

doi: 10.11823/j.issn.1674-5795.2025.03.08

石墨烯涂覆锥形光纤的快速生物检测研究

刘忍, 王晶晶, 冯吉军*

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院 上海市现代光学系统重点实验室, 上海 200093)

摘要: 为响应快速、高灵敏度检测结核病抗原及新型冠状病毒蛋白的需求, 研发了一种检测结核病抗原 (MPT64 蛋白、Ag85B 蛋白) 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 中核衣壳 (Nucleocapsid, N) 蛋白的高灵敏度光学微纤传感器。该光学微纤传感器通过具有极高表面积和优异光学特性, 并能显著增强锥形光纤固定能力的氧化石墨烯 (Graphene Oxide, GO) 进行涂覆; 然后采用能够在体外有效捕获目标蛋白, 并实现实时检测的适配体单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 对 GO 涂覆的锥形光纤进行修饰。采用制备好的传感器对目标物质进行检测。实验结果显示: 该传感器能够在复杂样本中快速检测 MPT64 和 Ag85B, 检测时间仅为 10 s, 检测限 (Limit of Detection, LOD) 分别为 4.23×10^{-20} M 和 3.11×10^{-19} M; 另外, 对 SARS-CoV-2 中 N 蛋白的 LOD 为 6.25×10^{-19} M。该光学微纤传感器具备高灵敏度和快速检测的优势, 有望在诸如结核病诊断和冠状病毒检测等医学领域发挥重要的作用。

关键词: 灵敏检测; 锥形光纤传感器; 冠状病毒; 结核病; 蛋白

中图分类号: Q811.4; TN253 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5795 (2025) 03-0085-15

Research on rapid biosensing with graphene-coated conical optical fibers

LIU Ren, WANG Jingjing, FENG Jijun*

(Shanghai Key Laboratory of Modern Optical System, School of Optical-Electrical and Computer Engineering,
University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In response to the need for rapid and highly sensitive detection of tuberculosis antigens and novel coronavirus proteins, a highly-sensitivity optical microfiber sensor for detecting tuberculosis antigens (MPT64 protein, Ag85B protein) and the nucleocapsid (N) protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been developed. The optical microfiber sensor is coated with graphene oxide (GO) which offers extremely high surface area and excellent optical properties, and can significantly enhance the conical optical fiber's immobilization capacity; the GO-coated conical optical fiber is further functionalized with single-stranded DNA (ssDNA) aptamers, enabling efficient capture of target proteins and facilitating real-time detection in vitro. The prepared sensor is employed to detect the target analytes. The experimental results reveal that the sensor can rapidly detect MPT64 and Ag85B in complex samples within 10 s, achieving detection limits of 4.23×10^{-20} M and 3.11×10^{-19} M, respectively. Additionally, the sensor exhibits a de-

收稿日期: 2025-01-14; 修回日期: 2025-02-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFE0107400); 国家自然科学基金项目 (U23A20381, 11933005);
上海市科技委员会项目 (23010503600, 23530730500); 上海市高校特聘教授 (东方学者) 岗位
计划项目 (GZ2020015); 浙江省医学电子与数字健康重点实验室开放项目 (2023AY311006)

引用格式: 刘忍, 王晶晶, 冯吉军. 石墨烯涂覆锥形光纤的快速生物检测研究[J]. 计测技术, 2025, 45
(3): 85-99.

Citation: LIU R, WANG J J, FENG J J. Research on rapid biosensing with graphene-coated conical optical fi-
bers[J]. Metrology & Measurement Technology, 2025, 45(3): 85-99.



tection limit of 6.25×10^{-19} M for the N protein of SARS-CoV-2. The optical microfiber sensor possesses the advantages of high sensitivity and rapid detection, and is expected to play an important role in medical fields such as tuberculosis diagnosis and coronavirus detection.

Key words: sensitive detection; tapered optical fiber sensor; coronavirus; tuberculosis; protein

0 引言

结核病是全球最常见的传染病之一,感染者近20亿,每年新发病例约1 000万,死亡人数约160万人^[1]。然而潜伏性结核感染(Latent Tuberculosis Infection, LTBI)通常不伴有症状,及时诊断对患者康复至关重要。结核分枝杆菌是导致结核病的关键病原体,其分泌的蛋白质在疾病诊断中具有重要作用^[2]。其中, MPT64^[3]和Ag85复合物^[4]是关键分子标志物。MPT64^[5]是结核分枝杆菌特有的,其作为细菌生长的代谢指标,参与迟发型超敏反应,是一个有价值的诊断工具。Ag85复合物由Ag85A、Ag85B和Ag85C组成^[6],其不仅在诱导保护性Th1型细胞因子方面起着重要作用,还通过与宿主纤维连接蛋白结合来帮助病原体实现免疫逃逸。此外,Ag85复合物能诱发特异性的免疫反应,在结核病诊断中至关重要。在新冠疫情期间, SARS-CoV-2因其传播迅速和非特异性症状导致确诊难度增加。与其他冠状病毒相同, SARS-CoV-2基因组编码4种结构蛋白^[7]: 刺突(Spike, S)蛋白、包膜(Envelope, E)蛋白、膜(Membrane, M)蛋白、N蛋白。N蛋白保留了RNA基因组,而S、E和M蛋白共同形成病毒包膜。与结核病类似, SARS-CoV-2携带的N蛋白具有潜在的分子标志价值。传统的生物检测方法(如培养和直接涂片显微镜)耗时长且具有挑战性,而分子诊断技术(如聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR))具有高灵敏度和特异性^[8-10]。但这些方法都存在检测速度慢、成本高和技术复杂性高等问题^[11],目前无法满足临床实践中的实时监测需求。

近年来,具有灵敏度高、易于微型化特性的光学微纤传感器作为生物检测领域的创新技术,展现出巨大的应用潜力^[12-15]。LI K等人^[16]利用功能化特殊抗体的光学微纤维实现了对 α -胎蛋白(Alpha-Fetoprotein, AFP)的高灵敏度检测, LOD可达0.2 ng/mL。YAP S H K等人^[17]使用氮和硫掺杂碳

点功能化的光纤传感器来检测生物样品中的 Fe^{3+} ,实现了灵敏度为 $0.006 \text{ nm}/(\mu\text{g}/\text{L})$ 、LOD为 $0.77 \mu\text{g}/\text{L}$ 的高检测性能。GO因其独特的物理化学性质,在光纤传感器领域中具有重要作用,其高比表面积、丰富的表面官能团(如羧基、羟基等)^[18]以及良好的电子传导性^[19],能够有效增强传感器的灵敏度和选择性。GO能够与分子识别元件(如抗体、适配体等)结合^[20],提升光纤传感器对特定目标物的检测能力,并通过表面吸附或电导率变化放大信号,实现高精度的检测。除此之外,GO在生物传感器中表现出优异的生物兼容性和稳定性^[21],适用于复杂生物样本的长时间检测。其优异的稳定性和抗干扰能力使其能够在不同的环境中应用,包括环境监测、疾病诊断、食品安全等。因此,GO作为功能化材料在光纤传感器领域中展现了广阔的应用前景。

本文通过将不同的特异性适配体固定在GO^[22]涂覆的锥形光纤上,成功构建了一系列高性能光学微纤传感器。这些传感器被分别用于结核病抗原(MPT64和Ag85B蛋白)以及SARS-CoV-2中N蛋白的检测。实验结果表明:所开发的传感器能够实现目标生物标志物的高灵敏度检测,展现出优异的检测性能和广阔的应用前景。

1 材料

本研究使用的化学试剂包括硫酸(H_2SO_4)、过氧化氢(H_2O_2)、3-氨丙基三乙氧基硅烷[(3-Aminopropyl) triethoxysilane, APTES]、乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)、GO以及去离子水(用于配制水溶液)等,所有化学试剂均按照收到的样品使用,未进一步纯化。包层直径为 $125 \mu\text{m}$ 的二氧化硅(SiO_2)单模光纤(SMF-28)由Corning公司提供;结核分枝杆菌的Ag85B(g230322)、MPT64蛋白、适配体MPT64-AP、适配体Ag85B-AP和L-精氨酸(L-arginine)由中国上海安升达(AZENTA)公司提供;N蛋白、RNA-AP、DNA-AP、牛血清蛋白(Bovine Serum Albu-

min, BSA)、L-天冬酰胺(L-Asparagine, Asn)、L-瓜氨酸(L-Citrulline, Cit)、尿素(Urea)由中国上海品诺生物科技有限公司(Gene Optimal)提供。

2 GO 功能化锥形光纤

首先,使用熔融法制备微纤(微纤的尺寸和结构会影响光在其中的传播方式),对光纤进行局部加热,同时在熔融状态下拉伸光纤两端,使其成为腰部直径约 $9.8\ \mu\text{m}$ 的锥形光纤^[23-24];接着,对制备好的微纤进行表面功能化,如图1所示,使用 APTES 溶液和食人鱼溶液对微纤进行表面胺化,以引入更多的正电荷^[25-26];随后,在微纤上涂覆 GO^[27],通过 GO 含氧基团与微纤表面氨基之间的静电作用,实现 GO 在微纤表面的功能化^[28-29]。

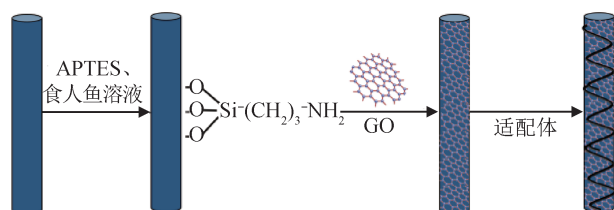


图1 锥形光纤表面功能化过程

Fig.1 The process of conical fiber surface functionalization.

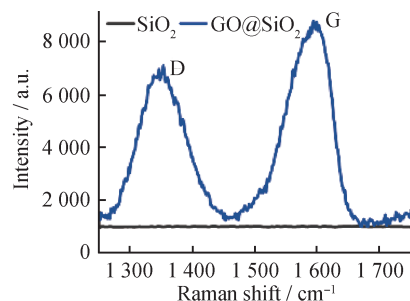
如图2所示,为了验证光纤增敏界面的成功构建,本文对GO增敏界面进行了表征。如图2(a)所示,洁净微纤在 $1\ 200 \sim 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 范围内的拉曼散射响应较弱,而经过GO涂覆后的微纤表面拉曼光谱在 $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 580\ \text{cm}^{-1}$ 附近清晰地显示特征峰D峰和G峰,因此,最终得到的产物是GO功能化的微纤。

针对不同探针的目标蛋白检测需求,本研究分别制备了相应的光学微纤适配体传感器,图2(b)~图2(g)展示了微纤表面在界面功能化前后的扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)图像,微纤表面的显著变化证明了适配体界面的成功构建。

3 结核病抗原MPT64和Ag85B的检测

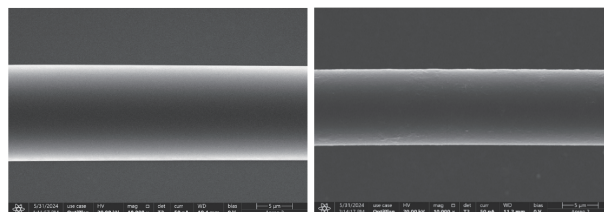
3.1 MPT64和Ag85B蛋白的表达与纯化及ssDNA适配体的筛选

MPT64和Ag85B都是结核分枝杆菌的重要免疫抗原,在结核分枝杆菌的检测和疫苗开发中起关键作用。结核病是一种人畜共患病,通过比较



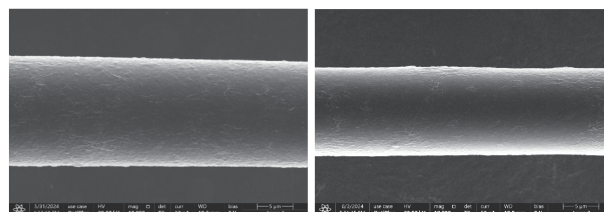
(a) 微纤表面的拉曼光谱图

(a) Raman spectrogram of microfiber surface



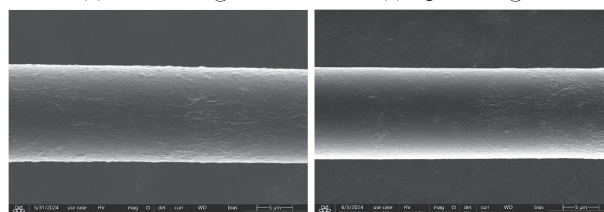
(b) 裸光纤
(b) Pure fiber

(c) GO纳米界面
(c) GO nanoscale interface



(d) MPT64-AP@GO
(d) MPT64-AP@GO

(e) Ag85B-AP@GO
(e) Ag85B-AP@GO



(f) RNA-AP@GO
(f) RNA-AP@GO

(g) DNA-AP@GO
(g) DNA-AP@GO

图2 微纤表面的拉曼光谱图和不同条件下微纤的SEM

Fig.2 Surface raman spectroscopy diagram and SEM images of microfiber under different conditions

细菌菌株的蛋白序列,发现人类和牛结核菌株中的MPT64和Ag85B蛋白具有高度同源性,其序列几乎完全一致,如图3(a)和图3(c)所示。

为对MPT64和Ag85B蛋白进行表达和纯化,对2种蛋白分别进行了十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)分析,具体过程为:将蛋白质样品以 $15\ 000\ g$ 的加速度离心 $5\ \text{min}$,收集剩余的沉淀物并将其溶解于样品缓冲液中,该缓冲液由 $10\ \text{mM}$ Tris-HCl ($\text{pH}=6.8$)、 10% 甘油、 0.05% 溴酚蓝、 2% SDS和 5% 2-巯基乙醇配置而成;

MPT64 (100%)		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MRKIFMLVTA VVLLCCSGVATAAPKTYCEELKGTDTGQACQIQMSDPAYNINISLPSYY	60
<i>Mycobacterium bovis</i>	MRKIFMLVTA VVLLCCSGVATAAPKTYCEELKGTDTGQACQIQMSDPAYNINISLPSYY	60
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PDQKSLNENYAQTRDKFLSAATSSTPREAPYELNITSATYQSAIPPRGTQAVVLKVYQNA	120
<i>Mycobacterium bovis</i>	PDQKSLNENYAQTRDKFLSAATSSTPREAPYELNITSATYQSAIPPRGTQAVVLKVYQNA	120
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GGTHPTTTYKAFDWDQAYRKPIYDTLWQADTDPLPVVFPVQGELSKQTGGQVSIAPNA	180
<i>Mycobacterium bovis</i>	GGTHPTTTYKAFDWDQAYRKPIYDTLWQADTDPLPVVFPVQGELSKQTGGQVSIAPNA	180
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GLDPVNYQNFAVTNDGVIFFFNPGEELPEAAGPTQVLVPRSAIDSMILA	228
<i>Mycobacterium bovis</i>	GLDPVNYQNFAVTNDGVIFFFNPGEELPEAAGPTQVLVPRSAIDSMILA	228

(a) MPT64蛋白的核酸序列比对

(a) Nucleotide sequence alignment of MPT64 protein

Ag85B (99%)		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTDVSRRKIRAWGRRLMIGTAAAVLPLGLVLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSMGR	60
<i>Mycobacterium bovis</i>	MTDVSRRKIRAWGRRLMIGTAAAVLPLGLVLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSMGR	60
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DIKVFQSGGNNSPA VYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYS	120
<i>Mycobacterium bovis</i>	DIKVFQSGGNNSPA VYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYS	120
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DWYSPACGKAGCQTYKWETLLTSELPPQWLSANRAVKPTGSAAGLSMAGSSAMILAAHYHP	180
<i>Mycobacterium bovis</i>	DWYSPACGKAGCQTYKWETLLTSELPPQWLSANRAVKPTGSAAGLSMAGSSAMILAAHYHP	180
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	QQFIYAGSLALLDPSQGMGSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQIQPKL	240
<i>Mycobacterium bovis</i>	QQFIYAGSLALLDPSQGMGSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQIQPKL	240
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	VANNTRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNG	300
<i>Mycobacterium bovis</i>	VANNTRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNG	300
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	THSWEYWGALNMGDLQSSSLGAG	325
<i>Mycobacterium bovis</i>	THSWEYWGALNMGDLQSSSLGAG	325

(c) Ag85B蛋白的核酸序列比对

(c) Nucleotide sequence alignment of Ag85B protein

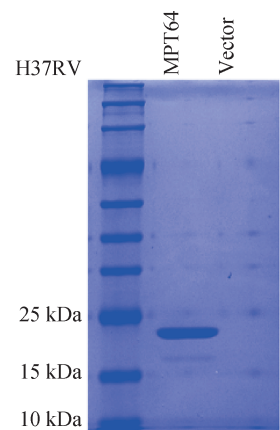
注:电泳迁移率变动分析(Electrophoretic mobility shift analysis, EMSA)。

图3 MPT64和Ag85B蛋白的表达与纯化

Fig.3 Expression and purification of MPT64 and Ag85B proteins

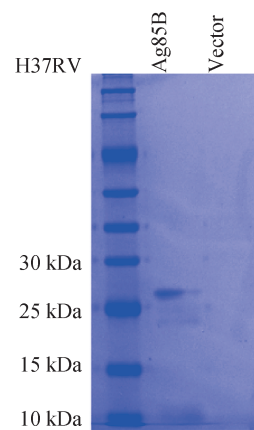
以已知分子量的蛋白质作为分子质量指标, SDS-PAGE分析按照JIA H等人^[30]描述的方法进行, 并使用考马斯亮蓝对凝胶进行染色。经过SDS-PAGE分析, 表达和纯化的MPT64和Ag85B蛋白表现出良好的特异性, 如图3(b)和图3(d)所示。

通过文献调研, 确定潜在靶向结核分枝杆菌MPT64和Ag85B蛋白的ssDNA适配体^[31], 并基于结构相似性选择这些适配体用于后续检测研究。进一步利用AlphaFold3预测候选适配体(MPT64-AP和Ag85B-AP)序列与MPT64和Ag85B的结合情况, 如图4所示。研究结果表明: MPT64-AP和Ag85B-AP适配体可以分别与MPT64和Ag85B蛋白结合。



(b) MPT64-AP的EMSA分析

(b) EMSA of MPT64-AP protein



(d) Ag85B-AP的EMSA分析

(d) EMSA of Ag85B-AP protein

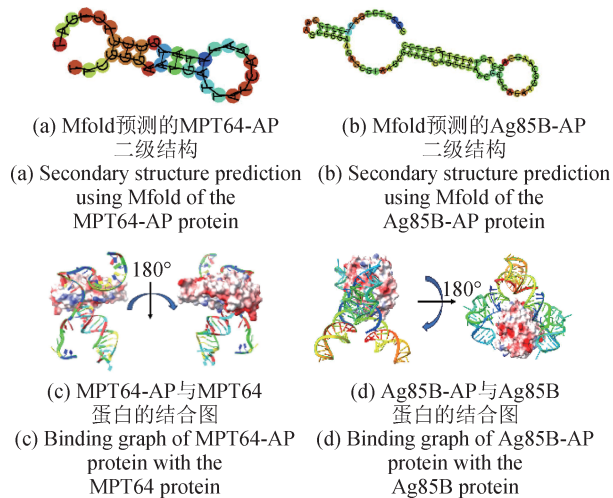


图4 适配体的二级结构及其与MPT64和Ag85B的分子对接结果

Fig.4 Secondary structure of the adapter protein and its molecular docking results with MPT64 and Ag85B proteins

3.2 MPT64-AP和Ag85B-AP适配体与结核分枝杆菌蛋白的特异性结合

为了评估适配体与MPT64和Ag85B蛋白的结合特异性,本文利用BIAcore T200生物传感系统对其进行了表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)分析,具体方法之前已有描述^[32]。实验中,预先用流动缓冲液(由pH=7.5的10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2.7 mM KCl组成)对GO功能化的传感芯片(Cytiva)进行平衡处理;然后使用100 mM N-羧基琥珀酰亚胺和400 mM N-乙基-N'-(二甲氨丙基)碳二亚胺对芯片表面进行活化,以便固定带有His标签的目标蛋白;蛋白质固定完成后,使用1 M 乙醇胺盐酸盐(pH=8.5)钝化芯片表面,封闭所有残留的活化基团,从而防止非特异

性结合;随后将传感器放入流动池中进行基线测定,基线稳定后,将至少6种不同浓度的适配体(MPT64-AP、Ag85B-AP、RNA-AP、DNA-AP)依次注入流动池中,每次样品注射后,使用10 mM NaOH对蛋白表面进行再生处理,并重新用流动缓冲液进行平衡。通过BIAcore评价程序(BIAcore, 版本3.2)分析SPR图谱,以确定适配体与目标蛋白的结合速率常数(K_a)和解离速率常数(K_d)。通过动力学分析可知,MPT64-AP和Ag85B-AP对各自的目标蛋白质MPT64和Ag85B均表现出较强的亲和力,其平衡解离常数(K_D)分别为 2.76×10^{-8} M和 3.11×10^{-8} M,如图5(a)和图5(b)所示。这些结果表明:适配体与目标蛋白之间结合紧密,能够满足对MPT64和Ag85B确定性测量的灵敏度和可重复性要求。

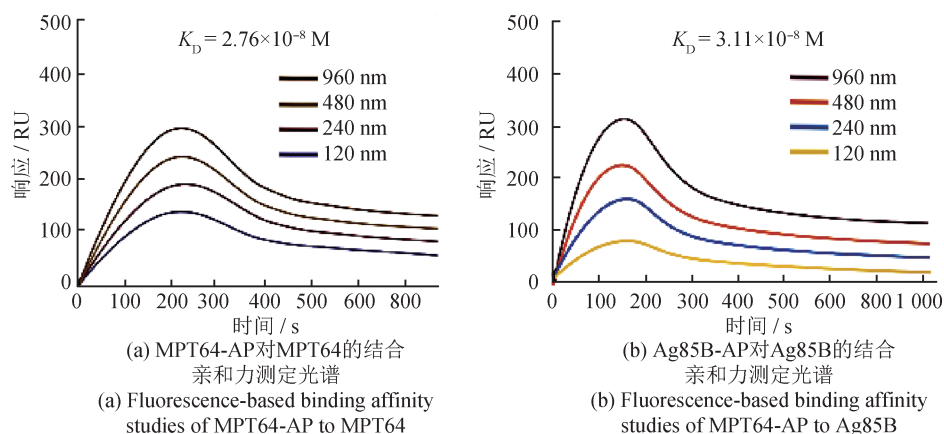


图5 MPT64-AP和Ag85B-AP对MPT64和Ag85B蛋白的结合亲和力测定光谱

Fig.5 Binding studies of MPT64-AP and Ag85B-AP proteins to MPT64 and Ag85B proteins using fluorescence spectroscopy

3.3 微纤传感器对MPT64和Ag85B蛋白的检测

本文研究了2种不同适配体(MPT64-AP和Ag85B-AP)修饰的微纤传感器对MPT64和Ag85B蛋白的检测能力,并设计了相应的对照实验以验证其有效性。MPT64-AP适配体被固定在GO修饰的微纤表面,然后将其置于浓度范围为 4.23×10^{-20} ~ 4.23×10^{-9} M的MPT64蛋白溶液中,以评估传感器对目标蛋白的检测能力。

如图6(a)、6(b)所示,随着MPT64蛋白浓度的增加,传感器的传输光谱出现明显的红移。传感器的灵敏度为 $1.11 \text{ nm} / \log \text{M}$,拟合线性度为98.88%。该光学传感器的LOD达到了 4.23×10^{-20} M,表明其在MPT64蛋白微量分析方面的适用性符合要求。

同样地,Ag85B-AP适配体被固定在GO修饰的

光纤上,并置于浓度为 3.11×10^{-19} ~ 3.11×10^{-11} M的Ag85B蛋白溶液中。如图6(c)所示,随Ag85B蛋白浓度的增加,传感器的传输光谱出现明显的红移。如图6(d)传感器的灵敏度为 $1.86 \text{ nm} / \log \text{M}$,拟合线性度为97.23%,LOD为 3.11×10^{-19} M。这表明该微纤传感器对Ag85B蛋白具有良好的检测性能。

3.4 传感器的选择性

在实际检测环境中,细胞外环境中干扰分子引起的波动是不可避免的,因此,在确定检测条件时,必须考虑和讨论干扰因素的影响。为了模拟临床测量的生理条件,本文评估了MPT64-AP传感器在低浓度MPT64蛋白溶液(4.23×10^{-9} M)和高浓度干扰蛋白成分(如尿素 3.33×10^{-6} M和精氨酸 1.15×10^{-6} M)之间的区分能力。如图7(a)所示,MPT64-

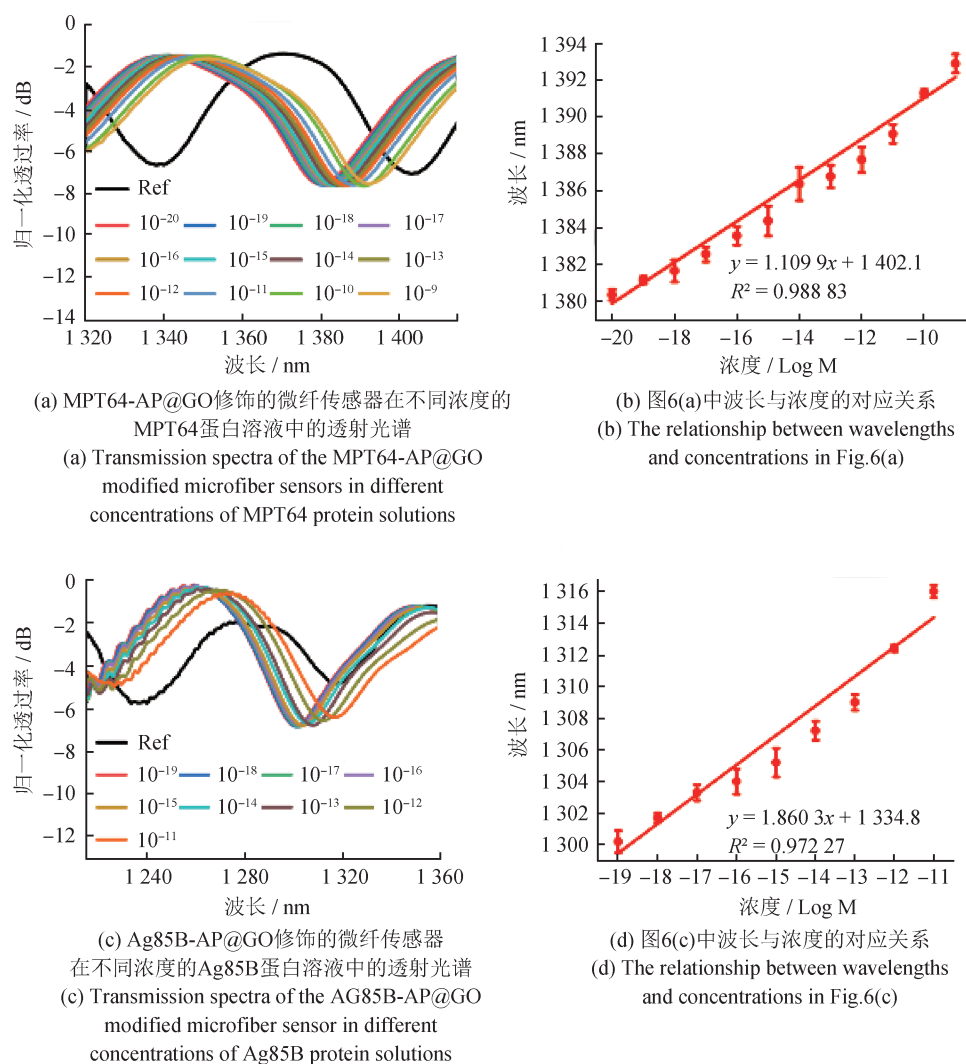


图6 MPT64-AP@GO和Ag85B-AP@GO修饰的传感器检测不同浓度的目标蛋白后的透射光谱及其波长与浓度的对应关系

Fig.6 The transmission spectra of different concentrations of target proteins detected by MPT64-AP@GO and Ag85B-AP@GO modified sensors and the corresponding relationships between wavelengths and concentrations

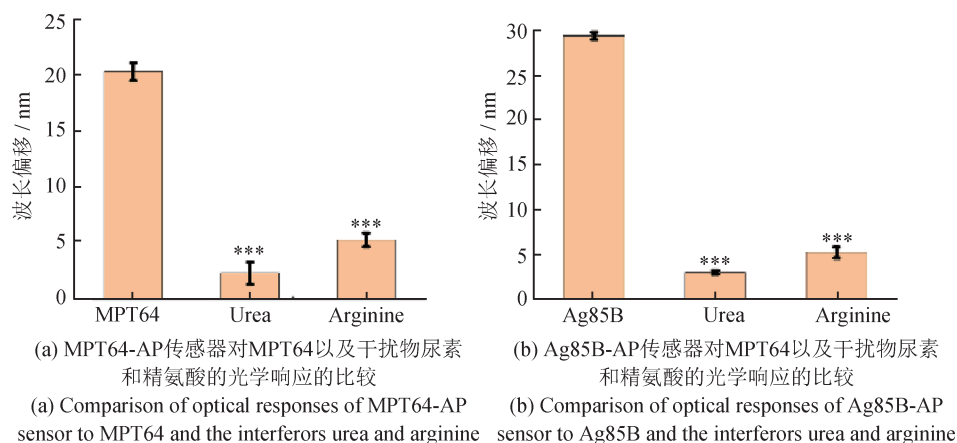


图7 不同传感器在无干扰和有干扰条件下的光学响应比较($n=3$), *** $p < 0.001$

Fig.7 The optical response characteristics of different sensors were compared under undisturbed and disturbed conditions to evaluate their performance differences($n=3$), *** $p < 0.001$

AP适配体在检测MPT64蛋白时表现出大约20.4 nm的显著波长偏移；而对尿素和精氨酸，其光学信号响应较弱，波长偏移量分别约为2.2 nm和5.2 nm。

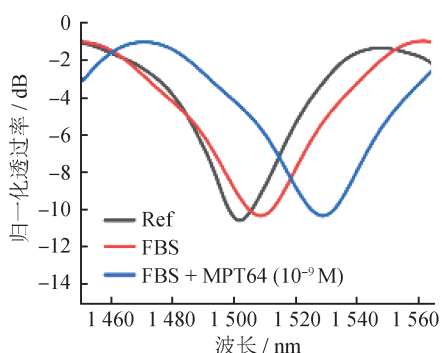
另外，本文对Ag85B-AP传感器在低浓度Ag85B蛋白溶液(3.11×10^{-9} M)与高浓度干扰成分蛋白(包括尿素 3.33×10^{-6} M和精氨酸 1.15×10^{-6} M)共存条件下的区分能力进行了测试。如图7(b)所示，Ag85B-AP配体在检测Ag85B蛋白时表现出约29.4 nm的波长偏移，超过了尿素和精氨酸引起的光学响应(分别约为3 nm和5.22 nm)。

结果显示：传感器与单独的血清反应时，其共振波长仅发生轻微红移；而与含有MPT64蛋白或Ag85B蛋白的血清反应时，红移显著增加。具体而言，MPT64-AP传感器在检测不含目标蛋白的FBS时，波长偏移为7.22 nm；而在FBS中检测到MPT64蛋白(4.23×10^{-9} M)时，波长偏移为

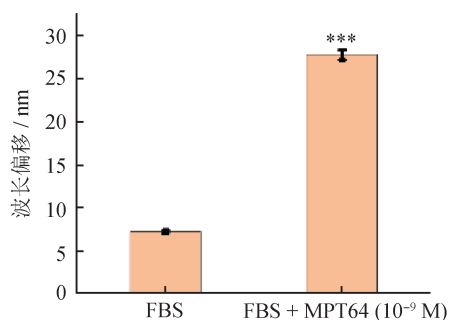
3.5 胎牛血清中MPT64和Ag85B蛋白的检测

为了验证该传感器在临床实际应用中的性能，本文对其在胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)样品中检测MPT64和Ag85B蛋白的能力进行了测试。此评估旨在模拟人类血清或其他生物液体分析中所面临的复杂样本基质挑战，以分析传感器在检测多样化样本时的表现。在测试过程中，光学传感器分别暴露于不含MPT64或Ag85B蛋白的FBS以及含有MPT64或Ag85B蛋白的FBS中，检测时间为10 s，每次反应后清洗5 min。

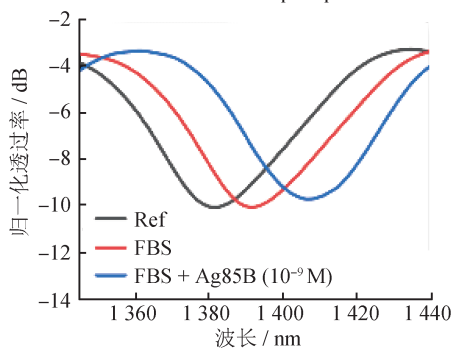
27.8 nm，如图8(a)和8(b)所示。Ag85B-AP传感器在检测不含目标蛋白的FBS时，波长偏移为11 nm；而在FBS中检测到Ag85B蛋白(3.11×10^{-9} M)时，波长偏移为27 nm，如图8(c)和8(d)所示。在检测FBS时观察到的轻微红移可能是FBS与GO涂层的直接结合所致，因为尽管光纤与适配体孵育



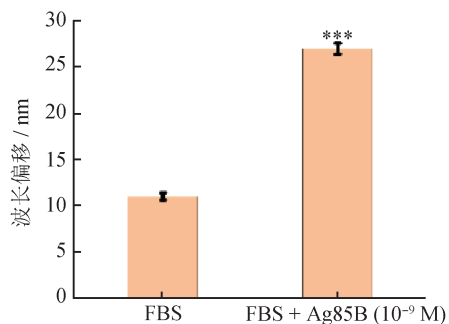
(a) Mpt64-AP@GO修饰的微纤传感器对有无Mpt64蛋白的FBS检测的透射光谱
(a) Transmission spectra of Mpt64-AP@GO-modified microfiber sensors for detecting FBS with or without Mpt64 protein



(b) 与左图对应的透射光谱波长偏移量
(b) The wavelength shift of the transmitted light spectrum corresponding to the left image



(c) Ag85B-AP@GO修饰的微纤传感器对有无Ag85B蛋白的FBS检测的透射光谱
(c) Transmission spectra of Ag85B-AP@GO-modified microfiber sensors for detecting FBS with or without Ag85B protein



(d) 与左图对应的透射光谱波长偏移量
(d) The wavelength shift of the transmitted light spectrum corresponding to the left image

图8 微纤传感器的传输光谱和波长偏移柱状图($n = 3$), *** $p < 0.001$

Fig.8 The transmission spectrum and wavelength shift histogram of the micro-fiber sensor($n = 3$), *** $p < 0.001$

了长达2 h,但适配体可能仍无法完全覆盖GO。实验结果表明:该生物传感器在复杂样本基质中能够实现MPT64蛋白和Ag85B蛋白的快速高效检测。

4 新型SARS-CoV-2中N蛋白的检测

4.1 SARS-CoV-2中N蛋白的表达与纯化及RNA/DNA适配体的筛选

SARS-CoV-2基因组编码4种结构蛋白,N蛋白保留了RNA基因组,而S、E和M蛋白共同形成病毒包膜。N蛋白的相应核苷酸序列被克隆到带有His标签的载体中。经过SDS-PAGE分析,表达和

纯化的蛋白具有良好的特异性,如图9(a)所示,N蛋白的分子量为49 kDa,与之前的文献报道一致。

作为一种高度免疫原性的磷蛋白,N蛋白通常表现出高度的保守性。如图9(b)所示,SARS-CoV-2中N蛋白基因序列与SARS-CoV中N蛋白序列相似度超过90%,这使其在病毒诊断方面具有巨大的潜力。基于N蛋白的序列相似性,筛选出了最适合SARS-CoV N蛋白的RNA和DNA适配体,用于后续的检测研究^[33]。通过Mfold程序对所选定的RNA适配体(RNA-AP)和DNA适配体(DNA-AP)的二级结构进行详细分析^[26],结果如图9(c)和图9(d)所示。

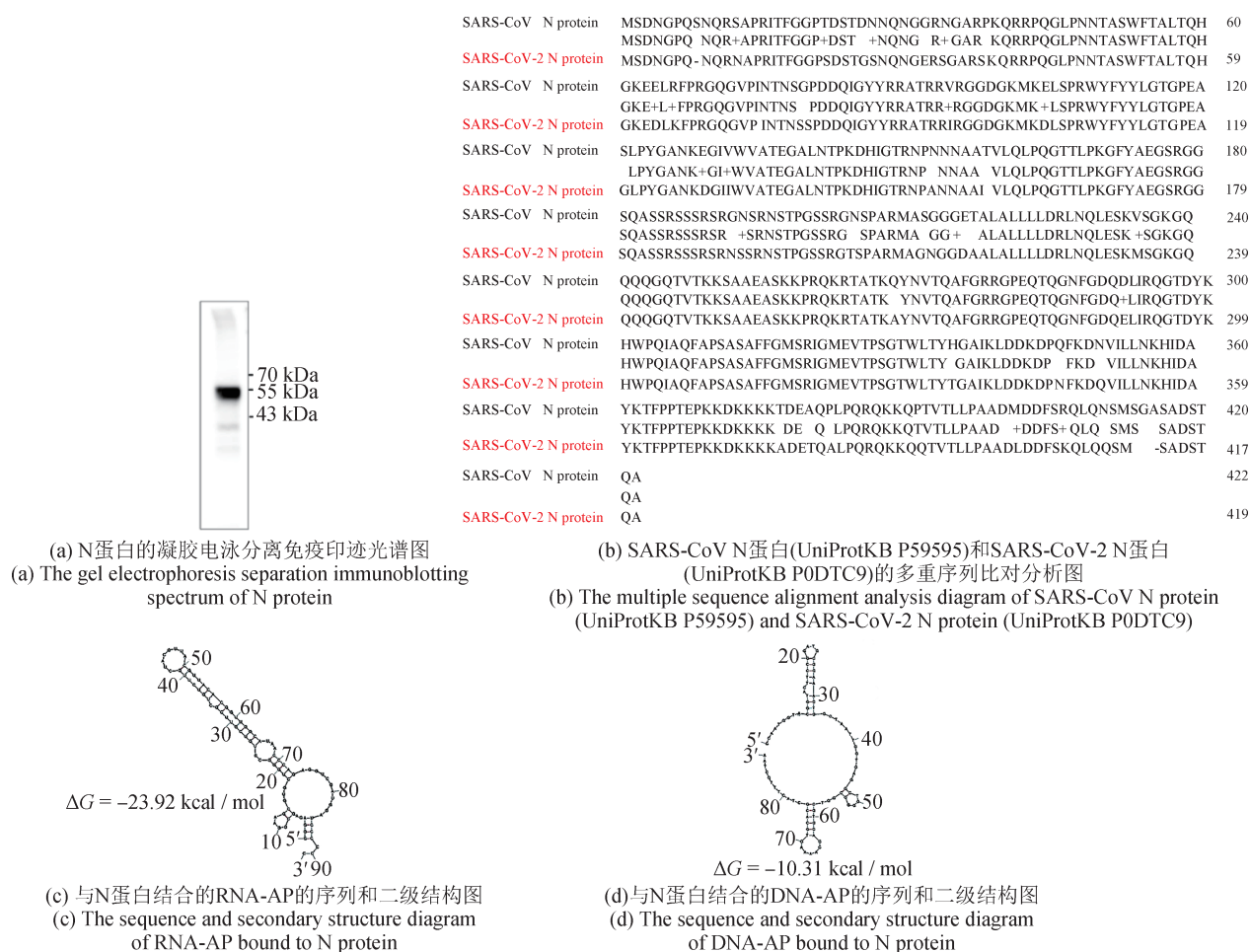


图9 SARS-CoV-2 N蛋白的表达与纯化及RNA/DNA适配体的筛选

Fig.9 The expression and purification of SARS-CoV-2 N protein and the screening of RNA/DNA aptamers

4.2 RNA-AP和DNA-AP与SARS-CoV-2中N蛋白的特异性结合

为了评估RNA-AP和DNA-AP与N蛋白的结合特异性,本文采用电泳迁移率变动(Electrophoretic

Mobility Shift Assay, EMSA)分别分析检测RNA-AP和DNA-AP与N蛋白的结合亲和力。如图10(a)和图10(b)所示,与N蛋白结合的RNA-AP和DNA-AP的电泳条带的颜色密度随着N蛋白浓度的增加

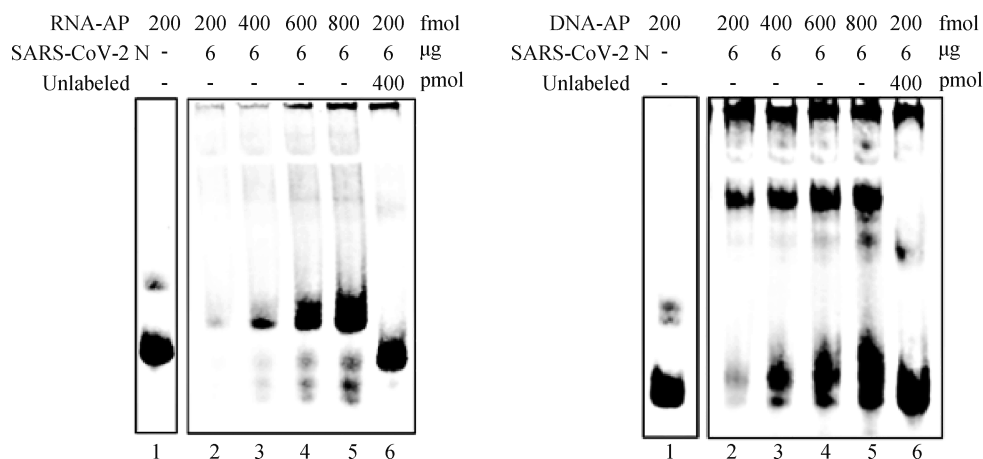
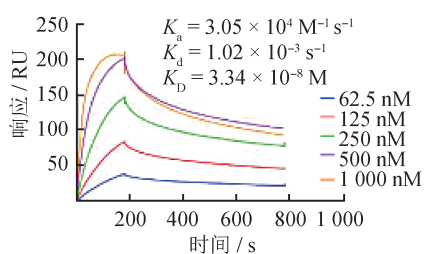


图10 RNA-AP和DNA-AP的电泳迁移图

Fig.10 The electrophoretic migration diagram of RNA-AP and DNA-AP

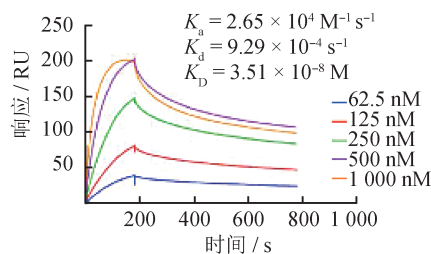
而增加。该结果表明：RNA-AP和DNA-AP对N蛋白具有高度特异性的亲和力。如图11(a)、图11(b)所示，通过SPR检测进一步评估了RNA-AP和DNA-AP与N蛋白的结合能力。实验结果显示：RNA-

AP和DNA-AP与N蛋白结合紧密，其平衡解离常数(K_D)分别为33.4 nM和35.1 nM。这些结果表明：RNA-AP和DNA-AP与N蛋白具有高度特异性的结合能力。



(a) RNA-AP与N蛋白的结合亲和力测定光谱图

(a) Determination of the binding affinity spectrum of RNA-AP with the N protein



(b) DNA-AP与N蛋白的结合亲和力测定光谱图

(b) Determination of the binding affinity spectrum of DNA-AP with the N protein

图11 RNA-AP和DNA-AP与N蛋白的结合亲和力测定光谱

Fig.11 The binding affinity measurement spectrum of RNA-AP and DNA-AP with the N protein

4.3 微纤传感器对N蛋白的检测

在将RNA-AP适配体固定于GO修饰的微纤上后，使用传感器对浓度范围为 $10^{-18} \sim 10^{-7}$ M的N蛋白溶液进行了检测。如图12(a)所示，随着N蛋白溶液浓度的增加，传感器的光谱传输谷显著红移。如图12(b)所示，该传感器对N蛋白溶液的检测灵敏度为1.21 nm/logM，拟合线性度为98.39%，LOD为 6.25×10^{-18} M，该低LOD有利于传感器对N蛋白的微量分析。同样地，当DNA-AP适配体连接到GO修饰的微纤上，并用于检测浓度范围为 $10^{-19} \sim 10^{-7}$ M的N蛋白溶液时，如图12(c)所示，光谱传输光谷随N蛋白溶液浓度的增加逐渐红移。如图12(d)所示，该传感器对N蛋白溶液的检测灵敏度

为1.29 nm/logM，拟合线性度为99.05%，LOD为 6.25×10^{-19} M。

如图12(e)所示，将RNA-AP适配体修饰在未经GO功能化的传感器上，并使用该传感器对不同浓度的N蛋白溶液进行检测，仅能检测到浓度为 10^{-15} M的N蛋白溶液，并且LOD较高。如图12(f)所示，未修饰GO的光纤上固定DNA-AP适配体的传感器对不同浓度的N蛋白溶液检测时，表现出不规则的传输谷频移，并且光谱调制效果较差。显然，在GO纳米界面存在的情况下，传感器对N蛋白溶液的检测光谱红移效果更加明显，因此，GO纳米界面对传感器灵敏度的提高起到了重要作用。

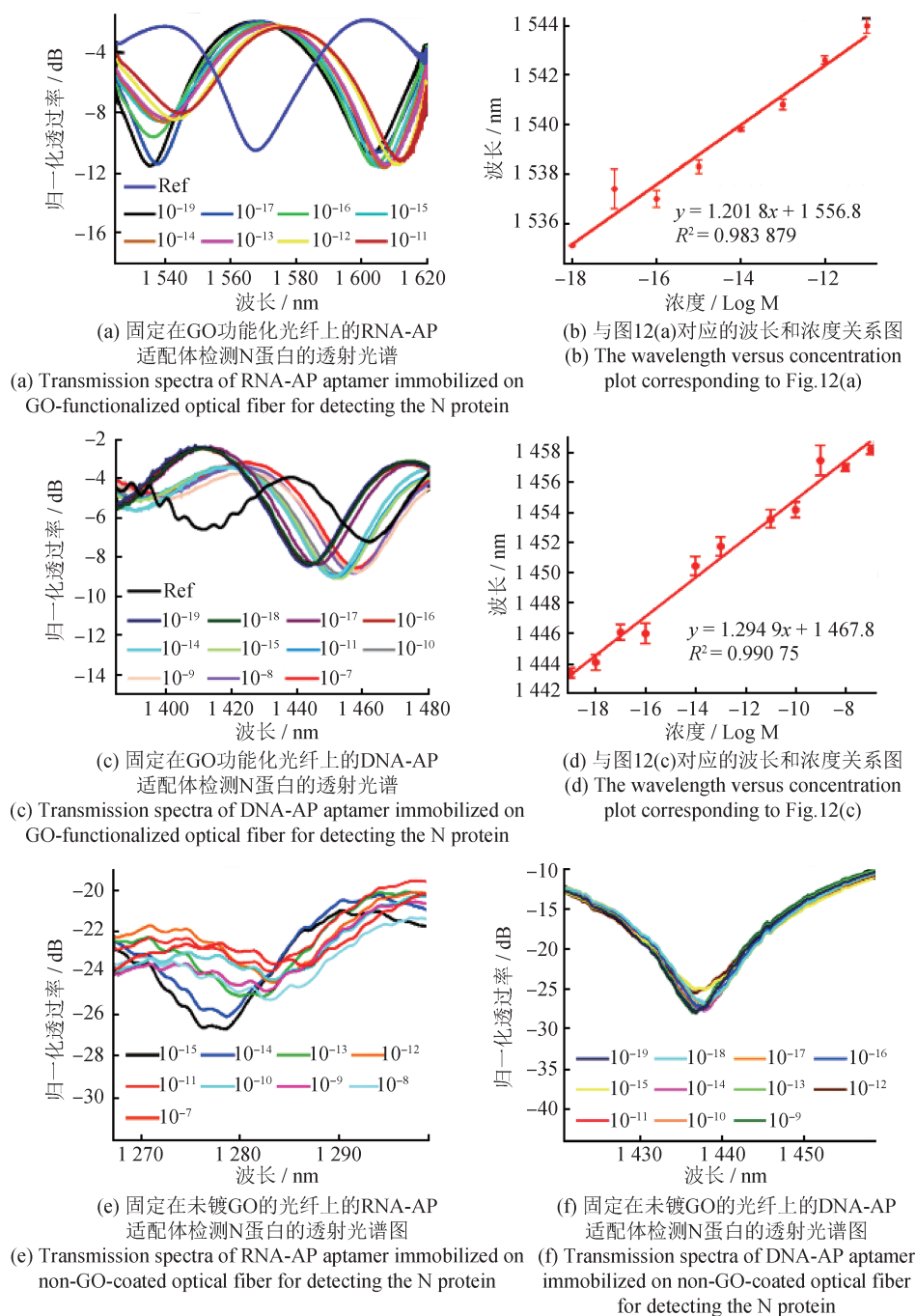


图12 FBS中N蛋白的检测

Fig.12 Detection of N protein in FBS

4.4 传感器的选择性

尽管修饰了不同适配体的传感器能够特异性检测N蛋白,但在实际检测环境中,细胞外环境中的干扰分子的波动是不可避免的,必须在检测条件中加以考虑和讨论。为了反映实际临床测量中的生理条件,本文使用RNA-AP传感器对低浓度的N蛋白溶液(10^{-7} M)与高浓度干扰蛋白Asn(10^{-3} M)、

Cit(10^{-3} M)、尿素(10^{-3} M)和BSA(10^{-5} M)进行检测。同时,使用DNA-AP传感器对低浓度的N蛋白溶液(10^{-11} M)与高浓度的干扰成分Asn(10^{-3} M)、Cit(10^{-3} M)、尿素(10^{-3} M)和BSA(10^{-5} M)进行检测。

如图13(a)所示,RNA-AP传感器检测N蛋白引起的波长偏移约为45.04 nm,而检测Asn、Cit、尿素和BSA引起的光学信号较弱,其波长偏移分

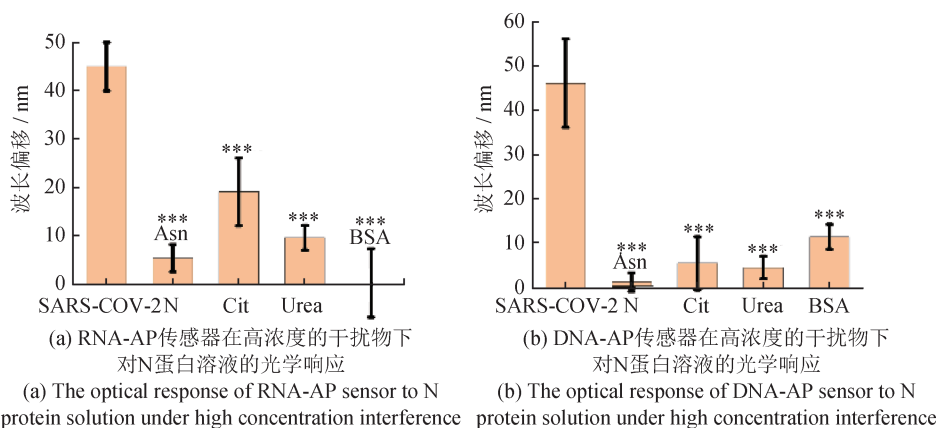


图13 比较了传感器在高浓度Asn、Cit、Urea和BSA的潜在干扰下RNA-AP和DNA-AP对N蛋白溶液的光学响应($n=3$), $***p < 0.001$

Fig.13 The optical response of the RNA-AP and DNA-AP to N proteins solution was compared under the potential interference of high concentrations of Asn, Cit, Urea and BSA ($n=3$), $***p < 0.001$

别为5.44、19.12、9.68、0.32 nm。如图13(b)所示, DNA-AP传感器检测N蛋白引起的波长偏移量约为46.40 nm, 明显大于其检测Asn、Cit、尿素和BSA引起的光学响应(波长偏移分别为1.28、5.52、4.56、11.52 nm)。RNA-AP和DNA-AP对N蛋白的显著光谱响应证明了对应传感器对SARS-CoV-2中N蛋白具有适应性和选择性。

4.5 SARS-CoV-2中N蛋白的检测

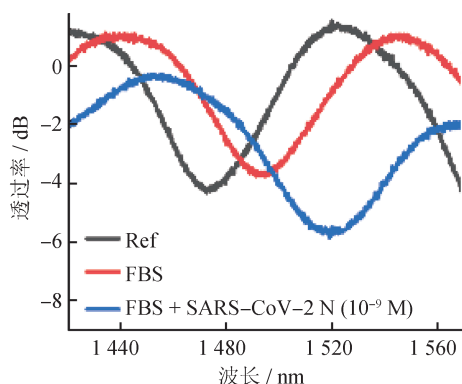
为了验证该传感器在临床应用中的可行性, 本文使用该传感器检测了混合在FBS样本中的N蛋白。这一测试旨在模拟分析人血清或其他生物流体时所面临的复杂样本基质挑战。在此测试中, 传感器分别与不含N蛋白的FBS和含有N蛋白的FBS反应3 min, 每次反应后清洗5 min。

结果表明: 当传感器与不含N蛋白的FBS反应时, 共振波长发生了轻微红移; 而与含N蛋白的FBS反应时, 共振波长则出现了较大的红移。如图14(a)和图14(b)所示, 当RNA-AP传感器检测不含N蛋白的FBS时, 波长红移为8.52 nm; 当检测含有N蛋白(1×10^{-9} M)的FBS时, 波长红移为34.4 nm。如图14(c)和图14(d)所示, 当DNA-AP传感器检测不含N蛋白的FBS时, 波长红移为19.92 nm; 检测含有N蛋白的FBS时, 波长红移为48.72 nm。传感器对不含N蛋白的FBS检测时观察到的波长轻微红移可能是GO纳米界面对FBS的直接捕获所致, 因为即使将光纤与适配体孵育长达2 h, 适配体也无法完全覆盖GO纳米界面。

该实验表明: 生物传感器在复杂样本基质中具有快速有效检测N蛋白的应用潜力。

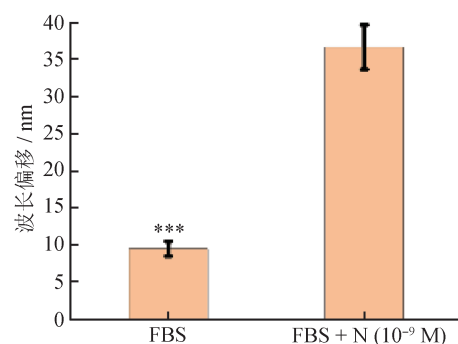
5 与商业生化试验和类似传感器的比较

本文所提出的光学微纤传感器在检测时间、LOD和便携性方面展现出显著优势。如表1所示, 与传统的逆转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)^[34]、酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)^[35]和酶联免疫吸附法(Enzyme Immunoassay, EIA)^[36]等检测方法相比, 本文的传感器能够在10 s内完成检测, 而RT-PCR、ELISA、EIA等方法的检测时间往往需要2~4 h; 并且本文的传感器表现出较低的LOD, 例如, MPT64-AP传感器的LOD为 4.23×10^{-20} M, 显著低于功能化的二氧化钛纳米管(Co-functionalized TiO_2 nanotube, Co-TNT)^[37]和分子印迹聚合物(Molecularly Imprinted Polymers, MIPs)^[38]修饰的传感器的LOD(分别为 14×10^{-9} M和 15×10^{-15} M); 另外, 本文传感器设备轻便、易操作, 这使其在临床和现场检测中具有更广泛的适用性。尽管场效应晶体管(Field-Effect Transistor, FET)生物传感器、Co-TNT修饰的传感器等^[37,39]也具有较短的检测时间和较低的LOD, 但使用它们时通常需要具备专业的操作技巧。此外, 本文传感器在抗假阴性方面表现出色, 能够有效避免出现假阴性结果, 为其在真实临床样本中的应用提供了更可靠的保障。



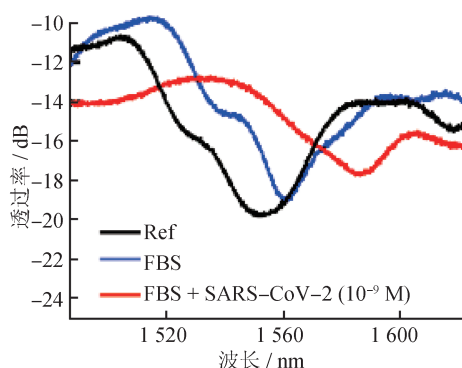
(a) RNA-AP@GO修饰的传感器检测在不掺杂和掺杂N蛋白的FBS溶液的透射光谱图

(a) The transmission spectrum of FBS solutions with and without N protein detected by RNA-AP@GO modified sensors



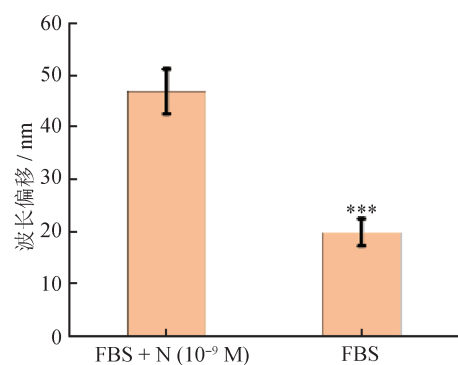
(b) 与左图对应的透射光谱的波长偏移直方图

(b) Histogram of wavelength shifts in the transmission spectra corresponding to the left figure



(c) DNA-AP@GO修饰的传感器检测在不掺杂和掺杂N蛋白的FBS溶液的透射光谱图

(c) The transmission spectrum of FBS solutions with and without N protein detected by DNA-AP@GO modified sensors



(d) 与左图对应的透射光谱的波长偏移直方图

(d) Histogram of wavelength shifts in the transmission spectra corresponding to the left figure

图14 RNA-AP@GO和DNA-AP@GO修饰的传感器检测有无N蛋白的FBS溶液光谱图和波长偏移直方图($n=3$), $***p < 0.001$

Fig.14 Transmission spectra and wavelength shift histograms of RNA-AP@GO and DNA-AP@GO modified sensors for detecting FBS solutions with and without N protein doping, ($n=3$), $***p < 0.001$

表1 本文生物传感器系统与商业生化试验和类似传感器比较

Tab.1 This article compares the biosensor system with commercial biochemical tests and similar sensors

试验或传感器	目标	检测时间	是否轻便	是否易操作	是否易受假阴性影响	LOD
RT-PCR	RdRp ⁺ , E or N ⁺	4 h	否	是	是	—
ELISA	IgG, IgM	2 ~ 4 h	否	是	否	—
EIA	IgG, IgM	2 h	否	是	否	—
Co-TNT	Spike-RBD	30 s	是	否	否	14×10^{-9} M
MIPs	Nucleocapsid	15 min	是	否	否	15×10^{-15} M
FET	Spike	1 h	是	否	否	1 fg/mL
本文传感器	MPT64蛋白, Ag85B蛋白, N蛋白	10 s	是	否	否	MPT64-AP: 4.23×10^{-20} M Ag85B-AP: 3.11×10^{-19} M RNA-AP: 6.25×10^{-18} M DNA-AP: 6.25×10^{-19} M

总之,本文所提出的光学微纤传感器相较于传统和现有的传感器,具有检测时间短、灵敏度高、操作简便和成本低等显著优势,是一种理想的快速诊断工具,特别适用于结核病和新冠病毒等传染病的检测。

6 结论

介绍了一种基于GO增强的光学微纤传感器,该传感器能够实时监测MPT64和Ag85B蛋白,LOD分别为 4.23×10^{-20} M和 3.11×10^{-19} M。另外,利用该传感系统检测了混合在FBS样本中的MPT64和Ag85B蛋白,模拟了人血清分析的复杂环境,检测灵敏度达到 4.23×10^{-9} M和 3.11×10^{-9} M;用同样方法实时监测SARS-CoV-2中N蛋白,传感器的LOD低至 6.25×10^{-19} M。通过该传感器在FBS样本中检测N蛋白,实现了 1×10^{-9} M的高灵敏度检测,进一步验证了该传感器在实际应用中的可行性。这种高灵敏度、超低LOD和微型化的传感器能够在体外高效检测超低浓度的蛋白质,为结核病和新冠肺炎等传染病的早期诊断提供了新的工具,且有望在未来应用于其他病原体的检测,具有广泛的应用前景,对保障公共卫生安全具有重要意义。

参考文献

- [1] STERLING T R, VILLARINO M E, BORISOV A S, et al. Three months of rifapentine and isoniazid for latent tuberculosis infection [J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(23): 2155-2166.
- [2] ZHANG M, XUE M, HE J-Q. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF ultra for tuberculosis disease: a preliminary systematic review and meta-analysis [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 90: 35-45.
- [3] XOLALPA W, VALLECILLO A J, LARA M, et al. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen mycobacterium tuberculosis [J]. *Proteomics*, 2007, 7(18): 3332-3341.
- [4] JIANG Y, LIU H, LI M, et al. Single nucleotide polymorphism in Ag85 genes of mycobacterium tuberculosis complex: analysis of 178 clinical isolates from China and 13 BCG strains [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2015, 12(2): 126. DOI: 10.7150/ijms.9951.
- [5] OETTINGER T, ANDERSEN A B. Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from mycobacterium tuberculosis H37Rv [J]. *Infection and immunity*, 1994, 62(5): 2058-2064.
- [6] BELISLE J T, VISSA V D, SIEVERT T, et al. Role of the major antigen of mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis [J]. *Science*, 1997, 276(5317): 1420-1422.
- [7] NAQVI A A T, FATIMA K, MOHAMMAD T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2020, 1866(10). DOI: 10.1016/j.bba-dis.2020.165878.
- [8] ZIMMERMANN K, MANNHALTER J W. Technical aspects of quantitative competitive PCR [J]. *Biotechniques*, 1996, 21(2): 268-279.
- [9] TAHAMTAN A, ARDEBILI A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: Issues affecting the results [J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2020, 20(5): 453-454.
- [10] FENG G D, SHI M, MA L, et al. Diagnostic accuracy of intracellular mycobacterium tuberculosis detection for tuberculous meningitis [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014, 189(4): 475-481.
- [11] PHILLIPS R O, ROBERT J, ABASS K M, et al. Rifampicin and clarithromycin (extended release) versus rifampicin and streptomycin for limited buruli ulcer lesions: a randomised, open-label, non-inferiority phase 3 trial [J]. *The Lancet*, 2020, 395(10232): 1259-1267.
- [12] JALI M H, RAHIM H R A, JOHARI M A M, et al. Optical microfiber sensor: a review [C]// *Photonics Meeting 2021 (PM21)*, Terengganu, Malaysia, 2021. DOI: 10.1088/1742-6596/2075/1/012021.
- [13] CHEN J H, LI D R, XU F. Optical microfiber sensors: sensing mechanisms, and recent advances [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2019, 37(11): 2577-2589.
- [14] MUSTAPHA KAMIL Y, ABU BAKAR M H, ZAINUDDIN NH, et al. Progress and trends of optical microfiber-based biosensors [J]. *Biosensors*, 2023, 13(2): 270. DOI: 10.3390/bios13020270.
- [15] LI J H, CHEN J H, XU F. Sensitive and wearable optical microfiber sensor for human health monitoring [J]. *Ad-*

- vanced Materials Technologies, 2018, 3(12). DOI: 10.1002/admt.201800296.
- [16] LI K, LIU G, WU Y, et al. Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum [J]. *Talanta*, 2014, 120: 419–424.
- [17] YAP S H K, CHAN K K, ZHANG G, et al. Carbon dot-functionalized interferometric optical fiber sensor for detection of ferric ions in biological samples [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(31): 28546–28553.
- [18] KAVINKUMAR T, SASTIKUMAR D, MANIVANNAN S. Effect of functional groups on dielectric, optical gas sensing properties of graphene oxide and reduced graphene oxide at room temperature [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(14): 10816–10825.
- [19] LIU J, BAO S, WANG X. Applications of graphene-based materials in sensors: a review [J]. *Micromachines*, 2022, 13(2): 184. DOI: 10.3390/mi13020184.
- [20] SHAHRIARI S, SASTRY M, PANJIKAR S, et al. Graphene and graphene oxide as a support for biomolecules in the development of biosensors [J]. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2021: 197–220.
- [21] LIU Y, YU D, ZENG C, et al. Biocompatible graphene oxide-based glucose biosensors [J]. *Langmuir*, 2010, 26(9): 58–60.
- [22] WOLF A J, DESVIGNES L, LINAS B, et al. Initiation of the adaptive immune response to mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(1): 105–115.
- [23] SALCEDA-DELGADO G, MARTINEZ-RIOS A, SELVAS-AGUILAR R, et al. Adaptable optical fiber displacement-curvature sensor based on a modal michelson interferometer with a tapered single mode fiber [J]. *Sensors*, 2017, 17(6): 1259. DOI: 10.3390/s17061259.
- [24] HARUN S W, LIM K, TIO C, et al. Theoretical analysis and fabrication of tapered fiber [J]. *Optik*, 2013, 124(6): 538–543.
- [25] WU Y, XUE P, KANG Y, et al. Highly specific and ultrasensitive graphene-enhanced electrochemical detection of low-abundance tumor cells using silica nanoparticles coated with antibody-conjugated quantum dots [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(6): 3166–3173.
- [26] SAENGDEEP, CHAISIRIRATANAKUL W, BUNJONGPRU W, et al. Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 134–138.
- [27] CAO Z, YAO B, QIN C, et al. Biochemical sensing in graphene-enhanced microfiber resonators with individual molecule sensitivity and selectivity [J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8(1): 107. DOI: 10.1038/s41377-019-0213-3.
- [28] WENG S, ZHANG J, MA H, et al. B21 DNA vaccine expressing Ag85B, Rv2029c, and Rv1738 confers a robust therapeutic effect against latent mycobacterium tuberculosis infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1025931.
- [29] LI H, HUANG Y, CHEN C, et al. Real-time cellular cytochrome C monitoring through an optical microfiber: enabled by a silver-decorated graphene nanointerface [J]. *Advanced Science*, 2018, 5(8). DOI: 10.1002/advs.201701074.
- [30] JIA H, ZHANG A, YANG Y, et al. A graphene oxide coated tapered microfiber acting as a super-sensor for rapid detection of SARS-CoV-2 [J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(12): 2398–2406.
- [31] QIN L, ZHENG R, MA Z, et al. The selection and application of ssDNA aptamers against MPT64 protein in mycobacterium tuberculosis [J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2009, 47(4): 405–411.
- [32] DREYMANN N, MÖLLER A, MENDER M M. Label-free determination of the kinetic parameters of protein-aptamer interaction by surface plasmon resonance [M]// *Nucleic Acid Aptamers: Selection, Characterization, and Application*. Springer, 2022: 141–53.
- [33] SHUM K T, TANNER J A. Differential inhibitory activities and stabilisation of DNA aptamers against the SARS coronavirus helicase [J]. *ChemBiochem*, 2008, 9(18): 3037–3045.
- [34] XU G, HSIEH T-M, LEE D Y, et al. A self-contained all-in-one cartridge for sample preparation and real-time PCR in rapid influenza diagnosis [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(22). DOI: 10.1039/c005265e.
- [35] PESTRONK A, CHOKSI R. Multifocal motor neuropathy: serum IgM anti-GM1 ganglioside antibodies in most

patients detected using covalent linkage of GM1 to ELISA plates[J]. *Neurology*, 1997, 49(5). DOI: 10.1212/wnl.49.5.1289.

- [36] FORTES-GABRIEL E, GUEDES M S, SHETTY A, et al. Enzyme immunoassays (EIA) for serodiagnosis of human leptospirosis: specific IgG3/IgG1 isotyping may further inform diagnosis of acute disease [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(2). DOI: 10.1371/journal.pntd.0010241.

- [37] BISWAS G C, CHOUDHURY S, RABBANI M M, et al. A review on potential electrochemical point-of-care tests targeting pandemic infectious disease detection: COVID-19 as a reference [J]. *Chemosensors*, 2022, 10 (7). DOI: 10.3390/chemosensors10070269.

- [38] CHO H, SHIM S, CHO W W, et al. Electrochemical impedance-based biosensors for the label-free detection of the nucleocapsid protein from SARS-CoV-2[J]. *ACS sensors*, 2022, 7(6). DOI: 10.1021/acssensors.2c00317.

- [39] GUO Q, JI D, WANG Q, et al. Supercapacitively liquid-solid dual-state optoelectronics [J]. *Advanced Materials*, 2024, 36(44). DOI: 10.1002/adma.202406345.

(本文编辑: 李成成)



第一作者: 刘忍(1997—), 女, 江苏徐州人, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为集成光子芯片。



通信作者: 冯吉军(1984—), 男, 教授, 目前主要从事集成光电器件及传感、计算等方向的研究。2005年获中国科学技术大学理学学士、工学学士, 2010年于中科院上海光学精密机械研究所获光学工程博士, 随后赴日本产业技术综合研究所(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST)工作, 2013年获日本学术振兴会(The Japan Society for the Promotion of Science, JSPS)外国人特别研究员资助, 2015年加入上海理工大学光电学院工作至今, 主持科技部国际合作、国家自然科学基金联合基金、面上以及上海市科委等科研项目多项, 发表论文近百篇, 授权发明专利10余项。