

# 用于新型冠状病毒检测的纳米材料及生物传感技术

李妍妍<sup>1,2</sup>, 彭宇思<sup>1,2</sup>, 林成龙<sup>1,2</sup>, 罗晓莹<sup>3</sup>, 滕 峥<sup>4</sup>,  
张 曦<sup>4</sup>, 黄政仁<sup>1,2</sup>, 杨 勇<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 2. 中国科学院大学材料科学与光电技术学院, 北京 100049; 3. 上海交通大学 医学院附属仁济医院, 上海市肿瘤研究所 癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200032; 4. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

**摘 要:** 新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)疫情大流行引起全球对此重大突发公共卫生事件的高度关注。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)经过多次突变, 出现传染速度加快、免疫逃逸、隐匿性传播等特性, 令防控形势至今仍异常严峻。对患者的早发现、早隔离仍然是目前最有效的防控措施。因此, 迫切需要快速、高灵敏的检测手段来甄别此病毒, 以便及早识别感染者。本文简要介绍了 SARS-CoV-2 的一般特征, 并针对核酸、抗体、抗原及病原体作为检测靶标的不同检测手段及最新进展进行分类概述; 对一些光学、电学、磁学以及可视化的新型纳米传感器在 SARS-CoV-2 检测技术上的应用进行了分析。鉴于纳米技术的应用在提高检测灵敏度、特异性以及准确率上具有优势, 本文详细介绍了新型纳米传感器在 SARS-CoV-2 检测中的研究进展, 包括表面增强拉曼基生物传感器、电化学生物传感器、磁纳米生物传感器以及比色生物传感器等, 并探讨了纳米材料在新型生物传感器构建中的作用和挑战, 为纳米材料研究人员开发各种类型的冠状病毒传感技术提供思路。

**关 键 词:** SARS-CoV-2; 检测方法; 核酸; 抗体; 抗原; 纳米材料; 生物传感器; 综述

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

## Nanomaterials and Biosensing Technology for the SARS-CoV-2 Detection

LI Yanyan<sup>1,2</sup>, PENG Yusi<sup>1,2</sup>, LIN Chenglong<sup>1,2</sup>, LUO Xiaoying<sup>3</sup>, TENG Zheng<sup>4</sup>,  
ZHANG Xi<sup>4</sup>, HUANG Zhengren<sup>1,2</sup>, YANG Yong<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructures, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 2. College of Materials Science and Opto-Electronics Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200032, China; 4. Shanghai Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract:** The outbreak of corona virus disease 2019 (COVID-19) has aroused great attention around the world. SARS-CoV-2 possesses characteristics of faster transmission, immune escape, and occult transmission by many mutation, which caused still grim situation of prevention and control. Early detection and isolation of patients are still the most effective measures at present. So, there is an urgent need for new rapid and highly sensitive testing tools to quickly identify infected patients as soon as possible. This review briefly introduces general characteristics of

收稿日期: 2022-04-12; 收到修改稿日期: 2022-05-03; 网络出版日期: 2022-06-22

基金项目: 国家自然科学基金(52172167); 国家重点研发计划国际合作(2021YFE011305)

National Natural Science Foundation of China (52172167); National Key R&D Program of China (2021YFE011305)

作者简介: 李妍妍(1997-), 女, 博士研究生. E-mail: liyanyan20@mails.ucas.ac.cn

LI Yanyan (1997-), female, PhD candidate. E-mail: liyanyan20@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 杨 勇, 研究员. E-mail: yangyong@mail.sic.ac.cn; 滕 峥, 主任技师. E-mail: tengzheng@scdc.sh.cn

YANG Yong, professor. E-mail: yangyong@mail.sic.ac.cn; TENG Zheng, professor. E-mail: tengzheng@scdc.sh.cn

SARS-CoV-2, and provides recent overview and analysis based on different detection methods for nucleic acids, antibodies, antigens as detection target. Novel nano-biosensors for SARS-CoV-2 detection are analyzed based on optics, electricity, magnetism, and visualization. In view of the advantages of nanotechnology in improving detection sensitivity, specificity and accuracy, the research progress of new nano-biosensors are introduced in detail, including SERS-based biosensors, electrochemical biosensors, magnetic nano-biosensors and colorimetric biosensors. Functions and challenges of nano-materials in construction of new nano-biosensors are discussed, which provides ideas for the development of various coronavirus biosensing technologies for nanomaterial researchers.

**Key words:** SARS-CoV-2; detection method; nucleic acid; antibody; antigen; nanomaterial; biosensor; review

21 世纪暴发了三种冠状病毒感染引起的大规模疫情, 分别是 2003 年的重症急性呼吸综合征(SARS)、2012 年的中东呼吸综合征(MERS)和 2019 年的新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19), 尤其是由 SARS-CoV-2(SARS-CoV-2)引起的 COVID-19 暴发引起了人们对此类重大突发性公共卫生事件的高度关注<sup>[1-2]</sup>。SARS-CoV-2 传染性极强, 致死率也高。截至 2022 年 4 月 8 日, 共有 4.9 亿人感染, 617 万人死亡, 231 个国家和地区报道了感染病例(数据来源 WHO)。随着最近多波次、多国国家新型冠状病毒肺炎疫情持续暴发, SARS-CoV-2 变异, 使其防控趋于常态化。目前 WHO 定义了 5 种 SARS-CoV-2“值得关注的变异株”(Variant of Concern, VOC)包括: 阿尔法(Alpha B.1.1.7)、贝塔(Beta B.1.351)、伽马(Gamma P.1)、德尔塔(Delta B.1.617.2)和奥密克戎(Omicron B.1.1.529)。特别是奥密克戎 BA.2 亚型出现, 根据 Sutter Health<sup>[1-2]</sup>的推算, BA.2 的基础传染系数(R0)为 9.1, 相比于原型株(R0 接近 3.0)传染能力大幅增强。

SARS-CoV-2 的主要传播途径为呼吸道飞沫和密切接触传播, 接触病毒污染的物品也可造成感染, 在相对封闭的环境中暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播的可能; 由于在粪便、尿液中可分离到 SARS-CoV-2, 也应当注意其对环境的污染可能造成接触传播或气溶胶传播<sup>[3]</sup>。为了尽快抑制 SARS-CoV-2 的传播, 有必要发展快速、准确的病毒检测技术。通过开展对感染者筛查以及环境中 SARS-CoV-2 污染监测, 及时消除传染源、切断传播途径, 才能有效控制疫情的蔓延<sup>[4]</sup>。

目前常用的检测方法主要有实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应法、联合探针锚定聚合测序法、恒温扩增芯片法、血清抗体检测法、免疫层析法、磁微粒化学发光法等<sup>[5-6]</sup>。近两年还出现了许多新型检测方法, 例如韩国开发的一种基于场效应晶体管生物传感器的新检测方法, 可通过石墨

烯纳米片上修饰 SARS-CoV-2 抗体来捕获病毒, 检测限可达到 242 copies/mL<sup>[7]</sup>。本实验室则开发了一种对 SARS-CoV-2 病原体特异性捕获和直接检测的基于表面增强拉曼散射(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)的新方法, 检测时间可在 10 min 之内<sup>[8]</sup>。

针对 COVID-19 大流行, 对检测技术的新需求和其本身的演变趋势, 本文介绍了各种传统病原体检测方法和新型病原体检测方法。在常用的诊断方法中, 酶联免疫吸附检测、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应、环介导等温扩增对于发现人类冠状病毒非常重要, 但是这些方法也存在局限性, 如实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应法需要熟练的操作人员、良好的实验室条件、耗费数小时才能完成检测; 酶联免疫吸附测定是基于抗原-抗体相互作用的方法, 虽然灵敏度高、操作简便, 但其试剂制备过程中需要特异性和高亲和力的抗体, 甚至昂贵的重组抗体。为了解决这一问题, 学术界和工业界基于纳米材料和纳米传感技术、生物技术的研究进展, 研发了多种检测 SARS-CoV-2 的前沿技术。为了把握 SARS-CoV-2 检测技术的现状和发展趋势, 本文综述了目前常规 SARS-CoV-2 检测方法和基于纳米技术的生物传感器检测的研究进展, 以期材料学界以及纳米技术研究人员开发更加简便、灵敏、高效的 SARS-CoV-2 及未知病毒检测方法和传感器件提供参考。

## 1 SARS-CoV-2 特征

冠状病毒科是一个单链 RNA 病毒家族, 包含 27~32 kb 的病毒基因组, 由双层脂质膜覆盖, 表面有大量蛋白颗粒或刺突, 直径约 120 nm(图 1)<sup>[9]</sup>。该科隶属于套式病毒目(Nidovirales), 分为两个亚科, 6 个属, 23 个亚属, 约 40 种。两个亚科即冠状病毒亚科(Coronavirinae)和环曲病毒亚科(Torovirinae),

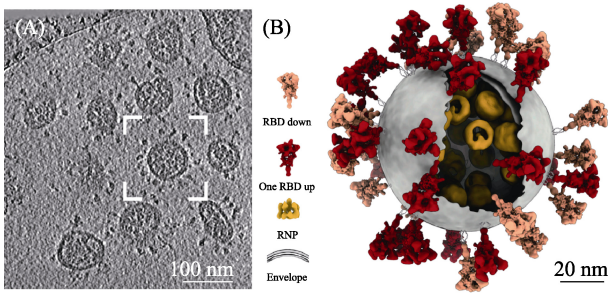


图 1 SARS-CoV-2 的 TEM 照片(A)和示意图(B)<sup>[9]</sup>  
 Fig. 1 TEM image (A) and schematic morphology (B) of SARS-CoV-2<sup>[9]</sup>

The color figures can be obtained from online edition

都可能涉及人类。然而,就涉及的范围和发病率而言,冠状病毒亚科相对更具有危害性。一旦冠状病毒开始感染人体细胞,S 蛋白就会将病毒颗粒附着在宿主细胞受体上,从而促进病毒的脱壳过程并引发感染。病毒通过细胞表面的受体区域进入细胞,其机制主要是通过几种结合肽酶与人细胞融合。例如 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 以及 HCoV-NL63 通过与血管紧张素转化酶 2(ACE2)结合以方便病毒进入细胞,MERS-CoV 则和人类二肽基肽酶(hDPP4)有高亲和力<sup>[10-14]</sup>而进入细胞。

目前感染人类导致病症的冠状病毒主要有 7 种,见图 2(a,c): HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和

SARS-CoV-2<sup>[15]</sup>。他们感染人体后可引起多种症状(图 2(b))。冠状病毒基因组都是 RNA,复制依赖 RNA 合成,不需要以 DNA 作为中间模板。病毒表面主要由 4 种蛋白组成,包括:特异性结合宿主细胞受体的棘突蛋白(Spike glycoprotein, S)、包膜形成相关的膜蛋白(Membrane protein, M)、包膜蛋白(Envelope small membrane protein, E)、病毒组装相关的核衣壳蛋白(Nucleoprotein, N),以及其他辅助类蛋白,他们的基因均分布在结构蛋白基因之间(图 2(d))<sup>[16]</sup>。S 蛋白与宿主细胞表面受体 ACE2 结合让冠状病毒进入宿主细胞;E 蛋白具有离子通道活性,参与病毒的组装和释放;M 蛋白是病毒的结构膜蛋白,通过与 N 蛋白结合促进病毒组装。

## 2 常规检测方法及其研究进展

自新冠疫情暴发以来,SARS-CoV-2 的检测成为疫情防控的重要一环。常规检测主要针对病毒核酸、病毒抗原及其产生的抗体,主要采用包括病原学检测、分子生物学检测、血清学检测以及其他光谱、影像学检测等方法。目前核酸检测和免疫学检测方法是世界各国普遍采用的方法。为了进一步提高 COVID-19 确诊的准确性和效率,中国国家卫生健康委员会发布的《SARS-CoV-2 肺炎防控方案

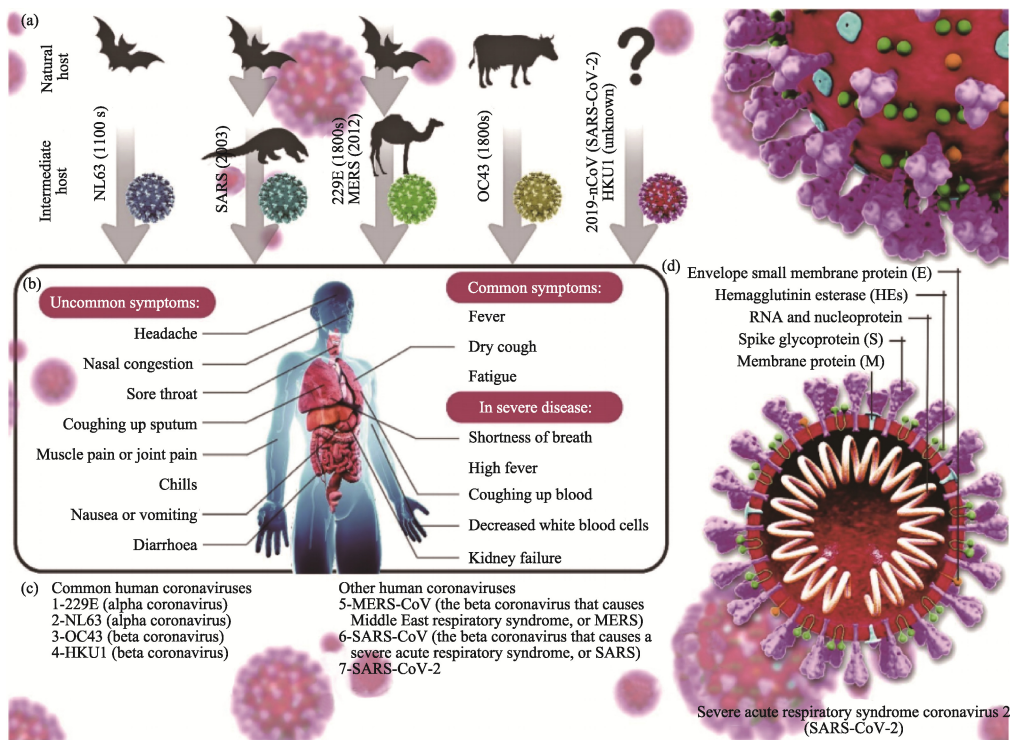


图 2 冠状病毒的分类(a、c)、感染症状(b)及其结构示意图(d)<sup>[16]</sup>  
 Fig. 2 Classification (a, c), symptoms (b) and structure (c) of coronavirus<sup>[16]</sup>

The color figures can be obtained from online edition

(第八版)》将免疫抗体检测用作疑似病例确诊的辅助诊断方法之一。免疫学检测法主要检测抗原或者人体免疫系统防御 SARS-CoV-2 产生的特异性抗体,包括免疫层析(胶体金)、酶联免疫吸附试验和化学发光免疫分析、量子荧光免疫层析等技术。核酸检测具有高灵敏度和高特异性特点,被认为是 SARS-CoV-2 早期诊断的“金标准”;抗原/抗体检测法操作便捷、检测迅速,可作为核酸诊断的辅助方法<sup>[17-18]</sup>。由于抗原检测灵敏度低于核酸检测,目前作为感染人群筛查补充方法之一。

## 2.1 核酸检测

SARS-CoV-2 的核酸检测主要是针对病毒 RNA 基因序列进行检测。基因序列的测定能够帮助筛查可疑的 SARS-CoV-2 感染者、及时发现 SARS-CoV-2 的变异毒株甚至新型毒株。目前,核酸检测以其高灵敏度和高特异性的特点而被广泛用于 COVID-19 疫情的防控工作中。基于核酸的检测涉及多种检测技术,如基因测序技术、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术、环介导等温扩增技术、微流控技术、微滴式数字聚合酶链式反应技术、规律间隔短回文重复序列检测技术等。

### 2.1.1 基因测序技术

高通量基因测序技术可以一次对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,能够从复杂样品中捕获到待测病原体,并详细解析基因组的完整信息。新冠疫情暴发以后,我国科学家率先完成 SARS-CoV-2 基因组的测序工作,通过测序技术发现该病原体的基因与 SARS-like 蝙蝠冠状病毒密切相关,且和 SARS-CoV 病毒有着高度的同源性<sup>[19-22]</sup>。病毒全基因组测序(Whole Genome Sequencing, WGS)提供了对严重急性呼吸系统综合征 SARS-CoV-2 的传播和进化的重要见解。目前用于 SARS-CoV-2 的基因测序技术主要有两种,分别为基于二代基因测序的宏基因组测序(metagenomics Next-Generation Sequencing, mNGS)和第三代纳米孔高通量测序(Nanopore Targeted Sequencing, NTS)。

宏基因组测序能够对微生物(真菌、细菌和病毒)群体进行高通量测序,无需分离和培养微生物,有利于获得高通量数据。宏基因组测序能够帮助了解 SARS-CoV-2 的基因序列及其变异情况,有利于病原体 SARS-CoV-2 的检测溯源和追踪。任丽丽等<sup>[21]</sup>基于 Illumina 平台对 5 位武汉金银潭医院临床肺炎患者的肺部灌洗液做了核酸提取以及第二代基因测序。基因序列的结果显示,在五位患者的灌洗液中都存在一种未知的但是属于  $\beta$ -CoV 病毒株的毒株,

且其核酸同源性达到 98%~99%。这些分离株的核酸和 SARS-CoV 病毒具有 79% 的同源性,和 MERS-CoV 病毒具有 51.8% 的同源性。该研究还表明,虽然该分离株和蝙蝠 SARS-like-CoVs 的核苷酸同源性为 86.3%~86.5%,但属于一种新的冠状病毒分支。陈良君等<sup>[23]</sup>也采用宏基因组第二代基因测序技术对两名具有相同肺炎症状的病人进行核酸提取和测序,发现采用 mNGS 开展基因溯源调查,能及早发现新病原体的出现。进一步基于 ORF1a/1b、S 和 N 基因的分析,推测该病毒是一种新型的冠状病毒。mNGS 可以直接对原始样本中的病原体进行基因序列的检测,且能够检测多种病原体,如 RNA 病毒、DNA 病毒、细菌、真菌等<sup>[24]</sup>。mNGS 可以用于准确鉴定未知的病原体,并对有相关症状的患者做出迅速准确的诊断。但是由于其所需时间较长(大于 5 d),在 SARS-CoV-2 快速检测方面受到限制。

目前,更多的是应用联合探针锚定聚合测序法,通过二代测序获得 SARS-CoV-2 全基因。通过全基因序列比对确诊 SARS-CoV-2,并可分析 SARS-CoV-2 的变异情况。该方法相对于宏基因组测序方法,操作简便,耗时少,是当下 SARS-CoV-2 全基因测序的常用方法。

第三代纳米孔高通量测序技术是另外一种基因测序技术。纳米孔测序技术能够对核酸片段进行全长读取,是一种长读序列的高通量检测技术<sup>[25]</sup>。武汉大学刘天罡等<sup>[26]</sup>创新性地提出纳米孔靶向测序检测方法,结合了病毒靶向扩增以及长读、实时纳米孔测序的优势,能够在 6~10 h 内同时检测 SARS-CoV-2 及其他 10 类呼吸道病毒,检测范围包括 12 个 SARS-CoV-2 基因组位点,具有很高的灵敏度和准确性。同时,该方法也可以分辨、鉴定 SARS-CoV-2 变异株。此外,纳米孔测序技术对实验室的要求不高,可使用便携式测序仪,有望成为一种集 SARS-CoV-2 快速检测和病毒变异监控为一体的现场检测工具。

高通量基因测序技术具有优异的高通量性能,获取信息量大,联合探针锚定聚合测序法具备快速和便携的特点。通过不断发展和优化,该技术已可作为一种快速检测工具,用于 SARS-CoV-2 的快速检测。此外,通过高通量的基因测序,也能全面监测 SARS-CoV-2 变异。对于以后可能突然暴发的新疫情而言,相信利用高灵敏度和高准确率的基因测序技术也能够帮助科研工作者们进行快速溯源。

### 2.1.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术

SARS-CoV-2 是表面带有糖蛋白(S 蛋白)刺突的



RNA 病毒。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术(Real-Time fluorescent quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)是将病原体的核酸(RNA)逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行多次 PCR 循环扩增, 最后通过荧光探针实时检测扩增产物。在 PCR 反应体系中, 具有一对特异性引物和一个 TaqMan 探针, 该探针为两端分别标记了报告荧光基团(reporter)和淬灭荧光基团的一段特异性寡核苷酸序列。当探针完整时, reporter 发射的荧光信号被淬灭基团吸收, 如反应体系存在靶序列, 探针与模板将在 PCR 反应时结合, DNA 聚合酶利用酶的外切酶活性沿模板将探针酶切降解, reporter 与淬灭基团分离, 发出荧光。每扩增一条 DNA 链, 代表产生一个荧光分子。荧光定量 PCR 仪通过监测荧光到达预先设定阈值的循环数( $C_t$ )来判断阴阳性,  $C_t$  大小代表病毒核酸浓度, 病毒核酸浓度越低,  $C_t$  越大。

目前 RT-qPCR 核酸检测技术是国内 SARS-CoV-2 临床标本检测的“金标准”, 需要专业的技术人员以及 PCR 专用实验室和分析仪器, 完成检测通常需要 4 h 左右时间。这类 PCR 检测方法使用了 TaqMan 探针, 检测特异性和灵敏度相对较高。目前国家药监局批准产品大多基于 SARS-CoV-2 基因组中开放读码框 1a/b (Open Reading Frame 1a, ORF1a)、核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N)和包膜蛋白(Envelope protein, E)进行特异性检测。虽然不同产品检测原理基本一致, 但是其引物和探针均不同, 分别为单靶区段(ORF1a)、双靶区段(ORF1a、N 蛋白)、以及三靶区段(ORF1a、E 蛋白和 N 蛋白)。核酸 PCR 通常检测的是位于病毒 ORF1a 和 N 基因上的两个靶标, 同一份标本需满足双靶标阳性、或单靶标阳性且两种标本同时满足单靶标阳性才能确认 SARS-CoV-2 核酸阳性。

### 2.1.3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal Amplification, LAMP)是一种新型的 DNA 分子诊断技术, 能够在等温条件下实现特异、高效且快速扩增核酸模板, 灵敏度是常规 PCR 的 10 倍以上。实时逆转录环介导等温扩增法(RT-LAMP)是 2000 年由日本研究人员 Notomi 等<sup>[27]</sup>发明的一种新型的体外等温扩增特异核酸片段的技术。不同于传统的 PCR 需要一系列重复的温度变化和 30~40 个循环, LAMP 不需要温度循环, 在恒温(60~65 °C)下进行。LAMP 只使用了一组 4 个特异引物和一个 DNA 聚合酶, 具有复制活性和高链置换活性, 在不到 1 h 的时间内扩增出高达  $10^9$  拷贝的目的基因。

LAMP 技术也采用逆转录酶和 RT-LAMP 的 DNA 聚合酶来检测 RNA 序列。放大的产物可以用光度法测量, 直观地显示副产物焦磷酸镁在溶液中沉淀造成的混浊。溶液中的任何变化都可以用肉眼或通过使用 SYBR 绿等荧光染料进行简单的光度技术分析。这项新技术现正被广泛应用于病毒感染检测, 是一种强有力的替代方法。

目前已经有团队设计了一些新的 RT-LAMP 方法来检测 COVID-19 的病原体, 可以在 63 °C 下 30 min 内完成检测。甚至还有团队的方案, 检测时长只需 15 min 左右, 使得该方案更加实用, 既加快了检测速度, 又方便了检测。Zhu 等<sup>[28]</sup>研发了基于纳米颗粒的生物传感器(Nanoparticles-based Biosensor, NBS)的 RT-LAMP 检测方法, 将 SARS-CoV-2 的 ORF1a/b 基因与 N 基因作为扩增片段, 实现 SARS-CoV-2 病人的精确诊断, 灵敏度和特异性高达 100%。总而言之, LAMP 技术的重要优点是较 RT-qPCR 检测的时间大大缩短, 且设备只需恒定的温度, 从而省略了 PCR 技术中最关键的步骤—热循环, 被认为是能够用于病毒现场快速检测(Point-of-Care Test)的一项新技术。

### 2.1.4 微流控技术

微流控芯片(Microfluidic chip)是一种在微米级别孔道中操控微液滴流动的技术。该技术可被视为是一种高度集成的芯片实验室(Lab-on-a-chip), 能够将样品制备、反应以及检测集成在一个较小的装置中。微流控技术具有高度自动化、易操作、携带、用时短、性价比高等优点, 可以实现“样本进, 结果出”, 可以作为快速/临床检测的装置<sup>[29-30]</sup>。与基于微孔板的 PCR 技术相比, 微流控技术能够实现大规模自动化组装纳米级 PCR 检测技术, 实现高通量检测, 且仅需少量昂贵的检测试剂。Fluidigm 公司正致力于将微流控技术应用于 SARS-CoV-2 表观遗传学的检测中, 提高 PCR 等分子检测技术的筛查速度和能力。

南京大学王光辉等<sup>[31-34]</sup>多年来致力于研制微流控芯片, 将光学检测和操作技术结合起来, 用于生物医疗中的快速检测。他们首次提出双重离心力微流控芯片以及先进的流体芯片设计和封装技术, 该装置能够将样品前处理、核酸提取、核酸扩增检测等过程集成在一个流体芯片上, 可应用于病毒现场快速检测。由捷克布拉格化学与技术大学、中国医科大学附属医院研究部、捷克布尔诺理工大学组成的研究团队, 结合 3D 打印制备了微流控基因传感器用于检测 SARS-CoV-2<sup>[35]</sup>。该基因传感器通过微流控技术和 3D 打印技术将电化学单元集成在一个装置中(图 3)。

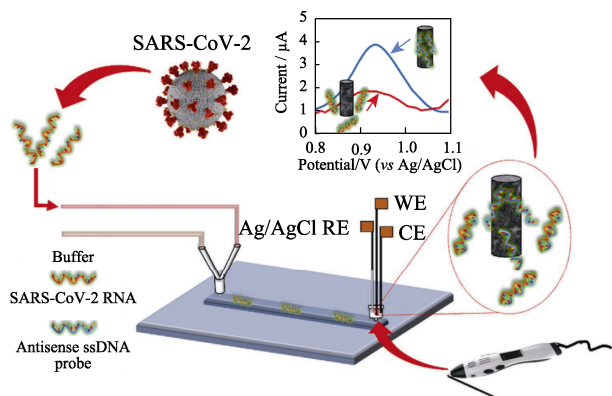


图 3 用于检测 SARS-CoV-2 的微流控基因传感器<sup>[35]</sup>

Fig. 3 Scheme of the lab-on-a-chip genosensor for SARS-CoV-2 virus detection<sup>[35]</sup>

WE: working electrode; CE: counter electrode; RE: reference electrode; ssDNA: single strand DNA

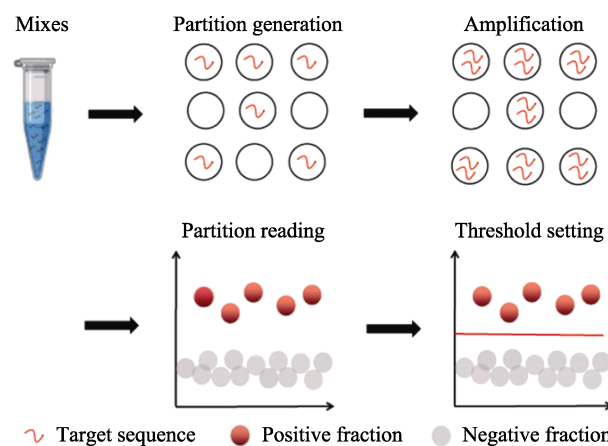
The color figure can be obtained from online edition

当 SARS-CoV-2 的 RNA 和单链 DNA(single strand DNA, ssDNA)结合后, 3D 打印笔上吸附的 ssDNA 解吸, 通过检测未解吸的 ssDNA 的电信号来判定是否存在病毒。这种“ON/OFF”模式的微流控基因传感器具有易操作、便携带、样品和试剂量少的特点, 能够在 7 min 内检测 SARS-CoV-2。目前, 基于微流控技术开发的一款名为“病毒检测盒”(Detect Virus BOX, DVBOX)的产品, 是一款具有全封闭和高灵敏度的 SARS-CoV-2 核酸检测设备, 能在普通实验室环境下, 无需专业医学人员即可完成灵敏、快速、准确的 SARS-CoV-2 检测, 其检测限可以达到 10 copies/mL。

### 2.1.5 微滴式数字聚合酶链式反应技术

微滴式数字 PCR(droplet digital Polymerase Chain Reaction, ddPCR)是一种核酸分子绝对定量技术, 其原理是将 PCR 反应混合液分配到大量的微小反应单元中(纳升级别), 数字 PCR 仪将反应混合液中众多核酸分子随机分配到独立反应单元, 降低了背景核酸对含量较少的靶序列扩增的干扰, 增加了检测的灵敏度和重复性(图 4)<sup>[36-37]</sup>。ddPCR 不像传统的 RT-qPCR 那样需要根据标准品进行校准。而且, PCR 反应被分割成数万个小液滴, 在这种情况下, PCR 抑制剂对样品的影响较小, 检测灵敏度提高<sup>[36-38]</sup>。在病毒载量低的情况下, 例如 SARS-CoV-2 感染的早期或处于潜伏期或者即将治愈的患者医疗效果评价时, 这种检测尤为重要。

疫情期间, 中国计量科学院的 Fang 和武汉、北京 CDC 等科研人员<sup>[39]</sup>建立了一个数字 RT-PCR 法, 测试了 196 个咽拭子样品(103 个疑似、77 个密接、16 个对比样), 结果显示其灵敏度、特异性和准确性分别达到 91%、100%和 93%, 相比 RT-qPCR 有很大的提高。另外, 武汉大学的研究人员采集了 77 名



~ Target sequence ● Positive fraction ● Negative fraction

图 4 ddPCR 在临床样本分析中的基本工作流程<sup>[37]</sup>

Fig. 4 Principle workflow of ddPCR in analyzing clinical samples<sup>[37]</sup>

The color figure can be obtained from online edition

患者的咽拭子, 并比较了 ddPCR 和 RT-qPCR 的结果<sup>[40]</sup>。研究人员在两种检测方案中使用了相同的引物和探针, 其中 26 名 RT-qPCR 阴性患者经过 RT-ddPCR 诊断后显示为阳性。而且, 在 14 名康复期患者中, 6 名患者的 RT-qPCR 检测结果为阴性, 但通过 ddPCR 仍然可以检测到病毒核酸。

### 2.1.6 CRISPR 核酸检测技术

规律间隔性成簇短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)核酸检测的是原核生物基因组内的一段重复序列, 其基本原理是: 在引物 RNA(single guide RNA, sgRNA)的引导下, Cas 蛋白识别并切割含有 PAM (Protospacer adjacent motif)序列的靶标 RNA 或 DNA, 从而用于基因序列检测<sup>[41]</sup>。近年来, 基于 Cas12a 和 Cas13a 的反式切割(trans-cleavage)和顺式切割(cis-cleavage)活性开发出来的 HOLMES (One-Hour-Low-Cost Multipurpose Highly Efficient System)、SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking)和 DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR TransReporter)的技术已经获得广泛使用。因此这些基于 CRISPR 的核酸检测技术被誉为“下一代分子诊断技术”<sup>[40-45]</sup>。

美国 Mammoth Biosciences 公司开发了一种快速(<40 min)、易行、准确的, 基于 CRISPR-Cas12 的侧向流动检测技术, 该检测技术可用于从呼吸拭子 RNA 提取物中检测 SARS-CoV-2(图 5)<sup>[44]</sup>。测试了来自美国患者(包括 36 例 COVID-19 感染的患者和 42 例其他病毒性呼吸道感染的患者)的参比样品和临床样品, 阳性预测率达 95%, 阴性预测率达 100%。其基于 CRISPR 的检测仪器和方法为美国疾病控制和预防中心 SARS-CoV-2 RT-qPCR 测定法提

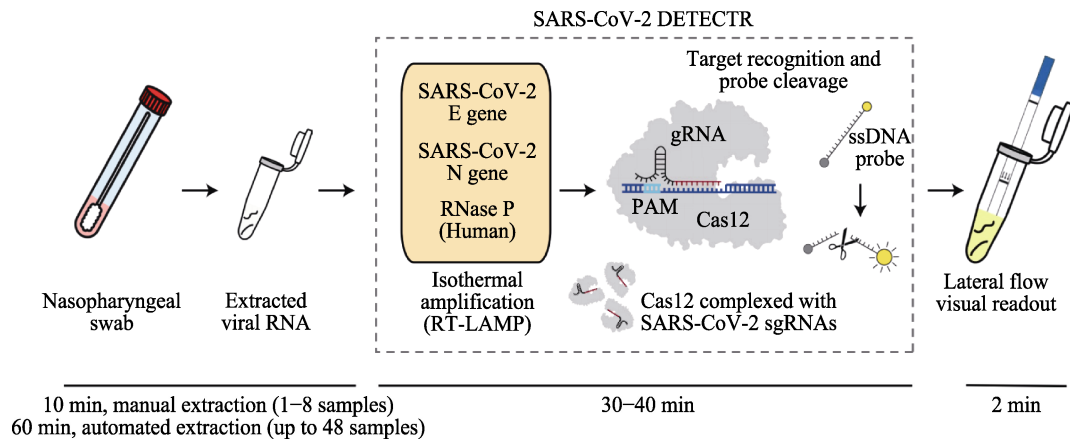
图 5 基于 CRISPR-Cas12 侧向流动技术检测 SARS-CoV-2<sup>[44]</sup>

Fig. 5 Detection of SARS-CoV-2 based on CRISPR-Cas12 combined with lateral flow technique<sup>[44]</sup>

The color figure can be obtained from online edition

供了直观、快速的替代方法。CRISPR 检测技术具有较高的灵敏度、特异性和可靠性,还可以与侧向流读数进行耦合,从而有可能实现居家检测。

前述 SARS-CoV-2 检测技术都是基于核酸的检测方法。核酸提取是核酸基检测技术的关键步骤,方法包括离心柱提取法、玻璃珠吸附法、二氧化硅基质法、阴离子交换法及微纳米磁珠提取法。磁珠法核酸提取技术诞生于 20 世纪 90 年代,其原理是磁珠表面带有特定的活性基团,在特定条件下能与细胞或组织中释放的核酸进行特异性可逆结合。同时利用磁珠自身具备的磁响应能力,在外加磁场的作用下进行定向移动与富集,从而实现对核酸的分离纯化。磁珠法核酸提取能够实现自动化、满足大批量操作的要求,操作简单,用时短。上海交通大学生物医学工程学院古宏晨教授团队<sup>[45]</sup>研发了新型“Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米磁珠”作为提取 SARS-CoV-2 核酸的核心载体,实现针对 SARS-CoV-2 核酸的高效分离、捕获与快速检测,并应用于上海之江生物科技股份有限公司 SARS-CoV-2 2019-nCoV 核酸检测试剂盒,为我国 SARS-CoV-2 检测贡献了力量。

## 2.2 抗体检测

当 SARS-CoV-2 侵入人体一段时间后,人体会产生特异性抗体来进行防御。机体在抗原物质刺激下,由浆细胞产生一类能与抗原特异性结合的免疫球蛋白。免疫球蛋白可根据分子结构和抗原特异性差异而被分为五类: IgG、IgM、IgA、IgD、IgE。病毒进入机体后,经过一定的潜伏期刺激集体免疫系统,从而产生浆细胞、合成分泌抗体。IgM 抗体最早出现,但该抗体维持的浓度低、时间短,在血液中只持续数日至数十日,在急性期感染可作为诊断指标。当 IgM 即将消失时, IgG 的含量达到高峰,其浓

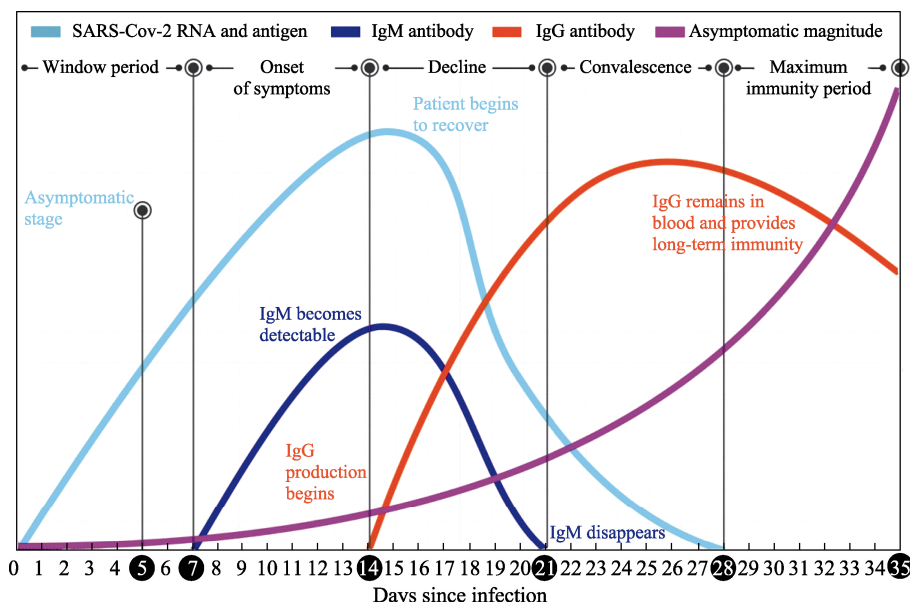
度高、维持时间长,血清 IgG 阳性则提示处于感染中后期或重复感染。

我国研究者对 COVID-19 患者进行研究发现,当 SARS-CoV-2 进入人体后,其内部的核蛋白和表面 S 蛋白的 RBD 区域会诱发人体的体液免疫,从而产生 IgM/IgG 抗体。其中,产生 IgM 抗体大约需要 5~7 d,产生 IgG 抗体需要 10~15 d (图 6)<sup>[16,46]</sup>。国家卫生健康委员会在 2020 年 3 月 4 日发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(第七版)》,血清学检测被确认为确诊病例和疑似病例的辅助检测方法之一,即通过检测人体样本中特异性抗体 IgG 和 IgM 的存在及载量,间接判断人体体内有无病毒及病毒感染。常用的抗体血清学检测方法主要包括 3 种:免疫层析(胶体金)法、酶联免疫吸附试验法和化学发光免疫分析法。

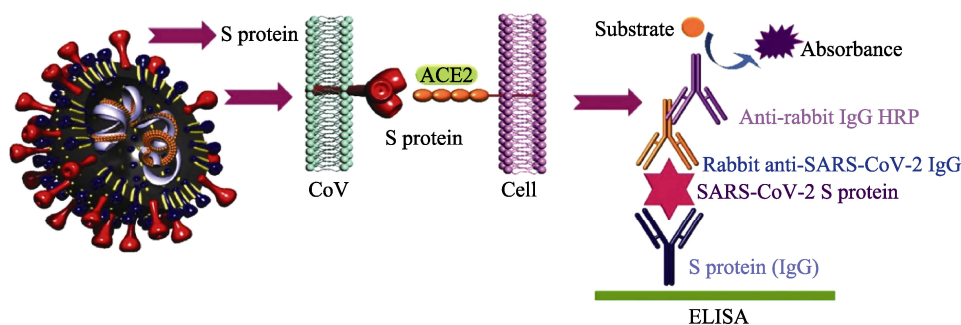
### 2.2.1 酶联免疫吸附测定

酶联免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是应用于 SARS-CoV-2 检测的血清学检测方法之一。该方法结合了抗原、抗体特异性反应和酶对底物高效催化作用,是一种高敏感性免疫学实验技术(图 7)<sup>[16]</sup>。检测时,受检标本与固相载体表面的抗体或抗原发生反应,之后固相载体上形成的抗原抗体复合物通过清洗除去液体中的其他物质。最后加入酶标记的抗体或抗原,并在固相载体上通过反应结合。加入酶反应底物后,底物被催化生成显色产物,产物的量与标本中受检物质的载量成正相关关系。因此可根据显色的深浅进行半定量或定性分析。该检测方法灵敏度较高,操作简便,但检测速度慢。在实际应用中,根据抗原抗体的特性研究者们发明了不同的检测法,包括双抗体夹心法、竞争法、免疫抑制法、间接法和直接法等类型。



图 6 病毒感染后人体免疫反应变化<sup>[16]</sup>Fig. 6 Change of human immune response after viral infection<sup>[16]</sup>

The color figure can be obtained from online edition

图 7 检测 SARS-CoV-2 的 ELISA 技术<sup>[16]</sup>Fig. 7 ELISA method for detection of SARS-CoV-2<sup>[16]</sup>

ACE2: angiotensin converting enzyme 2; HRP: horse radish peroxidase; ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

The color figure can be obtained from online edition

COVID-19 暴发时, ELISA 也被认为可以作为一种抗体检测技术来诊断 COVID-19 患者。Liu 等<sup>[47]</sup>通过基于重组的 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白(N 蛋白)和表面刺突蛋白(S 蛋白)的双酶联免疫试剂盒来检测 IgM 和 IgD 抗体。基于 N 蛋白和 S 蛋白的酶联免疫试剂盒对两种抗体的阳性检出率分别为 80.4%和 82.2%, 且在患者感染后期, 该试剂盒的灵敏度还会进一步提高。美国西奈山伊坎医学院 Krammer 等<sup>[48]</sup>也提出一种 ELISA 法来检测 SARS-CoV-2 的抗体, 他们分别使用完整的 SARS-CoV-2 的 S 蛋白以及 S 蛋白中受体结合区域(Receptor Binding Domain, RBD)来检测 16 名 SARS-CoV-2 肺炎患者的血清和血浆, 观察到两种类型的蛋白均产生了阳性的结果。而对 COVID-19 暴发前收集到的 50 份血清进行相同的检测过程, 发现它们对 S 蛋白无反应或者反应较低。以上结果表明, 基于这两种蛋白的 ELISA

方法可以用于 SARS-CoV-2 的检测。

ELISA 检测是基于抗原和抗体之间的相互作用, 使用一种酶, 以可测量的方式显示和转换读数。一般来说, 这种测试结果的准确性和实验中多种因素有关, 这使得它在某些情况下会出现实验偏差。这些因素包括: 由于存在感染“窗口期”而出现假阴性, 由于药物或类风湿因子等干扰物质的存在而出现假阳性, 不适当的平板清洗而导致的非特异性, 耗时准备的 ELISA 试剂盒中抗原抗体结合浓度的差异, 需使用 ELISA 读取仪和其他相关设备操作技能。

### 2.2.2 侧流免疫层析法

侧流免疫层析法(Lateral Flow Immunoassay, LFIA)包括胶体金法和时间分辨荧光微球法。其中胶体金法(colloidal gold method)是以胶体金纳米颗粒为显色标志物, 用以检测抗原和抗体的一种免疫标记技术。在柠檬酸钠等还原剂作用下, 四氯金酸



( $\text{HAuCl}_4$ )可被还原成一定大小的金颗粒, 形成表面带负电的疏水胶溶液, 通过控制不同的实验条件可以得到不同粒径的胶体 Au 颗粒, 其显示的颜色也各不相同。由于静电作用而成为稳定分散的 Au 溶胶, 故称胶体金。将胶体金标记的生物大分子在硝酸纤维素(NC)膜上固定, 设置加样孔, 并设置检测线(Test line)和质量控制线(Control line), 就得到胶体金试纸。在胶体金试纸的加样孔上加入人体采集样品后, 在试纸上进行层析。根据试纸上的免疫反应发生结果, 即检测线上是否出现红色条带, 来判断检测结果的阴阳性。

由葛均波院士团队研发的“新型冠状病毒(2019-nCoV)IgM 抗体检测试剂盒(胶体金免疫层析法)”成为首批通过法定检测机构鉴定合格的 SARS-CoV-2 快速检测试剂之一<sup>[49]</sup>。该检测试剂盒的特异度为 99.6%, 整体的诊断符合率为 98.1%。此外, 该胶体金免疫层析法能够直接对血液或者血清进行检测, 无需预处理样品, 需要的样品量少(10  $\mu\text{L}$  血清或 20  $\mu\text{L}$  全血, 能够在 10 min 内完成检测。该技术应用前景广阔, 有望用于机场、港口等聚集性场所的快速检测和居家检测。

### 2.2.3 化学发光免疫分析法

化学发光免疫分析法(Chemiluminescence Analysis, CLIA)主要用于检测各种抗原、抗体等生物大分子, 通过将高灵敏化学发光测定技术与高特异性免疫反应相结合, 因而其灵敏度高于 ELISA, 具有特异性强和可靠性高等特点, 广泛应用于检测人体临床标本。但该方法对人员和设备操作使用环境的要求比较高, 使用时需要配套专门化学发光仪器。中国科学院生物物理研究所阎锡蕴院士团队<sup>[50]</sup>开发了一种基于纳米酶的化学发光试纸, 对 SARS-CoV-2 抗体的检测限可达到 0.1 ng/mL, 时间仅需 16 min。

目前已经研发出 SARS-CoV-2 的 IgM 和 IgG 的抗体血清学试剂盒, 并且具有操作简便、灵敏度高且特异性好的优点。血清学测试不能单独用于判断患者是否受到病毒感染, 只能作为核酸检测的有益补充。其主要有以下几个局限性。首先, 抗体检测在检测人体体液中 SARS-CoV-2 的过程中, 操作人员可能会面临血液中 SARS-CoV-2 的威胁。为了避免这种风险, 可以将相应的血清或血浆溶液进行 56  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 的热处理<sup>[48]</sup>或者做好个人防护。其次对于早期 COVID-19 患者, 抗体产生处于“窗口期”时, 抗体检测的灵敏度只能达到 70%, 甚至无法检出, 而对于免疫力低下和产生抗体能力较弱的老年人来说, 其灵敏度会更低<sup>[51]</sup>。此外, 体液中有些药

物代谢物存在或者人体中类风湿因子的存在往往还会出现非特异性干扰。

### 2.3 抗原检测技术

抗原和病原体检测技术无需核酸提取的步骤, 有望成为一种现场检测技术。SARS-CoV-2 颗粒的检测存在感染操作人员的风险, 直接的病原体检测方法并不多见。抗原检测是利用 SARS-CoV-2 抗原蛋白的单克隆抗体来直接检测相应的抗原蛋白, 主要针对 S 蛋白和 N 蛋白等病毒固有的组织成分。抗原检测操作简单、快捷、成本低, 可用于大规模人群筛查作为在核酸检测基础上的补充, 以及满足欠发达地区快速筛查应用的需求。

用于抗体检测的侧流免疫层析(胶体金)法经过一些修饰也可以用于抗原的检测。由于具有快速、低成本、易操作的优势, 抗原快速检测装置(胶体金法)已经商品化并实现居家检测。Albert 等<sup>[52]</sup>评估了 Panbio<sup>TM</sup> COVID-19 Ag Rapid Test Device 在抗原检测方面的性能。在 412 名出现 COVID-19 感染症状的患者的检测中, 以 RT-qPCR 的检测结果作为参考, 该侧流免疫基的抗原快速检测装置的特异性和灵敏度分别为 100%和 79.6%。Baro 等<sup>[53]</sup>采集了 286 名无症状 COVID-19 患者的鼻咽拭子样品并进行抗原检测, 以此来评估 5 种商用的侧流免疫基抗原快速检测装置的性能。5 种抗原检测装置商品分别为 Panbio<sup>TM</sup> COVID-19 Ag Rapid Test、CLINITEST Rapid COVID-19 Antigen Test、SD Biosensor SARS-CoV Rapid Antigen Test、2019-nCoV Antigen Rapid Test Kit 和 COVID-19 Rapid Antigen Test Cassette。5 种抗原检测装置的检测灵敏度在 89.2% (Lepu medical)~99.5% (Abbott)。该团队基于检测结果认为侧流免疫基的抗原快速检测可以用于人群中 COVID-19 患者的大规模筛查。不同抗原快速检测装置的性能差别较大, 检测灵敏度总体来说较低。一些研究团队通过结合新型生物传感技术来提高检测灵敏度。Serebrennikova 等<sup>[54]</sup>将侧流免疫层析法和表面增强拉曼光谱技术联用, 检测 SARS-CoV-2 表面 S 蛋白的 RBD, 能够将检测限降低到原来的 1/10。

2021 年 11 月 3 日国家药监局应急审批通过广州万孚生物技术股份有限公司 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)抗原检测试剂盒(胶体金法)和北京金沃夫生物工程科技有限公司 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)抗原检测试剂盒(乳胶法)<sup>[55]</sup>。这两个我国首次批准的 SARS-CoV-2 抗原检测试剂, 产品检测时间在 15~30 min 之内。在病毒载量较高的急性

感染期,能够快速检出阳性病例,可以用于居家检测、感染人员早期分流和快速管理。抗原检测不能单独用于 SARS-CoV-2 感染的诊断,疑似人群抗原阳性结果应进行进一步核酸检测以确认。最终结合核酸检测、影像学等其他诊断信息及病史、接触史判断感染状态,从而判定是否感染病毒。

每种常规检测方法都具有其特点,现将各检测方法综合比较于表 1。

### 3 新型纳米生物传感技术

纳米生物传感技术是纳米技术与生物传感器的融合。纳米生物传感技术和生物传感器的原理类似,以待测物质为识别原件,通过敏感元件(感受器)和转化元件(换能器)将生物反应转化成可以识别的物理或化学信号。一方面,利用纳米材料独特的光学性能、电学性能、磁学性能以及表面活性有利于构建高特异性和高灵敏度的生物传感器;另一方面,纳米材料的尺寸和形状更容易调整,从而更有利于固定和修饰目标检测物质。新型纳米传感技术涉及到光学、电学、磁学等方面,从被检测的分析物来说,更包括了 SARS-CoV-2 抗原、抗体、核酸以及完整病原体等各种生物标志物。

#### 3.1 表面增强拉曼光谱基生物传感器

拉曼光谱是一种能够表征分子化学键振动的光谱,但相比于入射光的强度来说,拉曼光谱收集的散射光的强度较低,产生的拉曼信号较弱<sup>[56]</sup>。因此,引入表面增强拉曼光谱(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS),来解决拉曼光谱固有信号弱的缺点。表面增强拉曼是指在一些粗糙的纳米材料表面产生的拉曼信号增强的现象。SERS 的增强机理主要有电磁增强和化学增强,分别是由基底表面等离子体共振以及基底与被探测分子之间的电荷转移所引起的<sup>[57-58]</sup>。表面增强拉曼检测技术灵敏度高,一些 SERS 活性基底的检测能力甚至可以达到单分子水平。SERS 技术主要依赖于纳米级 SERS 活性基底的性能,所以纳米材料的制备技术,纳米材料的性质,如高表面能、团聚和分散状况、表面等离子体共振等,都会影响 SERS 基底的活性<sup>[59-60]</sup>。在医学检测方面,SERS 技术已经被广泛应用于癌症检测、病毒检测、生物成像等医学领域<sup>[61-65]</sup>。由于受到 SERS 基底本身非特异性的限制,基于 SERS 的生物传感器需要在基底表面修饰蛋白、抗体、适配体等生物分子以特异性捕获待测物质<sup>[65-69]</sup>。SERS 技术因其高灵敏度高、准确性、快速和低成本的特

点,已被用于 SARS-CoV-2 的快速检测及其传染性判断中。

SERS 技术分为两类,分别为标记法和无标记法 SERS 技术。标记法 SERS 技术是指在基底上标记具有较高拉曼散射截面的报告分子,通过合理设计 SERS 检测系统,使报告分子的拉曼信号和待测物的浓度成一定的比例,从而得到目标分子的浓度信息。标记法适用于目标分子的分子振动不具备拉曼活性或者拉曼活性较弱的情况,因此可以借助标记拉曼活性较强的报告分子来间接地检测待测物质。但是标记法 SERS 技术的设计较为复杂,而且因为不是直接收集待测物质的拉曼信号,无法对待测物质的分子结构进行解析,从而失去了拉曼信号作为指纹光谱的优势。此外,标记法的基底设计较为复杂,基底性能的稳定性比较难以保证。

无标记法 SERS 技术是直接收集待测物质的拉曼光谱,通过分析相应的拉曼振动光谱来解析待测物质的分子结构。特别是对需区分不同病毒以及识别病毒变异株来说,不仅可以从光谱振动的角度区分不同病毒,还能进一步分析和验证病毒核酸以及蛋白的实际变异特点。但是,对于生物大分子的无标 SERS 检测来说,生物大分子的光谱信号强度较弱、吸附方向不同而导致的光谱重复性较差等,都是无标 SERS 技术面临的重大挑战<sup>[70-72]</sup>。

随着 COVID-19 的大暴发,中国、美国、韩国和新加坡率先开展了 SERS 检测 SARS-CoV-2 的技术研发,处在世界领先水平。中国科学院上海硅酸盐研究所杨勇团队<sup>[56]</sup>报道了 SARS-CoV-2 的拉曼特征光谱及判定标准,首次报道了 Nb<sub>2</sub>C 材料具有优异的 SERS 活性,完成了对 SARS-CoV-2 S 蛋白的 SERS 检测和拉曼峰的准确识别,对 SARS-CoV-2 的实时监测和预警有重要意义。清华大学王大奕团队<sup>[67]</sup>报道了针对医疗污水中采用 SERS 方法检测 SARS-CoV-2 的工作,其准确性达到 93.33%。韩国中央大学报道了采用适配体修饰的 SERS 传感器检测 SARS-CoV-2 病毒,耗时不到 15 min,检测限优于 10 PFU/mL<sup>[73]</sup>(即 Plaque Forming Unit/mL,每毫升中的空泡形成单位,指每毫升试样中所含有的具有侵染性的、能致细菌裂解形成空泡的病毒数,当病毒裂解平板培养基上培养细菌后,就形成一个空斑,计为一个 plaque)。2022 年,新加坡南洋理工大学研究团队设计出一款基于 SERS 的呼气分析模型,可在 5 min 内完成 SARS-CoV-2 的筛查<sup>[74]</sup>。美国 SARS-CoV-2 研究权威机构约翰·霍普金斯大学利用大面积纳米压印光

表 1 常规 SARS-CoV-2 检测方法比较  
Table 1 Comparison of conventional detection methods for SARS-CoV-2

Object sample	Characteristic	Detection technology	Advantage	Disadvantage
RNA	1. Target: the gene sequences of SARS-CoV-2 2. Great producibility 3. Long detection period 4. Possibility of being contaminated and false positive result	Whole genome sequencing	1. High accuracy and sensitivity 2. Reflecting genetic information of pathogen comprehensively	1. Expensive special instruments 2. Relying on professionals 3. Difficulty in detection on a large scale
		RT-qPCR	1. High sensitivity and specificity 2. Low cost	1. Long amplification time 2. High requirements of equipment 3. Complex operation
		LAMP	1. Isothermal reaction 2. High efficiency and speed 3. High sensitivity and visualization	1. Complex design of primer 2. Low specificity
		Microfluidic chip	1. Multiple detection of pathogens 2. Integration of sample preparation and detection 3. Ability in automate analysis	Difficulty in chip design, material selection, processing, packaging, and storage
		ddPCR	1. High sensitivity and lowest limitation of detection 2. Facilitation and high degree of automation 3. Quantitative detection	1. Small reaction volume 2. Expensive equipment and reagents
Antibodies	1. Target: human antibodies stimulated by SARS-CoV-2 2. Easy sample collection and low detection threshold 3. Simple operation and high throughput 4. Limitation of timeframe 5. Lower sensitivity and specificity than those of nucleic acid detection	ELISA	1. Low difficulty of standardization of carrier 2. High sensitivity and specificity 3. Simple equipment	1. Long detection time and cumbersome steps 2. Limited single detection throughout
		LFIA (Colloidal gold method)	1. On-site detection caused by easy operation 2. High sensitivity and speed 3. Low cost 4. Mass production	1. Only qualitative analysis 2. Different reproducibility of different batches of products
		CLIA	1. High sensitivity and specificity 2. High throughput detection and high degree of automation	1. Special instrument 2. High detection cost
Antigen	1. Target: SARS-CoV-2 antigen 2. Simple and fast operation	LFIA (Colloidal gold method)	1. Fast and facile operation 2. Visualization 3. On-site detection and large-scale population screening	Low sensitivity

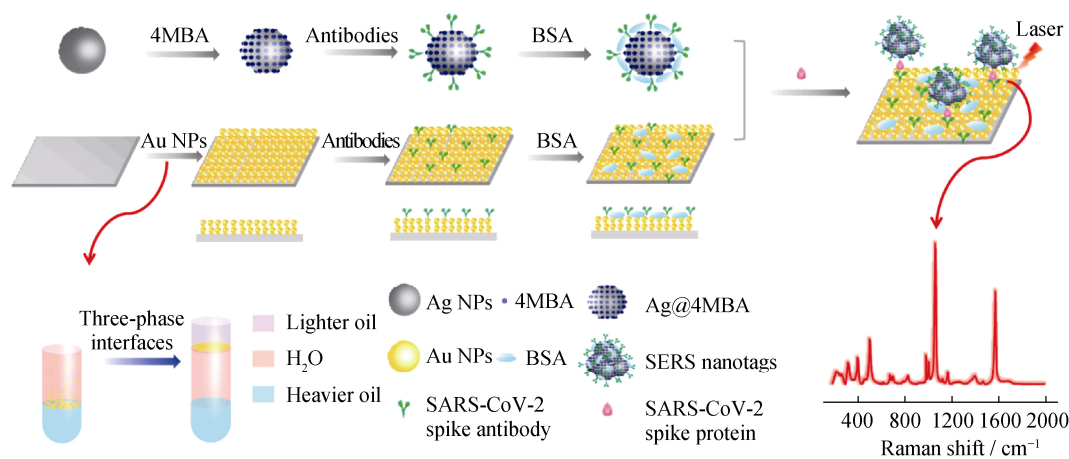
刻技术开发了一种基于表面增强拉曼光谱方法的 SARS-CoV-2 传感器, 结合机器学习技术, 可同时提高检测准确性和检测速度, 特别适用于大规模群体检测, 但其灵敏度改进后也只能达到  $10^3$  copies/mL 水平<sup>[75]</sup> (copies/mL 即病毒载量单位, 表示每一毫升血液中有多少病毒拷贝量, 1 copy 大致代表一个病毒)。

### 3.1.1 标记法 SERS 技术用于 SARS-CoV-2 检测

标记法 SERS 技术并不能直接获得待测物质的

光谱信息, 但是该方法具有较好的定量特性, 即 SERS 标记的拉曼强度和待测物质的浓度具有较强的线性关系<sup>[73,76]</sup>。标记法 SERS 检测平台由于其高灵敏度和快速的特点, 在 SARS-CoV-2 的快速检测中有着广泛的应用。

吉林大学刘小民团队<sup>[77]</sup>采用油/水/油液-液界面自组装的方法制备了 Au 纳米颗粒组装的双层膜, Au 膜表面修饰 SARS-CoV-2 抗体后可以作为免疫基底来检测 SARS-CoV-2 抗原(图 8)。该团队还设计了

图 8 SERS 基免疫平台示意图<sup>[77]</sup>Fig. 8 Schematic illustration of the SERS-based immunoassay<sup>[77]</sup>

MBA: thiosalicylic acid; BSA: bovine serum albumin; NPs: nanoparticles

The color figure can be obtained from online edition

一种标记法免疫 SERS 检测平台, 是一种由免疫 SERS 基底、探测分子以及抗体修饰的 Ag 纳米颗粒的 SERS 标签组成的“三明治”结构。这种基于 SERS 的免疫平台不会受到生物分子所处环境内杂质的干扰, 对未处理唾液中 SARS-CoV-2 S 蛋白的检测限可以达到 6.07 fg/mL, 且该检测平台具有优异的特异性和可重复性。美国杰克逊州立大学 Ray 等<sup>[66]</sup>制备了抗体修饰的 Au 纳米颗粒来检测 SARS-CoV-2 S 蛋白和假病毒, 他们利用不同大小金团簇呈现不同的等离子体共振峰, 从而显现出不同颜色的特点, 可以通过肉眼比色的方法快速判断是否存在 SARS-CoV-2, 具有较高的灵敏度, 其 SARS-CoV-2 S 蛋白的检测限为 1 ng/mL, 假病毒的检测限为 1000 vp/mL (即 virus particles/mL。前文还用到 PFU/mL 和 copies/mL 单位。这三种单位都可描述病毒载量, 测量病毒载量的方法和原理不同, 单位表示方法不一样。PFU 代表的是具有侵染性的病毒数, vp 包括不具侵染性的病毒, copy 包括尚未组装好的病毒)。此外, 基于标记法 SERS 技术能够进一步提高该检测系统的灵敏度, 能够在 5 min 内快速检测到浓度为 4 pg/mL 的 S 蛋白。该项研究还发现 S 蛋白和抗体修饰后的 Au 纳米颗粒结合后, 很难再与 ACE2 结合。可见, 抗体修饰后的 Au 纳米颗粒可以作为一种纳米疫苗, 有望实现检测和治疗一体的病毒诊疗方法。

标记法主要是通过检测 SERS 标签中报告分子的信号来间接检测 SARS-CoV-2, 所以报告分子的选择以及 SERS 活性基底的构建十分关键。通常选用纳米级 Au、Ag 这类具有强电磁场增强的贵金属作为基底, 选用 4-巯基苯甲酸(4-MBA)、4-氨基

硫酚、罗丹明 6G(R6G)等含有-SH/-NH<sub>2</sub> 基团的报告分子, 通过强的静电相互作用形成强结合力的 Ag/Au-S/N 键。

### 3.1.2 无标记法 SERS 技术用于 SARS-CoV-2 检测

无标记法 SERS 技术不仅可以快速筛选和诊断 SARS-CoV-2 携带者, 而且还可以根据待测物质(核酸、抗原、抗体或者病原体)的光谱信息来进一步解析 SARS-CoV-2, 包括区分病毒种类、识别病毒变异株以及判断病毒传染性等。

Daoudi 等<sup>[78]</sup>制备了银纳米粒子/硅纳米线(AgNPs/SiNWs)复合物, 通过对 SiNWs 长度的优化以及 AgNPs 浸没时间的调控, 对 SARS-CoV-2 S 蛋白中 RBD 的检测限为 10<sup>-12</sup> mol/L。在该项工作中, RBD 的 SERS 光谱重复性较差, 主要是生物大分子在 SERS 基底表面的吸附位点不同造成的。为了获得更好的光谱重复性, 研究者们通过在纳米基底上修饰 ACE2 或者特异性抗体来定向捕获待测物质。同时, 特异性修饰的 ACE2 或者抗体还会赋予 SERS 基底特异性, 从而有效地避免了保存液中杂质的干扰。

中国科学院上海硅酸盐研究所 SERS 技术精准捕获和检测 SARS-CoV-2 领域开展了系统研究, 取得了一系列开创性研究成果。所开发的传感器具有 ACE2 功能化的金纳米“森林”结构, 能选择性捕获 SARS-CoV-2, 其检测灵敏度达到了单病毒水平(即 1 copy 水平)(图 9)<sup>[8, 79]</sup>。源于特殊纳米“森林”结构及 ACE2 对 SARS-CoV-2 表面 S 蛋白的高亲和力, 该传感器在水中富集病毒能力提升了 10<sup>6</sup> 倍。源于特殊设计的金纳米结构产生的多效应 SERS 增强机制, 该传感器对病毒的 Raman 信号增强达到了 10<sup>9</sup> 倍。借



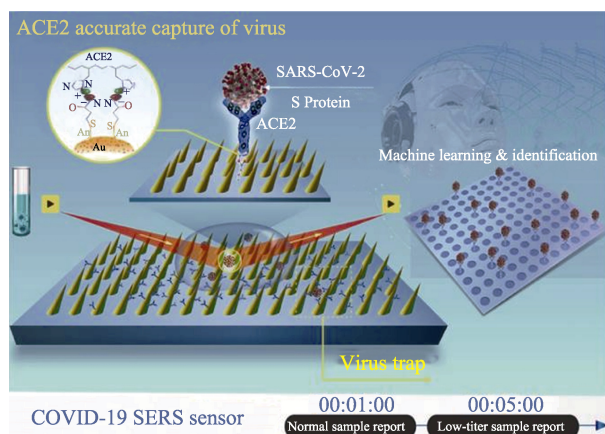


图 9 SERS 生物传感器精准捕获待检 SARS-CoV-2 病毒示意图<sup>[8]</sup>

Fig. 9 Schematic diagram of operation procedure of COVID-19 SERS sensor<sup>[8]</sup>

The color figure can be obtained from online edition

助于机器学习手段建立了病毒诊断信号标准和方法, 对 SARS-CoV-2 最佳检测限达到了 80 copies/mL, 时间仅需 5 min。这对 SARS-CoV-2 现场临床检测具有非常重要的意义。并开创性地提出了一种基于超敏 SnS<sub>2</sub> 微米球衬底的两步 SERS 检测法(图 10), 建立了 SARS-CoV-2 S 蛋白和 RNA 的 SERS 信号识别标准, 将其用于甄别环境中 SARS-CoV-2“死活”及传染性, 解决了目前 PCR 技术尚不能解决的环境中 SARS-CoV-2 传染性诊断的问题, 对当前 SARS-CoV-2 肆虐局势下避免疫情误判具有重要意义<sup>[80]</sup>。

无标记法 SERS 技术虽然可以增强目标分析物的拉曼信号强度, 但是生物分子自身的拉曼散射截面较小, 即使在增强的情况下, 一些振动的拉曼信号还是较染料分子的拉曼信号弱。不同保存液中杂质的影响以及生物大分子在 SERS 基底表面吸附方向的差异, 使得 SARS-CoV-2 的拉曼峰归属还未成系统。因此, 目前无标记 SERS 技术主要检测 SARS-CoV-2 的标记物 S 蛋白和完整的 SARS-CoV-2。

### 3.1.3 纳米技术在 SERS 基生物传感器中的应用

无论是标记法还是无标记法 SERS 技术, 目前在 SARS-CoV-2 检测中所涉及到的 SERS 基底大多是纳米级的贵金属基底。SERS 基底的制备方法可以大致分为化学法和物理法两种。化学法有常用的湿化学法合成、油/水/油液-液自组装、水热法等, 物理法有离子溅射、磁控溅射等<sup>[56,66-67,79-83]</sup>。相比于化学法来说, 物理法制备的基底具有较为规则的阵列结构, 能够根据检测需求构建更为均匀的“热点”结构, 耦合产生更强的电磁场增强, 从而实现更高的检测灵敏度。此外, 相比于化学法制备的纳米材料, 物理法制备的具有纳米结构的基底更易大规模

生产。化学法合成 SERS 基底步骤简单且对设备要求较低。在化学法制备基底的过程中, 为了抑制高表面能的纳米材料的团聚, 会使用各种表面活性剂, 如柠檬酸钠、聚醚酰亚胺(PEI)、聚乙二醇(PEG)等。表面活性剂会引入基底峰, 而一些物理法制备的 SERS 基底可以有效地避免这些基底峰。

## 3.2 表面等离子共振生物传感器

表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)生物传感器是通过等离子共振波和金属表面目标分子相互作用引起的折射率的变化来实现目标物质的检测, 具有实时、无标记、高性价比、无损、良好的重复利用性以及优异的再现性等优点<sup>[84-85]</sup>。然而, SPR 生物传感器检测所需的样品的体积以及功耗较大, 并且基于 SPR 的生物传感器或者设备的灵敏度以及分辨率依旧需要进一步提高, 这些缺点阻碍了 SPR 生物传感器用于生物医学的检测<sup>[86-87]</sup>。为了解决这些问题, 纳米材料、微流控设备、紧凑型以及无电源泵等已经尝试集成在 SPR 生物传感系统中。

### 3.2.1 SPR 基生物传感器用于 SARS-CoV-2 检测

SPR 基生物传感器也被广泛用于 SARS-CoV-2 的快速检测。Yano 等<sup>[88]</sup>构造了 Au 基-SARS-CoV-2 N 蛋白-抗体修饰的 Au 纳米粒子三明治结构, 利用 SPR 技术检测 SARS-CoV-2, N 蛋白的检测灵敏度达到了 fmol/L 水平。该团队将该系统优异的灵敏度归结于 Au 纳米颗粒和 Au 基底之间的表面等离子体共振的耦合作用以及大粒径 Au 颗粒(约 150 nm)的使用。通过实验和电磁场模拟, 他们认为相比于几十纳米的 Au 纳米颗粒来说, ~150 nm 的 Au 颗粒更有利于大分子分析物的检测。来自华中科技大学生命科学与技术学院国家纳米药物工程技术研究中心、复旦大学附属上海市公共卫生临床中心、量准(上海)实业有限公司等机构与企业的人员成功研发了基于新型纳米等离子光学芯片技术的高灵敏度光学检测系统, 可以快速特异性测量样品中的 SARS-CoV-2 颗粒的浓度, 使得 SARS-CoV-2 肺炎早期无症状感染现场快速无创检测成为可能(图 11)<sup>[89]</sup>。该研发团队开发了纳米等离子光学共振芯片, 具有由介电材料所包围金属超材料纳米结构中的电子气体集体振荡产生的特殊光学性质。借助这种传感器芯片, 仅用常规的普通设备如光学显微镜或酶标仪等就能完成病毒表面蛋白和抗体之间结合过程的定量分析测定。实验结果表明, 目前该系统进行无标记 SARS-CoV-2 定量检测, 最低检测限为 370 vp/mL, 这样的灵敏度可以满足唾液中的 SARS-CoV-2 浓度快速检测的要求。

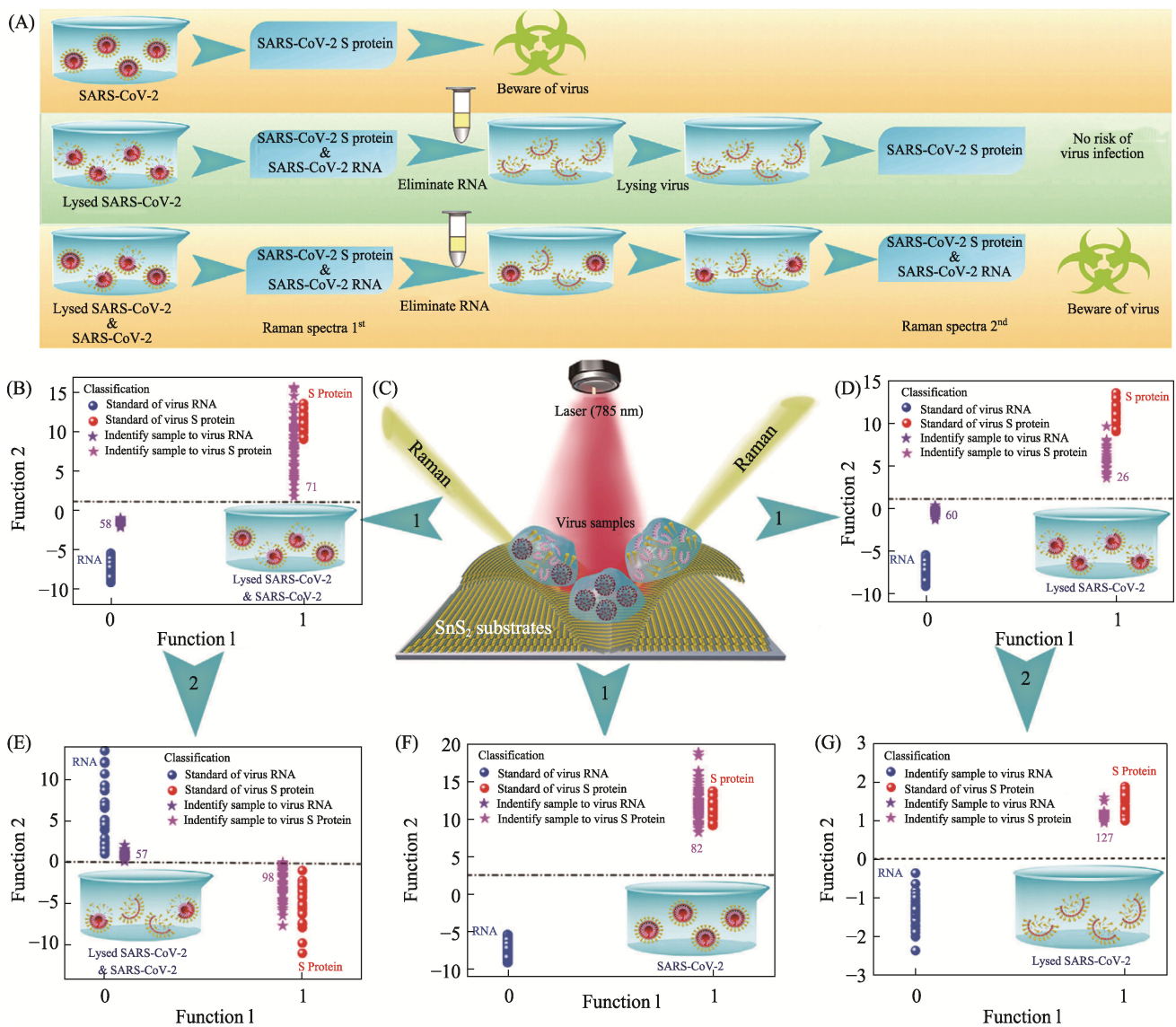


图 10 基于  $\text{SnS}_2$  微球的两步 SERS 检测法诊断 SARS-CoV-2 活性及其传染性<sup>[80]</sup>

Fig. 10 Application of  $\text{SnS}_2$  microspheres for diagnosing the infectiousness of SARS-CoV-2<sup>[80]</sup>

(A) Experimental procedure for diagnosing the infectiousness of SARS-CoV-2; (B) SVM analysis results to identify the mixture of the SARS-CoV-2 with complete viral structure and the lysed SARS-CoV-2; (C) Raman scattering diagram of three contamination situations of the novel coronavirus based on  $\text{SnS}_2$  substrates; (D) SVM analysis results to identify the lysed SARS-CoV-2; (E) SVM analysis results to identify the mixture of the SARS-CoV-2 with complete viral structure and the lysed SARS-CoV-2 after eliminating RNA and relaying virus samples; (F) SVM analysis results to identify the SARS-CoV-2 with complete viral structure; (G) SVM analysis results to identify the lysed SARS-CoV-2 after eliminating RNA and relaying virus samples. SVM: support vector machine

The color figure can be obtained from online edition

### 3.2.2 纳米技术在 SPR 基生物传感器中的应用

基于 SPR 的生物传感器和纳米材料/纳米结构产生的表面等离子体共振直接相关, 所以 SPR 生物传感器材料的制备也涉及到多种传统或新型的纳米材料的制备与微纳加工技术。SPR 技术主要分为两类, 分别为传播型表面等离子体共振技术(通常简称为 SPR)和局域型表面等离子体共振技术(Local-Surface Plasmon Resonance, LSPR)。基于传播型 SPR 技术的核心是基底微纳结构的设计, 主要方法有光刻法、电子束刻蚀法、聚焦离子束刻蚀法、纳米球自

组装法。而基于 LSPR 的纳米材料与材料的材质、几何形状、尺寸以及纳米颗粒之间的距离有关<sup>[90]</sup>。制备该基底材料的方法主要有湿化学法、电化学法以及水热法。其中, 湿化学法是最常用的制备方法。为了克服 SPR 检测技术的低灵敏度限制, 研究人员将传播型 SPR 技术和 LSPR 技术结合起来, 使它们互相耦合激发, 设计出复合 SPR 传感器, 从而极大地提高了传感性能。

### 3.3 荧光生物传感器

荧光生物传感器(Fluorescence biosensors)是一



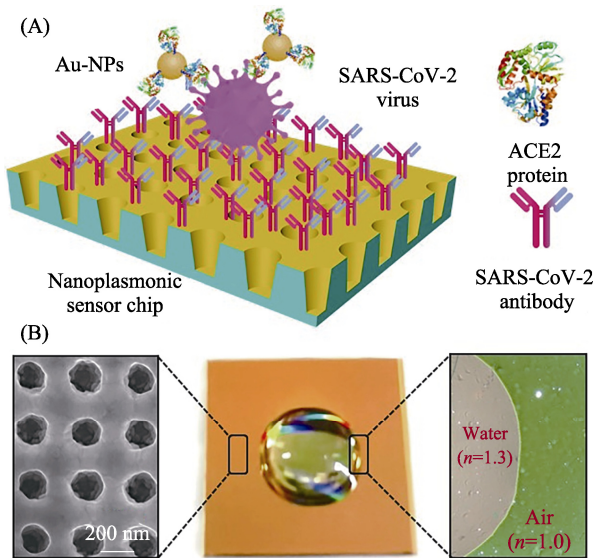


图 11 纳米等离子光学传感芯片检测 SARS-CoV-2 颗粒示意图<sup>[89]</sup>

Fig. 11 Schematic diagram of nano-plasma optic sensor for detection of SARS-CoV-2<sup>[89]</sup>

(A) Schematic diagram of the nanoplasmonic resonance sensor for determination of SARS-CoV-2 pseudovirus concentration; (B) Photograph (middle) of one piece of Au nanocup array chip with a drop of water on top

The color figure can be obtained from online edition

种传染病现场检测的常用方法, 具有高灵敏度、低成本、易操作、易分析的优点<sup>[91-95]</sup>。荧光分子是构建荧光生物传感器中重要的一部分, 荧光分子包括荧光染料和荧光纳米材料。在构建荧光生物传感器过程中, 最常用的策略为荧光共振能量转移理论 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), 涉及能量从荧光供体转移到荧光受体的过程<sup>[96-98]</sup>。一些纳米材料由于自身独特的物理、化学、电子传输性质也可以产生荧光信号, 从而在荧光生物传感器中得到广泛的应用<sup>[99]</sup>。

### 3.3.1 荧光生物传感器用于 SARS-CoV-2 检测

荧光生物传感器根据在检测过程中荧光产生和淬灭的现象分为三类, 分别是直接荧光标记的生物传感器、“signal-on”荧光传感器和“signal-off”荧光传感器。直接荧光标记的传感器是指将荧光标签直接修饰在特异性的配体上, 当此配体选择性地结合目标物质时, 就会产生荧光信号。“signal-on”荧光传感器是指荧光信号的强度和目标物质浓度成正比, 在目标物质不存在时, 荧光信号的强度几乎可以忽略不计。“signal-off”荧光传感器正好相反, 其荧光信号的强度和目标物质的浓度成反比, 当不存在目标物质时, 荧光强度最高。本文重点讨论以荧光纳米材料作为荧光分子的生物传感器, 主要关注此类荧光生物传感器在 SARS-CoV-2 检测中的应用以及所涉

及到的荧光纳米材料及其制备方法。

荧光纳米材料往往制备简单, 生物相容性好, 荧光性能稳定, 易于修饰和标记生物分子。荧光生物传感器中的荧光纳米材料可以有效地降低背景信号, 提高检测灵敏度和准确性。基于荧光纳米颗粒的荧光生物传感器已被用于 SARS-CoV-2 抗原、抗体以及病原体的检测。电子科技大学郭劲宏团队<sup>[100]</sup>提出一种 5G 支持的荧光生物传感器, 联合侧流免疫来定量检测 SARS-CoV-2 S 蛋白和 N 蛋白, 所使用的荧光纳米材料为介孔二氧化硅包覆的上转换发光纳米颗粒。这种荧光基的检测平台对 S 蛋白的检测限为 1.6 ng/mL, 对 N 蛋白的检测限为 2.2 ng/mL。此外, 该团队设计的 5G 支持的荧光传感平台可以和一些硬件(个人电脑、5G 智能手机等)通过互联网联系起来, 一些医疗数据可以通过蓝牙传输到个人硬件的应用软件上, 从而实现患者能随时记录自己的医疗数据并自主监控病情(图 12)。南昌大学黄小林团队<sup>[101]</sup>制备了具有发光效率的量子点, 该量子点作为荧光标签, 经过 SARS-CoV-19 抗原修饰后, 结合侧流免疫能够在 15 min 内完成抗体检测。基于荧光量子点侧流免疫的检测灵敏度优于基于 Au 纳米颗粒的侧流免疫分析平台, 山东大学韩琳团队<sup>[102]</sup>将基于纳米材料的荧光生物传感器集成在微流控系统中, 对 SARS-CoV-19 的 RNA 进行高通量检测。该检测系统无需提取 RNA 等样品处理步骤, 能够在 40 min 内完成 15 个样品的检测。此外, RNA 浓度在 1 amol/L~1 fmol/L 之间有较好的线性关系, 检测系统对 SARS-CoV-2 的检测限为 600 copies/mL。

### 3.3.2 纳米技术在荧光生物传感器中的应用

荧光生物传感器中的荧光纳米材料可以大致分为两类: 荧光纳米材料和荧光淬灭纳米材料。常用的荧光纳米材料有碳量子点、石墨烯量子点、二硫化钼量子点、金属纳米簇等<sup>[103-104]</sup>。量子点与传统的有机荧光染料分子相比, 具有更高的荧光强度, 更稳定的荧光性能等特点。此外, 碳量子点的合成方法简单多样, 成本低, 绿色, 无毒且具有优异的生物相容性。金属纳米簇是由 2 nm 左右的金属纳米颗粒组成, 可以使用模板法合成。一般使用核酸、蛋白质多肽为模板, 在还原剂的作用下, 将金属离子还原成聚集的金属原子, 模板法合成的金属团簇可以免去探针标记的步骤<sup>[105-106]</sup>。荧光淬灭纳米材料通常包括氧化石墨烯、碳纳米管、贵金属纳米材料、金属氧化物材料等。碳纳米材料具有大的比表面积以及宽的吸收光谱范围, 能够吸收各类荧

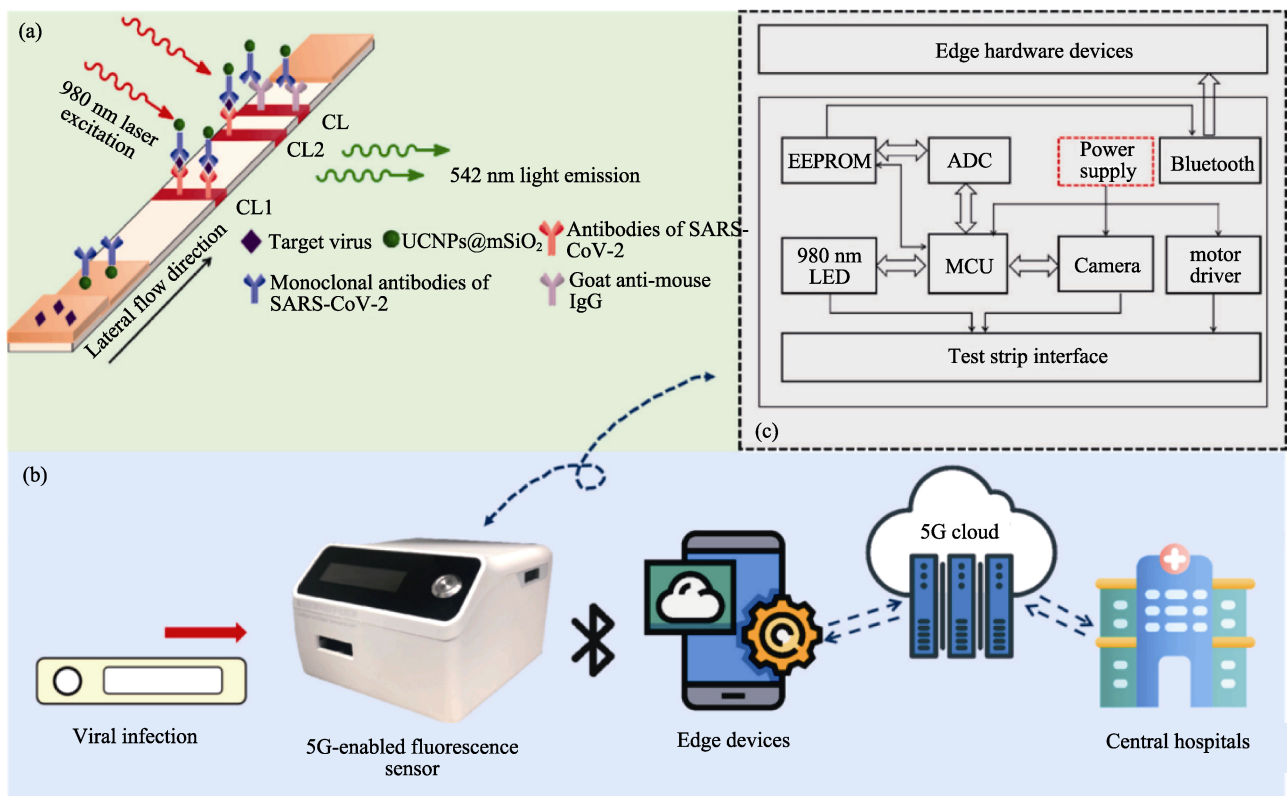


图 12 基于 5G 支持的荧光生物传感器用于 SARS-CoV-2 检测<sup>[100]</sup>

Fig. 12 SARS-CoV-2 detection based on 5G-enabled fluorescence biosensor<sup>[100]</sup>

(a) The principle of the UCNPs based lateral flow assay in detection of SARS-CoV-2; (b) The working process of the proposed 5G-enabled fluorescence sensor; (c) The circuit configuration and hardware composition of the fluorescence sensor; CL: control line; TL1: test line 1; TL2: test line 2; UCNPs: up-conversion nanoparticles; EEPROM: electrically erasable programmable read only memory; ADC: application data center; MCU: motor control unit  
The color figure can be obtained from online edition

光物质的荧光,所以在荧光生物传感器中常作为荧光受体使用<sup>[107]</sup>。贵金属金纳米颗粒由于具有宽的光谱吸收范围也常用作荧光淬灭材料<sup>[108]</sup>。金属氧化物如磁性的四氧化三铁纳米颗粒,可以降低背景信号,从而提高检测的灵敏度<sup>[109]</sup>。

### 3.4 电化学生物传感器

电化学生物传感器(Electrochemical biosensors)是一种高灵敏度和高特异性的定量和半定量分析技术。它通过电位法、安培法、电导法、极谱法、电容法或压电法工作<sup>[110-112]</sup>。电化学传感器中有效的物理传导取决于工作电极,敏感层是电极和分析环境之间的界面<sup>[113]</sup>。产生的电流和现存的或者产生的电活性物种的浓度直接相关,电化学生物传感器的传感元件必须是导体,并且在导体表面进行一定的修饰后可以特异性地识别和吸附目标分子<sup>[110]</sup>。电化学生物传感器检测时间短、装置简单、成本低且便携性高,有望成为现场检测的重要手段<sup>[114-115]</sup>。

在设计电化学传感器过程中,选择合适的材料十分重要。当电化学反应发生时,这种材料在当前电势下必须是惰性的。目前经常使用的固体电极主

要是金属,如金、银、镍、铜等。金属纳米颗粒或者纳米结构的金属电极具有高的比表面积,且易于修饰和标记,能够提高电化学传感器的灵敏度、特异性以及准确率。电化学传感器经常被用于病毒检测中,主要是由于其电极表面易于修饰且具有较高的生物相容性。对于电化学传感器来说,合适的表面修饰能够缩短检测时间。电化学传感器主要分为:伏安/安培生物传感器(Voltammetric/ampereometric biosensors)<sup>[116-117]</sup>、阻抗生物传感器(Impedimetric biosensors)<sup>[118-120]</sup>、电位生物传感器(Potentiometric biosensors)<sup>[121]</sup>和基于场效应晶体管的生物传感器(Field-Effect Transistor (FET) based biosensors)<sup>[122-123]</sup>四种。电化学传感器作为一种新型的传感平台,在 SARS-CoV-2 抗原、抗体、核酸的检测方面都有着广泛的应用。

#### 3.4.1 伏安/安培生物传感器

伏安/安培生物传感器具有高灵敏度的优点,这使其成为最常使用的电化学传感器<sup>[124]</sup>。迄今为止,伏安生物传感器发展了多种方法,包括循环伏安法、线性扫描伏安法、方波伏安法和微分脉冲伏安法<sup>[116, 125]</sup>。



伏安和安培生物传感器都是通过工作电极上电氧化和还原引起的电解产生的电流, 而实现对目标物质的检测。在伏安生物传感器中, 工作电极施加的电势是恒定速率递增的方式。电位生物传感器中, 则是以恒定速率施加电势<sup>[126]</sup>。

伏安法生物传感器是电化学生物传感器中最常用的一类传感器, 在 SARS-CoV-2 的快速检测方面也有广泛的应用。El-Said 等<sup>[127]</sup>构建了均匀的 Au 微立方体作为电极, 使用循环伏安法和方波伏安法来检测 SARS-CoV-2 的 S 蛋白, 检测限为 276 fmol/L。该方法用于 COVID-19 患者的鼻拭子临床样品, 得出的检测结果和 PCR 一致。由于 Au 电极的使用, 该电化学生物传感器还可以进一步结合 SPR 技术和 SERS 技术, 制备多模式的生物传感器, 从多个角度提高检测的准确性。Fabiani 等<sup>[126]</sup>利用基于磁珠和炭黑丝网印刷电极的电化学传感器检测 SARS-CoV-2 的 S 蛋白和 N 蛋白(图 13)。该传感器能够在 30 min 内通过伏安曲线的变化检测到未处理唾液中的目标物质, S 蛋白和 N 蛋白的检测限分别为 19 和 8 ng/mL。与 RT-qPCR 的检测结果相比, 该电化学生物传感器的检测结果与其一致, 且具有更快的检测时间。Alafeef 等<sup>[128]</sup>构建了一种快速 ( $\leq 5$  min)、低成本、容易操作、具有定量性质的电化学生物传感器用于检测 SARS-CoV-2 的 RNA, 临床样品中检测的灵敏度为 6.9 copies/mL。该传感器使用的是可以特异性捕获 N 蛋白的单链 DNA (Single Strand DNA, ssDNA) 修饰后的 Au 纳米颗粒。在对 22 个 SARS-CoV-2 阳性和 26 个 SARS-CoV-2 阴性的

临床样品的检测中, 该电化学传感器具有 100% 的准确率、特异性和灵敏度。以上对于临床样品的检测结果可以证明电化学生物传感器可用作 COVID-19 的现场实时诊断测试。

### 3.4.2 阻抗生物传感器

阻抗生物传感器是另外一种常用的生物传感器, 具有高灵敏度和低振幅的优点, 是通过电化学阻抗谱(EIS)来实现目标物质的检测<sup>[129-132]</sup>。电化学阻抗是增加的电压变化和产生的电流变化的比值, 电化学阻抗谱可以通过频率变化的小振幅正弦交流激励信号来确定电阻和电容的分量。当频率相当高时, 氧化还原物种在迁移到电极表面时受到目标分析物的阻挡会限制速率, 从而在交流电压和电流之间产生频率依赖的相位滞后。电化学阻抗谱可以基于法拉第模式和非法拉第模式。法拉第模式的 EIS 涉及到电极之间的电荷转移, 需要添加氧化还原对; 而非法拉第的 EIS 不需要添加额外的试剂, 其电容的变化是通过电极-电解质界面上的电荷分离产生的<sup>[133]</sup>。

Aydin 等<sup>[134]</sup>构建了一种可靠且快速的 SARS-CoV-2 抗原 RBD 区域的检测方法。首先是使用循环伏安法, 在炭黑存在的条件下, 合成了环氧官能团取代的噻吩单体, 并使用电沉积的方法沉积在一次性使用的氧化铟锡平台(Indium Tin Oxide, ITO)上, 从而得到高导电性纳米复合物。这个纳米复合物为抗体结合提供了合适的吸附位点, 有利于进一步构建阻抗式生物传感器。固定在纳米复合物上的 Anti-RBD 和 RBD 之间的免疫特异性结合, 会阻碍 ITO 基底表面和电解质之间的电荷转移, 从而造成阻抗信号的变化, 并且该信号的变化和捕获的 RBD 浓度成正比。该生物传感器具有优异的灵敏度(检测下限为 0.58 fg/mL)、稳定性、可重复性以及循环使用能力。Lorenzen 等<sup>[135]</sup>报道了一种基于阻抗法的电化学生物传感器, 用于检测人体血液样本中的抗体。阻抗生物传感器的修饰电极是由电化学合成的 PEDOT(Poly (3,4-ethylenedioxythiophene)) 和部分核蛋白, 即氨基酸残基(aa)160~406 修饰后的 Au 纳米颗粒组成。这个方法是通过分析待测样品结合前后电荷转移阻抗的变化来确定是否存在抗体, 并线性定量抗体浓度, 具有快速 ( $\leq 30$  min) 和高特异性的优点。Peng 等<sup>[136]</sup>提出了一种基于阻抗法和伏安法的高灵敏度电化学传感器来检测 SARS-CoV-2 的 RNA, 该传感器对 RNA 的检测限可以达到 26 fmol/L(图 14)。在该电化学传感器工作时, 若存在目标 RNA, 则会触发催化物质和引起末端脱氧核苷酸酶介导的 DNA 聚合, 从而产生

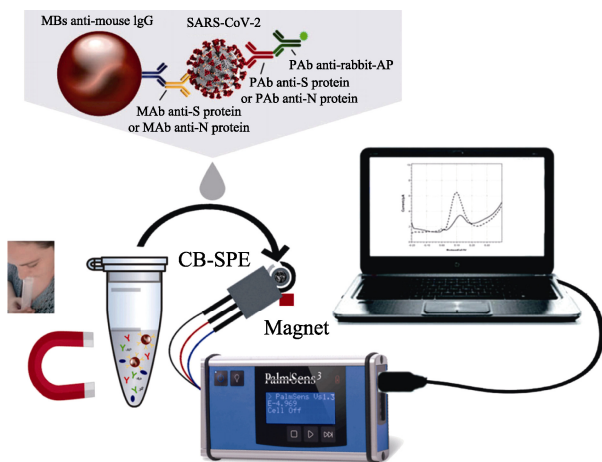


图 13 用于检测未处理唾液中 SARS-CoV-2 的磁珠基电化学分析平台<sup>[126]</sup>

Fig. 13 Magnetic beads-based electrochemical assay for SARS-CoV-2 detection in untreated saliva<sup>[126]</sup>

MBs: magnetic beads; MAb: monoclonal antibody; PAB: polyclonal antibody; AP: alkaline phosphatase; CB-SPE: carbon-based screen-printed electrodes

The color figure can be obtained from online edition

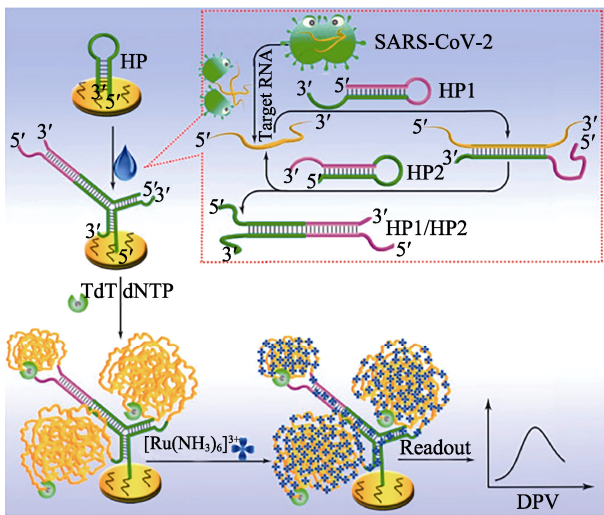


图 14 基于电化学生物传感器分析 SARS-CoV-2 RNA 的检测原理<sup>[136]</sup>

Fig. 14 Principle of the proposed electrochemical biosensor for sensitive analysis of SARS-CoV-2 RNA<sup>[136]</sup>

HP: hairpin; TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase; dNTP: deoxyribonucleotides; DPV: differential pulse voltammetry

The color figure can be obtained from online edition

大量的 ssDNA。由于静电吸附, 这些带负电荷的 ssDNA 会和大量带有正电的电化学活性分子结合, 从而放大电化学信号。该研究团队基于提出的电化学传感器来检测临床的 SARS-CoV-2 样品, 显示出高度稳定性。

### 3.4.3 电位生物传感器

电位生物传感器通过指示电极的电位变化来表示目标物质浓度或活度的变化<sup>[137-138]</sup>。对于生物检测, 电位传感器通常使用酶催化化学反应, 并在电极附近产生离子<sup>[138]</sup>。电位生物传感器具有体积小、响应快、使用方便、成本低、抗干扰能力强、不依赖样品体积等优点, 具有成为 SARS-CoV-2 现场检测工具的潜力。

SARS-CoV-2 侵入人体后, 不仅会引起血液内抗体数量的变化, 对于人体的一些新陈代谢以及酶促反应等也会有一定影响。有研究报告, 在 COVID-19 严重感染的阶段, 胆碱酯酶水平会降低。Eldin 等<sup>[139]</sup>提出一种微纳制造的电位型生物传感器用于监测临床患者血液中乙酰胆碱酶促降解的动态过程。该传感器以纳米结构的铜作为电极, 并通过化学聚合在电极表面沉积一层石墨烯充当传导层。这个诊断方法具有重大意义, 不仅可以评估患者是否需要做乙酰胆碱的检查、确定乙酰胆碱的剂量, 还可作为便携且低成本的诊断装置能够无需医疗人员介入, 自动读数, 并推荐治疗方案以及反映患者处于疾病的哪种阶段。Perschina 等<sup>[131]</sup>使用多层聚合物电解质构建了一种碳纤维基的电位型传

感器来检测 SARS-CoV-2 患者的生物流体内的离子浓度。聚乙烯亚胺/聚苯乙烯磺酸盐复合物具有吸湿性, 并且能够保留无机盐的离子簇。聚乙烯亚胺/聚苯乙烯磺酸盐复合物的形成允许疏水离子选择膜的粘附, 并在微型传感器系统中产生能斯特响应。这个基于离子选择型电极的生物传感器能够检测到 SARS-CoV-2 患者尿液或者血液中  $\text{Na}^+$  或者  $\text{K}^+$  的浓度变化, 继而评估患者的病程。

电位型生物传感器在 SARS-CoV-2 检测方面还未实现对抗原、抗体及病原体的检测, 但是该方法可以通过检测患者体内的离子平衡或者酶促反应等过程来了解患者的感染状态, 对患者的病程进行解析, 推荐用药剂量以及治疗手段。

### 3.4.4 基于场效应晶体管的生物传感器

基于场效应晶体管的生物传感器也属于一类电化学传感器, 用于检测带电目标物质在传感器表面累积而造成电场中电导率的变化<sup>[140-145]</sup>。该类传感器具有无标签、小型化、易于批量化生产、通用性强和成本低的优点, 是 SARS-CoV-2 现场检测手段的理想候选者<sup>[145-147]</sup>。

Shao 等<sup>[148]</sup>报道了一种高纯度半导体单壁碳纳米管基的场效应晶体管, 通过特异性的化学修饰检测 SARS-CoV-2 肺炎患者鼻咽拭子样本中的抗原。S 蛋白抗体和 N 蛋白抗体修饰的 FET 传感平台对 S 蛋白的检测限为 0.55 fg/mL, 对 N 蛋白的检测限为 0.016 fg/mL, 并且可以准确地区分阴/阳性样品。Li 等<sup>[149]</sup>构建了一种 Au 纳米颗粒修饰的石墨烯基的场效应晶体管, 然后将互补的磷酸二酰胺吗啡寡聚物 (PMO) 探针修饰在 Au 纳米颗粒的表面(图 15)。这种传感器可以在 2 min 内完成 SARS-CoV-2 RdRp 高灵敏度测试, 咽拭子中的检测限为 2.29 fmol/L。而且,

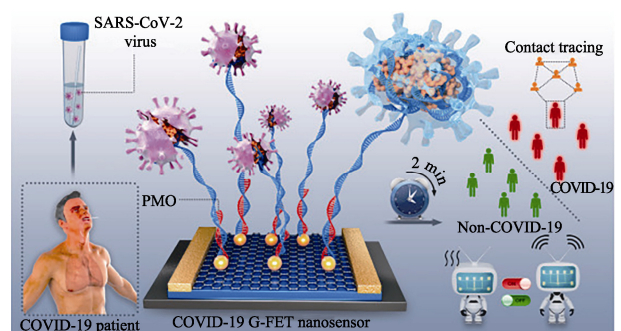


图 15 基于 PMO 修饰的 G-FET 纳米传感器快速直接识别 SARS-CoV-2 的示意图<sup>[148]</sup>

Fig. 15 Schematic diagram of rapid direct identification of SARS-CoV-2 using PMO-functionalized G-FET nano-sensors<sup>[148]</sup>  
G-FET: graphene field-effect transistor; PMO: phosphorodiamidate morpholino oligos

The color figure can be obtained from online edition

由于 PMO 不会产生电荷, 背景信号较低。利用该传感器对 30 例真实临床样品测试, 其结果和 RT-qPCR 具有高度一致性。该研究团队进一步使用构造的传感器成功区分了 SARS-CoV-2 RdRp 和 SARS-CoV RdRp。复旦大学魏大程团队<sup>[150]</sup>构建了分子机电系统, 将 SARS-CoV-2 核酸片段和石墨烯场效应的晶体管进行组装, 能够在 4 min 内检测到 SARS-CoV-2。

电化学传感器具有响应速度快、操作简单、成本低、检测设备小型化的特点, 但是商业化还存在一定挑战。首先大部分电化学传感器检测都处于实验室阶段, 处于外界实际环境中时, 部分电化学传感器的稳定性欠佳。其次, 目标物质如 S 蛋白或者 N 蛋白在非洁净的电化学检测平台上如何保证结构不会遭到污染和破坏, 并保证检测结果的可信度, 尚缺乏相关试验。此外, 临床样本是比较复杂的, 病毒/蛋白/核酸的生物环境复杂且保存液的成分也会有所差异, 电化学传感器的灵敏度是否会受到影响, 能否保证结果的稳定性, 尚需验证。当然, 对于各类新型传感器来说, 如何保证检测人员不受到病毒感染也是一个关键问题。

### 3.4.5 纳米技术在电化学生物传感器中的应用

纳米材料在生物传感器中主要作为传感器敏感界面的修饰材料或者固载生物分子的材料。纳米材料具有大比表面积和高表面能等特点, 可作为一种活泼的电子受体或者电子供体。经过纳米材料修饰的电极可以显著提高电极的比表面积, 提高电极的导电性, 固载更多的生物分子, 提高传感器检测的灵敏度和稳定性, 加快传感器的响应<sup>[151]</sup>。

电化学生物传感器中常用的纳米材料有贵金属纳米材料、碳纳米管、石墨烯、磁性氧化物纳米颗粒等。以金纳米颗粒为代表的贵金属纳米颗粒除了具有大比表面积和高表面能, 还具有催化效率高、吸附力强、优异的生物相容性, 可有效地固载和标记目标生物分子。此外, 金纳米粒子具有优异的电化学活性, 能够有效地提高电子传输效率。Au 纳米颗粒还可以通过 Au-S 键和 Au-N 键形成强共价结合, 有利于含巯基和氨基的生物分子的配合<sup>[152]</sup>。碳纳米管和石墨烯这类纳米级的碳材料都具有大的比表面积和超强的电子传导能力。这类碳材料的修饰能够在很大程度上提高电极的电化学活性、提高检测灵敏度、增大电流信号、缩短电化学生物传感器的响应时间<sup>[112,153-154]</sup>。磁性纳米颗粒可以修饰在电极表面来提高电极的比表面积, 也可以作为固载生物分子的材料, 提高电化学检测的选择性、特异性和灵敏度, 避免生物环境中其他杂质对目标分子物质的干扰。

## 3.5 磁性生物传感器

磁性生物传感器(Magnetic biosensors)在过去二十年引起了研究者的广泛关注, 该生物传感器可以分为基于表面和基于体积的磁性生物传感器(Surface-based and volume-based magnetic biosensors), 被广泛用于病毒、病原体、癌症标志物的检测中<sup>[155-157]</sup>。在磁性生物传感器中, 通常使用适当的抗体或者 DNA/RNA 探针修饰后的磁性纳米颗粒作为磁性纳米标签<sup>[158]</sup>。这些磁性纳米标签可以巧妙地将分析物的浓度转换为磁信号。相比于光学、等离子体、电化学生物传感器而言, 磁性生物传感器具有较低的背景噪声。因为大多数生物样品所处的生物环境都是非磁性的, 所以磁性生物传感器不会受到生物环境的干扰, 从而产生更加准确和可靠的检测结果<sup>[159]</sup>。磁性生物传感器大致可以分为 3 类: 磁阻传感器(Magnetoresistance (MR) sensors)、磁颗粒光谱平台(Magnetic Particle Spectroscopy (MPS) platforms)以及核磁共振平台(Nuclear Magnetic Resonance (NMR) platforms)。

### 3.5.1 磁阻生物传感器

磁阻生物传感器是一种基于表面的技术, 它对于磁纳米颗粒接近于传感器表面产生的漏磁场非常敏感, 从而实现将带有分析物的磁纳米颗粒的结合转换为可读的电信号<sup>[160-161]</sup>。磁阻生物传感器中的磁纳米标签需要在不损失顺磁性的同时, 产生较高的磁矩。

目前, 磁阻生物传感器用于 SARS-CoV-2 检测方面的研究较少, 主要原因推测为, 磁性纳米颗粒在尺寸减小的同时, 难免会同时降低磁矩。电子科技大学郭劲宏团队<sup>[162]</sup>构建了一种基于超顺磁性纳米颗粒和巨磁阻传感系统的侧流免疫方法, 同时检测 SARS-CoV-2 的免疫球蛋白 IgM 和 IgG。其中, 巨磁阻传感平台可以通过蓝牙将医疗数据传输到智能手机上, 方便医护人员获取患者的信息。平均尺寸为 68 nm 的超顺磁性纳米颗粒是通过一种简单且快速的共沉淀方法合成的, 具有优异的分散性和磁性能。该技术具有低成本、快速、易操作、高灵敏度的优点, 能够在 10 min 内同时检测到 SARS-CoV-2 的两种抗体, IgM 的检测限为 10 ng/mL, IgG 的检测限为 5 ng/mL。

### 3.5.2 磁颗粒光谱平台

磁颗粒光谱平台是一种基于体积的检测技术, 它直接检测磁纳米颗粒的磁动态响应<sup>[163-164]</sup>。因此, 对于该类传感器而言, 激发磁场、饱和磁化强度、各向异性等性能十分关键。



Wu 等<sup>[165]</sup>构建了一种磁颗粒光谱平台,通过磁颗粒之间不同的结合状态造成的高次谐波的变化来定性或者定量地检测目标物质。在磁纳米颗粒上修饰 N 蛋白或者 S 蛋白的单克隆抗体,当体系中存在待检测的 N 蛋白或者 S 蛋白时,磁纳米颗粒作为探针结合目标物质,形成纳米颗粒团簇,从而产生一定的磁响应。该检测平台是一种基于纳米颗粒团簇的一步式、免洗的磁纳米传感平台,具有优异的检测灵敏度,对 N 蛋白的检测限为 12.5 nmol/L,对 S 蛋白的检测限为 1.56 nmol/L。Rosch 等<sup>[166]</sup>报道了一种基于磁纳米颗粒磁响应变化的 SARS-CoV-2 核酸检测平台(图 16)。特异性修饰后的磁纳米颗粒的目标物质介导的组装会导致水动力半径增大,这些变化可以通过交变磁场中的磁颗粒光谱来测量。该方法对 SARS-CoV-2 RNA 的检测具有超高灵敏度,检测限可以达到 0.28 nmol/L,且如唾液这样的生物样品不会影响该检测平台的检测效果。

### 3.5.3 核磁共振平台

核磁共振平台是利用磁性纳米颗粒作为对比度增强剂,从而造成局部磁场的非均匀性,监控周围水分子的频率变化<sup>[167-168]</sup>。因此,高灵敏度的核磁共振平台的设计本质上依赖于合适的磁纳米颗粒的应

用。对该类传感器而言,需要具有高的横向弛豫磁纳米颗粒。

中国科学院上海微系统与信息技术研究所杨思维团队<sup>[169]</sup>报道了一种基于超低场核磁共振弛豫的技术以快速、高灵敏度地检测 SARS-CoV-2 病原体(图 17)。该方法以 SARS-CoV-2 抗体修饰的磁性的石墨烯量子点为探针构建磁弛豫开关,特异性地检测 SARS-CoV-2。值得注意的是,该方法是将待测溶液和抗体修饰的磁性石墨烯量子点密闭混合,无需样品的前处理,并且也不会感染检测者。这种一步式的检测方法具有优异的灵敏度和快速检测的特点,能够在 2 min 内完成检测,且检测限可以达到 248 particles/mL。

核磁共振光谱与红外光谱、拉曼光谱一样,可以解析待测物质的结构。不同于能够直接反映分子结构信息的拉曼光谱和红外光谱,核磁共振光谱是通过解析  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  的核磁共振图谱来分析待测物质的骨架结构。核磁共振光谱在 SARS-CoV-2 抗体筛选、蛋白及核酸结构表征方面也有广泛的应用。磁性纳米颗粒在该种检测方法中可以充当信号放大的标签,提高检测的灵敏度。Schoenle 等<sup>[170]</sup>报道了一套 SARS-CoV-2 RBD 的序列特异性骨架归峰,

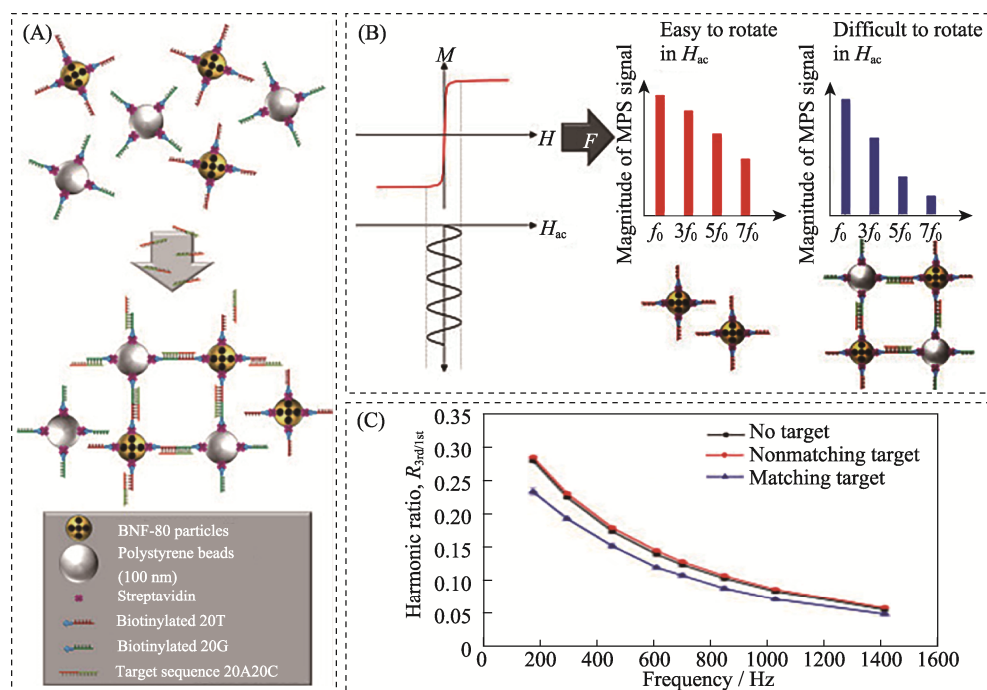


图 16 基于磁颗粒光谱生物传感器的 SARS-CoV-2 核酸检测示意图<sup>[166]</sup>

Fig. 16 Schematic diagram of detection of SARS-CoV-2 RNA based on magnetic particle spectroscopy biosensors<sup>[166]</sup>

(A) Magnetic nanoparticles (gold) and polystyrene beads (silver) with streptavidin (purple)-modified surface are equipped with single stranded DNA strands (red and green, respectively) with a specific sequence via biotin-streptavidin-binding; (B) Applying a sinusoidal magnetic field (black) to a solution of nanoparticles results in reorientation of the nanoparticles which can be readout by measuring the magnetic response  $M$  of the nanoparticles; (C) Exemplary spectrum of the ratio of received harmonics as a function of excitation frequencies for 80 nm BNF magnetic particles

The color figure can be obtained from online edition



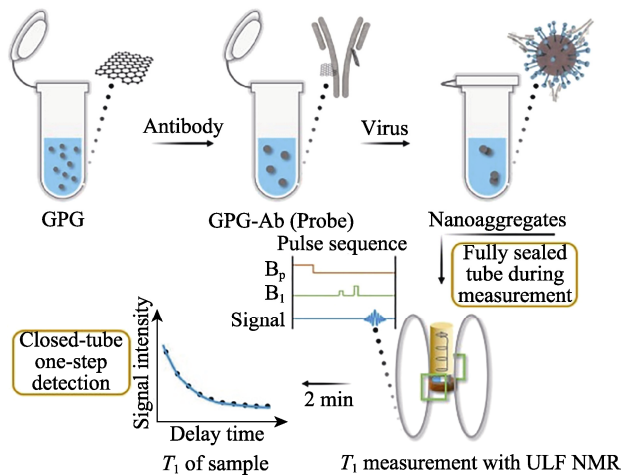


图 17 基于超低场核磁共振的磁弛豫开关分析的 SARS-CoV-2 检测过程<sup>[169]</sup>

Fig. 17 Detection process of SARS-CoV-2 of the magnetic relaxation switches assay with ULF NMR<sup>[169]</sup>

ULF: ultra-low field; GPG: Gd<sup>3+</sup> loaded PEG modified GQDs; GQDs: graphene quantum dots

The color figure can be obtained from online edition

并证明了生物分子的核磁共振光谱化学位移扰动映射图,能够快速成功识别 RBD 特异性的抗体分子表位。核磁共振光谱基的化学位移扰动映射图,结合其他分子检测技术,可以帮助准确认识到 RBD 和抗体之间的相互作用,对抗体的筛查以及进一步疫苗的研制具有重要意义。SARS-CoV-2 的 3CLp 蛋白酶是一种 SARS-CoV-2 的病原体,对于该类蛋白酶的研究有利于对应药物的开发。Cantrelle 等<sup>[171]</sup>利用核磁共振光谱技术,通过分析 NMR 信号的归属解析二聚体 3CLp 的构象以及监控结合的过程。此外,Novakovic 等<sup>[172]</sup>还利用二维核磁共振光谱 NOESY 解析 SARS-CoV-2 RNA 的结构。

与基于光学的生物传感器相比,磁性生物传感器检测过程中有着更为简单的样品处理步骤,相比于电化学生物传感器,磁性标签更为安全。由于其具有高灵敏度、高准确率、高特异性,该方法有望作为现场检测技术检测 SARS-CoV-2。

### 3.5.4 纳米技术在磁性生物传感器中的应用

磁性纳米材料独特的磁弛豫性能以及良好的生物相容性赋予许多生物传感器高灵敏度和选择性。磁性生物传感器依赖于纳米磁性颗粒标签,在设计传感器的过程中,需要和待检物的尺寸相匹配<sup>[168, 173]</sup>。然而,随着磁性纳米颗粒尺寸降低,这些纳米尺寸的磁性标签往往具有较低的磁矩和不均匀的粒径分布。此外,在较低浓度待检物的检测中,纳米颗粒表面严重的表面缺陷以及无法避免的磁热效应都会造成磁信号的波动<sup>[173]</sup>。所以,基于磁性纳米材料的生物传感器的发展应该关注如何制备尺寸均一且分散

性好的磁性纳米颗粒,以及磁性生物传感器的现场检测能力。

### 3.6 比色生物传感器

比色生物传感器(Colorimetric biosensors)一直以来被用于现场诊断(Point-Of-Care Test, POCT),因其具有制备简单、读数容易、成本低且便于携带的优点<sup>[174]</sup>。比色法检测可以通过过氧化物酶或者类过氧化物酶的纳米材料的氧化、纳米材料的团聚或者添加染料指示剂来实现<sup>[175-177]</sup>。近年来,类过氧化物酶纳米材料和纳米材料的团聚被广泛用于比色生物传感器的构建中,如金纳米粒子、铂纳米粒子、银纳米粒子、磁性纳米粒子等<sup>[178-181]</sup>。其中,金纳米粒子的应用最为广泛,因为其制备简单、易于修饰、纳米粒子具有强的表面等离子体共振,且通过粒子间的团聚可以引起迅速的颜色变化<sup>[182-185]</sup>。这部分将聚焦于基于纳米材料或者纳米酶的比色生物传感器,详细论述该类传感器在 SARS-CoV-2 检测中的应用以及所涉及到的纳米技术。

#### 3.6.1 比色生物传感器用于 SARS-CoV-2 检测

比色法生物传感器的研究较为成熟,其在 SARS-CoV-2 检测方面也做出了巨大贡献。Büyüksünetçi 等<sup>[186]</sup>合成了具有类过氧化物酶活性的  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米颗粒,将无色的 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)氧化成蓝色的 TMB<sub>(Ox)</sub>。当向蓝色的 TMB<sub>(Ox)</sub>和 ACE2 的混合溶液中加入 SARS-CoV-2 S 蛋白时,随着 S 蛋白浓度增大,溶液的颜色会逐渐变浅。他们推测,颜色的变化可能是由 TMB<sub>(Ox)</sub>作为一种氧化还原酶分子,在 S 蛋白 RBD 区域和 ACE2 结合时,S 蛋白中半胱氨酸二硫键与 TMB<sub>(Ox)</sub>相互作用,二硫键发生变化所导致。Ventura 等<sup>[187]</sup>基于 Au 纳米颗粒团聚引起的颜色变化来检测 SARS-CoV-2 (图 18)。他们在金纳米颗粒上修饰了三种抗体,分别是病毒表面的 S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白。当存在目标病毒时,金纳米颗粒由于抗原-抗体的结合聚集在病毒的表面,从而造成 Au 溶胶颜色的变化。该团队构建的基于 Au 纳米颗粒的比色法在 SARS-CoV-2 检测方面的灵敏度可以和 RT-qPCR 相媲美。此外,该方法能够在 3 min 内进行快速检测,具备成为快速检测工具的潜力。山东大学韩琳教授团队<sup>[188]</sup>利用比色法成功在 40 min 内检测 SARS-CoV-2 的核酸。他们在粒径 17 nm 左右的 Au 纳米颗粒表面上修饰 DNA 探针,DNA 探针可以进一步提高 Au 纳米颗粒的稳定性。当存在目标 RNA 时,DNA 和 RNA 结合并从金纳米颗粒表面脱落,导致 Au 颗粒发生团聚,从而改变金溶胶的颜色。该团队

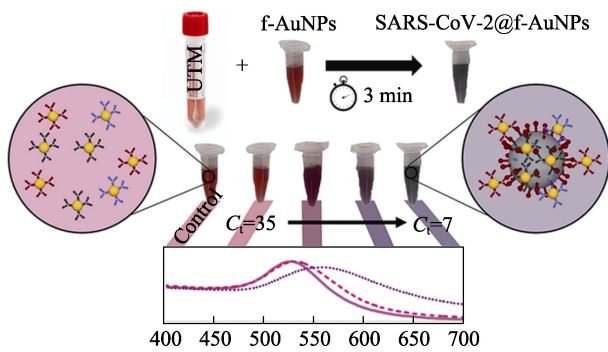


图 18 基于比色法的 SARS-CoV-2 检测示意图<sup>[187]</sup>

Fig. 18 Schematic diagram of the detection of SARS-CoV-2 based on colorimetric biosensors<sup>[187]</sup>

UTM: universal transport medium

The color figure can be obtained from online edition

还将设计的 Au 溶胶检测系统应用于荧光检测和 SERS 检测,从三个检测模式的角度来检测目标物质,此联用的方法更有利于得到准确的检测结果。目前, Au 溶胶结合侧流免疫的抗原检测试剂盒已经商用,能够在 15 min 内通过测试线上 Au 溶胶的颜色变化反映是否存在 SARS-CoV-2,检测限在 300~500 PFU/mL。

### 3.6.2 纳米技术在比色生物传感器中的应用

纳米材料高比表面积、高催化性能以及易于修饰的表面特性使得金属纳米颗粒以及纳米酶能够通过团聚或者氧化还原的催化反应来使检测体系发生颜色变化。对于纳米材料而言,纳米颗粒本身高表面能促使颗粒间极易团聚,从而导致纳米酶的催化效率降低以及检测体系灵敏度下降。以比色法常用的金纳米颗粒为例,在制备 Au 纳米颗粒过程中,需要使其表面带有负电荷或者将带有 -SH/-NH<sub>2</sub> 的高聚体包裹在金纳米颗粒的表面,以阻止 Au 纳米颗粒聚集。最常用的表面钝化方法为柠檬酸钠还原法,使其表面带有丰富的负电荷,通过静电斥斥作用稳定 Au 纳米颗粒<sup>[189]</sup>。此外,还可以使用巯基功能化的有机物、分散在聚合物基底上等方法来稳定 Au 纳米颗粒<sup>[190-191]</sup>。基于比色法的生物传感器最大的优点是可以通过肉眼来判断体系中是否存在目标物质,非常适合居家检测的应用场景。但是,比色法往往会受到检测灵敏度的限制,所以比色法需要和其他技术(如电化学、SERS 等)联用来进一步提高检测系统的灵敏度和准确性。

这些新型的 SARS-CoV-2 检测方法虽然提高了检测时效性,但和常规检测方法一样,检测的是病毒的一部分(如核酸 PCR 检测的是 SARS-CoV-2 裂解后的核酸),难于分辨一个完整病毒的活性。尤其对环境,如进口冷链食品病毒的检测,这些方法只能判断是否存在病毒或其标志物,而不能判断病毒

是否具有活性,这会导致大量的虚警,并引起恐慌和造成巨大的社会成本消耗。基于长期奋战在 SARS-CoV-2 检验前线的上海疾病预防控制中心得出的第一手经验和认识,现阶段开发可分辨 SARS-CoV-2 活性的新型快速、高灵敏度检测方法仍非常必要。

基于每种新型纳米生物传感技术检测方法都有其特点,各检测方法综合比较见表 2。

## 4 总结与展望

截至目前, SARS-CoV-2 在全球持续扩散和蔓延, COVID-19 疫情面临全球化和时间持续化的困境。我国的疫情防控形势依旧严峻,尤其是针对 SARS-CoV-2 不断变异,其传播速度加快、隐匿性增强、免疫逃逸比例增高,甚至新变种依旧对免疫力低下的人群和老年人群造成重症和死亡的威胁,因此针对 SARS-CoV-2,需要进一步完善传统检测方法,突破原有检测方法局限性,同时研发新方法作为日后监测和检测方法的补充或替代势在必行。特别是在部分医疗资源短缺的发展中国家,以及面对大流行发生时疫情暴发导致的医疗挤兑,研发快速、操作简便、高通量、智能化的检测方法尤为重要。目前核酸检测等方法还不能充分满足多种应用场景的 SARS-CoV-2 快速检测任务。例如冷链运输环境下食品、贸易往来的货运品等 SARS-CoV-2 的检测,其中部分病毒因失水裂解等而失活,而部分病毒可以长时间存活,传统方法无法快速判别病毒的活性;其二,随着各大国注射疫苗的进展,国际社会回归正常的经济开放已是大势所趋,但在国际机场、边境口岸、海关通关、密闭交通工具等区域,亟需快速简便(10 min 内)且具有低病毒载量检测能力并能实现现场 SARS-CoV-2 检测及活性判定的新方法。

针对不同的检测场景、人群特点开发新兴的快速、高灵敏度检测技术仍然是非常必要的。新型纳米传感技术所依附的纳米技术已较为成熟,但是生物检测应用方面还需要进一步改善,如纳米材料的生物毒性、纳米材料表面生物分子的修饰、纳米材料的大规模制造等。对于新型纳米传感器则需要着重考虑如下几个方面。

(1) 高灵敏度检测。目前国内外各种 PCR 诊断试剂盒的准确性尚可,检测限已处于 200~500 copies/mL。但对于低病毒载量病人的检测仍会出现假阴性,鉴于 SARS-CoV-2 常态化管理的筛查和日后监测需要,为及早发现感染者,开发高灵敏度、受采样

表 2 用于 SARS-CoV-2 检测的新型生物传感器比较  
Table 2 Comparison of novel biosensors for SARS-CoV-2 detection

Detection technology	Detection method	Object	Sample	Related material	Detection time	Lower detection limit	Ref.
SERS-based biosensors	Labelled-SERS	S protein	Lysis solution	Macro/nanostructure Au substrate	15 min	10 PFU/mL	[73]
	Label-free SERS	Virus particles	Nasal/throat solution	Macro/nanostructure Au substrate, Au nanoparticles	15 min	60 copies/mL	[72]
SPR-based biosensors	Combining SPR and LSPR	Pseudovirus particles	N/A	Macro/nanostructure Au substrate, Au nanoparticles	15 min	370 vp/mL	[89]
Fluorescence biosensors	“signal on” mode	RNA	Lysis solution	N/A	15 samples/45 min	600 copies/mL	[102]
Electrochemical biosensors	Voltammetric/ amperometric biosensors	RNA	Nasal/throat solution	Au nanoparticles	5 min	6900 copies/mL	[128]
	Impedimetric biosensors	Antibodies	Serum	Au nanoparticles	30 min	N/A	[135]
	Potentiometric biosensors	Cholinesterase	Blood	Graphene and copper	~7 s (only detection time)	$7.9 \times 10^{-8}$ mol/L	[139]
	FET-based biosensors	RNA	Nasal/throat solution	Graphene	1 min (only detection time)	10–20 copies/mL	[150]
Magnetic biosensors	Magnetoresistance	Antibodies	Blood	Magnetic nanoparticles	10 min	5–10 ng/mL	[162]
	Magnetic particle spectroscopy platforms	S protein and N protein	PBS	Magnetic nanoparticles	N/A	1.56 nmol/L	[165]
	Nuclear magnetic resonance	Antibodies	Blood	Magnetic graphene quantum dot	2 min	248 vp/mL	[169]
Colorimetric biosensors	Agglomeration of nanoparticles	RNA	N/A	Au nanoparticles	>45 min	160 fmol/L	[185]

方式和样品质量影响小的检测方法仍然非常必要。

(2) 高通量检测。实现大量样本的同时检测, 这能够缓解疫情大规模暴发时带来的检测压力。

(3) 多病原检测。加强对多种病原体及病毒变种的识别和检测能力, 对于常态化管理下多病原体鉴别诊断来说, 可节省人力、物力和时间。

(4) 环境病毒及病毒活性检测。针对治愈后复阳的病例, 环境、空气、货运中病毒检测, 开发能够分辨病毒活性的智能化检测技术, 能够准确识别病毒并预警, 同时避免不必要的虚警(如山东奶枣事件)和巨大的社会成本消耗。现阶段开发可分辨 SARS-CoV-2 活性的新型快速、高灵敏度病原体直接检测方法, 填补目前检测方法的空缺。

(5) 现场检测。针对医院、海关、社区甚至家庭等不同应用场景, 开发便携性、经济型且小型化

的仪器实现现场快速检测, 这将大大有助于提高监测时效性, 关口前移, 控制 SARS-CoV-2 肺炎疫情传播的风险。

(6) 自动化和多种技术集成化检测。单一检测技术总有其缺点, 集成样本前处理、核酸提取、扩增与检测为一体, 真正实现“样本进-结果出”; 并将新型技术与现存的核酸、抗体和病原体检测方法进行集成和优势互补、联合使用将有望实现 SARS-CoV-2 的精准迅速检测, 为目前的 SARS-CoV-2 肺炎疫情和未来的未知病原体检测提供强有力的手段; 对于未来应用于呼吸道疾病鉴别诊断、环境监测、食品安全性评估等领域均具有重要的现实意义。

(7) 智能化检测。对于大人群高通量筛查结果、仪器判读结果以及生信分析结果进行智能标准化, 避免人工判读滞后和主观性。判读结果不仅有可比

性, 而且能及时输出结果用于现场或远程研判。

## 参考文献:

- [1] YUCE M, FILIZTEKIN E, OZKAYA K G. COVID-19 diagnosis-a review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **172**: 112752.
- [2] JI T X, LIU Z W, WANG G Q, *et al.* Detection of COVID-19: a review of the current literature and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **166**: 112455.
- [3] XUE X, BALL J K, ALEXANDER C, *et al.* All surfaces are not equal in contact transmission of SARS-CoV-2. *Matter*, 2020, **3(5)**: 1433.
- [4] CHEN W, CAI B, GENG Z, *et al.* Reducing false negatives in COVID-19 testing by using microneedle-based oropharyngeal swabs. *Matter*, 2020, **3(5)**: 1589.
- [5] CUI F Y, ZHOU H S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **165**: 112349.
- [6] LIN D C, LIU L, ZHANG M X, *et al.* Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020, **39(12)**: 2271.
- [7] SEO G, LEE G, KIM M J, *et al.* Correction to rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, 2020, **14(9)**: 12257.
- [8] 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. *Nano-Micro Letters*, 2021, **13**: 109.
- [9] YAO H P, SONG Y T, CHEN Y, *et al.* Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 2020, **183(3)**: 730.
- [10] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, **579(7798)**: 270.
- [11] LI W H, MOORE J M, VASILIEVA N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, **426**: 450.
- [12] HOFMANN H, PYRC K, HOEK V D L, *et al.* Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102(22)**: 7988.
- [13] LU G W, HU Y W, WANG Q H, *et al.* Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, 2013, **500(7461)**: 227.
- [14] RAJ V S, MOU H, SMITS S L, *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 2013, **495(7440)**: 251.
- [15] MENACHERY V D, YOUNT B L JR, DEBBINK K, *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*, 2015, **21(12)**: 1508.
- [16] OROOJI Y, SOHRABI H, HEMMAT N, *et al.* An overview on SARS-CoV-2 (COVID-19) and other human coronaviruses and their detection capability via amplification assay, chemical sensing, biosensing, immunosensing, and clinical assays. *Nano-Micro Letters*, 2021, **13**: 18.
- [17] TO K K W, TSANG O T Y, LEUNG W S, *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, **20(5)**: 565.
- [18] DONG X, CAO Y Y, LU X X, *et al.* Eleven faces of coronavirus disease 2019. *Allergy*, 2020, **75(7)**: 1699.
- [19] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance*, 2020, **25(3)**: 23.
- [20] LU R J, ZHAO X, LI J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020, **395(10224)**: 565.
- [21] REN L L, WANG Y M, WU Z Q, *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese Medical Journal*, 2020, **133(9)**: 1015.
- [22] PEIRIS S M J, PHIL D, YUEN Y K, *et al.* The severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2003, **349**: 2431.
- [23] CHEN L J, LIU W Y, ZHANG Q, *et al.* RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, **9(1)**: 313.
- [24] SHI M, ZHANG Y Z, HOLMES E C. Meta-transcriptomics and the evolutionary biology of RNA viruses. *Virus Research*, 2018, **243**: 83.
- [25] SAKAMOTO Y, SEREEWATTANAWOOT S, SUZUKI A. A new era of long-read sequencing for cancer genomics. *Journal of Human Genetics*, 2020, **65(1)**: 3.
- [26] WANG M, FU A S, HU B, *et al.* Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Small*, 2020, **16**: 2002169.
- [27] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**: 63.
- [28] ZHU X, WANG X X, HAN L M, *et al.* Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **166**: 112437.
- [29] ZHUANG J J, YIN J X, LV S W, *et al.* Advanced "lab-on-a-chip" to detect viruses-current challenges and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **163**: 112291.
- [30] WANG L J, PUMERA M. Recent advances of 3D printing in analytical chemistry: focus on microfluidic, separation, and extraction devices. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, **135**: 116151.
- [31] WANG G H, TAN J, TANG M H, *et al.* Binary centrifugal microfluidics enabling novel, digital addressable functions for valving and routing. *Lab on a Chip*, 2018, **18(8)**: 1141.
- [32] CHEN J J, KANG Z W, WANG G H, *et al.* Optofluidic guiding, valving, switching and mixing based on plasmonic heating in a random gold nanoisland substrate. *Lab on a Chip*, 2015, **15(11)**: 2504.
- [33] TANG M H, LOO J F, WANG Y Y, *et al.* Motor-assisted chip-in-a-tube (MACT): a new 2- and 3-dimensional centrifugal microfluidic platform for biomedical applications. *Lab on a Chip*, 2017, **17(3)**: 474.
- [34] TANG M H, WANG G H, KONG S K, *et al.* A review of biomedical centrifugal microfluidic platforms. *Micromachines (Basel)*, 2016, **7**: 26.
- [35] CREVILLEN A G, MAYORGA-MARTINEZ C C, VAGHASIYA J V, *et al.* 3D-Printed SARS-CoV-2 RNA genosensing microfluidic



- system. *Advanced Materials Technologies*, 2022, **7(6)**: 2101121.
- [36] WIENCKE J K, BRACCI P M, HSUANG G, *et al.* A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood. *Epigenetics*, 2014, **9(10)**: 1360.
- [37] CHEN B, JIANG Y F, CAO X H, *et al.* Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clinica Chimica Acta*, 2021, **517**: 156.
- [38] SEDLAK R H, JEROME K R. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, **75(1)**: 1.
- [39] DONG L H, ZHOU J B, NIU C Y, *et al.* Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta*, 2021, **224**: 121726.
- [40] SUO T, LIU X J, GUO M, *et al.* ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, **9**: 1259.
- [41] HOU T Y, ZENG W Q, YANG M L, *et al.* Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *PLoS Pathogens*, 2020, **16(8)**: e1008705.
- [42] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, *et al.* Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *MedRxiv*, 2020, 10.1101/2020.05.04.20091231
- [43] 上海交大人投身一线 众志成城 科技战“疫”, 上海交通大学·新闻学术网, 2020-02-05, <https://news.sjtu.edu.cn/jdyw/20200204/119621.html>.
- [44] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360(6387)**: 436.
- [45] BROUGHTON J P, DENG X D, YU G X, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, 2020, **38(7)**: 870.
- [46] HOU H Y, WANG T, ZHANG B, *et al.* Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical Translational Immunology*, 2020, **9(5)**: 01136.
- [47] LIU W B, LIU L, KOU G M, *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, **58(6)**: 00461.
- [48] AMANAT F, STADLBAUER D, STROHMEIER S, *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 2020, **26(7)**: 1033.
- [49] 葛均波院士团队联合研发 SARS-CoV-2 IgM 抗体快检试剂盒通过注册检验, 新民晚报, 2020-2-18, <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1658849335805344872&wfr=spider&for=pc>.
- [50] DUAN D M, FAN K L, ZHANG D X, *et al.* Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, **74**: 134.
- [51] WANG H H, LI X M, LI T, *et al.* The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020, **39(9)**: 1629.
- [52] ALBERT E, TORRES I, BUENO F, *et al.* Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio COVID-19 Ag rapid test device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clinical Microbiology and Infection*, 2021, **27(3)**: 472.
- [53] BARO B, RODO P, OUCHI D, *et al.* Performance characteristics of five antigen-detecting rapid diagnostic test (Ag-RDT) for SARS-CoV-2 asymptomatic infection: a head-to-head benchmark comparison. *Journal of Infection*, 2021, **82(6)**: 269.
- [54] SEREBRENNIKOVA K V, BYZOVA N A, ZHERDEV A V, *et al.* Lateral flow immunoassay of SARS-CoV-2 antigen with SERS-based registration: development and comparison with traditional immunoassays. *Biosensors*, 2021, **11(12)**: 510.
- [55] 国家药监局应急审批2款SARS-CoV-2抗原检测产品 广东企业上榜, 潇湘晨报, 2020-11-24, <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1684237376273195168&wfr=spider&for=pc>.
- [56] PENG Y S, LIN C L, LONG L, *et al.* Charge-transfer resonance and electromagnetic enhancement synergistically enabling MXenes with excellent SERS sensitivity for SARS-CoV-2 S protein detection. *Nano-Micro Letters*, 2021, **13**: 52.
- [57] MORAIS L M C, PARASKEVAIDI M, CUI L, *et al.* Standardization of complex biologically derived spectrochemical datasets. *Nature Protocols*, 2019, **14**: 1546.
- [58] YANG L L, YANG Y, MA Y F, *et al.* Fabrication of semiconductor ZnO nanostructures for versatile SERS application. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, **7**: 398.
- [59] SHAN Y F, YANG Y, CAO Y Q, *et al.* Synthesis of wheatear-like ZnO nanoarrays decorated with Ag nanoparticles and its improved SERS performance through hydrogenation. *Nanotechnology*, 2016, **27(14)**: 145502.
- [60] YANG Y, NOGAMI M, SHI J L, *et al.* Self-assembled semiconductor capped metal composite nanoparticles embedded in BaTiO<sub>3</sub> thin films for nonlinear optical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2003, **13(12)**: 3026.
- [61] YANG L L, PENG Y S, YANG Y, *et al.* Green and sensitive flexible semiconductor SERS substrates: hydrogenated black TiO<sub>2</sub> nanowires. *ACS Applied Nano Materials*, 2018, **1(9)**: 4516.
- [62] KIM H, KANG H, KIM H N, *et al.* Development of 6E3 antibody-mediated SERS immunoassay for drug-resistant influenza virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **187**: 113324.
- [63] WANG C W, WANG C G, WANG X L, *et al.* Magnetic SERS strip for sensitive and simultaneous detection of respiratory viruses. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2019, **11(21)**: 19495.
- [64] WANG J F, WU X Z, WANG C W, *et al.* Facile synthesis of Au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2016, **8(31)**: 19958.
- [65] WANG C G, LIU M, WANG Z F, *et al.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases: from methods to devices. *Nano Today*, 2021, **37**: 101092.
- [66] PRAMANIK A, GAO Y, PATIBANDLA S, *et al.* The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles. *Nanoscale Advances*, 2021, **3(6)**: 1588.
- [67] ZHANG D Y, ZHANG X L, MA R, *et al.* Ultra-fast and onsite interrogation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in waters via surface enhanced Raman scattering (SERS). *Water Research*, 2021, **200**: 117243.
- [68] LIN C L, LIANG S S, PENG Y S, *et al.* Visualized SERS imaging of single molecule by Ag/black phosphorus nanosheets. *Nano-Micro Letters*, 2022, **14**: 75.
- [69] ZAVYALOVA E, AMBARTSUMYAN O, ZHDANOV G, *et al.* SERS-based aptasensor for rapid quantitative detection of SARS-CoV-2. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, **11**: 1394.
- [70] 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. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, **197**: 113736.
- [71] SANCHEZ J E, JARAMILLO S A, SETTLES E, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 and its S and N proteins using surface enhanced



- Raman spectroscopy. *RSC Advances*, 2021, **11**(41): 25788.
- [72] LI Y Y, LIN C L, PE Y S. High-sensitivity and point-of-care detection of SARS-CoV-2 from throat and nasal swabs by magnetic SERS biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, **365**: 131974.
- [73] CHEN H, PARK S G, CHOI N, *et al.* Sensitive detection of SARS-CoV-2 using a SERS-based aptasensor. *ACS Sensors*, 2021, **6**(6): 2378.
- [74] LEONG S X, LEONG Y X, TAN E X, *et al.* Noninvasive and point-of-care surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based breathalyzer for mass screening of coronavirus disease 2019 (COVID-19) under 5 min. *ACS Nano*, 2022, **16**(2): 2629.
- [75] PARIJA D, KWOK K S, RAJ P, *et al.* Label-free spectroscopic SARS-CoV-2 detection on versatile nanoimprinted substrates. *Nano Letters*, 2022, **22**(9): 3620.
- [76] LI J R, WUETHRICH A, EDWARDRAJA S, *et al.* Amplification-free SARS-CoV-2 detection using nanoyeast-scFv and ultrasensitive plasmon nanobox-integrated nanomixing microassay. *Analytical Chemistry*, 2021, **93**(29): 10251.
- [77] 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. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **190**: 113421.
- [78] DAOUDI K, RAMACHANDRAN K, ALAWADHI H, *et al.* Ultra-sensitive and fast optical detection of the spike protein of the SARS-CoV-2 using AgNPs/SiNWs nanohybrid based sensors. *Surfaces and Interfaces*, 2021, **27**: 101454.
- [79] YANG Y, TANEMURA M, HUANG Z R, *et al.* Aligned gold nanoneedle arrays for surface-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology*, 2010, **21**: 325701.
- [80] PENG Y S, LIN C L, LI Y Y, *et al.* Identifying infectiousness of SARS-CoV-2 by ultra-sensitive SnS<sub>2</sub> SERS biosensors with capillary effect. *Matter*, 2022, **5**(2): 694.
- [81] 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. *Applied Surface Science*, 2021, **561**: 150060.
- [82] SITJAR J, XU H Z, LIU C Y, *et al.* Synergistic surface-enhanced Raman scattering effect to distinguish live SARS-CoV-2 S pseudovirus. *Analytica Chimica Acta*, 2022, **1193**: 339406.
- [83] 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. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2022, **355**: 131324.
- [84] CHEN C, WANG J S. Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *Analyst*, 2020, **145**(5): 1605.
- [85] FIRDOUS S, ANWAR S, RAFYA R. Development of surface plasmon resonance (SPR) biosensors for use in the diagnostics of malignant and infectious diseases. *Laser Physics Letters*, 2018, **15**: 065602.
- [86] LYNN N S, DANDY D S. Passive microfluidic pumping using coupled capillary/evaporation effects. *Lab on a Chip*, 2009, **9**(23): 3422.
- [87] MARCHESINI G R, KOOPAL K, MEULENBERG E, *et al.* Spretta-based biosensor assays for endocrine disruptors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**: 1908.
- [88] YANO T A, KAJISA T, ONO M, *et al.* Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using large gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance. *Scientific Reports*, 2022, **12**: 1060.
- [89] HUANG L P, DING L F, ZHOU J, *et al.* One-step rapid quantification of SARS-CoV-2 virus particles *via* low-cost nanoplasmonic sensors in generic microplate reader and point-of-care device. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **171**: 112685.
- [90] KAJIURA M, NAKANISHI T, IIDA H, *et al.* Biosensing by optical waveguide spectroscopy based on localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles used as a probe or as a label. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, **335**(1): 140.
- [91] PASHCHENKO O, SHELBY T, BANERJEE T, *et al.* A comparison of optical, electrochemical, magnetic, and colorimetric point-of-care biosensors for infectious disease diagnosis. *ACS Infectious Diseases*, 2018, **4**(8): 1162.
- [92] ZHANG R Q, LIU S L, ZHAO W, *et al.* A simple point-of-care microfluidic immunomagnetic fluorescence assay for pathogens. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(5): 2645.
- [93] TAKEMURA K, ADEGOKE O, SUZUKI T, *et al.* A localized surface plasmon resonance-amplified immunofluorescence biosensor for ultrasensitive and rapid detection of nonstructural protein 1 of Zika virus. *PLoS ONE*, 2019, **14**(1): 0211517.
- [94] GUERREIRO M R, FREITAS D F, ALVES P M, *et al.* Detection and quantification of label-free infectious adenovirus using a switch-on cell-based fluorescent biosensor. *ACS Sensors*, 2019, **4**(6): 1654.
- [95] HUANG R R, HE L, LI S, *et al.* A simple fluorescence aptasensor for gastric cancer exosome detection based on branched rolling circle amplification. *Nanoscale*, 2020, **12**(4): 2445.
- [96] WANG Y, LI Z H, WANG J, *et al.* Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 2011, **29**(5): 205.
- [97] SAHA K, AGASTI S S, KIM C, *et al.* Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, 2012, **112**(5): 2739.
- [98] YANG D D, LIU M, XU J, *et al.* Carbon nanosphere-based fluorescence aptasensor for targeted detection of breast cancer cell MCF-7. *Talanta*, 2018, **185**: 113.
- [99] LI B M, YU Q L, DUAN Y X. Fluorescent labels in biosensors for pathogen detection. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, **35**(1): 82.
- [100] GUO J C, CHEN S Q, TIAN S L, *et al.* 5G-enabled ultra-sensitive fluorescence sensor for proactive prognosis of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **181**: 113160.
- [101] ZHOU Y F, CHEN Y, LIU W J, *et al.* Development of a rapid and sensitive quantum dot nanobead-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay and its clinical performance for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, **343**: 130139.
- [102] CHU Y J, QIU J Y, WANG Y H, *et al.* Rapid and high-throughput SARS-CoV-2 RNA detection without RNA extraction and amplification by using a microfluidic biochip. *Chemistry*, 2022, **28**: 202104054.
- [103] HAMD-GHADAREH S, HAMAH-AMEEN B A, SALIMI A, *et al.* Ratiometric enhanced fluorometric determination and imaging of intracellular microRNA-155 by using carbon dots, gold nanoparticles and rhodamine B for signal amplification. *Mikrochim Acta*, 2019, **186**: 469.
- [104] ZHU S J, ZHANG J H, QIAO C Y, *et al.* Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications. *Chemical Communication*, 2011, **47**(24): 6858.
- [105] NEW S Y, LEE S T, SU X D. DNA-templated silver nanoclusters: structural correlation and fluorescence modulation. *Nanoscale*, 2016, **8**(41): 17729.
- [106] LIAN J Y, LIU Q, JIN Y, *et al.* Histone-DNA interaction: an effective approach to improve the fluorescence intensity and

- stability of DNA-templated Cu nanoclusters. *Chemical Communication*, 2017, **53(93)**: 12568.
- [107] LIU Y Y, JIANG L P, FAN X J, *et al.* Intracellular fluorometric determination of microRNA-21 by using a switch-on nanoprobe composed of carbon nanotubes and gold nanoclusters. *Mikrochim Acta*, 2019, **186**: 447.
- [108] WANG Y H, HE L L, HUANG K J, *et al.* Recent advances in nanomaterial-based electrochemical and optical sensing platforms for microRNA assays. *Analyst*, 2019, **144(9)**: 2849.
- [109] ZHU W Y, SHEN X, ZHU C H, *et al.* Turn-on fluorescent assay based on purification system via magnetic separation for highly sensitive probing of adenosine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **259**: 855.
- [110] KUMAR N, HU Y, SINGH S, *et al.* Emerging biosensor platforms for the assessment of water-borne pathogens. *Analyst*, 2018, **143(2)**: 359.
- [111] ZHANG Z Y, TANG Z M, FAROKHZAD N, *et al.* Sensitive, rapid, low-cost, and multiplexed COVID-19 monitoring by the wireless telemedicine platform. *Matter*, 2020, **3(6)**: 1818.
- [112] TORRENTE-RODRIGUEZ R M, LUKAS H, TU J, *et al.* SARS-CoV-2 rapid plex: a graphene-based multiplexed telemedicine platform for rapid and low-cost COVID-19 diagnosis and monitoring. *Matter*, 2020, **3(6)**: 1981.
- [113] AKSHATH U S, SHUBHA L R, BHATT P, *et al.* Quantum dots as optical labels for ultrasensitive detection of polyphenols. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, **57**: 317.
- [114] NISHITANI S, SAKATA T. Enhancement of signal-to-noise ratio for serotonin detection with well-designed nanofilter-coated potentiometric electrochemical biosensor. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2020, **12(13)**: 14761.
- [115] DAI Y F, LIU C C. Recent advances on electrochemical biosensing strategies toward universal point-of-care systems. *Angewante Chemie International Edition*, 2019, **58(36)**: 12355.
- [116] GOLICHENARI B, NOSRATI R, FAROKHI-FARD A, *et al.* Electrochemical-based biosensors for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis biomarkers. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, **39(8)**: 1056.
- [117] CHAND R, RAMALINGAM S, NEETHIRAJAN S. A 2D transition-metal dichalcogenide MoS<sub>2</sub> based novel nanocomposite and nanocarrier for multiplex miRNA detection. *Nanoscale*, 2018, **10(17)**: 8217.
- [118] REICH P, PREUSS J A, BAHNER N, *et al.* Impedimetric aptamer-based biosensors: principles and techniques. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 2020, **174**: 17.
- [119] PREUSS J A, REICH P, BAHNER N, *et al.* Impedimetric aptamer-based biosensors: applications. *Advances in Biochemical Engineering- Biotechnology*, 2020, **174**: 43.
- [120] LOW S S, CHIA J S, TAN M T, *et al.* A proof of concept: detection of avian influenza H5 gene by a graphene-enhanced electrochemical genosensor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016, **16(3)**: 2438.
- [121] MOUSAVI M P S, AINLA A, TAN E K W, *et al.* Ion sensing with thread-based potentiometric electrodes. *Lab on a Chip*, 2018, **18(15)**: 2279.
- [122] LABIB M, SARGENT E H, KELLEY S O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. *Chemical Reviews*, 2016, **116(16)**: 9001.
- [123] LI Q, LU N, WANG L H, *et al.* Advances in nanowire transistor-based biosensors. *Small Methods*, 2018, **2**: 1700263.
- [124] BOLLELLA P, GORTON L. Enzyme based amperometric biosensors. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2018, **10**: 157.
- [125] CHEN A, CHATTERJEE S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 2013, **42(12)**: 5425.
- [126] FABIANI L, SAROGLIA M, GALATA G, *et al.* Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: a reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **171**: 112686.
- [127] EL-SAID W A, AL-BOGAMI A S, ALSHITARI W, *et al.* Electrochemical microbiosensor for detecting COVID-19 in a patient sample based on gold microcuboids pattern. *BioChip Journal*, 2021, **15**: 287.
- [128] ALAFEEF M, DIGHE K, MOITRA P, *et al.* Rapid, ultrasensitive, and quantitative detection of SARS-CoV-2 using antisense oligonucleotides directed electrochemical biosensor chip. *ACS Nano*, 2020, **14(12)**: 17028.
- [129] BROSEL-OLIU S, MERGEL O, URIA N, *et al.* 3D impedimetric sensors as a tool for monitoring bacterial response to antibiotics. *Lab on a Chip*, 2019, **19(8)**: 1436.
- [130] ELSHAFEY R, TLILI C, ABULROB A, *et al.* Label-free impedimetric immunosensor for ultrasensitive detection of cancer marker murine double minute 2 in brain tissue. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **39(1)**: 220.
- [131] PERSHINA L V, GRABEKLIS A R, ISANKINA L N, *et al.* Determination of sodium and potassium ions in patients with SARS-CoV-2 disease by ion-selective electrodes based on polyelectrolyte complexes as a pseudo-liquid contact phase. *RSC Advances*, 2021, **11(57)**: 36215.
- [132] TORRES M D T, DE ARAUJO W R, DE LIMA L F, *et al.* Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. *Matter*, 2021, **4(7)**: 2403.
- [133] DANIELS J S, POURMAND N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. *Electroanalysis*, 2007, **19(12)**: 1239.
- [134] AYDIN E B, AYDIN M, SEZGINTURK M K. New impedimetric sandwich immunosensor for ultrasensitive and highly specific detection of spike receptor binding domain protein of SARS-CoV-2. *ACS Biomaterials Science Engineering*, 2021, **7(8)**: 3874.
- [135] LORENZEN A L, DOS SANTOS A M, DOS SANTOS L P, *et al.* PEDOT-AuNPs-based impedimetric immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Electrochimica Acta*, 2022, **404**: 139757.
- [136] PENG Y, PAN Y H, SUN Z W, *et al.* An electrochemical biosensor for sensitive analysis of the SARS-CoV-2 RNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **186**: 113309.
- [137] KIMMEL D W, LEBLANC G, MESCHIEVITZ M E, *et al.* Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 2012, **84(2)**: 685.
- [138] LUO X L, DAVIS J J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chemical Society Reviews*, 2013, **42(13)**: 5944.
- [139] ELDIN N B, EL-RAHMAN M K A, ZAAZAA H E, *et al.* Microfabricated potentiometric sensor for personalized methacholine challenge tests during the COVID-19 pandemic. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **190**: 113439.
- [140] CHAIBUN T, PUENPA J, NGAMDEE T, *et al.* Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2. *Nature Communication*, 2021, **12**: 802.
- [141] LEE M Y, LEE H R, PARK C H, *et al.* Organic transistor-based chemical sensors for wearable bioelectronics. *Accounts Chemical Research*, 2018, **51(11)**: 2829.
- [142] MATSUMOTO A, MIYAHARA Y. Current and emerging

- challenges of field effect transistor based bio-sensing. *Nanoscale*, 2013, **5(22)**: 10702.
- [143] GUTIERREZ-SANZ O, ANDOY N M, FILIPIAK M S, *et al.* Direct, label-free, and rapid transistor-based immunodetection in whole serum. *ACS Sensors*, 2017, **2(9)**: 1278.
- [144] KANG H, WANG X J, GUO M Q, *et al.* Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibody by graphene field-effect transistors. *Nano Letters*, 2021, **21(19)**: 7897.
- [145] WANG Z, YI K Y, LIN Q Y, *et al.* Free radical sensors based on inner-cutting graphene field-effect transistors. *Nature Communications*, 2019, **10**: 1544.
- [146] GANGULI A, FARAMARZI V, MOSTAFA A, *et al.* High sensitivity graphene field effect transistor-based detection of DNA amplification. *Advanced Functional Materials*, 2020, **30**: 2001031.
- [147] PICCARA A, MANOLI K, MACCHIA E, *et al.* Ultimately sensitive organic bioelectronic transistor sensors by materials and device structure design. *Advanced Functional Materials*, 2019, **30**: 1904513.
- [148] SHAO W T, SHURIN M R, WHEELER S E, *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 antigens using high-purity semiconducting single-walled carbon nanotube-based field-effect transistors. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2021, **13(8)**: 10321.
- [149] LI J H, WU D, YU Y, *et al.* Rapid and unamplified identification of COVID-19 with morpholino-modified graphene field-effect transistor nanosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **183**: 113206.
- [150] WANG L Q, WANG X J, WU Y G, *et al.* Rapid and ultrasensitive electromechanical detection of ions, biomolecules and SARS-CoV-2 RNA in unamplified samples. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, **6(3)**: 276.
- [151] YOU C C, CHOMPOOSOR A, ROTELLO V M. The biomacromolecule-nanoparticle interface. *Nano Today*, 2007, **2(3)**: 34.
- [152] DANIEL M C, ASTRUC D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2004, **104**: 293.
- [153] BANKS C E, CROSSLEY A, SALTER C, *et al.* Carbon nanotubes contain metal impurities which are responsible for the "electrocatalysis" seen at some nanotube-modified electrodes. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45(16)**: 2533.
- [154] SHEN J F, HU Y Z, LI C, *et al.* Synthesis of amphiphilic graphene nanoplatelets. *Small*, 2009, **5(1)**: 82.
- [155] AYTUR T, FOLEY J, ANWAR M, *et al.* A novel magnetic bead bioassay platform using a microchip-based sensor for infectious disease diagnosis. *Journal of Immunological Methods*, 2006, **314**: 21.
- [156] HASH S, MARTINEZ-VIEDMA M P, FUNG F, *et al.* Nuclear magnetic resonance biosensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biomedical Journal*, 2019, **42(3)**: 187.
- [157] SU D Q, WU K, KRISHNA V D, *et al.* Detection of influenza a virus in swine nasal swab samples with a wash-free magnetic bioassay and a handheld giant magnetoresistance sensing system. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 1077.
- [158] PASTUCHA M, FARKA Z, LACINA K, *et al.* Magnetic nanoparticles for smart electrochemical immunoassays: a review on recent developments. *Mikrochimica Acta*, 2019, **186**: 312.
- [159] SCHOTTER J, KAMP P B, BECKER A, *et al.* Comparison of a prototype magnetoresistive biosensor to standard fluorescent DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **19(10)**: 1149.
- [160] BAIBICH M N, BROTO J M, FERT A, *et al.* Giant magnetoresistance of (001)Fe/(001)Cr magnetic superlattices. *Physical Review Letters*, 1988, **61(21)**: 2472.
- [161] BINASCH G, GRUNBERG P, SAURENBACH F, *et al.* Enhanced magnetoresistance in layered magnetic structures with antiferromagnetic interlayer exchange. *Physical Review B: Condensed Matter*, 1989, **39(7)**: 4828.
- [162] BAYIN Q, HUANG L, REN C H, *et al.* Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM detection with a GMR based LFIA system. *Talanta*, 2021, **227**: 122207.
- [163] ZHANG X J, REEVES D B, PERREARD I M, *et al.* Molecular sensing with magnetic nanoparticles using magnetic spectroscopy of nanoparticle Brownian motion. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **50**: 441.
- [164] ZNOYKO S L, ORLOV A V, BRAGINA V A, *et al.* Nanomagnetic lateral flow assay for high-precision quantification of diagnostically relevant concentrations of serum TSH. *Talanta*, 2020, **216**: 120961.
- [165] WU K, CHUGH V K, D. KRISHNA V, *et al.* One-step, wash-free, nanoparticle clustering-based magnetic particle spectroscopy bioassay method for detection of SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in the liquid phase. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2021, **13(37)**: 44136.
- [166] RÖSCH E L, ZHONG J, LAK A, *et al.* Point-of-need detection of pathogen-specific nucleic acid targets using magnetic particle spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **192**: 113536.
- [167] ZALESSKIY S S, DANIELI E, BLUMICH B, *et al.* Miniaturization of NMR systems: desktop spectrometers, microcoil spectroscopy, and "NMR on a chip" for chemistry, biochemistry, and industry. *Chemical Reviews*, 2014, **114(11)**: 5641.
- [168] BEMETZ J, WEGEMANN A, SAATCHI K, *et al.* Microfluidic-based synthesis of magnetic nanoparticles coupled with miniaturized NMR for online relaxation studies. *Analytical Chemistry*, 2018, **90(16)**: 9975.
- [169] LI Y Q, MA P X, TAO Q, *et al.* Magnetic graphene quantum dots facilitate closed-tube one-step detection of SARS-CoV-2 with ultra-low field NMR relaxometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, **337**: 129786.
- [170] SCHOENLE M V, LI Y, YUAN M, *et al.* NMR based SARS-CoV-2 antibody screening. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, **143(21)**: 7930.
- [171] CANTRELLE F X, BOLL E, BRIER L, *et al.* NMR spectroscopy of the main protease of SARS-CoV-2 and fragment-based screening identify three protein hotspots and an antiviral fragment. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60(48)**: 25428.
- [172] NOVAKOVIC M, KUPCE E, SCHERF T, *et al.* Magnetization transfer to enhance NOE cross-peaks among labile protons: applications to imino-imino sequential walks in SARS-CoV-2-derived RNAs. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60(21)**: 11884.
- [173] WU K, SAHA R, SU D Q, *et al.* Magnetic-nanosensor-based virus and pathogen detection strategies before and during COVID-19. *ACS Applied Nano Materials*, 2020, **3(10)**: 9560.
- [174] CHOI Y, HWANG J H, LEE S Y. Recent trends in nanomaterials-based colorimetric detection of pathogenic bacteria and viruses. *Small Methods*, 2018, **2(4)**: 1700351.
- [175] CALVERT A E, BIGGERSTAFF B J, TANNER N A, *et al.* Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, 2017, **12(9)**: 0185340.
- [176] ROY S, MOHD-NAIM N F, SAFAVIEH M, *et al.* Colorimetric nucleic acid detection on paper microchip using loop mediated isothermal amplification and crystal violet dye. *ACS Sensors*, 2017, **2(11)**: 1713.
- [177] WU J J, WANG X Y, WANG Q, *et al.* Nanomaterials with

- enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). *Chemical Society Reviews*, 2019, **48(4)**: 1004.
- [178] WANG Z Q, LI Z S, ZOU Z G. Application of binder-free  $\text{TiO}_x\text{N}_{1-x}$  nanogrid film as a high-power supercapacitor electrode. *Journal of Power Sources*, 2015, **296**: 53.
- [179] WANG Z F, YANG X, FENG J, *et al.* Label-free detection of DNA by combining gated mesoporous silica and catalytic signal amplification of platinum nanoparticles. *Analyst*, 2014, **139(23)**: 6088.
- [180] VILELA D, GONZALEZ M C, ESCARPA A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: chemical creativity behind the assay. a review. *Chemical Society Reviews*, 2012, **751**: 24.
- [181] ALHOGAIL S, SUAIFAN G, BIKKER F J, *et al.* Rapid colorimetric detection of pseudomonas aeruginosa in clinical isolates using a magnetic nanoparticle biosensor. *ACS Omega*, 2019, **4(26)**: 21684.
- [182] GUO L H, XU Y, FERHAN A R, *et al.* Oriented gold nanoparticle aggregation for colorimetric sensors with surprisingly high analytical figures of merit. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135(33)**: 12338.
- [183] ALDEWACHI H, CHALATI T, WOODROOFE M N, *et al.* Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, 2017, **10(1)**: 18.
- [184] SUN J S, XIANYU Y L, JIANG X Y. Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. *Chemical Society Reviews*, 2014, **43(17)**: 6239.
- [185] GODAKHINDI V S, KANG P, SERRE M, *et al.* Tuning the gold nanoparticle colorimetric assay by nanoparticle size, concentration, and size combinations for oligonucleotide detection. *ACS Sensors*, 2017, **2(11)**: 1627.
- [186] BÜYÜKSÜNETCI Y T, CITIL B E, TAPAN U, *et al.* Development and application of a SARS-CoV-2 colorimetric biosensor based on the peroxidase-mimic activity of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles. *Mikrochimica Acta*, 2021, **188**: 335.
- [187] VENTURA B D, CENNAMO M, MINOPOLI A, *et al.* Colorimetric test for fast detection of SARS-CoV-2 in nasal and throat Swabs. *ACS Sensors*, 2020, **5(10)**: 3043.
- [188] 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. *Analytica Chimica Acta*, 2021, **1154**: 338330.
- [189] LEE J K, CHI Y S, S CHOI I. Reactivity of acetylenyl-terminated self-assembled monolayers on gold: triazole formation. *Langmuir*, 2004, **20**: 3844.
- [190] CHE J, PARK K, GRABOWSKI C A, *et al.* Preparation of ordered monolayers of polymer grafted nanoparticles: impact of architecture, concentration, and substrate surface energy. *Macromolecules*, 2016, **49(5)**: 1834.
- [191] KIMLING J, MAIER M, OKENVE B, *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Chemical Physics*, 2006, **110**: 15700.