

DOI:10.13350/j.cjpb.220523

• 综述 •

纳米金颗粒应用于病原微生物检测的研究进展*

蔡子涵,陈丽萍,杨毅梅**

(大理大学基础医学院寄生虫教研室,云南大理 671000)

【摘要】 纳米金颗粒的理化性质独特,在检测技术中具有操作简单、敏感、特异的特点,在病原微生物的检测较传统方法有较大的优势。本文就纳米金颗粒应用于病原微生物的细菌、病毒和真菌等方面的检测进行综述。

【关键词】 纳米金颗粒;纳米金;病原微生物;检测;综述

【中图分类号】 R38

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0608-03

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 May;17(5):608-610.]

Research progress in the application of gold nanoparticles in the detection of pathogenic microorganisms

CAI Zi-han, CHEN Li-ping, YANG Yi-mei (Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

【Abstract】 Gold nanoparticles have unique physical and chemical properties. They are simple, sensitive and specific in detection technology. They have great advantages over traditional methods in the detection of pathogenic microorganisms. This paper reviews the application of gold nanoparticles in the detection of bacteria, viruses and fungi of pathogenic microorganisms.

【Key words】 Gold nanoparticles; Nano gold; Pathogenic microorganism; detection; review

***病原微生物是一类可以引起人类感染的微生物,其所引起的感染性疾病发病率高,甚至部分微生物所致疾病传染性强。由于未能有效诊断及抗生素的滥用,导致微生物的耐药性不断加强,严重危害到人类的生命安全。传统的病原微生物的检测方法是确诊病原微生物的“金标准”,但检测步骤繁琐、耗时长^[1],对临床诊断存在延迟性。免疫学方法相较于传统方法虽提高了检测的时间,但检测的灵敏度低,易出现假阳性。分子生物学方法提高了检测的灵敏度和特异度,但对操作人员和仪器均有严格要求。因此,亟需研发一种新型的检测方法,克服现有方法的不足,使其更好的为临床服务。随着纳米金颗粒以及表面修饰技术的完善,使得以纳米金颗粒为基础设计的检测技术应用于快速检测病原微生物成为可能,本文就近几年纳米金颗粒在病原微生物检测中的应用进行综述。

1 纳米金颗粒的特点

纳米金颗粒是指表现出至少一个维度低于100 nm的金颗粒。纳米金颗粒具有一般纳米材料所具备的优势而且其最有利的是它的简化合成过程,其可通过柠檬酸盐还原氯金酸的方法制备,通过改变每种物质的比例,改变颗粒的大小、形状。目前最多见的为球形和棒状形^[2-3]。基于纳米金颗粒在光学、化学方面拥有着独特性质以及生物相容性、低细胞毒性、免疫原性、功能化等特征,被广泛应用于快速检测技术中^[4]。例如由于纳米金颗粒作为标记物不但能标记大部分生物分子,而且对他们的活性影响甚微,使其标记技术成为了高敏感、高效率的免疫标记技术^[5]。纳米金颗粒的吸光效应,使其随着纳米金颗粒聚合程度不同,溶液出现肉眼可见的颜色变化,检测的灵敏度提高。因此,纳米金颗粒以其制备简单,在致病菌检测领域备受关注^[6]。

2 病原微生物检测方面的应用

2.1 纳米金颗粒在细菌检测中的应用 大肠埃希菌 O157:H7 是最危险的大肠埃希菌之一,因为它能产生志贺毒素。该菌可以引起出血性肠炎还会导致溶血性尿毒症以及血小板减少性紫癜等疾病^[7]。在欧美国家由大肠埃希菌 O157:H7 感染所致的食物中毒的人数仅次于沙门氏菌^[8],并且 10 活菌即可造成人体感染^[9]。因此,能够对大肠埃希菌 O157:H7 进行早期、快速检测是必要的。Jia 等^[10]基于纳米金光热效应与免疫层析技术相结合构建了对该菌进行快速检测的免疫过滤条法,该方法能够检出浓度为 1.95×10^4 CFU/ml 的细菌,相较于胶体金免疫试纸条,灵敏度提高 10 倍。除此以外,该方法利用纳米金光热效应,能够完全杀灭条带上的大肠埃希菌 O157:H7,做到一次性、无害的处理。周丽霞等^[11]利用纳米金颗粒包被抗体使纳米金颗粒功能化并于相应的抗原结合,使纳米金颗粒相互聚集发生肉眼可见的颜色变化,从而达到对大肠埃希菌 O157:H7 的可视化检测,该方法可在 3 h 内完成对标本的检测,检出限达到 4.1×10^2 CFU/ml。周帅帅等^[12]在纳米金颗粒呈棒状形态的前提下,通过嵌入的方式将大肠埃希菌 O157:H7 特异识别的适配体-1 和罗丹明 B 于其结合,使纳米金棒再生长为“金纳米骨”,加强其表面的拉曼强度,使其成为金信号探针,并于磁捕获探针、大肠埃希菌 O157:H7 构建成三明治复合结构的表面增强拉曼散射(SERS)传感器,该传感器可对大肠埃希菌 O157:H7 进行特异、快速的检测,其检出限可达到 10 CFU/ml。同样,Liu 等^[13]根据 SERS 特性,将 4-甲基硫代苯甲

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81460316)。

** **【通讯作者】** 杨毅梅, E-mail: yimeiy@dali.edu.cn

【作者简介】 蔡子涵(1997-),男,江苏宿迁人,硕士研究生,主要从事免疫学研究。E-mail: 15751519947@163.com

酸作为拉曼探针插到金、银核壳纳米粒子的内部间隙中,并与测流纸条检测法相结合,构建一种可对大肠埃希菌 O157:H7 定量检测的方法,该方法可在 15 min 内完成对标本的检测,并且其灵敏度不受食品基质的干扰,比传统的测流试纸条检测法高 10 倍。

沙门氏菌是普遍且发病率较高的食源性细菌,该菌可以通过多种途径传播,因此沙门氏菌感染成为了全球公共卫生、动物和食品工业的一个主要问题^[14-15]。为了能够早期、快速、特异的检测出该菌。王旗等^[16]将沙门氏菌目的序列互补的 DNA 制备成 DNA 量子点,通过静电吸附作用与纳米金颗粒相连接,构建出 DNA 探针,当探针与目的序列发生杂交时,细菌的荧光强度会被极大的增强,利用荧光光谱仪即可快速检测出沙门氏菌的 DNA 浓度。周宝青等^[17]通过对纳米金颗粒进行巯基化修饰与沙门氏菌互补的 DNA 相结合,构建出纳米金探针,再基于时间相关的光散射技术即可检测出靶 DNA 序列含量,快速、简便、特异,比常规的动态光散射技术高。

金黄色葡萄球菌是最常见的致病菌之一,该菌可以产生多种毒素,其中引起食物中毒的毒素以金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA)为主要类型,其摄入量为 50 ng,即可对体重 70 kg 的成人造成食物中毒,甚至危及生命^[18]。传统检测方法存在耗时长、特异性低、灵敏度差等缺点,而纳米金颗粒的应用恰恰弥补了传统检测方法的不足,马欣月等^[19]基于纳米金棒对荧光基团有着的淬灭的能力与荧光标记的适配体相结合,当标本中存在目的菌时,目的菌与适配体特异性结合,纳米金棒远离荧光基团,出现强的荧光信号,相反带正电的纳米金棒通过静电吸附作用吸附荧光标记的适配体,导致荧光淬灭,荧光信号变弱。此方法可在 1 h 内对标本进行快速检测且检出限可达 5.66 ng/ml。Yao 等^[20]利用纳米金颗粒的蚀刻增强过氧化物酶样催化活性,将免疫磁分离技术与信号放大技术相结合,建立了一种检测金黄色葡萄球菌的比色免疫分析法,65 min 内即可检出金黄色葡萄球菌,检出限为 10 CFU/ml。

单增李斯特菌广泛的存在于各类食物中,其具有耐酸、耐高盐、耐低温等生物学特性,致使人 and 动物均可感染,被世界卫生组织列为 4 大食源致病菌之一^[21]。为了提高该菌的检出率,陈威凤等^[22]基于作为比色探针的纳米金和作为识别元件的核酸适配体,构建了一种能够对单增李斯特菌进行可视化快速检测的方法,该方法可以在 2 h 内通过观察液体颜色对该菌快速检测,其检测线可达 5 CFU/ml。该方法与 LIU 等^[23]利用表面增强拉曼散射与重组酶聚合酶扩增技术,构建的对该菌检测方法相比,无需繁琐的操作步骤,能够在更短的时间内对单增李斯特菌进行可视化检测,其检出限更低。卢春霞等^[24]将纳米金颗粒的特性应用到了胶体层析技术中,与亲和素-生物素技术相结合,制备出可以检测单核李斯特菌的双适配体夹心模式的试纸条,该试纸条对 4×10^6 CFU/ml 的单核李斯特菌检测为阳性,对其他同样浓度的病原体检测为阴性,具有较高的特异性。

2.2 纳米金颗粒在病毒检测中的应用 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 其因传染性强、传播速度快、感染范围广以及传播途径多等特征,成为了新中国成立以后发生最大的突发公共卫生事件^[25]。病毒的快速蔓延,对全球造成了巨大的影响。切断传染源是阻止该病毒传播最有效的方法,而有效的检测方

法又是切断传染源的前提。因此,早期、快速检测对于患者的早期诊断,及时治疗以及减少疾病传播具有重要的意义。李智杰等^[26]利用了具有良好导热率的纳米金颗粒与传统的 PCR 技术结合,构建了一种对新型冠状病毒进行快速诊断的方法。该方法灵敏度高于普通 PCR 技术 10 倍,适用于大批量筛查工作,还能对无症状带毒者进行排查。Moitra 等^[27]将针对 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的反义寡核苷酸 (ASO) 进行巯基化后与纳米金颗粒结合,当有目的 RNA 出现时即 ASO 和目的 RNA 发生杂交,加入核糖核酸酶 H (RNase H) 将纳米金颗粒与 RNA 链分离,导致溶液中纳米金颗粒之间相互聚集出现可视化的沉淀。该方法可在 10 min 内对独立 RNA 样本完成检测,且无需特殊的专业仪器。Tian 等^[28]将纳米金颗粒的特性应用于横向流动免疫检测条带中,利用纳米金颗粒偶联抗人 IgG 与样本中存在的 SARS-CoV-2 IgG 抗体结合,再通过与条带上该病毒的核衣壳蛋白结合,出现肉眼可见的红色检出线。

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 主要通过破损的皮肤或者黏膜侵入机体,患者及携带者的血液、唾液等体液都可成为传染源,使得 HBV 感染成为了全球性的公共卫生问题。在我国,2016 年慢性 HBV 感染人数约 8 600 万,诊断率仅有 18.7%^[29]。因此,有效、快速的诊断是降低慢化率以及感染率的最直接方法。戴颖等^[30]利用 DNA 纳米金探针与磁珠探针技术相结合,通过碱基互补配对对信号精确定位以及通过显色对乙肝病毒进行定量检测。该方法具有很高的敏感性和重复性。

2.3 纳米金颗粒在真菌检测中的应用 真菌是一类独立的真核生物群,其可产生各种真菌毒素,是一种次级代谢,极易对各种食品造成污染,包含香料、酒、肉制品等。在感染初期,各类毒素入侵宿主后,难以根据临床表现进行诊断。早期、灵敏、低水平检测这些毒素方法尤为重要^[31-32]。季艳伟^[33]通过对种子介导生长法进行改良,制备出花状纳米金,并将其作为新型标记探针与针对各种真菌毒素的单克隆抗体结合,建立一种免疫层析检测技术。该技术较传统的试纸条敏感性提高 10 倍,最低检出限达到 0.32 pg/ml。孔德莉等^[34]利用荧光共振能量转移原理,将赭曲霉毒素 A 的核酸适配体与其互补的单链 DNA 修饰的金纳米颗粒结合,构建出一种新型的传感器。该传感器具有灵敏性高、易上手以及检测下限低的特点。

3 纳米金颗粒在寄生虫检测中的应用

鉴于纳米金颗粒功能独特,可以在早期对病原微生物进行快速、灵敏的检测。同时,其应用于寄生虫的检测也展现出较高的应用价值。

寄生虫是一类通过依附于宿主,吸取宿主养分从而获得生存的生物,其引起的疾病为寄生虫病。大多数寄生虫病具有传染性,并且对宿主造成不可逆的慢性损伤,在疾病早期不表现或低表现临床症状,难以确诊。因此,早期、灵敏的检测对寄生虫病治疗和预后至关重要。Sousa 等^[35]基于纳米金颗粒的光学性质,用来源于 II 型弓形虫特异性 GRA6 抗原的多肽修饰纳米金颗粒,构建出纳米探针,当特异性结合抗体时,纳米探针会出现不同的聚集现象,溶液颜色改变,通过比色即可判断结果。李家萌等通过优化金晶种子法制备出纳米金棒,基于纳米金棒纵向等离子吸收峰随直径长比增大而出现红移现象,分别制备出针对日本血吸虫、广州管圆线虫以及旋毛虫的功能化纳米

金棒,并实施检测^[36]。该方法相较于 ELISA 法可以做到早期检测并且有更高的灵敏性和特异性。

4 展望

目前随着病原微生物种类发现的增多,病原微生物传染性也呈逐年增强趋势,传统的检测技术比如 ELISA、法学分析法等已经满足不了对病原微生物检测的需求,尤其是早期快速检测的需求。纳米金颗粒作为效果最好的纳米材料之一,以其为载体检测技术敏感、特异,有望取代传统的血清学和分子方法^[37],成为临床诊断的新工具。

【参考文献】

- [1] 李吉业,王宗萍.适配体功能化纳米材料传感器快速检测食源性致病菌[J].山东化工,2021,50(4):184-188.
- [2] Panda T, Deepa K. Biosynthesis of gold nanoparticles [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(12): 10279-10294.
- [3] 朱逢龙,廉晓丽,季亚楠,等.纳米金在医学寄生虫学应用中的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2019,14(9):1108-1111.
- [4] You CC, Verma A, Rotello VM. Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface[J]. Soft Matter, 2006, 2(3): 190-204.
- [5] 孔玉方,杨毅梅.纳米医学技术在妇产科疾病诊疗方面的应用[J].实用医学杂志,2017,33(11):1724-1727.
- [6] Fan JN, Cheng YQ, Sun MT. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and biomedical applications [J]. Chem Record, 2020, 20(12): 1474-1504.
- [7] 辛思培,蒋蔚,龙梦瑶,等.检测牛奶中肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 的双抗夹心化学酶联免疫方法的建立[J].畜牧与兽医, 2020, 52(4): 116-121.
- [8] Wadamori Y, Gooneratne R, Hussain MA. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce [J]. J Sci Food Agric, 2017, 97(5): 1396-1403.
- [9] 曲晓莹,吴清平,熊争,等.检测大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 免疫磁珠的制备、保存与应用[J].微生物学通报, 2019, 46(10): 2801-2810.
- [10] Jia M, Liu J, Zhang J, et al. An immunofiltration strip method based on the photothermal effect of gold nanoparticles for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Analyst, 2019, 144(2): 573-578.
- [11] 周丽霞,肖勇,杨耀东.基于金纳米颗粒的比色法检测大肠埃希菌 O157:H7 [J].江苏农业学报, 2014, 30(4): 885-889.
- [12] 周帅帅.适配体功能化“金纳米骨”基底创制及其检测大肠埃希菌 O157:H7 的 SERS 方法研究 [D].北京:中国农业科学院, 2020.
- [13] Liu HB, Chen CY, Zhang CN, et al. Functionalized Au(MBA) ag nanoparticles as an optical and sers dual probe in a lateral flow strip for the quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. J Food Sci, 2019, 84(10): 2916-2924.
- [14] Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance [J]. Vet World, 2019, 12(4): 504-521.
- [15] 曹颖,李家萌,赵媛,等.纳米金标记技术应用于病原生物检测的研究[J].中国病原生物学杂志, 2016, 11(3): 272-275.
- [16] 王旗,程小翠,夏娟.基于 DNA 量子点复合荧光探针的沙门氏菌定量检测[J].赤峰学院学报(自然科学版), 2020, 36(9): 76-81.
- [17] 周宝青.基于金纳米粒子动态光散射技术快速检测沙门菌和大肠埃希菌 O157:H7 的研究及食品安全检测车设计 [D].南昌:南昌大学, 2018.
- [18] Schwan WR. *Staphylococcus aureus* Toxins: armaments for a significant pathogen [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(8): 457-460.
- [19] 马欣月.基于纳米材料的核酸适配体荧光传感策略快速检测金黄色肠毒素 A [D].长春:吉林大学, 2020.
- [20] Yao S, Li J, Pang B, et al. Colorimetric immunoassay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* based on etching-enhanced peroxidase-like catalytic activity of gold nanoparticles [J]. Mikrochim Acta, 2020, 187(9): 504.
- [21] 武鑫.食品中单增李斯特菌快速检测技术研究进展 [J].食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6013-6017.
- [22] 陈威风,陈薇,蔡颖,等.基于核酸适配体结合纳米金模拟酶用于单增李斯特菌的快速检测 [J].食品与发酵工业, 2021, 47(3): 176-180.
- [23] Liu HB, Du XJ, Zang YX, et al. SERS-Based lateral flow strip biosensor for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serotype enteritidis [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(47): 10290-10299.
- [24] 卢春霞,李红敏,孙凤霞,等.基于适配体识别的侧向层析法快速检测单核细胞增生李斯特氏菌 [J].食品与生物技术学报, 2020, 39(4): 85-92.
- [25] 周志红.国内外科技期刊关于新型冠状病毒报道的分析与思考 [J].科技管理研究, 2021, 41(6): 43-48.
- [26] 李智杰,孙飞雁,刘占悝,等.新型冠状病毒纳米 PCR 快速检测方法的建立 [J].病毒学报, 2021, 37(1): 19-24.
- [27] Moitra P, Alafeef M, Dighe K, et al. Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by n gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles [J]. ACS Nano, 2020, 14(6): 7617-7627.
- [28] Tian W, Huang C, Shi FJ, et al. Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus [J]. Analyst, 2020, 145(15): 5345-5352.
- [29] 崔富强,庄辉.中国乙型肝炎的流行及控制进展 [J].中国病毒病杂志, 2018, 8(4): 257-264.
- [30] 戴颖.纳米探针芯片技术用于微量乙肝病毒 DNA 的检测 [J].中国医疗器械信息, 2018, 24(01): 30-43.
- [31] Zhao H, Xiang X, Chen M, et al. Aptamer-based fluorometric ochratoxin a assay based on photoinduced electron transfer [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(2): 65-75.
- [32] Wang B, Wu Y, Chen Y, et al. A highly sensitive aptasensor for OTA detection based on hybridization chain reaction and fluorescent perylene probe [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 81: 8125-81130.
- [33] 季艳伟.花状纳米金及抗独特型纳米抗体在真菌毒素免疫学检测中的应用研究 [D].南昌:南昌大学, 2017.
- [34] 孔德莉,罗思,彭瑞晨,等.基于无标记金纳米簇的新型荧光生物传感器在赭曲霉毒素 A 快速检测中的应用 [J].食品科学, 2021, 42(4): 263-270.
- [35] Sousa S, Antonio C, Correia Da Costa Jose-Manuel, et al. Biosensor based immunoassay: a new approach for serotyping of *Toxoplasma gondii* [J]. Nanomaterials, 2021, 11(8): 2065.
- [36] 季亚楠,廉晓丽,朱逢龙,等.金属纳米粒子在常见感染性疾病检测及治疗中的应用研究进展 [J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(1): 115-119.
- [37] Jazayeri MH, Aghaie T, Avan A, et al. Colorimetric detection based on gold nano particles (GNPs): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA, and ion) [J]. Sens Bio Sen Res, 2018: 201-208.

【收稿日期】 2021-12-05 【修回日期】 2022-02-05