临床中更灵敏的检测提供了可能性。

### 参 考 文 献

- [1] Denny J C, Collins F S. Precision medicine in 2030: seven ways to transform healthcare[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1415-1419.
- [2] Li B, Severson E, Pignon J C, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 174.
- [3] Lambert T, Verlingue L, Colmet-Daage L, et al. Pan-tumor prognostic value of multiple immune protein expressions[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2019, 37(15): 2618.
- [4] Zeng L, Guo L L, Wang Z X, et al. Immunoassays for the rapid detection of pantothenic acid in pharmaceutical and food products[J]. *Food Chemistry*, 2021, 348: 129114.
- [5] Yalow R S, Berson S A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1960, 39(7): 1157-1175.
- [6] Thaxton C S, Elghanian R, Thomas A D, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(44): 18437-18442.
- [7] Wilson D H, Hanlon D W, Provuncher G K, et al. Fifth-generation digital immunoassay for prostate-specific antigen by single molecule array technology [J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(12): 1712-1721.
- [8] Chang L, Song L N, Fournier D R, et al. Simple diffusion-constrained immunoassay for p24 protein with the sensitivity of nucleic acid amplification for detecting acute HIV infection[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 188(1/2): 153-160.
- [9] Wu G X, Cheney C, Huang Q, et al. Improved detection of HIV gag p24 protein using a combined immunoprecipitation and digital ELISA method[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 636703.
- [10] Struyfs H, van Broeck B, Timmers M, et al. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  isoforms for early and differential dementia diagnosis [J]. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 2015, 45(3): 813-822.
- [11] Liu X J, Tu Y, Gai H W. Imaging of single molecules by wide-field optical microscopy[J]. *Progress in Chemistry*, 2013, 25(S1): 370-379. 刘晓君, 涂洋, 盖宏伟. 单分子宽场光学显微成像技术[J]. *化学进展*, 2013, 25(S1): 370-379.
- [12] Liu X J, Zhang Y S, Liang A Y, et al. Plasmonic resonance energy transfer from a Au nanosphere to quantum dots at a single particle level and its homogenous immunoassay[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(76): 11442-11445.
- [13] Basu A S. Digital assays part II: digital protein and cell assays[J]. *SLAS Technology*, 2017, 22(4): 387-405.
- [14] Hwang J, Banerjee M, Venable A S, et al. Quantitation of low abundant soluble biomarkers using high sensitivity Single Molecule Counting technology[J]. *Methods*, 2019, 158: 69-76.
- [15] O’Connell G C, Alder M L, Smothers C G, et al. Use of high-sensitivity digital ELISA improves the diagnostic performance of circulating brain-specific proteins for detection of traumatic brain injury during triage[J]. *Neurological Research*, 2020, 42(4): 346-353.
- [16] Ma Y F, Shortreed M R, Li H L, et al. Single-molecule immunoassay and DNA diagnosis[J]. *ELECTROPHORESIS*, 2001, 22(3): 421-426.
- [17] Gai H W, Bai J L, Lin B C. Single molecule capillary electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2002, 30(7): 869-874. 盖宏伟, 白吉玲, 林炳承. 单分子毛细管电泳[J]. *分析化学*, 2002, 30(7): 869-874.
- [18] Rissin D M, Kan C W, Campbell T G, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J].

- Nature Biotechnology, 2010, 28(6): 595-599.
- [19] Rissin D M, Kan C W, Song L N, et al. Multiplexed single molecule immunoassays[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(15): 2902-2911.
- [20] Liu C C, Xu X N, Li B, et al. Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics[J]. Nano Letters, 2018, 18(7): 4226-4232.
- [21] Tian S B, Zhang Z, Chen J Y, et al. Digital analysis with droplet-based microfluidic for the ultrasensitive detection of  $\beta$ -gal and AFP[J]. Talanta, 2018, 186: 24-28.
- [22] Akama K, Shirai K, Suzuki S. Droplet-free digital enzyme-linked immunosorbent assay based on a tyramide signal amplification system[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(14): 7123-7129.
- [23] Liu X J, Huang C H, Dong X L, et al. Asynchrony of spectral blue-shifts of quantum dot based digital homogeneous immunoassay[J]. Chemical Communications, 2018, 54(93): 13103-13106.
- [24] Liu X J, Huang C H, Zong C H, et al. A single-molecule homogeneous immunoassay by counting spatially “overlapping” two-color quantum dots with wide-field fluorescence microscopy[J]. ACS Sensors, 2018, 3(12): 2644-2650.
- [25] Akama K, Iwanaga N, Yamawaki K, et al. Wash-and amplification-free digital immunoassay based on single-particle motion analysis[J]. ACS Nano, 2019, 13(11): 13116-13126.
- [26] Akama K, Noji H. Multiplexed homogeneous digital immunoassay based on single-particle motion analysis [J]. Lab on a Chip, 2020, 20(12): 2113-2121.
- [27] Akama K, Noji H. Multiparameter single-particle motion analysis for homogeneous digital immunoassay [J]. The Analyst, 2021, 146(4): 1303-1310.
- [28] Chen H, Li Z, Zhang L Z, et al. Quantitation of femtomolar-level protein biomarkers using a simple microbubbling digital assay and bright-field smartphone imaging[J]. Angewandte Chemie, 2019, 58(39): 13922-13928.
- [29] Zhang Q Q, Zhang X B, Li J J, et al. Nonstochastic protein counting analysis for precision biomarker detection: suppressing poisson noise at ultralow concentration[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(1): 654-658.
- [30] Chatterjee T, Knappik A, Sandford E, et al. Direct kinetic fingerprinting and digital counting of single protein molecules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(37): 22815-22822.
- [31] He L Q, Tessier D R, Briggs K, et al. Digital immunoassay for biomarker concentration quantification using solid-state nanopores[J]. Nature Communications, 2021, 12: 5348.
- [32] Hu Z L, Huo M Z, Ying Y L, et al. Biological nanopore approach for single-molecule protein sequencing[J]. Angewandte Chemie, 2021, 60(27): 14738-14749.
- [33] Zhang Q Q, Li J J, Pan X Y, et al. Low-numerical aperture microscope objective boosted by liquid-immersed dielectric microspheres for quantum dot-based digital immunoassays[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(38): 12848-12853.
- [34] Farka Z, Mickert M J, Hlaváček A, et al. Single molecule upconversion-linked immunosorbent assay with extended dynamic range for the sensitive detection of diagnostic biomarkers[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(21): 11825-11830.
- [35] Salehi-Reyhani A. Evaluating single molecule detection methods for microarrays with high dynamic range for quantitative single cell analysis[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 17957.
- [36] Smith L, Kohli M, Smith A M. Expanding the dynamic range of fluorescence assays through single-molecule counting and intensity calibration[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(42): 13904-13912.
- [37] Wilson B D, Soh H T. Re-evaluating the conventional wisdom about binding assays[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45(8): 639-649.
- [38] Schallmeiner E, Oksanen E, Ericsson O, et al. Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays[J]. Nature Methods, 2007, 4(2): 135-137.
- [39] Chang L, Rissin D M, Fournier D R, et al. Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: theoretical considerations[J]. Journal of Immunological Methods, 2012, 378(1/2): 102-115.
- [40] Macdonald P J, Ruan Q Q, Tetin S Y. Direct single-molecule counting for immunoassay applications[J]. Analytical Biochemistry, 2019, 566: 139-145.
- [41] Mickert M J, Farka Z, Kostiv U, et al. Upconversion-linked immunosorbent assay measures subfemtomolar concentrations of prostate-specific antigen through single-molecule counting[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(15): 9435-9441.
- [42] Todd J, Freese B, Lu A, et al. Ultrasensitive flow-based immunoassays using single-molecule counting

- [J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(11): 1990-1995.
- [43] Chen H X, Busnel J M, Peltre G, et al. Magnetic beads based immunoaffinity capillary electrophoresis of total serum IgE with laser-induced fluorescence detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(24): 9583-9588.
- [44] Wellner E F, Kalish H. A chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis assay for assessing hormones in human biological fluids[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(16): 3477-3483.
- [45] Basu A S. Digital assays part I: partitioning statistics and digital PCR[J]. *SLAS Technology*, 2017, 22(4): 369-386.
- [46] Rissin D M, Walt D R. Digital readout of target binding with attomole detection limits via enzyme amplification in femtoliter arrays[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(19): 6286-6287.
- [47] Song Y J, Zhao J Y, Cai T, et al. Machine learning-based cytokine microarray digital immunoassay analysis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 180: 113088.
- [48] Wang X, Cohen L, Wang J, et al. Competitive immunoassays for the detection of small molecules using single molecule arrays[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(51): 18132-18139.
- [49] Kim S H, Iwai S, Araki S, et al. Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(23): 4986-4991.
- [50] Huang N T, Hwong Y J, Lai R L. A microfluidic microwell device for immunomagnetic single-cell trapping[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2018, 22(2): 16.
- [51] Barbee K D, Hsiao A P, Heller M J, et al. Electric field directed assembly of high-density microbead arrays[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(22): 3268-3274.
- [52] Cohen L, Cui N W, Cai Y M, et al. Single molecule protein detection with attomolar sensitivity using droplet digital enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(8): 9491-9501.
- [53] Shim J U, Ranasinghe R T, Smith C A, et al. Ultrarapid generation of femtoliter microfluidic droplets for single-molecule-counting immunoassays [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(7): 5955-5964.
- [54] Zhang L, Yang Y J, Xiong J Y, et al. Absolute quantification of particle number concentration using a digital single particle counting system[J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(8): 529.
- [55] Yelleswarapu V, Buser J R, Haber M, et al. Mobile platform for rapid sub-picogram-per-milliliter, multiplexed, digital droplet detection of proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(10): 4489-4495.
- [56] Shi X B, Meng X X, Sun L C, et al. Observing photophysical properties of quantum dots in air at the single molecule level: advantages in microarray applications[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(21): 2844-2847.
- [57] Zhao W F, Dong S L, Sun L C, et al. Investigating the photostability of quantum dots at the single-molecule level[J]. *Chemistry, an Asian Journal*, 2014, 9(12): 3542-3548.
- [58] Liu X J, Sun Y Y, Lin X Y, et al. Digital duplex homogeneous immunoassay by counting immuno complex labeled with quantum dots[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(6): 3089-3095.
- [59] Li X, Wei L, Pan L L, et al. Homogeneous immunosorbent assay based on single-particle enumeration using upconversion nanoparticles for the sensitive detection of cancer biomarkers[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(7): 4807-4814.
- [60] Wu C, Garden P M, Walt D R. Ultrasensitive detection of attomolar protein concentrations by dropcast single molecule assays[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(28): 12314-12323.
- [61] Chatterjee T, Li Z, Khanna K, et al. Ultraspecific analyte detection by direct kinetic fingerprinting of single molecules[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 123: 115764.
- [62] Henry N L, Hayes D F. Cancer biomarkers[J]. *Molecular Oncology*, 2012, 6(2): 140-146.
- [63] Wu Z, Zhou C H, Pan L J, et al. Reliable digital single molecule electrochemistry for ultrasensitive alkaline phosphatase detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(18): 9166-9172.
- [64] Jiang Y, Li X, Walt D R. Single-molecule analysis determines isozymes of human alkaline phosphatase in serum[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2020, 59(41): 18010-18015.
- [65] Morasso C, Ricciardi A, Sproviero D, et al. Fast quantification of extracellular vesicles levels in early breast cancer patients by Single Molecule Detection Array (SiMoA) [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2022, 192, 65-74.

- [66] Wei P, Wu F, Kang B, et al. Plasma extracellular vesicles detected by Single Molecule array technology as a liquid biopsy for colorectal cancer[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 9(1): 1809765.
- [67] da Silva A P B, Silva R B M, Goi L D S, et al. Experimental models of neuroimmunological disorders: a review[J]. *Frontiers in Neurology*, 2020, 11: 389.
- [68] Cantó E, Barro C, Zhao C, et al. Association between serum neurofilament light chain levels and long-term disease course among patients with multiple sclerosis followed up for 12 years[J]. *JAMA Neurology*, 2019, 76(11): 1359-1366.
- [69] Verberk I M W, Koel-Simmelink M, Twaalfhoven H, et al. Ultrasensitive immunoassay allows measurement of serum neurofilament heavy in multiple sclerosis[J]. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2021, 50: 102840.
- [70] Schindler P, Grittner U, Oechtering J, et al. Serum GFAP and NFL as disease severity and prognostic biomarkers in patients with aquaporin-4 antibody-positive neuromyelitis optica spectrum disorder[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 105.
- [71] Chang X C, Huang W J, Wang L, et al. Serum neurofilament light and GFAP are associated with disease severity in inflammatory disorders with aquaporin-4 or myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 647618.
- [72] Song L N, Lachno D R, Hanlon D, et al. A digital enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive measurement of amyloid- $\beta$  1-42 peptide in human plasma with utility for studies of Alzheimer's disease therapeutics[J]. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2016, 8(1): 58.
- [73] Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, et al. Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with alzheimer disease [J]. *JAMA Neurology*, 2017, 74(5): 557-566.
- [74] Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, et al. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2018, 10(1): 71.
- [75] de Wolf F, Ghanbari M, Licher S, et al. Plasma tau, neurofilament light chain and amyloid- $\beta$  levels and risk of dementia; a population-based cohort study [J]. *Brain*, 2020, 143(4): 1220-1232.
- [76] Emsen B, Villafane G, David J P, et al. Clinical impact of dual-tracer FDOPA and FDG PET/CT for the evaluation of patients with parkinsonian syndromes [J]. *Medicine*, 2020, 99(45): e23060.
- [77] Ng A S L, Tan Y J, Lu Z H, et al. Plasma alpha-synuclein detected by single molecule array is increased in PD[J]. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2019, 6(3): 615-619.
- [78] Bhumkar A, Magnan C, Lau D, et al. Single-molecule counting coupled to rapid amplification enables detection of  $\alpha$ -synuclein aggregates in cerebrospinal fluid of parkinson's disease patients[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(21): 11874-11883.
- [79] O'Bryant S E, Edwards M, Zhang F, et al. Potential two-step proteomic signature for Parkinson's disease: pilot analysis in the Harvard Biomarkers Study[J]. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 2019, 11: 374-382.
- [80] Gao Z Q, Song Y J, Hsiao T Y, et al. Machine-learning-assisted microfluidic nanoplasmonic digital immunoassay for cytokine storm profiling in COVID-19 patients[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 18023-18036.
- [81] Norman M, Gilboa T, Ogata A F, et al. Ultrasensitive high-resolution profiling of early seroconversion in patients with COVID-19[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(12): 1180-1187.
- [82] Wang Y, Yang Y Z, Chen C, et al. One-step digital immunoassay for rapid and sensitive detection of cardiac troponin I[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(4): 1126-1131.
- [83] Jing W W, Wang Y, Chen C, et al. Gradient-based rapid digital immunoassay for high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) detection in 1  $\mu$ L plasma[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(2): 399-407.
- [84] Huijser E, Göpfert J, Brkic Z, et al. Serum interferon- $\alpha$ 2 measured by single-molecule array associates with systemic disease manifestations in Sjögren's syndrome[J]. *Rheumatology*, 2021: keab688.
- [85] Wilson D H, Rissin D M, Kan C W, et al. The simoa HD-1 analyzer: a novel fully automated digital immunoassay analyzer with single-molecule sensitivity and multiplexing[J]. *Journal of Laboratory Automation*, 2016, 21(4): 533-547.
- [86] Fischer S K, Joyce A, Spengler M, et al. Emerging technologies to increase ligand binding assay sensitivity [J]. *The AAPS Journal*, 2015, 17(1): 93-101.