引用本文：王海涛, 马晓媛, 宋艳冰, 王雨萱, 王亚斐, 赵琢, 张拥军. 蛋白质生物标志物超灵敏检测技术的研究进展 [J]. 离子交换与吸附, 2025, 41(1): 46-63.
Citation: WANG Hai-tao, MA Xiao-yuan, SONG Yan-bing, WANG Yu-xuan, WANG Ya-fei, ZHAO Zhuo, ZHANG Yong-jun. Research Progress in Ultrasensitive Detection Technologies for Protein Biomarkers [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2025, 41(1): 46-63.

· 综述 ·

文章编号：1001-5493(2025)01-0046-18 DOI: 10.16026/j.cnki.iea.2025010046

蛋白质生物标志物超灵敏检测技术的研究进展*

王海涛, 马晓媛, 宋艳冰, 王雨萱, 王亚斐, 赵琢**, 张拥军**

(天津工业大学化学学院, 天津 300387; 沧州市天津工业大学沧州研究院, 沧州 061019;
河北省膜产业技术研究院, 沧州 061019)

摘 要：蛋白质生物标志物作为疾病分子诊断的重要依据，对早期诊断、疾病分期及治疗效果评估具有重要价值。文章综述了蛋白质生物标志物超灵敏检测技术的研究进展，介绍了常见的蛋白质生物标志物的超灵敏检测技术，特别探讨了基于分子印迹聚合物和纳米技术构建的生物传感器在蛋白质生物标志物超灵敏检测中的应用，这些传感器在检测蛋白质生物标志物方面展现出了高灵敏度和高特异性。此外，文章还讨论了蛋白质生物标志物超灵敏检测面临的挑战，并对未来的发展方向进行了展望。

关键词：疾病早期诊断，生物标志物，蛋白质超灵敏检测，生物传感器

中图分类号：R34 **文献标志码：**A

1 前 言

疾病的早期诊断一直是医学领域最重要的研究课题[1]。世界卫生组织的统计数据显示，80%的心脑血管疾病、80%的二型糖尿病、绝大部分的原发性高血压，甚至40%的肿瘤均可预防，但疾病早期往往因症状不明显而难以诊断，从而错过医疗干预的最佳时机。以致死率最高的癌症——肺癌为例，其早期因症状不明显或无症状而易被忽略，待患者就诊时，往往已错失最佳治疗时机，使死亡率显著升高，其平均5年生存率仅为15%；然而若能在病程早期发现病灶，并进行手术切除，5年生存率可显著提升85%~90%[2-5]。阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease，AD) 是一种以中枢神经系统退行性病变为标志的疾病，表现为最常见的老年性痴呆，其主要病理特征为淀粉样蛋白 (Amyloid-β，Aβ) 沉积与Tau蛋白形成的神经纤维缠结。AD的发病机制仍不清楚，患者出现临床症状后没有有效的治疗方法来延缓、阻止甚至逆转病程的进展。近年来，多个AD的新药研发临床试验宣告失败[6]，其原因很可能是出现临床症状的AD患者已错失了最佳的治疗时机，AD药物的临床试验也表明在患者产生临床症状之前可能更易提高治疗效果[7-8]。

美国国家癌症研究所将生物标志物定义为“能从血液、其他体液或组织中检测出，并可准确反映疾病状态或正常生理条件的生物分子。”生物标志物承载着丰富的疾病相关信息，其表达水平的异常往往与疾病的发生发展紧密相连。因此，生物标志物就疾病的诊断、分期判断以及评估新药物或治疗方法在特定人群中的安全性与有效性方面有着广泛的应用[9]。预计到2026年，

* **收稿日期：**2025-05-07
基金项目：国家自然科学基金重点项目 (基金号52033004)；天津工业大学沧州研究院第二批孵化与产业化项目 (基金号TGCYY-F-0203)；河北省自然科学基金面上项目 (基金号E2023110007)；沧州市重点研发计划指导项目 (基金号222107007).
作者简介：王海涛 (1998—)，硕士研究生.
****通信作者：**赵琢, E-mail: zhaozhuo@tiangong.edu.cn；张拥军, E-mail: zhangyj@taingong.edu.cn.

生物标志物研究服务市场规模将达到182亿美元，生物标志物研究已成为热门的研究领域之一[10]。蛋白质作为生命活动的主要载体和生物学功能的执行者，是最主要的生物标志物。蛋白质可执行许多生物学功能，包括但不限于催化活体生物中的反应、解码细胞中的信息、调节生物化学活性、储存和运输小分子等[11]。各种疾病的发生通常涉及蛋白质表达及其分布的改变[12]。近年来，随着蛋白质组学研究的兴起，蛋白质生物标志物的检测已成为疾病早期诊断的重要分子诊断方法之一。然而大多数与疾病相关的蛋白质表达水平都非常低，特别是在疾病早期阶段，其难以被传统的蛋白质检测方法检测到。随着蛋白质生物标志物研究的不断深入，许多研究需求 (如新的蛋白质生物标志物的发现) 和实际应用需求 (如疾病早期诊断和筛查、新药的安全性及有效性评估) 对蛋白质生物标志物的检测，特别是低丰度蛋白质的检测，提出了前所未有的挑战，不仅要求检测方法准确、灵敏、稳定可靠，还对检测样本的易得性 (血液、尿液、唾液样本最佳)、检测方法的经济性 (低成本和高通量才有可能实现大规模筛查和早期诊断) 提出了较高的要求[13-14]。

近年来，蛋白质检测分析技术的发展取得了巨大的进步。这些技术包括传统的免疫学检测方法，如酶联免疫吸附测定 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 和化学发光免疫分析 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) 等方法，以及蛋白质微阵列和基于质谱的技术[15-20]等。尽管其中一些技术具有相对较高的灵敏度和较低的检测限，但大多数技术仍存在假阴性、假阳性、重现性差等缺陷[21-24]，在超低水平 (pmol/L 或 fmol/L) 下检测蛋白质的结果往往不够可靠。虽然癌症、传染病和生化过程中许多重要的蛋白质生物标志物在疾病发展的早期阶段以非常低的水平存在，但仅几个病理蛋白质分子就足以引发疾病或影响细胞的生物学功能。因此，具有极高灵敏度和高特异性的蛋白质超灵敏检测方法越来越受到研究者的关注，展现出重大的研究价值。

2　蛋白质生物标志物检测的研究进展

事实上，除了疾病的早期诊断和筛查，传染病防控、新药研发、食品安全等多个领域都迫切需要发展高灵敏度、高特异性、稳定可靠且成本低廉的蛋白质生物标志物检测方法[25]。由于传统的蛋白质检测方法具有局限性，不能满足低丰度蛋白质生物标志物的检测需求，近年来，研究者们开发出了多种蛋白质生物标志物超灵敏检测方法，但这些方法因各有缺陷而未得到大规模应用。

研究者们基于传统的免疫学检测方法做出了一系列改进，试图提高检测灵敏度，开发出了夹心法 ELISA、单分子免疫检测技术 (Single Molecule Counting，SMC)、荧光免疫分析 (Immunofluorescence Assay，IFA) 以及电化学免疫发光法 (Electrochemi-Luminescence Immunoassay，ECLI) 等超灵敏检测方法，但这些方法在提高检测灵敏度的同时降低了检测的可靠性。夹心法 ELISA 利用固定在固体表面上的抗原或抗体与待检测样品中的特定抗原或抗体结合，并使用另一种与目标分子结合的酶标记的抗体来检测，以增强信号放大效应。但其对检测所使用的单克隆抗体的质量要求非常高 (不同品牌甚至不同批次的试剂盒对同一样本的检测结果有时不同)，且检测灵敏度提升有限[25-29]。SMC 是一种高度敏感的检测方法，能实现对单个分子的检测。它通常将待检测分子标记在表面上，并使用高分辨率的成像技术 (如单分子荧光显微镜) 来观察单个分子的结合事件。SMC 虽然可提供 pg/mL 级别的灵敏度，但其检测系统非常不稳定，样品检测失败率常>30%，且该仪器极其昂贵[27]。IFA 利用荧光标记的抗体来检测特定的抗原或分子。在样品中的目标分子与荧光标记的抗体结合后，再通过荧光显微镜或流式细胞仪等设备来检测荧光信号，操作简便。然而此系统多限于单一生物分子检测，且对有效能量/电子转移条件要求严格，信号易受生物样本基质中背景噪音 (包括自发荧光与散射光) 影响，这些因素制约了 IFA 技术的广泛应用[30-32]。ECLI 结合了电化学和发光技术，利用电化学反应产生的中间体激发荧光发射，待检测的分子与标记在电极上的抗体结合后，通过电化学反应产生发光信号，从而检测目标分子的存在。但 ECLI 在复杂生物样本检测中，因稳定性不足及重现性差而面临重大挑战[33]。

研究者们还使用光谱、色谱和质谱分析方法尝试对生物样本中的蛋白质生物标志物进行检测。表面增强拉曼 (SERS) 免疫分析技术依靠激光照射诱发贵金属纳米粒子表面产生等离子体共振，进而显著提升拉曼散射信号的强度。虽然SERS技术在特异性和灵敏度方面表现出色，但其未成为常规分析手段的关键原因在于SERS信号重复性较差，以及金属纳米结构表面粗糙度的再现性不足。此外，有效的SERS信号增强主要集中在金属基底表面100 nm范围内，这一局限性缩小了分子间作用区域，从而影响了对微量生物大分子的检测[34]。基于表面等离子体共振 (SPR) 的免疫分析技术利用SPR原理探测生物传感芯片上固定配体与流动相中分析物之间的相互作用。近年来，SPR技术及其应用取得了显著进展，其通过多种方法进行信号放大，如功能化纳米颗粒、等温扩增技术和量子点等，以实现对低浓度目标分子的高效检测[35-36]。然而，与其他免疫检测方法相比，现有SPR技术在检测成本、易用性、稳定性及检测效率等方面仍存在不足，限制了其在临床中的广泛应用[37]。

近年来，色谱-质谱联用技术也被用于蛋白质生物标志物的检测，然而大多数色谱-质谱联用检测不能直接应用于复杂的样品基质 (如血液或尿液)，烦琐的前处理和复杂的数据分析过程不仅大大降低了检测效率，而且影响了低丰度蛋白质检测的灵敏度；同时，昂贵的仪器进一步增加了检测成本。因此，目前质谱检测很少应用于实际蛋白质生物标志物检测。

3 分子印迹聚合物及纳米材料在蛋白质生物标志物超灵敏检测中的应用

3.1 神经系统疾病生物标志物

近10年来，阿尔茨海默病 (Alzheimer’s Disease，AD) 已成为最常见的老年性痴呆疾病，给社会和经济带来了巨大的负担，引起了人们的极大关注。β-淀粉样蛋白 (Aβ) 是一种参与神经元死亡和脑老年斑形成的多肽，是阿尔茨海默病公认的生物标志物[38]。目前，临床评估、认知测试和神经影像学检查是完整的诊断AD的标准程序。认知测试包括简易精神状态检查 (MMSE) 和蒙特利尔认知评估，可通过评估大脑功能区分轻度认知障碍和衰老[39-40]；神经影像学是一种通过监测大脑结构变化来诊断AD的客观循证方法。正电子发射断层扫描 (PET)、单光子发射计算机断层扫描 (SPECT) 和磁共振成像 (MRI) 是最常见的神经成像类型[41]，PET和SPECT的主要缺点是需将放射性成像剂注入患者体内；虽然MRI是非侵入性的，但对这些神经退行性大脑中的细微结构和功能异常进行分析成本相当昂贵。更重要的是，这种疾病的发展早在海马体或斑块和Tau蛋白缠结沉积明显减少之前就开始了。因此，发展无创性的AD风险评估对AD的早期诊断和治疗策略至关重要。Flinders大学的陈教授开发了一种直接的、通用的和超灵敏的多重检测方法，即利用磁性纳米粒子作为纯化和预富集平台，通过免疫反应捕获目标蛋白形成磁性免疫复合物，然后使用新开发的吲哚荧光染料SIM进行标记，荧光成像系统检测荧光标记的磁性免疫复合物可实现高灵敏度检测 (图1)[42]。在该测定中，以微量样品消耗实现了非常低的检测限，低至飞摩尔范围。这种多功能检测方法不仅能在1 h内定量脑脊液样品中的靶蛋白，而且能可靠地定量唾液和尿液中的蛋白质生物标志物。Iskenderun Technical大学的Özcan[43]构建了一种可简单快速地检测$A\beta_{42}$的基于分层碳化钛MXene和多壁碳纳米管复合物 (包括分子印迹聚合物) 的电化学生物传感器 (图2)，显示出对$A\beta_{42}$的高灵敏度和选择

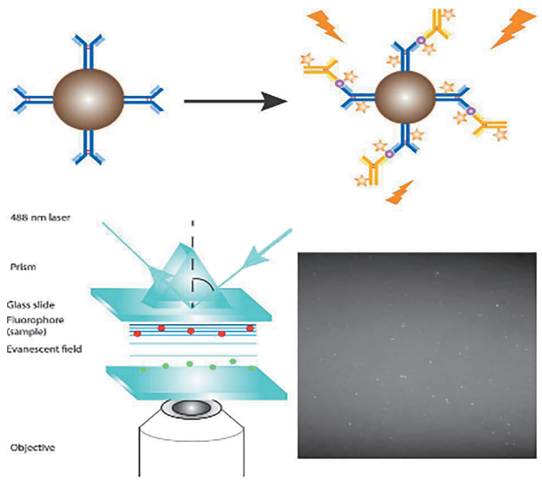

图1 用于直接定量目标蛋白质生物标志物的检测分析方法示意图[42].

Figure 1 Schematic illustration of the detection assay for the direct quantification of target protein biomarkers[42].

性，检测限达到0.3 fg/mL。将其应用于血浆样本中 $A\beta_{42}$ 的分析，并与液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 方法的结果进行比较，验证了该电化学生物传感器的有效性。这2项工作研究展现出其对阿尔茨海默病临床诊断的潜在应用价值，为蛋白质超灵敏检测提供了理论的研究方向。

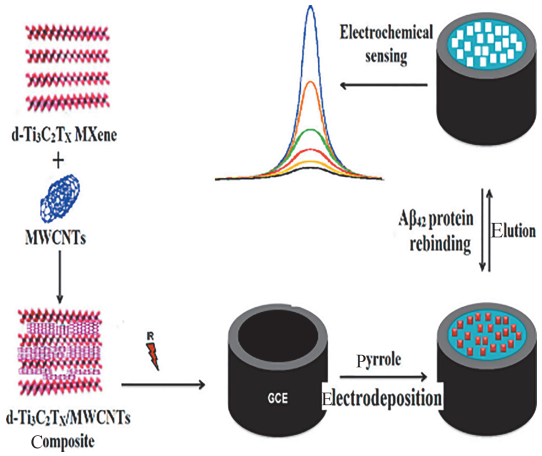

图2 分子印迹聚合物/掺杂钛碳化氮/多壁碳纳米管修饰玻碳电极 (MIP/d-Ti_3C_2TX/MWCNTs/GCE) 的制备流程[43].

Figure 2 Preparation procedure of MIP/d-Ti_3C_2TX/MWCNTs/GCE[43].

3.2　癌症生物标志物

3.2.1　肝癌生物标志物

肝癌的诊断依赖于测量血清中甲胎蛋白 (AFP) 的水平。AFP是一种在胎儿发育期间由肝脏和卵黄囊产生的单链糖蛋白，AFP在胎儿血液循环中具有较高浓度，胎儿出生后AFP会急速下降，数月至1年内降至正常，通常以低水平 (10~20 ng/mL) 存在于血浆中。AFP是原发性肝癌 (HCC) 筛查和诊断中重要的血清学肿瘤标志物，AFP升高可能预示着肝癌的存在，尤其是当AFP的质量浓度≥400 μg/L时[44]。Yang等[45]报道了一种基于分子印迹聚合物 (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs) 和碳点 (Carbon Dots, CDs) 的量子点荧光纳米传感器 (图3)。该传感器利用乙烯基化碳点 (Vinylated Carbon Dots, V-CDs) 作为信号元件，通过非共价相互作用和硼酸酯键的协同效应，实现了对AFP的高选择性识别。另外，CDs@MIPs纳米传感器在荧光猝灭实验中对AFP浓度表现出良好的线性响应，检测限达到0.474 ng/mL，且在人体血清样本中

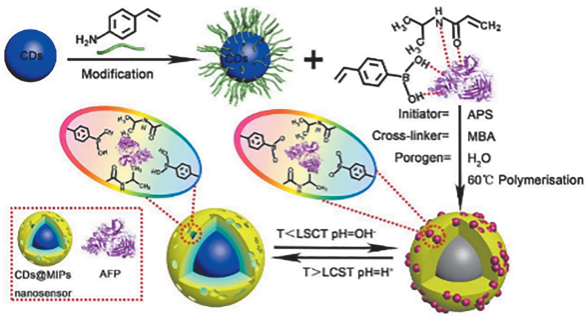

图3 CDs@MIPs纳米传感器合成示意图[45].

Figure 3 Schematic representation for the synthesis of CDs@MIPs nanosensor[45].

成功应用，表明其在临床诊断中对AFP快速、灵敏检测的潜力。研究还展示了该传感器在不同温度和pH值下的响应行为，证实了其对外部刺激 (如温度和pH值变化) 的响应性，模拟了生物受体的识别和响应活性。这项工作为肿瘤标志物的检测提供了一种新的策略，并为临床样本中生物标志物的高灵敏度检测开辟了新的可能性。Zhao等[46]开发了一种基于银纳米粒子增强的免疫荧光检测系统，用于AFP的高灵敏度检测 (图4)。该系统利用了磁性微珠的快速分离能力，结合了银离子荧光探针3',6'-双 (二乙氨基)-2-(2-碘代乙基) 螺[异吲哚啉-1,9'-氧杂蒽]-3-酮 (Ag^+-FP) 的显著信号放大效应。将银纳米粒子 (AgNPs) 溶解在过氧化氢 (H_2O_2) 中会产生大量银离子，从而激活Ag^+-FP的荧光，实现AFP的灵敏检测。该系统对AFP的检测限低至70 pg/mL，在检测肝癌患者血清样本时，表现出与商业电化学发光免疫分析 (ECLI) 方法相当的性能，但其成本更低、操作更简便。该系统提供了一个有应用前景的生物标志物检测平台，有望成为临床诊断中的强大工具。Wang等[47]开发了一种基于氧化石墨烯 (GO) 和单链DNA (ssDNA) 的超灵敏荧光生物传感器，用于检测AFP (图5)。该生物传感器的核心原理是GO能形成GO-ssDNA复合结构有效猝灭荧光染料修饰的ssDNA荧光，而AFP能选择性地与GO-ssDNA发生反应，导致GO-ssDNA解体，从而恢复荧光，且荧光强度随AFP浓度的增加而增加。该方法在0~300 pg/mL的范围内对AFP表现出良好的线性响应，检测限为0.909 pg/mL。此外，该生物传感器还成功应用于血清样品和细胞成像中的AFP检测。研究结果表明，所提出的生物

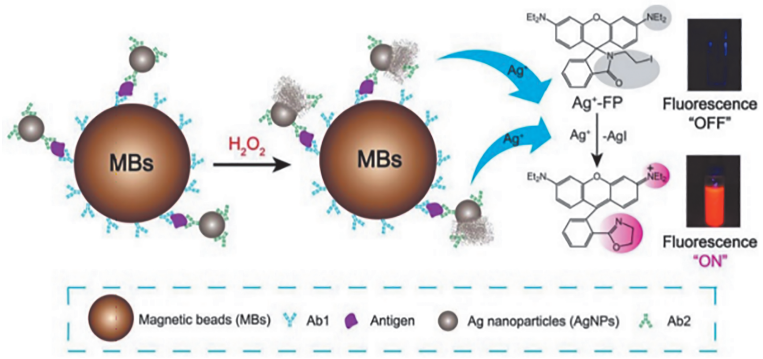

图4 银离子触发的蛋白质生物标志物荧光检测示意图[46].

Figure 4 Schematic illustration of Ag^+ triggered fluorescence detection for protein biomarkers[46].

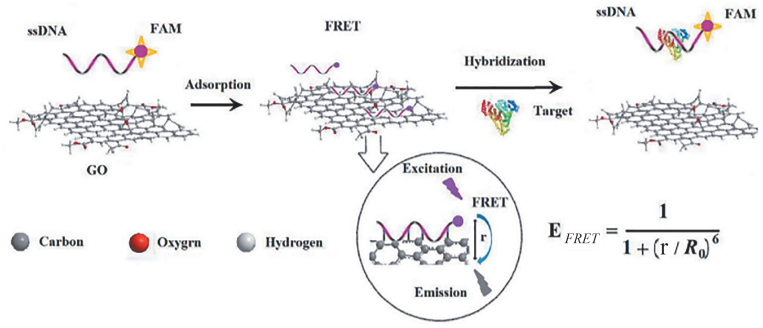

图5 用于检测甲胎蛋白 (AFP) 的氧化石墨烯 (GO) 和羧基荧光素标记单链DNA (FAM-ssDNA) 传感平台示意图[47].

Figure 5 Schematic illustration of GO and FAM-ssDNA sensing platform for detection of AFP[47].

传感器在AFP相关的临床诊断和研究中具有巨大的应用潜力。

3.2.2 乳腺癌生物标志物

硫氧还蛋白-1 (Trx-1) 是细胞内一种重要的巯基-二硫键氧化还原酶，对细胞内氧化还原状态的调控及在抵抗氧化应激损伤过程中发挥着重要的作用。近些年发现，它可作为乳腺癌生物标志物[48-49]。传统的乳腺癌生物标志物如CA15-3和CEA反映了大体积肿瘤的水平，它们在乳腺癌的筛查和早期诊断中具有局限性[50-51]。韩国西江大学吴教授提出基于人体血清白蛋白的包裹大量辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase，HRP)的纳米粒子，纳米粒子表面通过蛋白A (ProA) 修饰以便通过自组装固定抗体，形成信号增强纳米粒子探针 (HEHPA)，并作为检测探针通过直接夹心ELISA方法检测Trx-1，实现了超高灵敏度的检测 (图6)[52]。这种策略可在10 fM~100 pM的范围内测量，其灵敏度是常规方法的10^5倍，这项工作不仅提高了检测的灵敏度，而且由于HEHPA纳米粒子具有ProA，易结合或更换抗体，可应用于HRP结合试剂盒或其他抗原检测试剂盒。此外，这些纳米粒子还可应用于需使用过氧化物酶进行高效率信号放大的各种生物传感器，如电化学传感器或免疫传感器。乳腺癌患者血清中的miR-155也可用作乳腺癌筛查的生物标志物。Hakimian等[53]开发了一种超敏感的电化学生物传感器，用于检测血清中的miR-155 (图7)。该生物传感器将硫醇化的探针固定在金电极表面，然后利用带正电荷的聚乙烯亚胺-银纳米粒子 (PEI-Ag NPs) 作为电活性标签，通过静电作用将其吸附到带负电荷的探针-目标杂交体上，从而实现对miR-155的高灵敏度检测。该传感器实现了20 zmol的超低检测限和2×10^{-20}~2×10^{-12} mol的宽动态范围。此外，该生物传感器能成功区分正常和癌症血清样本，在乳腺癌筛查中具有潜在应用价值。该研究提供了一种简单、成本低、效益高且高度灵敏的miR-155检测方法，为乳腺癌的早期诊断和治疗监测提供了新的策略。

3.2.3 结直肠癌生物标志物

结直肠癌 (CRC) 是胃肠道恶性肿瘤，发病率高 (全球每年约87.5万例)，进展迅速，死亡

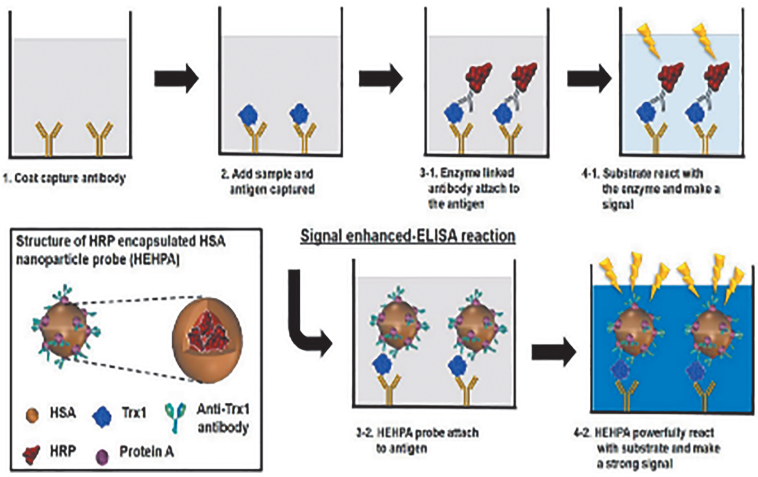

图 6　HEHPA 的结构和使用 HEHPA 增强信号的整体 ELISA 反应步骤示意图[52].

Figure 6　Structure of HEHPA and scheme of overall ELISA reaction steps using HEHPA for signal enhancement[52].

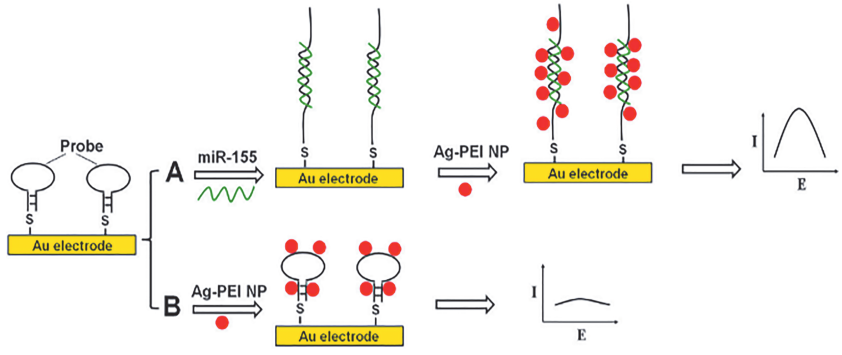

图 7　电化学生物传感器的制备示意图[53].

Figure 7　Schematic illustration of fabrication the electrochemical biosensor[53].

率高 (约 57 万例死亡)[54]。目前，CRC 已成为严重威胁人类健康的重大公共卫生问题之一[55-57]。尽管接受早期疾病诊断的患者治疗成功率高，但大多数 CRC 患者首次便被诊断为中晚期病理阶段的癌症，已无法完全治愈，这是该疾病整体死亡率高的主要原因[58]。NM 23-H2 核苷二磷酸激酶 B(NDKB) 是存在于结直肠癌肿瘤细胞中的核苷酸代谢酶，当前已在各种癌细胞的组织培养上清液和癌症患者的体液中检测到高水平的细胞外 NDKB 蛋白[59]。NDKB 水平及其变化可作为结直肠癌早期筛查、预测、动态监测和诊断的重要肿瘤标志物。研究人员开发了一种基于无标记表面增强拉曼散射 (SERS) 技术的生物传感器，用于高灵敏度检测 NDKB (图 8)[60]。该传感器融合了分子印迹聚合物的高选择性捕获特性和 SERS 技术的高灵敏度特性，通过特定的印迹腔室实现对 NDKB 蛋白的特异性识别。在检测过程中，NDKB 蛋白的特异性结合导致拉曼信号显著降低，从而实现对目标蛋白的定量分析。该方法的检测限达到 0.82 pg/mL，展现了比传统免疫分析技术成本更低、响应更快和灵敏度更高的优势。此外，该生物传感器还表现出良好的重复性、稳定性和再生能力，为 CRC 的早期诊断和肿瘤进展监测提供了一种新的有效工具。Yao 等[61]开发了一种基于金-银核壳纳米结构 (Au@Ag NPs) 的表面增强拉曼散射 (SERS) 新方法，用于无标记、高灵敏度地检测 CRC 标志物——核苷酸二磷酸激酶 A (NDKA) (图 9)。该研究团队通过精确控制银壳层厚度，制备了尺寸可控的 Au@Ag NPs 作为 SERS 基底，并将 Cr^{3+} 作为聚集剂，诱导 Au@Ag NPs 形成“热点”，显著增强了与蛋白质分析物的拉曼信号。该方法不仅成功实现了对 NDKA 的高灵敏度检测 (检测限为 300 ng/mL)，还扩展了在其他几种蛋白质检测中的应用，包括肌红蛋白、人血清白蛋白、溶菌酶和细胞色素 C，均表现出极

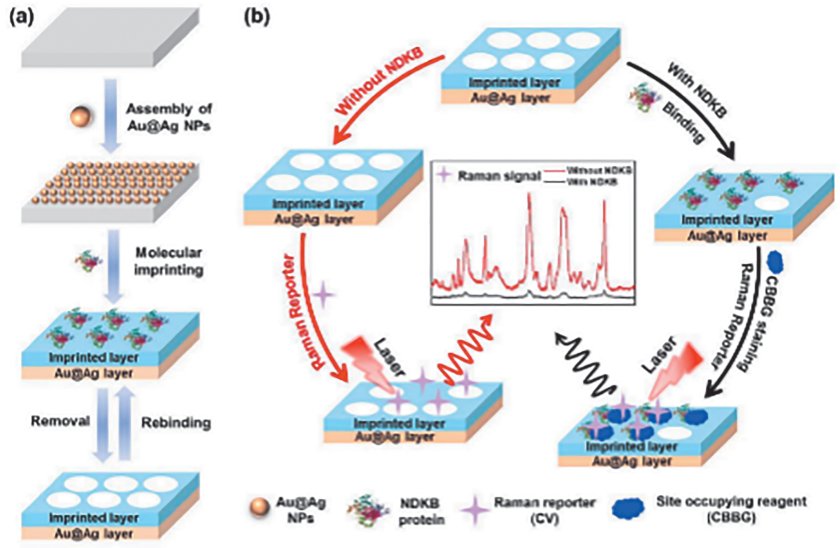

图8 (a) 通过Au@Ag NPs表面组装和分子印迹技术在硅片上构建生物传感器; (b) 基于分子印迹表面增强拉曼散射(MIP-SERS)检测目标蛋白神经衍生孤儿受体B (NDKB)的传感机制[60].

Figure 8 (a) The construction of biosensors on silicon wafers by the surface assembly of Au@Ag NPs and molecular imprinting technology inspired by mussels; (b) Sensing mechanism based on MIP-SERS detection of target protein NDKB[60].

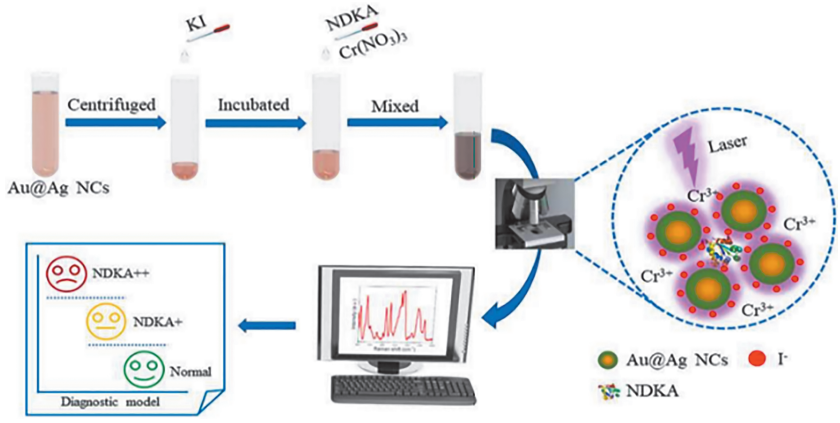

图9 基于Au@Ag ICNPs表面增强拉曼散射(SERS)法定量测定结直肠癌标志物神经衍生孤儿受体A (NDKA)的示意图[61].

Figure 9 A schematic of the Au@Ag ICNPs SERS-based method for the quantitativedetermination of CRC marker NDKA[61].

低浓度下的高灵敏度和良好重复性。这项工作为医疗治疗和临床诊断领域提供了一种新的无标记蛋白质检测策略，有望推动CRC等重大疾病的早期诊断和治疗。Zhang等[62]开发了一种基于表面增强拉曼散射(SERS)的免疫类夹心多重“热点”生物传感器，用于在血清中超灵敏检测NDKA (图10)。该生物传感器利用分子印迹聚合物和NDKA抗体特异性地捕获NDKA，并借助SERS纳米标签产生的拉曼信号，实现了对NDKA的超灵敏检测和稳定性分析。将精心设计的金纳米粒子阵列和生物相容的多巴胺分子印迹聚合物作为基质，该传感器不仅避免了纳米粒子的聚集，还克服了某些蛋白质缺乏多个抗体或配体结合位点时在免疫策略中遇到的障碍。在实际应用中，该SERS生物传感器在血清中检测NDKA的最低检测限达到了0.25 pg/mL，同时在混合蛋白溶液中也能检测到质量浓度为10 ng/mL的NDKA，展现出了出色的灵敏度和特异性。这一免疫类夹心多重“热点”生物传感器不仅为CRC的早期检测提供了有效的工具，还为未来癌症生物标志物传感策略的发展提供了新思路。

3.2.4 卵巢癌生物标志物

卵巢癌是女性中常见的癌症之一，它导致

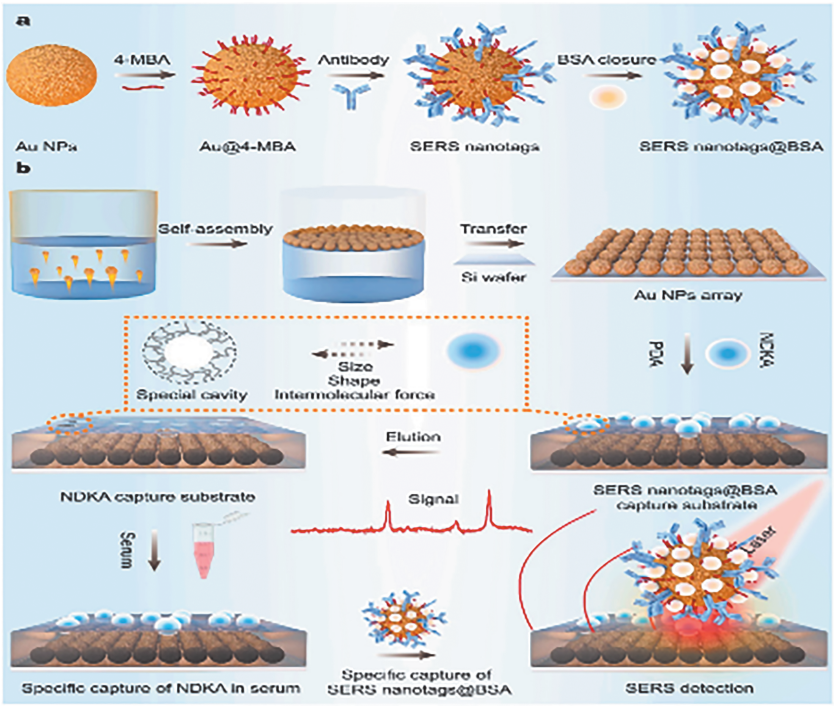

图 10　免疫类夹心多重热点表面增强拉曼散射生物传感器的工作原理: (a) 表面增强拉曼散射纳米标签的制备示意图; (b) 分子印迹捕获底物的制备示意图和用于测定 NDKA 蛋白的表面增强拉曼散射生物传感器[62].

Figure 10　Working principle of the immune-like sandwich multiple hotspots SERS biosensor: (a) Schematic of the preparation of SERS nanotags; (b) Schematic of the preparation of molecularly imprinted capture substrates, and the SERS biosensor used for the determination of NDKA protein[62].

的死亡人数超过任何其他类型的女性生殖系统癌症。卵巢癌是一种在卵巢组织中形成的癌症，大多数卵巢癌是卵巢上皮癌或恶性生殖细胞肿瘤。卵巢癌的症状往往是模糊的，大多数卵巢癌在晚期被发现，死亡率较高。因此，必须开发成本低且简单的卵巢癌早期诊断方法[63-64]。十余年的组学研究已确定了许多卵巢癌的潜在生物标志物，但目前只有少数用于临床。卵巢上皮癌抗原 125 (CA125) 是在许多卵巢癌细胞表面发现的蛋白质，也是仅有的 2 种被批准用于监测卵巢癌的标志物之一[65-66]。研究人员在三维金纳米电极集合体 (GNEE) 上开发了蛋白质印迹聚合物，以检测与卵巢癌相关的 CA125 (图 11)[67]。该研究中，首先将模板蛋白 CA125 嵌入薄膜涂层中，然后从薄膜的可接触表面提取蛋白，形成 CA125 的印迹。利用 GNEE 上非常薄的蛋白质印迹位点进行 CA125 分子的免疫特异性捕获，并通过检测电极表面的法拉第电流的减少来检测结合的质量。在最佳条件下，开发的传感器在 0.5~400 U/mL 的浓度范围内显示出良好的响应，最低检测限为 0.5 U/mL。此外，还分析了人体血清样本，证明了该传感器在实际应用中的有效性。该研究强调了分子印迹技术和纳米技术在蛋白质生物标志物检测中的潜力，提供了一种替代传统抗体检测方法的低成本效益方案。该传感器的开发为卵巢癌的早期诊断提供了一种新的简便灵敏的工具，对改善卵巢癌患者的治疗和预后具有重要意义。Viswanathan 等[68]成功开发了一种基于金纳米电极和免疫脂质体的电化学免疫传感器，用于超灵敏检测卵巢癌生物标志物 Mucin-16 (MUC16)，MUC16 也称为 CA125 (图 12)。该传感器利用金纳米电极集合体 (GNEE) 和包裹有呋喃羧酸的脂质体，通过夹心免疫分析法进行检测。该研究团队通过电化学方法在聚碳酸酯膜孔中沉积金，制备了 GNEE，并使用差分脉冲伏安法 (DPV) 来量化从免疫脂质体释放出的呋喃羧酸的法拉第氧化还原反应。该方法的剂量-反应曲线在 0.001~300 U/mL 的 MUC16 浓度范围内，最低检测限为 5×10^{-4} U/mL。此外，对添加的血清样本和志愿者的真实血清样本进行评估，发现该免疫传感器的性能与商业 ELISA 试剂盒显示出良

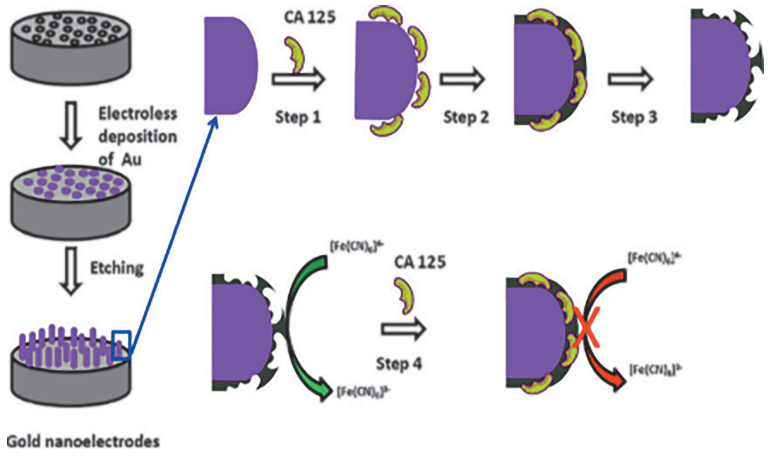

图11 分子印迹蛋白质纳米传感器制备及模板蛋白检测示意图(步骤1:癌抗原125 (CA 125) 吸附到纳米电极表面;步骤2:苯酚电化学聚合;步骤3:去除模板蛋白;步骤4:CA 125结合并产生信号[67].)

Figure 11 Schematic representation of molecular imprinted protein nanosensor fabrication and template protein detection (Step1: Adsorption of CA 125 on to the nanoelectrodes surface; Step 2: Electrochemical polymerization of phenol; Step 3: Template protein removal; Step 4: CA 125 binding and signal generation[67].)

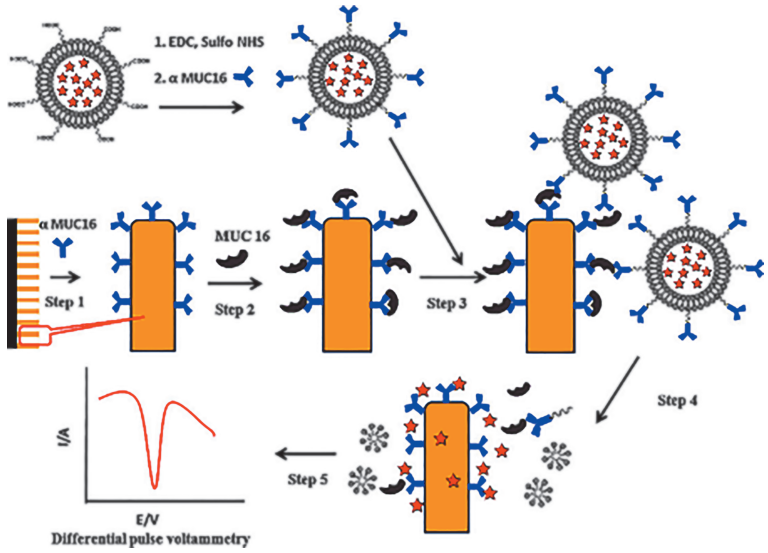

图12 使用αMUC16 - FcL生物标记物和iGNEE对黏蛋白16 (MUC16,抗原) 进行脂质体放大电化学检测的流程:步骤1,αMUC16 (抗体) 固定在电极表面;步骤2,MUC16在电极表面与αMUC16免疫结合;步骤3,与αMUC16 - FcL形成夹心免疫复合物;步骤4,结合的脂质体裂解,二茂铁羧酸释放到电极表面;步骤5,释放的二茂铁羧酸的伏安响应[68].

Figure 12 Outline of liposome amplified electrochemical detection of MUC16 (antigen) using αMUC16-FcL biolables and iGNEE: Step 1, αMUC16 (antibody) immobilized on electrode surface; Step 2, MUC16 immunoconjugated with αMUC16 on electrode surface; Step 3, sandwich immunocomplex formed with αMUC16-FcL; Step 4, bound liposomes were lysed and ferrocene carboxylic acid released on the electrode surface; Step 5, voltammetric response of release ferrocene carboxylic acid[68].

好的一致性。这项工作展示了一种新型的高灵敏度生物标志物检测平台，对卵巢癌的早期诊断和治疗监测具有重要意义。

3.3 炎症生物标志物

C-反应蛋白 (CRP) 是一种炎症和感染的生物标志物，在肝脏中产生并在人体血浆中被发现[69]。当人体出现炎症或感染症状时，其可增加至正常值的1000倍，如果治疗后CRP值持续不下降，表明身体可能还存在损伤。人血液中CRP水平异常与多种疾病直接相关，包括高血压、糖尿病、心血管疾病以及病毒和细菌感染[70-72]。因此，患者CRP水平升高是诊断这些疾病的重要因素。常规检测方法包括临床免疫测定、荧光免疫测定、垂直流动免疫测定、电

化学免疫测定、侧向流动免疫测定、化学发光免疫测定和色谱传感器等，但这些方法对大范围 CRP 水平的定量检测不够灵敏[73-74]。此外，这些技术耗时多，成本高，阻碍了大规模疾病筛查的实施。Gupta 等[75]利用制备的超细双金属 PtRu 合金纳米粒子 (CA@PtRu ANPs) 开发了一种新型的非酶促比色免疫分析法，用于快速、灵敏且选择性地定量检测 CRP (图 13)。该方法中，CA@PtRu ANPs 作为酶模拟物，显著放大了颜色信号，氨基功能化的硅烷包覆磁性微珠 (APTES/SiO_2@Fe_3O_4) 则作为 CRP 的识别捕获探针。研究成果表明，该比色免疫分析法能检测质量浓度为 0.01~180 μg /mL 范围内的 CRP，检测限为 0.01 μg/mL。该方法可快速、灵敏地检测 CRP，为后期的临床诊断提供了可能，也为其他病症的诊断方案提供了理论思路。Hu 等[76]提出了一种基于核酸适配体的新型表面增强拉曼散射 (SERS) 生物传感器，用于超灵敏检测蛋白质生物标志物 (图 14)。该研究团队设计了一种包含 SERS 标签 (报道标记的金纳米桥接纳米间隙颗粒，Au NNPs) 和新型磁性捕获基质 (银包覆 Fe_3O_4-Au NPs，Ag MNPs) 的生物传感器。以 C-反应蛋白 (CRP) 作为代表性的生物标志物，通过 Au NNPs-CRP-Ag MNPs 夹心法进行特异性识别。这种策略实现了对 CRP 的高灵敏度检测，检测限低至 1.14 pg/mL。此外，该方法在其他蛋白质的干扰下对 CRP 表现出卓越的选择性和特异性，并在实际人体血清样本检测中展现出了高准确性。这项工作提出的检测策略可扩展至其他蛋白质生物标志物的超灵敏检测，对临床疾病诊断具有重要的应用前景。Ali 等[77]开发了一种基于 RNA 适配体功能化的铜基金属有机框架 (Cu-MOF) 的光学生物传感器，用于检测 C-反应蛋白 (CRP) (图 15)。该生物传感器利用 Cu-MOF 的荧光模拟过氧化物酶活性，当 CRP 结合 RNA 时，能触发荧光和酶活性的变化，从而实现对 CRP 的高灵敏度检测。该传感器在荧光模式下的检测限为 40 pg/mL，在比色法模式下的检测限为 240 pg/mL，这些检测限均低于临床实践中的浊度技术，且与高灵敏度 CRP 检测的正常临床截止值 (1 μg/mL) 相当。该研究还成功将该生物传感器应用于 COVID-19 患者 CRP 的检测，显示出 84%~102% 的恢复率和 0.94%~2.05% 的相对标准偏差。这一研究成果为炎症生物标志物的检测提供了一种新的高灵敏度和选择性的检测方法，对临床诊断和疾病监测具有重要意义。

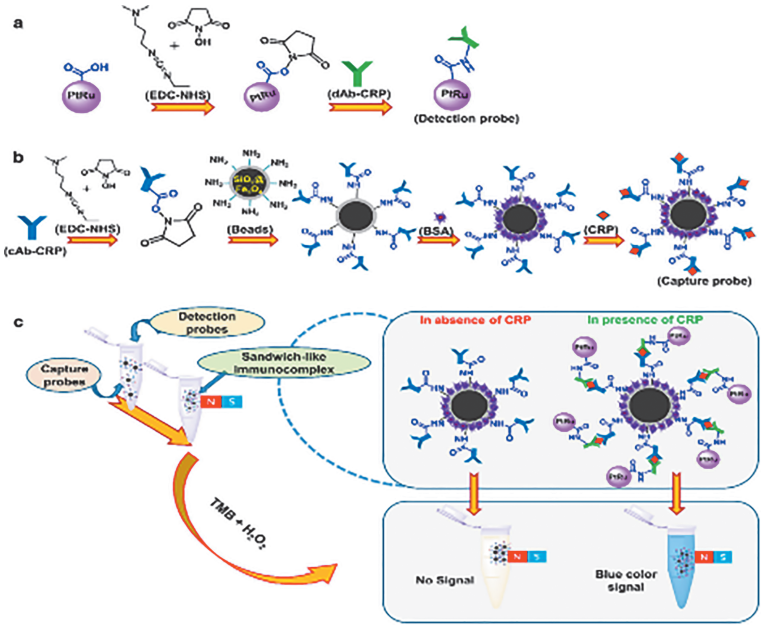

图 13　(a) dAb-CRP/CA@PtRu ANPs 结合物 (检测探针) 的制备示意图; (b) CRP/cAb-CRP/APTES/SiO_2@Fe_3O_4 结合物 (捕获探针) 的制备示意图; (c) C 反应蛋白定量的工作方法[75].

Figure 13　Schematic of (a) preparation of dAb-CRP/CA@PtRu ANPs conjugates (detection probe) and (b) CRP/cAb-CRP/APTES/SiO_2@Fe_3O_4 conjugates (capture probe); (c) The working methodology for the quantification of CRP[75].

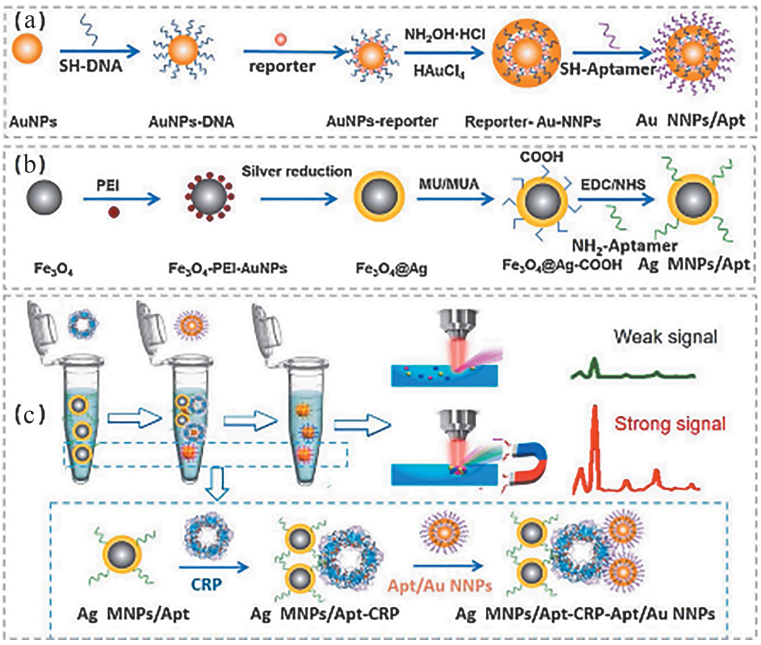

图14 (a) 金纳米纳米粒子表面增强拉曼散射 (SERS) 标签; (b) 银磁性纳米粒子磁性捕获底物的合成; (c) 通过银磁性纳米粒子 - C反应蛋白 - 金纳米纳米粒子"三明治"结构利用SERS检测蛋白质的示意图[76].

Figure 14 Synthesis of (a) Au NNPs SERS tag and (b) Ag MNPs magnetic capture substrate; (c) Schematic illustration of protein detection via Ag MNPs-CRP-Au NNPs "sandwich" structure by SERS[76].

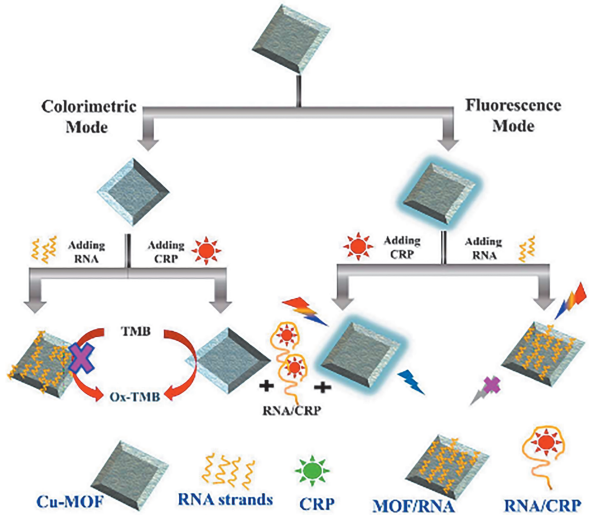

图15 基于铜基金属有机框架 (Cu-MOF) 上RNA制备C反应蛋白适配体传感器的过程示意图[77].

Figure 15 Schematic diagram of the processes to prepare CRP aptasensor based on RNA on Cu-MOF[77].

3.4 心血管疾病生物标志物

美国每年有大约150万例急性心肌梗死 (AMI)。如果患者在早期得到准确的诊断，就有可能对急性心肌梗死进行快速和适当的治疗。通常，这种诊断通过心电图仪来完成，以减少治疗的延迟。将这项技术与基于生物标志物的检测相结合，可实现对急性心肌梗死患者的准确诊断。现已证实肌钙蛋白等心脏特异性收缩蛋白在提升预测急性心肌梗死的成功率方面具有很大潜力。与其他心脏生物标志物相比，肌钙蛋白-T具有更高的特异性和有效性，诊断效率更高，在循环中持续时间更长[78]。心肌肌钙蛋白-T是一种结构蛋白，当心肌发生损伤时，它被释放到血液中，并与损伤的强度成正比。它的水平在中风发作后3.5 h~10 d内持续升高[79]。德克萨斯大学的Munje等[80]研究团队开发了一种基于锌氧化物 (ZnO) 纳米纹理表面的无标记、非法拉第电化学传感器，用于超灵敏检测心脏生物标志物肌钙蛋白-T (图16)。该研究使用了2种交联分子：二硫苏糖酰亚胺丙酸酯 (DSP) 和3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)，它们与ZnO结合后的化学特性显著不同。通过电化学阻抗谱 (EIS) 分析了2种链接剂对肌钙蛋白-T剂量反应的影响，并比较了与2种链接剂相关的传感器性能，包括动态范围和检测限。使用锌表面终止的传感器在磷酸盐缓冲盐水和人血清中对肌钙蛋白-T的检测范围分别为26%~54%和21%~65% (质量浓度为10 fg/mL~1 ng/mL)，检测限为10 fg/mL，具有在心血管疾病的临床诊断点 (POC) 中应用的潜力。这项工作实现了对肌钙蛋白-T的超低检测限，对心肌梗死的早期诊

断具有重要意义，同时展示了其在临床诊断中检测心血管疾病生物标志物的潜在应用价值。心肌肌钙蛋白-I (cTnl) 同样是心肌损伤的敏感和特异性生物标志物，对急性心肌梗死的快速识别和诊断至关重要。Akanda 等[81]开发了一种基于碱性磷酸酶 (ALP) 和氧化还原循环的免疫传感器，实现了对心肌肌钙蛋白-I 的超灵敏检测 (图 17)。该研究选用 L- 抗坏血酸 2- 磷酸酯 (AAP) 作为 ALP 底物，三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 作为还原剂，这些选择有助于在无需任何电催化剂或电子介体的情况下，实现快速的氧化还原循环和低背景电流水平。在优化条件下，免疫传感器对心肌肌钙蛋白-I 的检测限达到了 10 fg/mL。该研究展示了一种简单、灵敏且可重复的免疫传感器制备方法，为心肌损伤的早期诊断和治疗监测提供了一种有效的检测工具。Diware 等[82]报道了一种基于溶液浸没硅 (SIS) 传感器的超灵敏、无标记、高通量免疫传感器，用于早期诊断急性心肌梗死 (图 18)。该传感器通过非反射条件 (NRC) 对 p 偏振波进行检测，对生物层厚度的变化极为敏感，且不受周围介质折射率变化的影响。该技术避免了热噪声的干扰，且无需参考信号，测量快速且准确。研究中，SIS 传感器被应用于检测心肌损伤时释放到血液中的生物标志物，包括肌红蛋白、肌酸激酶 MB (CK-MB) 和心肌肌钙蛋白-I (cTnI)。该研究团队成功实现了在 PBS 和血液血清中对 cTnI 的检测限分别为 5 pg/mL 和 10 pg/mL，响应时间约为 5 min。这种新型技术是成本低效益高的现场快速检测应用的理想选择。

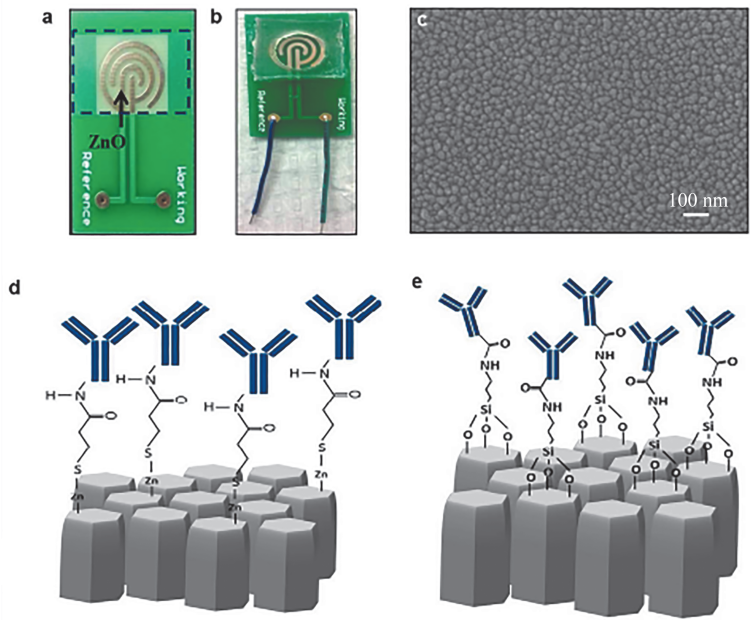

图 16　(a) 在金电极图案上溅射氧化锌 (ZnO) 的传感器; (b) 使用电化学阻抗谱 (EIS) 进行生物传感的组装传感器; (c) 纳米纹理化 ZnO 薄膜的扫描电子显微镜 (SEM) 图像; (d) 使用与肌钙蛋白 - T 抗体结合的二硫代双 (琥珀酰亚胺基丙酸酯) (DSP) 在 ZnO 表面进行免疫分析的设置; (e) 使用与肌钙蛋白 - T 抗体结合的 3 - 氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 在 ZnO 表面进行免疫分析的设置[80].

Figure 16　(a) Sensor with sputtered ZnO over gold electrode pattern; (b) Assembled sensor for bio-sensing using EIS; (C) SEM of nano-textured ZnO thin film; (d) Immunoassay setup on the ZnO surface using DSP bound with troponin-T antibody; (e) Immunoassay setup on the ZnO surface using APTES bound with troponin-T antibody[80].

4　蛋白质超灵敏检测的挑战与未来发展

4.1　挑战

蛋白质生物标志物超灵敏检测技术虽在疾病生物标志物发现、生物医学研究和个性化医疗中展现出巨大潜力，但仍面临多重挑战和限制。从技术角度来看，需解决如何从复杂的生物样本中准确捕获微量蛋白质，以及检测信号放大的问题，同时需确保检测结果的稳定性和重复性。此外，创新性挑战要求我们不断探索新的检测原理和技术，以提高检测的灵敏度和

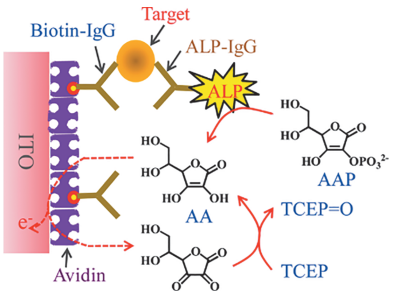

图17 使用碱性磷酸酶 (ALP) 生成抗坏血酸 (AA) 以及使用三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 使AA发生氧化还原循环的电化学免疫传感器示意图[81].

Figure 17 Schematic representation of an electrochemical immunosensor using the generation of AA by ALP and the redox cycling of AA by TCEP[81].

特异性，这可能包括纳米技术、量子点、单分子荧光技术等前沿科技的应用。成本问题也是一个重要的制约因素，高昂的设备和试剂成本限制了该技术在临床和研究中的广泛应用。因此，开发操作简便、成本低廉的检测技术和材料，降低整体检测成本，是推动该技术普及的关键。除了上述挑战，蛋白质生物标志物超灵敏检测技术还面临着样本前处理、数据解析和分析、检测设备小型化和便携化等方面的问题。样本前处理需更高效的方法来提取和纯化目标蛋白质以提高检测通量，而数据解析和分析则需更先进的算法和计算工具来处理和解释大量的检测数据。此外，随着移动医疗和即时检测的需求增加，检测设备的小型化和便携化也成为未来发展的重要方向。

4.2 展望

蛋白质生物标志物超灵敏检测技术正处于快速发展阶段，其在未来的生物医学研究和临床诊断中具有广阔的应用前景。在疾病早期诊断方面，随着技术灵敏度的提升，将能更早地发现疾病生物标志物，为早期干预提供可能，助力改善治疗效果和患者生活质量。个性化医疗将因精确的蛋白质表达分析而得到加强，使治疗方案更加精准，提高疗效并减少副作用。在药物开发领域，超灵敏检测技术将加速新药开发，通过精准筛选药物靶点、实时监测药物效果以及评估药物安全性，降低研发成本，提高新药上市的成功率。此外，生物安全与环境监测将受益于快速检测和识别环境污染物、病原体能力的增强，为及时应对和控制生物安全事件提供支持。

相信在不远的将来，随着人工智能和机器学习技术的发展，蛋白质检测数据的分析将变得更加自动化和智能化，蛋白质检测技术会因此而受益。同时，其将推动跨学科研究，结合生物信息学、系统生物学等领域的知识，更全面地解释生物过程和疾病机制。此外，随着技

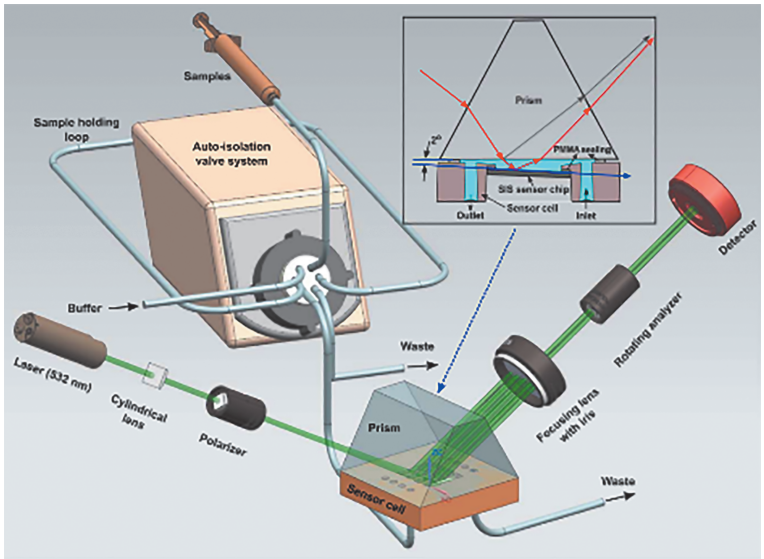

图18 SIS传感器系统示意图 (采用RAE配置的椭圆偏振仪作为光学换能器,用于探测生物分子间的相互作用; 传感器芯片与棱镜表面呈2°倾斜排列,以将棱镜表面反射光束产生的噪声降至最低[82]).

Figure 18 Schematics of SIS sensor system (Ellipsometer in RAE configuration was used as an optical transducer to probe biomolecular interactions; Sensor chip was aligned at an inclination of 2° with respect to the surface of the prism to minimize the noise due to the reflected beam from the prism surface, shown in the inset[82]).

术的发展，需更多地关注患者隐私保护、数据安全以及伦理和法律问题，确保技术的应用符合社会伦理标准和法律规定。设备小型化与便携化的趋势将使检测更加方便快捷，适用于多种场景，满足移动医疗和即时检测的需求。综上所述，蛋白质生物标志物超灵敏检测技术的应用将极大地推动生物医学研究和临床实践的进步，同时也将带来新的挑战和机遇，为人类健康和福祉做出重要贡献。

本文综述了蛋白质生物标志物在多种疾病中的重要作用，以及超灵敏检测技术在早期诊断和治疗监测中的应用。通过对神经系统疾病、癌症、炎症和心脏病等相关生物标志物研究进展的探讨，我们认识到蛋白质生物标志物超灵敏检测对疾病的早期发现和治疗具有不可估量的价值。特别是分子印迹技术和纳米技术在提高检测灵敏度和特异性方面展现出巨大潜力。这些传感器不仅灵敏度高，而且具有较好的选择性和稳定性，为临床诊断提供了新的工具。然而，蛋白质生物标志物超灵敏检测技术在应用于临床实践之前，仍需克服成本、操作复杂性、样本制备和标准化等方面的一系列挑战。

参考文献

1 Levin A, Stevens P E. Early detection of CKD: The benefits, limitations an deffects on prognosis[J]. *Nature Reviews Nephrology*, **2011**, 7(8): 446-457.

2 Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Epidemiology of lung cancer in C hina[J]. *Thoracic Cancer*, **2015**, 6(2): 209-215.

3 Barta J A, Powell C A, Wisnivesky J P. Global epidemiology of lung cancer[J]. *Annals of Global Health*, **2019**, 85(1): 8.

4 Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: A review[J]. *Journal of Clinical Oncology*, **2007**, 25(5): 561-570.

5 Blackhall F V T, Devita S, Hellman S A. Rosenberg (Eds.), cancer: Principles and practice of oncology, seventh edition[J].*Surgical Oncology*, **2006**, 14(4):195.

6 Honig L S, Vellas B, Woodward M, et al. Trial of solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease[J]. *New England Journal of Medicine*, **2018**, 378 (4): 321-330.

7 None. The need for early detection and treatment in Alzheimer's disease[J]. *EBioMedicine*, **2016**, 9: 1-2.

8 Maliszewska-Cyna E, Lynch M, Jordan O J, et al. The benefits of exercise and metabolic interventions for the prevention and early treatment of Alzheimer's disease[J]. *Current Alzheimer Research*, **2017**, 14(1): 47-60.

9 Richardet E, Villavicencio R, Hernandez P A, et al. P1.09: Delays in the diagnosis and treatment of lung cancer[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, **2016**, 11(10): S185.

10 Ghosh R K, Pandey T, Dey P. Liquid biopsy: A new avenue in pathology[J]. *Cytopathology*, **2019**, 30 (2): 138-143.

11 Petsko G A, Ringe D. *Protein structure and function*[M]. Washington: New Science Press, **2004**.

12 Hanash S. Disease proteomics[J]. *Nature*, **2003**, 422(6928): 226-232.

13 Drabovich A P, Martínez-Morillo E, Diamandis E P. Toward an integrated pipeline for protein biomarker development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Proteins and Proteomics*, **2015**, 1854(6): 677-686.

14 Waikar S S, Betensky R A, Emerson S C, et al. Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, **2012**, 23(1): 13-21.

15 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, **1971**, 8(9): 871-874.

16 Yalow R S , Berson S A .Immunoassay of endogenous plasma insulin in man[J].*Journal of Clinical Investigation*, **1960**, 39(6):1157-1175.

17 Luppa P B, Sokoll L J, Chan D W. Immunosensors: Principles and applications to clinical chemistry[J]. *Clinica chimica acta*, **2001**, 314(1/2): 1-26.

18 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, **2003**, 422(6928): 198-207.

19 Bange A, Halsall H B, Heineman W R. Microfluidic immunosensor systems[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 20(12): 2488-2503.

20 Templin M F, Stoll D, Schrenk M, et al. Protein microarray technology[J]. *TRENDS in Biotechnology*, **2002**,

20(4): 160-166.

21 Yang X, Tang Y, Alt R R, et al. Emerging techniques for ultrasensitive protein analysis[J]. *The Analyst*, **2016**, 141(12): 3473-3481.

22 Hu R, Sou K, Takeoka S. A rapid and highly sensitive biomarker detection platform based on a temperature-responsive liposome-linked immunosorbent assay[J]. *Scientific Reports*, **2020**, 10(1): 18086.

23 Cardozo K H M, Lebkuchen A, Okai G G, et al. Establishing a mass spectrometry-based system for rapid detection of SARS-CoV-2 in large clinical sample cohorts[J]. *Nature Communications*, **2020**, 11(1): 6201.

24 Higashi S, Yagyu K, Nagase H, et al. Ultra-high-speed western blot with the aid of immunoreaction enhancing technology[J]. *Journal of visualized experiments : JoVE*, **2020**(163): e61657.

25 Naylor S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **2003**, 3(5): 525-529.

26 Mayeux R. Biomarkers: Potential uses and limitations[J]. *NeuroRx*, **2004**, 1: 182-188.

27 Gunn G R, Evans C, Yang E. Immunogenicity and biomarkers: Bioanalytical challenges and considerations[J]. *Bioanalysis*, **2017**, 9(22): 1729-1732.

28 Yang S Y, Chiu M J, Chen T F, et al. Analytical performance of reagent for assaying tau protein in human plasma and feasibility study screening neurodegenerative diseases[J]. *Scientific Reports*, **2017**, 7(1): 9304.

29 Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H. Update on ultrasensitive technologies to facilitate research on blood biomarkers for central nervous system disorders[J]. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis*, *Assessment & Disease Monitoring*, **2016**, 3(1): 98-102.

30 Pallares R M, Su X, Lim S H, et al. Fine-tuning of gold nanorod dimensions and plasmonic properties using the Hofmeister effects[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, **2016**, 4(1): 53-61.

31 Sun J, Sun H, Liang Z. Nanomaterials in electrochemiluminescence sensors[J]. *ChemElectroChem*, **2017**, 4(7): 1651-1662.

32 Oh E S, Mielke M M, Rosenberg P B, et al. Comparison of conventional ELISA with electrochemiluminescence technology for detection of amyloid-β in plasma[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2010**, 21(3): 769-773.

33 Chen H, Jiang C, Yu C, et al. Protein chips and nanomaterials for application in tumor marker immunoassays[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24(12): 3399-3411.

34 Dinish U S, Beffara F, Humbert G, et al. Surface-enhanced Raman scattering-active photonic crystal fiber probe: Towards next generation liquid biopsy sensor with ultra high sensitivity[J]. *Journal of Biophotonics*, **2019**, 12(11): e201900027.

35 Gorodkiewicz E, Lukaszewski Z. Recent progress in surface plasmon resonance biosensors (2016 to Mid-2018)[J]. *Biosensors*, **2018**, 8(4): 132.

36 Wang J, Lin W, Cao E, et al. Surface plasmon resonance sensors on Raman and fluorescence spectroscopy[J]. *Sensors*, **2017**, 17(12): 2719.

37 Hu W, Chen H, Shi Z, et al. Dual signal amplification of surface plasmon resonance imaging for sensitive immunoassay of tumor marker[J]. *Analytical Biochemistry*, **2014**, 453: 16-21.

38 Murphy M P, Levine I H. Alzheimer's disease and the amyloid-β peptide[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2010**, 19(1): 311-323.

39 Conti S, Bonazzi S, Laiacona M, et al. Montreal cognitive assessment (MoCA) -italian version: Regression based norms and equivalent scores[J]. *Neurological Sciences*, **2015**, 36(2): 209-214.

40 Ercoli L M, Siddarth P, Dunkin J J, et al. MMSE items predict cognitive decline in persons with genetic risk for Alzheimer's disease[J]. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, **2003**, 16(2): 67-73.

41 Ferreira L K, Busatto G F. Neuroimaging in Alzheimer's disease: Current role in clinical practice and potential future applications[J]. *Clinics*, **2011**, 66: 19-24.

42 Chan H N, Xu D, Ho S L, et al. Ultra-sensitive detection of protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Chemical Science*, **2017**, 8(5): 4012-4018.

43 Özcan N, Medetalibeyoglu H, Akyıldırım O, et al. Electrochemical detection of amyloid-β protein by delaminated titanium carbide MXene/multi-walled carbon nanotubes composite with molecularly imprinted polymer[J]. *Materials Today Communications*, **2020**, 23: 101097.

44 Kew M. Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases[J]. *Gut*, **1974**, 15(10): 814-821.

45 Yang H, Zhao C, Li R, et al. Noninvasive and prospective diagnosis of coronary heart disease with urine using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *The Analyst*, **2018**, 143(10): 2235-2242.

46 Zhao L J, Yu R J, Ma W, et al. Sensitive detection of protein biomarkers using silver nanoparticles enhanced immunofluorescence assay[J]. *Theranostics*, **2017**, 7(4): 876-883.

47 Wang C F, Wang Z G, Sun X Y, et al. An ultrasensitive fluorescent aptasensor for detection of cancer marker proteins based on graphene oxide-ssDNA[J]. *RSC Advances*, **2018**, 8(72): 41143-41149.

48 Cha M K, Suh K H, Kim I H. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **2009**, 28(1): 93.

49 Park B J, Cha M K, Kim I H. Thioredoxin 1 as a serum marker for breast cancer and its use in combination with CEA or CA15-3 for improving the sensitivity of breast cancer diagnoses[J]. *BMC Research Notes*, **2014**, 7(1): 7.

50 Ebeling F G, Stieber P, Untch M, et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer[J]. *British Journal of Cancer*, **2002**, 86(8): 1217-1222.

51 Molina R, Jo J, Filella X, et al. C-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: Prognostic value[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, **1998**, 51(2): 109-119.

52 Lee M J, Lee E S, Kim T H, et al. Detection of thioredoxin-1 using ultra-sensitive ELISA with enzyme-encapsulated human serum albumin nanoparticle[J]. *Nano Convergence*, **2019**, 6(1): 37.

53 Hakimian F, Ghourchian H. Ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of microRNA-155 as a breast cancer risk factor[J]. *Analytica Chimica Acta*, **2020**, 1136: 1-8.

54 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2018**, 68(6): 394-424.

55 Todua F, Gagua R, Maglakelidze M, et al. Cancer incidence and mortality-Major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia[J]. *Bull Georg Natl Acad Sci*, **2015**, 9(1): 168-173.

56 Martini G, Troiani T, Cardone C, et al. Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets[J]. *World Journal of Gastroenterology*, **2017**, 23(26): 4675.

57 Siegel R L, Miller K D, Fedewa S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2017**, 67(3): 177-193.

58 Arnold M, Sierra M S, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. *Gut*, **2017**, 66(4): 683-691.

59 Romani P, Ignesti M, Gargiulo G, et al. Extracellular NME proteins: A player or a bystander? [J]. *Laboratory Investigation*, **2018**, 98(2): 248-257.

60 Lu Y, Liu Q, Fu B, et al. Label-free MIP-SERS biosensor for sensitive detection of colorectal cancer biomarker[J]. *Talanta*, **2023**, 258: 124461.

61 Yao M M, Tang H, Yin Y C, et al. Tuning the surface enhanced Raman spectroscopy performance of Au core-Ag shell nanostructure for label-free highly sensitive detection of colorectal cancer marker[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, **2022**, 896: 163043.

62 Zhang X, Gan T, Xu Z, et al. Immune-like sandwich multiple hotspots SERS biosensor for ultrasensitive detection of NDKA biomarker in serum[J]. *Talanta*, **2024**, 271: 125630.

63 Geurts S M E, De-Vegt F, Van-Altena A M, et al. Considering early detection of relapsed ovarian cancer: A review of the literature[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, **2011**, 21(5): 837-845.

64 Zhu C S, Pinsky P F, Cramer D W, et al. A Framework for evaluating biomarkers for early detection: Validation of biomarker panels for ovarian cancer[J]. *Cancer Prevention Research*, **2011**, 4(3): 375-383.

65 Peng N J, Liou W S, Liu R S, et al. Early detection of recurrent ovarian cancer in patients with low-level increases in serum CA-125 levels by 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography/computed tomography [J]. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **2011**, 26(2): 175-181.

66 Cramer D W, Bast R C, Berg C D, et al. Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens[J]. *Cancer Prevention Research*, **2011**, 4(3): 365-374.

67 Viswanathan S, Rani C, Ribeiro S, et al. Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of

ovarian cancer marker[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **2012**, 33(1): 179-183.
68 Viswanathan S, Rani C, Delerue-Matos C. Ultrasensitive detection of ovarian cancer marker using immunoliposomes and gold nanoelectrodes[J]. *Analytica Chimica Acta*, **2012**, 726: 79-84.
69 Sproston N R, Ashworth J J. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection[J]. *Frontiers in Immunology*, **2018**, 9: 754.
70 Reitz C, Berger K, De-Maat M P M, et al. CRP gene haplotypes, serum CRP, and cerebral small-vessel disease: The rotterdam scan study and the MEMO study[J]. *Stroke*, **2007**, 38(8): 2356-2359.
71 Yanbaeva D G, Dentener M A, Spruit M A, et al. IL6 and CRPhaplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: A case-control study[J]. *BMC Medical Genetics*, **2009**, 10(1): 23.
72 Zhang P, Bao Y, Draz M, et al. Rapid and quantitative detection of C-reactive protein based on quantum dots and immunofiltration assay[J]. *International Journal of Nanomedicine*, **2015**: 6161.
73 Biondi M, D'Alessandro P. Genus-group names of Afrotropical flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae): Annotated catalogue and biogeographical notes[J]. *European Journal of Entomology*, **2010**, 107(3): 401-424.
74 Luo Y, Zhang B, Chen M, et al. Sensitive and rapid quantification of C-reactive protein using quantum dot-labeled microplate immunoassay[J]. *Journal of Translational Medicine*, **2012**, 10(1): 24.
75 Gupta P K, Son S E, Seong G H. Functionalized ultra-fine bimetallic PtRu alloy nanoparticle with high peroxidase-mimicking activity for rapid and sensitive colorimetric quantification of C-reactive protein[J]. *Microchimica Acta*, **2021**, 188(4): 119.
76 Hu Z, Zhou X, Duan J, et al. Aptamer-based novel Ag-coated magnetic recognition and SERS nanotags with interior nanogap biosensor for ultrasensitive detection of protein biomarker[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2021**, 334: 129640.
77 Ali G K, Omer K M. Ultrasensitive aptamer-functionalized Cu-MOF fluorescent nanozyme as an optical biosensor for detection of C-reactive protein[J]. *Analytical Biochemistry*, **2022**, 658: 114928.
78 Butcher K S, Parsons M W. Cardiac enzyme elevations after stroke: The importance of specificity[J]. *Stroke*, **2002**, 33(8): 1944-1945.
79 Katus H A, Remppis A, Neumann F J, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, **1991**, 83(3): 902-912.
80 Munje R D, Jacobs M, Muthukumar S, et al. A novel approach for electrical tuning of nano-textured zinc oxide surfaces for ultra-sensitive troponin-T detection[J]. *Analytical Methods*, **2015**, 7(24): 10136-10144.
81 Akanda M R, Aziz M A, Jo K, et al. Optimization of phosphatase- and redox cycling-based immunosensors and Its application to ultrasensitive detection of troponin I[J]. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83(10): 3926-3933.
82 Diware M S, Cho H M, Chegal W, et al. Ultrasensitive, label-free detection of cardiac biomarkers with optical SIS sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 87: 242-248.

Review

Research Progress in Ultrasensitive Detection Technologies for Protein Biomarkers

WANG Hai-tao, MA Xiao-yuan, SONG Yan-bing, WANG Yu-xuan, WANG Ya-fei, ZHAO Zhuo*, ZHANG Yong-jun*

(*School of Pharmacy, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China*; *Cangzhou Institute of Tianjin Polytechnic University, Hebei Provincial Membrane Industry Technology Research Institute, Cangzhou 061019, China*)

Abstract This article reviews the research progress of ultrasensitive detection techniques for protein biomarkers. Protein biomarkers, serving as important evidence for molecular diagnosis of diseases, are of great value for early

diagnosis, disease staging, and evaluation of treatment efficacy. The article introduces common ultrasensitive detection techniques for protein biomarkers, with a particular focus on the application of biosensors constructed based on molecularly imprinted polymers and nanotechnology in the ultrasensitive detection of protein biomarkers. These sensors have demonstrated high sensitivity and specificity in detecting protein biomarkers. In addition, the article also discusses the challenges faced in the ultrasensitive detection of protein biomarkers and looks ahead to the future development directions.

Keywords Early disease diagnosis, Biomarker, Ultrasensitive protein detection, Biosensor

* **Corresponding author:** ZHAO Zhuo,E-mail:zhaozhuo@tiangong.edu.cn;ZHANG Yong-jun,E-mail:zhangyj@taingong.edu.cn.