

· 综述 ·

脂联素生物传感器的研究进展

安家莹, 霍明珠, 张庆祥, 张祐霖, 司雨欣, 张淼, 房钰鑫*

天津中医药大学 针灸推拿学院, 天津 301617

安家莹, 霍明珠, 张庆祥, 张祐霖, 司雨欣, 张淼, 房钰鑫. 脂联素生物传感器的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2052-2069.

AN Jiaying, HUO Mingzhu, ZHANG Qingxiang, ZHANG Youlin, SI Yuxin, ZHANG Miao, FANG Yuxin. Research progress in biosensors for adiponectin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2052-2069.

摘要: 脂联素是脂肪组织细胞因子之一, 也是一种新定义的脂肪细胞因子, 可以参与胰岛素、葡萄糖和脂肪细胞代谢过程。脂联素水平降低会增加发生代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的风险。脂联素因其具有抗动脉粥样硬化和有效的胰岛素增敏作用而被认为是治疗 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)和 MS 的重要工具。因此, 准确测定人血浆中的脂联素浓度对 T2DM 和 MS 的预测及治疗决策具有重要的意义。目前, 已经开发了许多生物传感器用于检测脂联素等生物标志物。本文综述了电化学传感器、表面增强拉曼散射传感器以及化学发光微流控传感器在脂联素检测领域中的应用, 阐述了近年来脂联素传感器的研究进展, 以为脂联素传感器的进一步研究及其在医疗领域中的应用提供参考。

关键词: 脂联素; 代谢综合征; 电化学; 表面增强拉曼散射; 微流控; 生物传感器

Research progress in biosensors for adiponectin

AN Jiaying, HUO Mingzhu, ZHANG Qingxiang, ZHANG Youlin, SI Yuxin, ZHANG Miao, FANG Yuxin*

School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Adiponectin, a cytokine associated with adipose tissue, is a recently defined adipocytokine involved in insulin, glucose, and adipocyte metabolism. Reduced adiponectin levels can increase the risk of developing metabolic syndrome (MS). Adiponectin is considered

资助项目: 国家自然科学基金(81973944); 天津市自然科学基金(22JCYBJC00990)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81973944) and the Tianjin Natural Science Foundation (22JCYBJC00990).

*Corresponding author. E-mail: meng99_2006@126.com

Received: 2023-12-11; Accepted: 2024-04-19; Published online: 2024-06-11

an important target for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and MS due to its anti-atherosclerotic and insulin-sensitizing effects. Therefore, the accurate determination of adiponectin concentrations in human plasma is necessary for the management of both T2DM and MS. A variety of biosensors have been developed for the detection of biomarkers such as adiponectin. This paper reviews the applications of electrochemical sensors, surface-enhanced Raman scattering sensors, and microfluidic chip-based chemiluminescence sensors in the detection of adiponectin and the recent research progress in the sensors for the detection of adiponectin, aiming to provide a reference for the research and application of sensors for adiponectin in the medical field.

Keywords: adiponectin; metabolic syndrome; electrochemical; surface-enhanced Raman scattering; microfluidic; biosensor

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是一种由多种代谢问题组成的症候群,包括肥胖、高血压、糖耐量受损和血脂异常。这些症状相互关联,共同增加了个体发展成2型糖尿病和心脑血管疾病的风险。因此,代谢综合征被认为是这些慢性疾病的一个关键预警信号。由于脂肪细胞因子与肥胖和脂肪组织功能障碍有着密切的联系,且能够影响胰岛素抵抗和促炎状态^[1],因此脂肪细胞因子可能是预测MS未来发展的关键。脂联素是一种30 kDa大小的单体糖蛋白,由氨基端(N-terminus, N)信号序列、非同源或高变区、胶原结构域和羧基端(C-terminus, C) C1q样球状结构域组成^[2]。脂联素单体仅存在于脂肪细胞中,是一种新定义的脂肪细胞因子,它可以参与胰岛素、葡萄糖和脂肪细胞代谢过程^[3-4]。脂联素于20世纪90年代中期同时被多个课题组发现,分别命名为30 kDa的脂肪细胞补体相关蛋白(Acrp30)、脂肪组织最丰富的基因转录酶1(apM1)以及28 kDa的明胶结合蛋白(GBP28)^[5-8]。直至1999年,Arita等^[9]最终将这种蛋白质命名为脂联素(adiponectin, AdipoQ),且至今仍在沿用这一名称;同时,该课题组研制出人脂联素的单克隆和多克隆抗体以定量脂联素的浓度,并且开发了酶联免疫吸附测定(enzyme linked

immunosorbent assay, ELISA)系统^[9]。已有研究表明,血浆脂联素水平降低会增加发生MS的风险^[10]。此外,根据已有文献报道,脂联素的血浆浓度不仅与肥胖和糖尿病的风险成反比;而且在糖尿病前期,脂联素水平降低可能是早期预警信号,它可以发生在胰岛素敏感性降低之前^[3,9]。因其具有抗动脉粥样硬化和胰岛素增敏作用,脂联素对治疗2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)和MS具有重要意义,且脂联素浓度升高在T2DM和MS中起着积极作用^[11]。因此,准确测定人血浆中的脂联素浓度有助于实现T2DM和MS的早期筛查和干预,从而降低发病率和并发症风险。

目前,可以通过ELISA^[12-14]、免疫比浊法^[15-16]、胶金试纸条^[17]等方法进行脂联素检测,其中以ELISA检测最为常见。然而,这些检测方法普遍存在一些局限性,例如操作步骤多、分析时间长、灵敏度低等。因此,有必要研发出一种简单、高效、灵敏的脂联素检测方法。近年来,生物传感器在医学诊断领域得到了广泛关注,它可用于检测血糖、神经递质及肿瘤标志物等,本课题组前期也进行了相关研究,研发了多种微型生物传感器以用于监测生物标志物。近年来,本课题组在自制植入式微型电极表面,先后

采用多种纳米材料和多酶级联膜层(如普鲁士蓝纳米颗粒、铜纳米化、适配体等), 实现了在体内实时检测多种待测物质^[18-20]。

生物传感器是一种可以检测各种生物分析物的分析设备, 由生物识别元件、换能器及信号处理系统组成^[21-22]。其中生物识别元件是生物传感器的重要组成部分, 它能识别特定的生物分子, 如抗原抗体、核酸或细胞受体、酶以及脂肪细胞蛋白等。生物传感器具有成本低廉、操作简易、灵敏度和选择性高等优势^[22], 能够

在脂联素检测方面提供新的思路及可能。目前, 已经开发了多种生物传感器应用于检测脂联素等生物标志物^[23-24]。本文首先综述了电化学传感器、表面增强拉曼散射传感器以及化学发光微流控传感器的工作原理(图 1), 然后对近年来脂联素传感器的设计、性能及应用方面的研究进展进行了归纳整理, 最后讨论了目前脂联素传感器在实际应用方面的研究难点与不足, 并对开发可应用于脂联素即时检测的便携式传感器进行了展望。

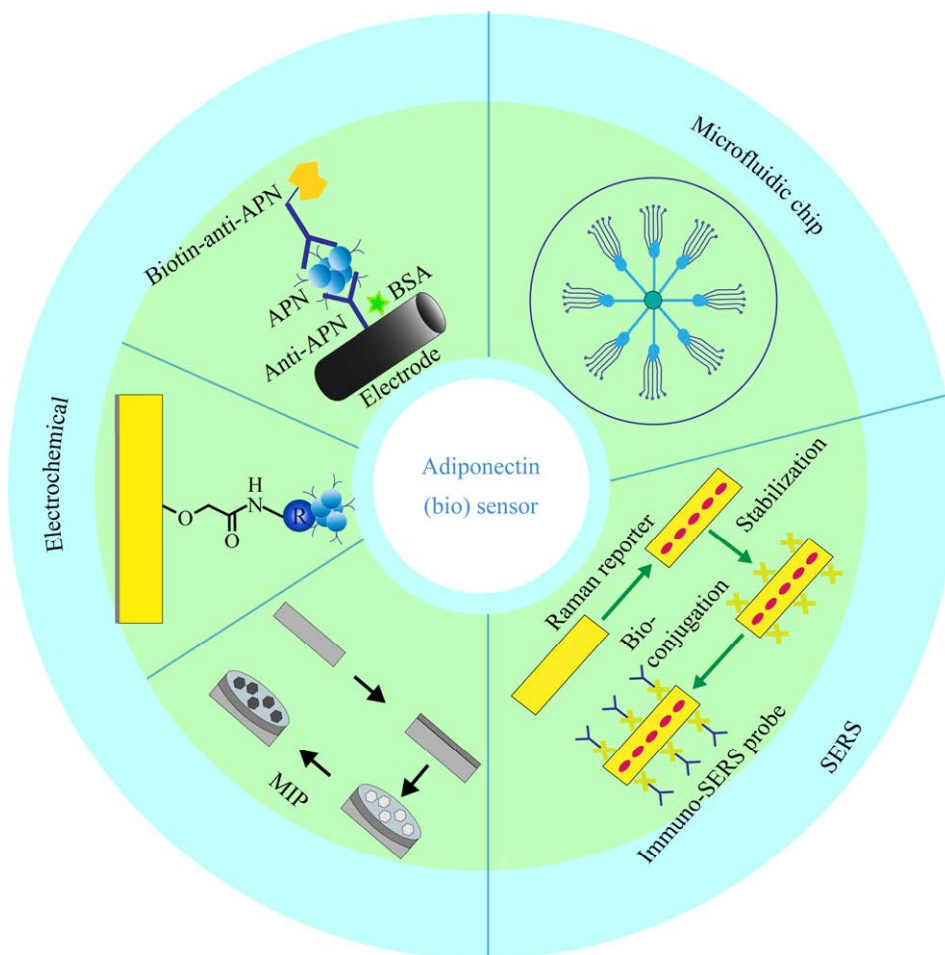


图 1 各类传感器在脂联素测定中的应用概述示意图 APN: 脂联素; MIP: 分子印迹聚合物; SERS: 表面增强拉曼散射; BSA: 牛血清白蛋白

Figure 1 Application diagram of various sensors in adiponectin determination. APN: Adiponectin; MIP: Molecularly imprinted polymers; SERS: Surface-enhanced Raman scattering; BSA: Bovine serum albumin.

1 脂联素电化学传感器

1.1 电化学传感器的原理与构成

电化学传感器具有操作简易、即时检测、灵敏度高、体积小及成本低等优点,因而在生物传感器中占有重要的比重,是应用最广泛、种类最多及商用最成功的一类生物传感器^[25-26]。电化学传感器是利用电化学分析的方法将抗体、酶、蛋白质、核酸、微生物、细胞、组织等生物活性物质作为识别元件进行定量分析的装置。该类传感器使分析物和传感设备之间的电化学相互作用,将定性或定量电化学信息转换为用于分析的信号^[27-28],工作原理如图2所示。根据用于修饰电极表面的各类生物识别元件,可将其分为电化学免疫传感器、电化学DNA传感器、电化学酶传感器、电化学微生物传感器以及电化学全细胞传感器^[30]。

1.2 脂联素电化学免疫传感器

电化学免疫传感器是以抗原或抗体作为生物识别元件,将抗原抗体间高度特异性反应和电化学分析技术相结合的一类免疫传感器。免疫

反应策略和电化学检测技术的适当结合可以获得更直接的免疫反应程序、更短的响应时间、更少的试剂、更显著的信号和更优越的选择性^[31]。基于这些优势,电化学免疫传感器在食品分析、临床检测等领域得到了广泛的应用^[32-35],并且随着各种新型材料的不断涌现,研究人员已经设计了多种可用于脂联素检测的电化学免疫传感器。

1.2.1 基于碳糊电极的电化学传感器

碳糊电极(carbon paste electrode, CPE)是由导电性的石墨粉和憎水性的黏合剂混合制作而成的一种新型电极,其优势在于价格低廉、制备简便,电位使用范围宽、表面积可重现^[36],因此CPE是电化学传感器中常见的电极材料之一。

2012年,Pavlina等^[37]采用吸附转移溶出方波伏安法(adsorptive transfer stripping square wave voltammetry, AdTS SWV)研究脂联素在CPE上的电化学行为(图3A)。为了得到用于测定目标蛋白质最灵敏的分析工具,该课题组对CPE表面累积时间和0.2 mol/L磷酸盐缓冲液的pH进行优化,在累积时间300 s及0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.98)的优化条件下,脂联素对CPE表

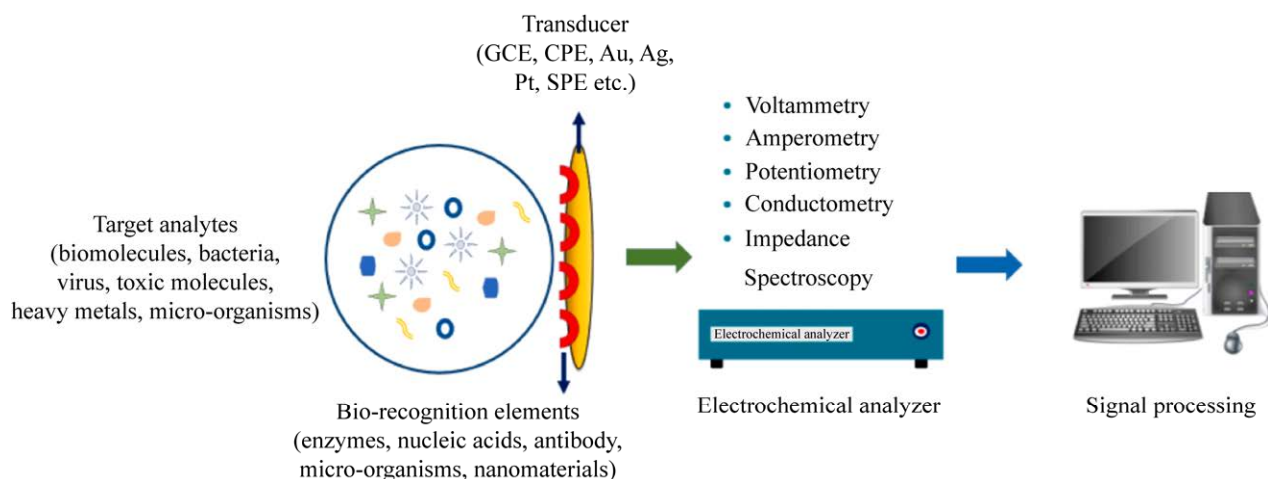


图2 电化学生物传感器及其组成元件示意图^[29] GCE: 玻碳电极; CPE: 碳糊电极; SPE: 丝网印刷电极
Figure 2 A schematic representation of electrochemical biosensor and its components^[29]. GCE: Glassy carbon electrode; CPE: Carbon paste electrode; SPE: Screen-printed electrode.

面具有良好的亲和力, 其检测限为 50 pg/mL (5 μ L 中 250 fg); 此外, 还使用 AdTS SWA 研究胶原蛋白在 CPE 上的电活性, 所制备的胶原改性 CPE, 可以检测到检测限为 100 ng/mL 的胶原蛋白^[37]。该课题组构建了一种蛋白质修饰的伏安生物电极, 用于研究胶原蛋白与脂联素之间能否形成蛋白质-蛋白质复合物并相互作用, 同时采用伏安法测量电流以确定形成该复合物的电活性部分的含量; 结果表明胶原蛋白与脂联素之间有较强的相互作用, 可用作脂联素修饰胶原蛋白血管移植物的基础^[37]。在脂联素检测方面, 该研究的实验性虽处于探索阶段, 但为脂联素传感器的进一步开发提供了新的思路。

1.2.2 基于碳纳米管修饰电极的电化学传感器

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是一种由碳制成的一维纳米材料, 其重量轻、六边形结构连接完美, 具有许多优异的物理和化学性质, 如高强度、高导电性、高导热性等。依据纳米管的分层可将碳纳米管细分为: 单壁碳纳米管(single-wall carbon nanotubes, SWCNTs)、双壁碳纳米管(double-walled carbon nanotubes, DWCNTs)、多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。已有报道表明, DWCNTs 在结构和性质上介于 SWCNTs 和 MWCNTs 之间, 因此它能够表现出一些独特的特性; 与 SWCNTs 相比, DWCNTs 的外壁可以在不改变内管机械和电子性能的情况下进行功能化, 并且在化学、机械和热处理方面, DWCNTs 相较于 MWCNTs 具有更好的稳定性^[42]。

2015 年, Ojeda 等^[38]研发了一种基于功能化 DWCNTs 修饰的丝网印刷碳电极(screen printed carbon electrode, SPCE)作为固定特异性抗体平台的电化学免疫传感器(图 3B), 用于脂联素的检测; 该研究使用功能化 DWCNTs 作为电极平台, 通过 4-羧基苯基(4-carboxyphenyl, HOOC-Phe)对

其进行功能化处理, 从而形成 4-羧基苯基-双壁碳纳米管(HOOC-Phe-DWCNTs), 以提高电极的电化学活性; 同时使用金属聚合物(metallic-complex chelating polymer, Mix&GoTM)以提高抗体的定向结合和稳定性, 这有助于提高检测的灵敏度和特异性; 对影响所研制免疫传感器性能的不同变量进行优化后, 该传感器的线性范围为 0.05–10.00 μ g/mL 之间, 检测限为 14.5 ng/mL^[38]。该传感器在选择性、灵敏度、重现性及储存稳定性等方面表现优异, 并且在检测时间方面, 该传感器固定抗体的实验过程需要 2 h, 而商业 ELISA 试剂盒则需要较长的时间, 例如: 3 h 20 min (Invitrogen)或 4 h 45 min (Abcam)^[38]。此外, 该传感器已应用于分析健康人血清样本, 成功测定出人血清中所需的脂联素水平, 验证了该传感器用于临床检测的可行性。

1.2.3 基于石墨烯修饰电极的电化学传感器

石墨烯是一种广泛应用于电化学分析的多功能纳米材料, 具有较强的电子流动性和热传导性、较高的硬度和强度等特点。然而, 这种材料也存在一些局限性, 如高疏水性、低溶解度等。尤其在传感器领域中, 最主要的障碍是石墨烯表面缺乏活性基团, 从而使生物分子难以有效固定。可以通过使用羧甲基纤维素(carboxyl methyl cellulose, CMC)制备石墨烯-聚合物杂化物来解决这一问题。CMC 因开发成本低、无毒无害, 且具有良好的生物相容性^[43], 近年来常作为生物传感器材料。

2016 年, Arenas 等^[39]通过将氧化羧甲基纤维素与氧化石墨烯层(graphene oxide, GO)共价结合, 应用硼氢化钠化学还原的方法合成了还原氧化石墨烯-羧甲基纤维素杂化物(reduced graphene oxide-carboxy methyl cellulose, CMC-rGO), 基于该材料制备的电化学免疫传感器可用于检测脂联素(adiponectin, APN); 在 CMC-rGO 杂化材料

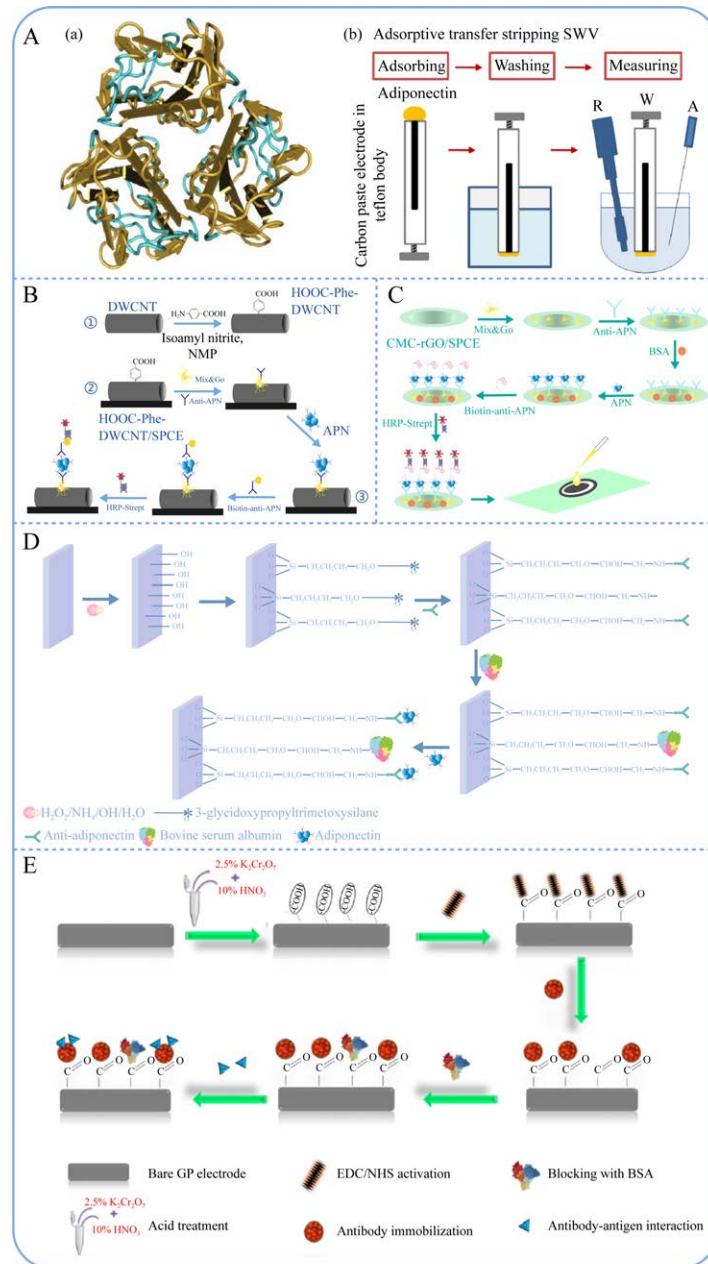


图3 脂联素电化学免疫传感器构建方法示意图^[37-41] A: Acrp30 的三维(3D)结构(a)、吸附转移溶出(AdTS)技术与碳糊电极(CPE)的联用方案(b)^[37]. B: 功能化 DWCNTs 及金属络合物螯合聚合物 Mix&GoTM 定向固定抗 APN^[38]. C: Mix&GoTM-CMC-rGO/SPCE 共价固定抗 APN^[39]. D: 基于氧化铟锡的免疫传感器的制造过程^[40]. E: 基于石墨纸的免疫传感器的固定化过程^[41]

Figure 3 Schematic diagram of adiponectin electrochemical immunosensor construction method^[37-41]. A: Three-dimensional (3D) structure of Acrp30 (a) and scheme of adsorptive transfer stripping (AdTS) technique in connection with the carbon paste electrode (CPE) (b)^[37]. B: Functionalized DWCNTs and oriented immobilization of anti-APN using metallic-complex chelating polymer Mix&GoTM^[38]. C: Mix&GoTM-CMC-rGO/SPCE covalently immobilized anti-APN^[39]. D: Manufacturing process of immune sensor based on indium tin oxide^[40]. E: Schematic of the immobilization processes of the GP-based immunosensor^[41].

的制备程序中,通过化学还原共价结合,形成了稳定的结构,这有助于保持电极的长期稳定性;同时,使用 Mix&Go™ 聚合物进行抗 APN 抗体的定向固定(图 3C),使其能够与 CMC-rGO 杂化材料中的羧基形成强的多价相互作用,以确保抗体的正确定向,从而提高了选择性^[39]。另外,该课题组采用夹心型免疫测定法,通过将生物素化的抗 APN 抗体和辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(horseradish peroxidase-streptavidin, HRP-Strept)相结合以实现信号放大,从而提高了灵敏度。并在-200 mV 的电位下使用过氧化氢/氢醌酶底物/介导系统有效催化电化学反应,以进一步提高检测信号;该传感器的线性范围为 0.5–10.0 μg/mL 之间,检测限为 61 ng/mL;该传感器具有出色的储存稳定性,并且该传感器抗体固定用时不到 2 h,而 ELISA 试剂盒的使用时间几乎为 5 h^[39]。该传感器已用于分析高胆固醇血症及糖尿病患者的人血清样本,可以成功检测出人血清中的脂联素,证明其在临床检测中的应用潜力。

1.2.4 基于氧化铟锡电极的电化学传感器

氧化铟锡(indium tin oxide, ITO)是一种透明导电氧化膜,由于 ITO 薄膜电极具有高导电性、成本低廉和宽工作区域等特点,在生物传感器领域得到广泛使用^[44]。2021 年,Ince 等^[40]将 ITO 覆盖在聚对苯二甲酸乙二醇酯(poly ethylene terephthalate, PET)片材上作为工作电极(图 3D),制备了一种用于检测脂联素的电化学免疫传感器;该课题组使用 3-缩水甘油氧基丙基三甲氧基硅烷(3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane, 3-GOPS)作为硅烷化剂,形成一个稳定的层固定抗脂联素,从而提高传感器的灵敏度;同时,通过傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和原子力显

微镜(atomic force microscope, AFM)等方法证明了抗脂联素抗体在 ITO 膜上的固定化^[40]。另外,该传感器表面使用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)进行封闭,这有助于阻止非特异吸附,从而进一步提高特异性;该传感器的线性范围为 25–2 500 pg/mL 之间,检测限为 20.19 pg/mL^[40]。该免疫传感器已成功用于分析人血清样本中的脂联素,表明其适合于临床检测。此外, PET 作为一种经济实惠的材料,有助于降低传感器的生产成本。

1.2.5 基于石墨纸电极的电化学传感器

由于石墨纸(graphite paper, GP)具有成本低廉、高导电性和具有有效的固定技术等优点,因此被广泛应用于开发免疫传感系统^[45]。2021 年,Özcan 等^[41]研发了一种基于 GP 工作电极的阻抗型免疫传感器(图 3E),用于检测脂联素,该传感器的固定化步骤包括:对 GP 电极进行清洗程序以获得敏感和透明的电极表面,然后用含有重铬酸钾(K₂Cr₂O₇)和硝酸(HNO₃)的水溶液破坏电极表面,随后使用 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, EDC]/N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)交联剂激活电极表面的羧基,抗体固定后,抗脂联素(10 ng/mL)的胺基与电极表面活化的羧基可以共价结合,而 BSA 封闭溶液(0.5%)则用于封闭不能结合胺基的活性羧基末端;结合上述固定化程序,使得该传感器获得良好的灵敏度、稳定性及准确性^[41]。该课题组采用电化学阻抗谱和循环伏安法技术对 GP 电极表面进行修饰,优化了电极表面,增强了传感器对脂联素的敏感性;同时采用单频阻抗技术研究了抗脂联素与脂联素的相互作用,这种技术能够实时监测抗体/抗原的动力学行为,从而提高检测的灵敏度;该传感器的线性范围为 0.05–25.00 pg/mL,检测限为

0.003 3 pg/mL^[41]。为了评估其在真实血清样品分析中的潜力,该传感器被用于测定 5 个不同儿童的血清样品,样品回收率与相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)结果表明,所提出的脂联素传感器具有临床应用潜力^[41]。

1.3 脂联素电化学受体传感器

脂联素的体内识别主要是由 AdipoR1 和 AdipoR2 两种受体完成,它们分别大量存在于骨骼肌和肝脏中^[46]。AdipoR1 和 AdipoR2 的分子结构相似,都含有 7 个跨膜结构域,但与 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)的拓扑结构相反,其氨基末端位于细胞内,羧基末端位于细胞外^[47-48]。脂联素主要通过与其受体(AdipoR1 和 AdipoR2)结合发挥作用。AdipoR 1 对脂联素的球状结构域具有高亲和力,同时 AdipoR 2 与脂联素的结合结构相互作用^[49]。由于受体蛋白具有较高的特异性和亲和性,在生物传感器的应用中受到了极大的关注。

2016 年, Brazaca 等^[49]研发了一种基于特异性跨膜受体(AdipoR1 和 AdipoR2)的电化学生物传感器,用于脂联素的检测;该课题组使用 3-巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, 3-MPA)和交联剂 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC]、N-羟基丁二酰亚胺将脂联素跨膜受体 AdipoR 1 和 AdipoR 2 固定在金电极表面,以确保受体与脂联素的高效结合,从而提高检测的灵敏度;同时,通过循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)和电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)技术进行检测,基于循环伏安法的脂联素生物传感器的线性范围为 0.025–0.750 $\mu\text{mol/L}$ (包括典型人血清水平), $R^2=0.992$, 检出限为 7.0 nmol/L, 重现性为 1.7%, $n=3$; 电化学阻抗谱的结果表明,电荷转移电阻($R^2=0.97$)从 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 呈线性增加到

1.000 $\mu\text{mol/L}$, 检出限为 7.0 nmol/L, 重复性为 5.6%, $n=3$ 。该传感器已用于分析糖尿病患者、对照组和肥胖患者的血清样品,得到的分析与 ELISA 的结果一致,置信水平为 95%^[49]。该课题组提供了一种受体传感器构建的通用策略,结合 3-MPA 修饰及 EDC/NHS 活化技术,有望应用于临床中监测患者脂联素。

1.4 脂联素电化学分子印迹传感器

分子印迹技术(molecular imprinting technology, MIT)受到抗体形成机制的启发,其基本原理是选用合适的模板分子(印迹分子)与功能单体通过共价或非共价作用形成复合物,并在适当交联剂的作用下发生聚合反应,然后通过萃取或经酸水解的方法将模板分子从聚合物中去除,这样便可以在聚合物中留下与模板分子完全匹配的立体孔穴。利用分子印迹技术制得的聚合物称为分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs),即“抗体模拟物”,可以很好地模拟生物受体,如蛋白质 MIPs^[50-51]。蛋白质 MIPs 作为一类人工识别受体,能够与靶蛋白分子实现强大的特异性相互作用,具有制备简单、成本低廉、选择性好、高稳定性、寿命时间长以及易于与换能器结合等优点^[52-54],因此在食品安全、临床诊断及环境分析领域得到广泛应用^[55-57]。

2020 年, Mihailescu 等^[58]研制了一种基于 MIPs 修饰金电极的仿生电化学传感器(图 4),用于脂联素(adiponectin, A)和瘦素(leptin, L)的检测。其中,为了克服模板结合后低响应信号的局限性,该课题组使用苯酚电聚合(polyphenol, PP)和东莨菪内酯电聚合(polyscopoletin, PS)用于模板形成;基于 EIS 和 CV 的特性,对传感器进行了电化学优化,确保在传感器的制备过程中形成均匀的聚合物薄膜,从而提高传感器的选择性和灵敏度;同时,在微流控平台集成这些传感器,这不仅提高了检测效率,还有助于

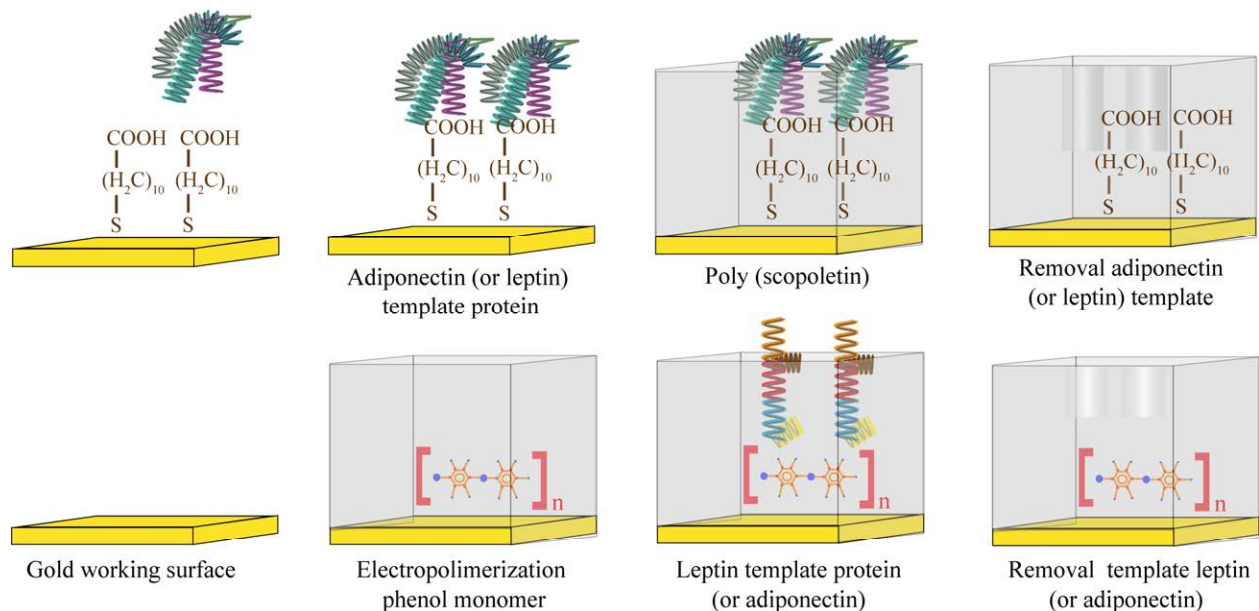


图4 在苯酚电聚合(PP)和东莨菪内酯电聚合(PS)中合成的仿生MIP传感器的反应示意图^[58]

Figure 4 Schematic representation of the reaction involved in formation of biomimetic MIP sensors formatted in polyscopoletin and polyphenol^[58].

保持传感器的稳定性；在优化条件下，该传感器的线性范围为0–50 $\mu\text{g/mL}$ (A)和1–32 ng/mL (L)，检测限为0.25 $\mu\text{g/mL}$ (A)和0.110 ng/mL (L)^[58]。该传感器已应用于分析人血清样品，成功测定出人血清中的脂联素和瘦素，并具有极高的准确性。该研究利用MIP技术和电聚合策略，提高了仿生电化学传感器的选择性，在临床检测领域具有广泛的应用前景。然而，该传感器也存在一定局限性，为了获得预期结果，传感器的制备过程需要严格控制实验条件，任何参数的微小变化(如模板表面电阻参数)都可能导致选择性和特异性的损失。

2 脂联素表面增强拉曼散射传感器

2.1 表面增强拉曼散射技术及其增强机理

表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)是一种用于检测生物分子的新

型分析技术，具有灵敏度高、选择性好、需要的样本量低、光稳定性等优点，在生物检测领域展现出良好的应用潜力^[59–61]。虽然SERS技术得到广泛应用，但由于其效应体系比较复杂，其增强机理至今仍未达成共识。目前被人们广泛接受的增强机理包括电磁场增强机理(electromagnetic mechanism, EM)和化学增强机理(chemical mechanism, CM)两种^[62–63]。EM主要以表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)效应引起的局域表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)效应为主。当入射光子照射到粗糙的金属纳米颗粒表面时，会引起金属纳米颗粒表面的自由电子发生集体振荡，从而产生表面等离子体共振，但此共振只会使金属纳米颗粒表面的局域电磁场增强，进而对分子的拉曼散射信号极大增强。CM主要包括非共振增强、共振增强、电荷转移增强3种机理，其中以电荷转移增强为主。电荷转移增强就是将探针分子与SERS基底之间的电荷转移，从

而引起分子拉曼信号的增强。目前大多数 SERS 体系都是由电磁场增强和化学增强两种机理共同作用以构成最终的增强效果,并且在 SERS 体系中,电磁场增强机理起到了主导作用^[64-65]。同时,与其他方法比较,基于 SERS 的免疫测定方法具有独特的优势^[66]:(1) 由于表面等离子体共振的光激发(和散射)的局部化和放大导致拉曼信号的大幅增强,基于 SERS 的系统可以达到高达单分子(single-molecule, SM)方案的灵敏度,这使得构建极低检测限的分析方法成为可能;(2) 由于拉曼波段很窄(几纳米),因而允许有效的光谱编码和高通量多重分析;(3) 只要适当控制激光功率, SERS 就不容易发生样品褪色和淬灭。

2.2 SERS 在脂联素检测中的应用

2017 年, Wang 等^[67]使用免疫性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ 三重核壳磁性微粒(triple core-shell microparticles, TCSMPs)和 4-巯基苯甲酸(4-mercaptobenzoic acid, 4MBA)标记的免疫银纳米粒子(argentum nanoparticles, Ag NPs)作为 SERS 探针,构建了一种基于 SERS 的夹心型免疫测定法(图 5A),用于检测脂联素和瘦素抗原;该课题组使用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ TCSMPs 作为 SERS 平台,这些微粒具有高度的 SERS 活性,能够显著增强拉曼信号,从而提高检测的灵敏度; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ TCSMPs 的合成顺序为:在聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)的存在下,通过原位水热还原硝酸银(AgNO_3)在 SiO_2 壳层表面形成 Fe_3O_4 核,随后依次包覆 SiO_2 和 Ag NPs。并且通过调整 AgNO_3 的浓度控制 Ag NPs 的覆盖密度,优化 SERS 活性,从而使得在极低的浓度下也能检测到目标分子;同时, Fe_3O_4 核心赋予 TCSMPs 优越的磁性,使得它们可以通过外加磁场更加容易地分离,从而减少了在免疫分析过程中的物理损失

和化学干扰; SiO_2 壳层的引入保护了 Fe_3O_4 核心,避免了与其他化学物质的相互作用,也提高了微粒的稳定性和分散性^[67]。另外,该研究使用 4MBA 修饰的 Ag NPs 作为 SERS 标记,这些标记具有明显的振动特性,能够在 SERS 光谱中产生特征峰,有助于提高检测的特异性;在磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)中,脂联素和瘦素的线性范围分别为 $25 \mu\text{g/mL}-25 \text{pg/mL}$ 和 $200 \mu\text{g/mL}-20 \text{pg/mL}$,检测限分别为 25pg/mL 和 20pg/mL ;该免疫测定方法已成功应用于分析肥胖患者被稀释 3 个数量级的血清样品中,并且检测到血清中的痕量脂联素(0.934ng/mL)和瘦素(2.636pg/mL)^[67]。因此,该方法具有准确测定临床肥胖和糖尿病的巨大潜力。

2022 年, Kim 等^[68]研发了一种基于各向异性金纳米三角片(gold nanotriangles, AuNTs)作为免疫 SERS 探针的生物传感器平台(图 5B),用于检测脂联素;该课题组使用各向异性的 AuNTs 作为 SERS 活性基底,利用有限元计算模拟优化 AuNTs 的电磁场增强,确保这些 AuNTs 在 785nm 激光源下的局部表面 LSPR 性能有红移,从而增强了 SERS 信号;同时,在 AuNTs 的合成和净化过程中,采用损耗诱导相互作用的方法获得高产量的单分散 AuNTs,从而提高平台的稳定性。该研究还通过自组装策略,使用硫醇基团和热图上的 ON-OFF 策略,确保 SERS 免疫分析平台的稳定性。该传感器的线性范围为 $10^{-15}-10^{-6} \text{g/mL}$ ($R^2=0.994$),检测限为 $3.0 \times 10^{-16} \text{g/mL}$;该免疫传感器已成功用于分析孕妇体液样品中的脂联素,且具有分析范围广、灵敏度高、选择性好以及飞秒级检测潜力等优点,因此有望成为诊断妊娠早期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)的临床生物传感器平台^[68]。

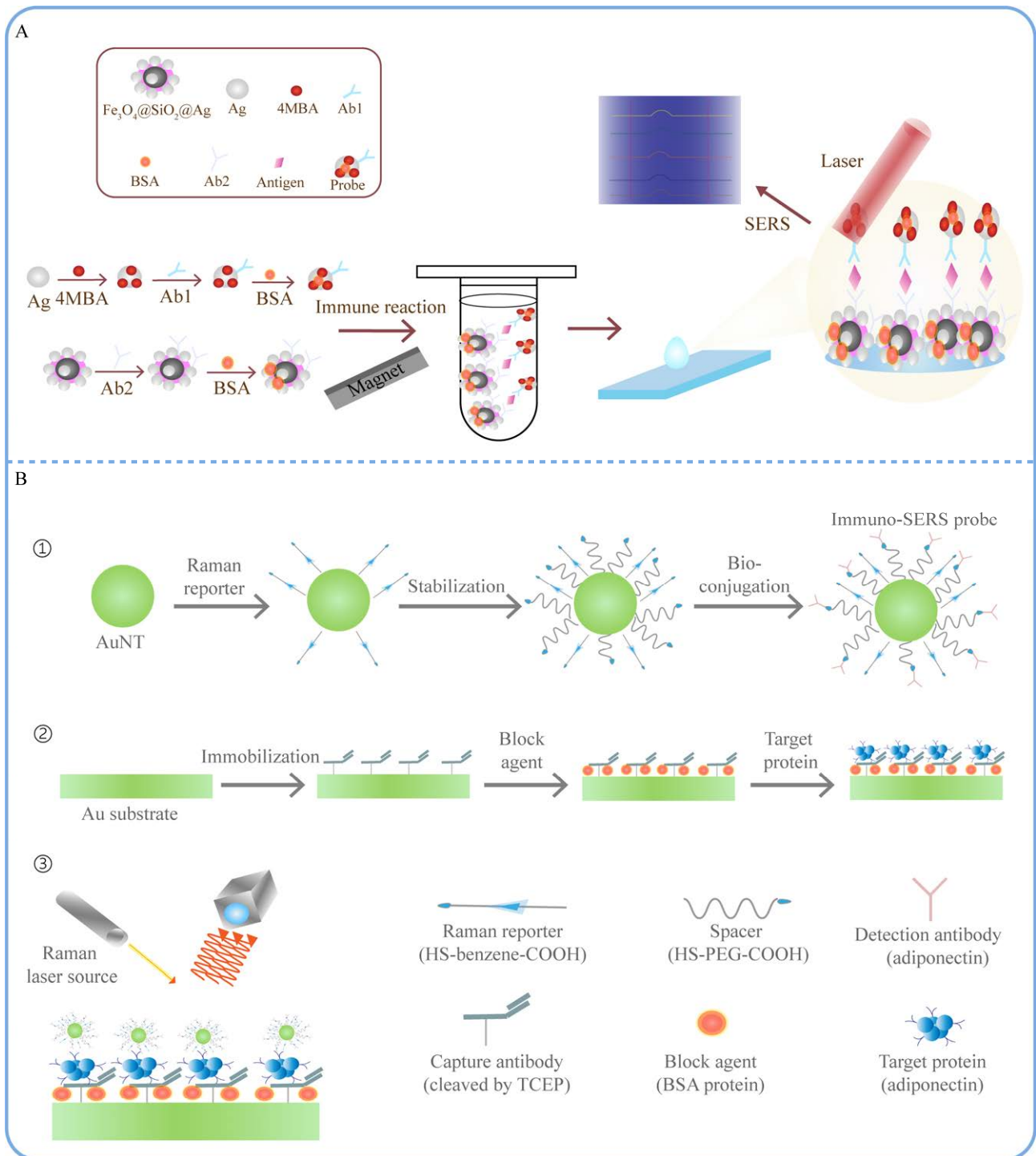


图5 脂联素 SERS 免疫测定示意图 A: 免疫 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@Ag$ TCSMPs 的制备及免疫测定^[67]. B: 基于 AuNTs 探针的用于检测脂联素的夹心 SERS 免疫测定的方案^[68]

Figure 5 Schematic diagram of adiponectin SERS immunoassay. A: Preparation of immunizing $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@Ag$ TCSMPs and schematics of the sers-based immunoassay^[67]. B: AuNTs probe based sandwich SERS immunoassay scheme for adiponectin detection^[68].

3 脂联素化学发光微流控传感器

3.1 微流控芯片的概述及化学发光分析法

微流控芯片(microfluidic chip)又称芯片实验室(lab on chip, LOC),是微全分析系统(micro total analysis system, μ TAS)发展的重要领域。 μ TAS是20世纪90年代初由瑞士Manz和Widmer等在微机电加工技术的基础上提出的一个新概念^[69],它以微机电加工技术为依托,以分析化学为基础,将微管道网络作为结构特征,将生命科学作为目前重点应用领域,同时以芯片作为操作平台,在该平台用一块几平方厘米的微小芯片以自动化的方式完备地实施分析所需的全部步骤,如样品的制备、反应、分离和检测等。微流控芯片技术因样品消耗少、分析时间短、高通量及出色的便携性等优点,日益成为一种广受关注的分析平台^[70]。

化学发光(chemiluminescence, CL)是通过化学反应引起电子从基态转化为激发态,从而产生光的一种发光现象。化学发光分析法不需要外部光源,因此具有较高的灵敏度。此外,由于它只需要极少的光学元件,因此使得仪器的成本降低,更易微型化、集成化,与芯片集成在一起,可以很简单地在微流控芯片的顶部或底部安装^[71]。CL与微流控技术相结合,在一定程度上降低了样品基质效应对检测结果的影响,在痕量分析物的检测中显示出较高的灵敏度和选择性^[72],因此其被广泛应用于检测微生物、酶和蛋白质等^[73-76]。

3.2 微流控芯片在脂联素检测中的应用

2023年, Li等^[77]研制了一种基于微流控芯片的低成本便携式化学发光仪作为测定脂联素的即时检测(point of care testing, POCT)装置(图6),用于糖尿病的早期风险评估;其中离心微流控芯片由聚碳酸酯(polycarbonate, PC)制

成,具有40个平行检测微通道,因此免疫分析在该微芯片上进行;设备的半自动离心辅助洗涤过程简化了操作步骤,减少了人为操作误差,提高了测试的重复性和稳定性;同时通过专门设计的便携式化学发光仪记录化学发光信号,然后使用光电倍增管高效地将光学转换为电信号,使得电信号能够显著放大,从而提高检测的灵敏度;整套设备的成本不到600美元,重量仅为0.5 kg,适合POCT使用;该仪器的线性范围为1.1-70.5 ng/mL,检测限为2.7 ng/mL;该方法已成功应用于分析人血清样品中的脂联素,且具有成本低廉、操作简单、特异性好、灵敏度高等优点^[77]。另外,该研究设计了“花瓣”形状的微流控芯片,通过对称排列的微通道和中央的检测区域,减少了不同样本之间的交叉污染,从而提高了选择性^[77]。

4 结论与展望

脂联素作为一种生物标志物,在糖尿病、高血压以及心脑血管等疾病中起着至关重要的作用。因此,开发具有灵敏度高、分析迅速及操作简便的脂联素检测平台,对于早期临床诊断和疾病预防具有重要的参考价值 and 现实意义。生物传感器因其分析速度快、特异性好、费用成本低、灵敏度及准确性高等优势,在临床分析中愈发受到重视。

本文综述了已经研发的多种用于检测脂联素的生物传感器(表1),这些传感器应用的工作原理各不相同。目前研究较多的一类为电化学传感器,为了获得较宽的检测范围及较低检测限,正确选择固定技术和材料是必不可少的。特别是随着科技的进步和应用领域的拓展,对于高选择性、经济实惠和可重复性的分析设备的需求正在快速上涨,纳米材料的重要性正在逐步增

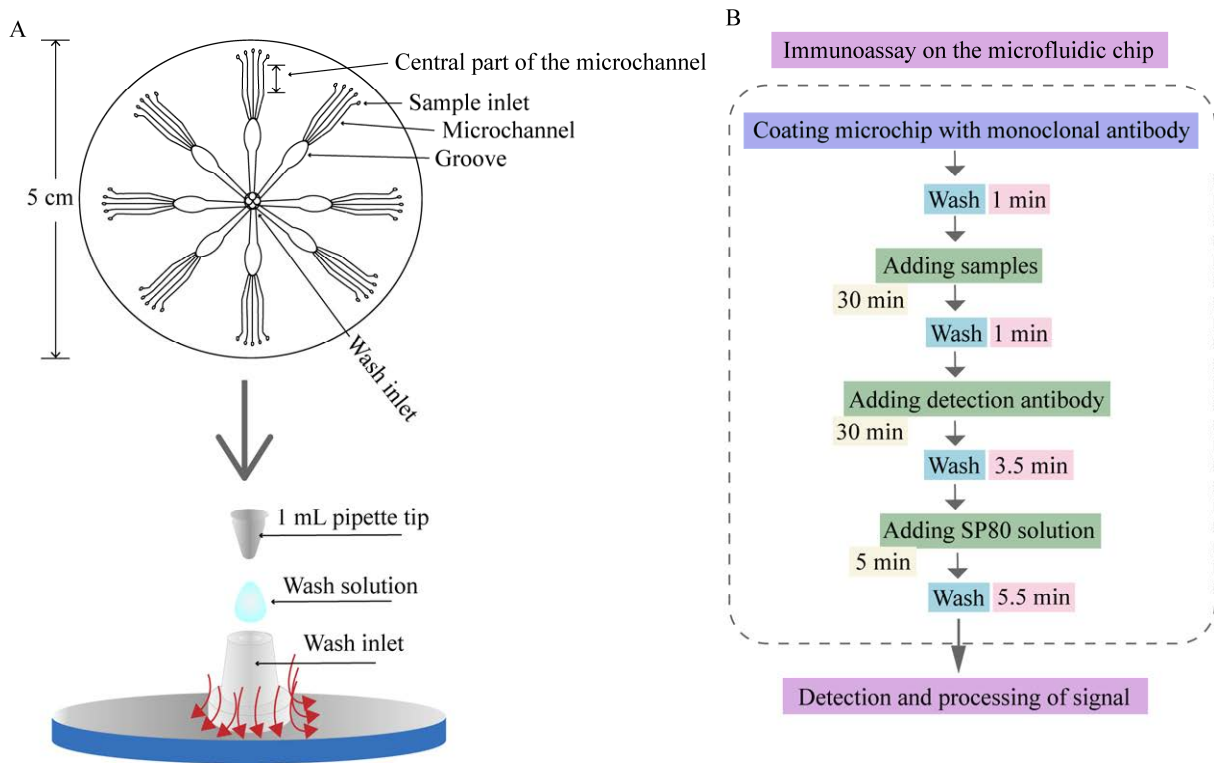


图 6 用于检测脂联素的便携式微流控化学发光传感器 A: 微芯片洗清程序示意图. B: 基于免疫分析的工作流程图示意图^[77]

Figure 6 Portable microfluidic chemiluminescence sensor for the detection of adiponectin. A: Schematic diagram of the microchip cleaning procedure. B: Workflow diagram based on immunoassay^[77].

表 1 比较各类用于脂联素检测的传感器

Table 1 Compare various sensors for adiponectin detection

Electrode/Probe	Immobilization method	Measurement method	Linear range (pg/mL)	Limit of detection (pg/mL)	Real sample	Reference
CPE electrode	Collagen modification	SWA	—	50	—	[37]
SPCE electrode	HOOC-Phe-DWCNTs	CV	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$	1.45×10^4	Serum	[38]
SPCE electrode	CMC-rGO	EIS	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$	6.1×10^4	Serum	[39]
ITO-PET electrode	3-GOPS	EIS	25–2 500	20.19	Serum	[40]
GP electrode	$K_2Cr_2O_7$ and HNO_3	EIS, CV	0.05–25	0.003 3	Serum	[41]
Au electrode	3-MPA	EIS, CV	$7.5 \times 10^5 - 2.25 \times 10^7$	2.1×10^5	Serum	[49]
Au electrode	GWEs/PS/MIPA and GWEs/PP/MIPL	EIS, CV	$0 - 5.0 \times 10^7$	2.5×10^5	Serum	[58]
Immune Ag probes	Ag NPs/ $Fe_3O_4@SiO_2@Ag$ TCSMPs	SERS	$25 - 2.5 \times 10^7$	25	Serum	[67]
Immune Au probes	AuNTs	SERS	$0.001 - 1 \times 10^6$	0.000 3	Body fluid	[68]
Microfluidic chip	Immunoassay	CL	$1.1 \times 10^3 - 7.05 \times 10^4$	2 700	Serum	[77]

ITO-PET: Indium tin oxide-poly ethylene terephthalate; GWEs/PS/MIPA: Gold working electrodes/polyscopoletin/molecularly imprinted polymer (adiponectin); GWEs/PP/MIPL: Gold working electrodes/polyphenol/molecularly imprinted polymer (leptin); —: Not available.

长。纳米及纳米复合材料具有优异的电化学性能,可以使脂联素的测定结果得到极大改善。此外,金属聚合物 Mix&Go™ 能够高效地与蛋白质结合,提高抗体的定向结合和稳定性,从而可以很好地增强传感器检测的灵敏度。此外,MIP 技术与受体蛋白在传感器中的应用,也为脂联素传感器的进一步研究拓宽了思路。除了电化学传感器外,SERS 和微流控芯片技术也被应用于免疫分析领域。近年来基于 SERS 免疫分析法的研究进展,固体底物辅助夹心结构已经普遍应用于蛋白质的检测。表面增强拉曼散射传感器具有较多优势:其一,它可以通过选择合适的增强基底和适当的表面修饰,实现对不同分子的高选择性检测;其二,它具有高灵敏度,可以检测到非常低浓度的分子。然而,目前用于脂联素检测的 SERS 传感器也存在一定局限性。其中最重要的问题在于 SERS 技术本身相对复杂,可能需要专业的操作和设备,这限制了其在资源有限的环境中的应用,同时复杂的制备过程可能会增加成本,从而限制了该技术的大规模应用。与 SERS 技术相比,化学发光法不受干扰物质的影响,具有更高的分析准确性。微流控芯片技术在脂联素检测中最显著的优势在于可用于社区卫生站和其他医疗资源有限的环境中,即使是非专业人员也可简易操作,且与化学发光法相结合,大大提高了检测的灵敏度。

虽然这些传感器具有一定优点,但该领域仍然存在一些问题需要完善。首先,目前研究的大多数脂联素传感器尚不能满足实际临床需求,研究仍然停留在实验室阶段。尽管这些传感器在实验中表现出良好的特异性和稳定性,但在实际应用中仍然面临诸多障碍。一方面,温度是部分传感器面临的重要难题,无论是已制备的传感器,还是待检测的目标分析蛋白,

全程都需要低温或冷藏以维持其储存稳定性或蛋白活性。虽然 Mihalescu 课题组^[58]报道的电化学分子印迹传感器可在室温下储存 3-6 个月,但仍需要严格放入含有硅胶的真空袋中保存。另一方面,部分传感器对于真实临床样本的检测数量有限,可能会增加检测过程中的误差和变异性,从而降低传感器的准确性和可靠性。因此,在开发脂联素传感器时应增加临床数据以扩大传感器的应用。其次,部分传感器在即时检测和脂联素样本的实时检测方面存在一定的局限性。因此,可以开发便携式传感设备以进一步探索其潜在应用。如 Li 课题组^[77]通过化学发光法与微流控芯片相结合的策略,提供了一种简单便携的即时检测传感平台。受此启发,未来可以通过多种分析方法(如比色法和光电化学)和相关检测技术(如试纸、可穿戴和手持设备)相结合的策略探索和开发更多可用于脂联素检测的便携式传感器,以实现即时检测和实时在线分析。

总之,脂联素传感器具有高灵敏度、高选择性、快速响应、便携式以及低成本等优势,这使得它在临床医学、健康管理和研究领域中具有潜在的广泛应用价值。随着脂联素传感器研究的不断深入,相信上述问题都会得到改善和解决,未来脂联素传感器也有望从实验室研究转向临床诊断、预防评估等实际领域的应用。

REFERENCES

- [1] ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ. The metabolic syndrome[J]. *Lancet*, 2005, 365(9468): 1415-1428.
- [2] LEI XT, QIU S, YANG GY, WU QN. Adiponectin and metabolic cardiovascular diseases: therapeutic opportunities and challenges[J]. *Genes & Diseases*, 2022, 10(4): 1525-1536.
- [3] CHOUBEY M, BORA P. Emerging role of adiponectin/AdipoRs signaling in choroidal neovascularization, age-related macular degeneration,

- and diabetic retinopathy[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 982.
- [4] LIM JY, TEMPLETON SP. Regulation of lung inflammation by adiponectin[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1244586.
- [5] SCHERER PE, WILLIAMS S, FOGLIANO M, BALDINI G, LODISH HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [6] HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(18): 10697-10703.
- [7] MAEDA K, OKUBO K, SHIMOMURA I, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, MATSUBARA K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose most abundant gene transcript 1)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 221(2): 286-289.
- [8] NAKANO Y, TOBE T, CHOI-MIURA NH, MAZDA T, TOMITA M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1996, 120(4): 803-812.
- [9] ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N, TAKAHASHI M, MAEDA K, MIYAGAWA J, HOTTA K, SHIMOMURA I, NAKAMURA T, MIYAOKA K, KURIYAMA H, NISHIDA M, YAMASHITA S, OKUBO K, MATSUBARA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 257(1): 79-83.
- [10] LINDBERG S, JENSEN JS, BJERRE M, FRYSTYK J, FLYVBJERG A, JEPPESEN J, MOGELVANG R. Low adiponectin levels at baseline and decreasing adiponectin levels over 10 years of follow-up predict risk of the metabolic syndrome[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2017, 43(2): 134-139.
- [11] GHADGE AA, KHAIRE AA, KUVALEKAR AA. Adiponectin: a potential therapeutic target for metabolic syndrome[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018, 39: 151-158.
- [12] EBINUMA H, MIYAZAKI O, YAGO H, HARA K, YAMAUCHI T, KADOWAKI T. A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 372(1/2): 47-53.
- [13] TANITA T, MIYAKOSHI H, NAKANO Y. Performance of ELISA for specific measurement of high-molecular-weight (HMW) adiponectin[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 333(1/2): 139-146.
- [14] 李登清, 陈琳磊, 何笑恬, 卫玲, 曹琳, 曹洁, 徐晓晶, 袁洪, 金维荣. 人血清脂联素定量 ELISA 检测方法的建立及初步临床应用[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(7): 850-853.
- LI DQ, CHEN LL, HE XT, WEI L, CAO L, CAO J, XU XJ, YUAN H, JIN WR. Development of quantitative ELISA for determination of serum adiponectin and its clinical application[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2009, 30(7): 850-853 (in Chinese).
- [15] NISHIMURA A, SAWAI T. Determination of adiponectin in serum using a latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay with an automated analyzer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 371(1/2): 163-168.
- [16] POZAIC P, DUKIC L, SIMUNDIC AM. The effect of hemolysis, icterus and lipemia on Randox immunoturbidimetric adiponectin assay[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 450: 64-66.
- [17] 广东优尼德生物科技有限公司. 一种检测脂联素的胶体金试纸条及其定量检测方法: CN201810141218.7[P]. 2018-06-15.
- Guangdong Unied Biotechnology Co., LTD. Colloidal gold test strip for detecting adiponectin and quantitative detection method thereof: CN201810141218.7[P]. 2018-06-15 (in Chinese).
- [18] FANG YX, WANG SJ, LIU YY, XU ZF, ZHANG K, GUO Y. Development of Cu nanoflowers modified the flexible needle-type microelectrode and its application in continuous monitoring glucose *in vivo*[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 110: 44-51.
- [19] CHANG HE, HUO MZ, ZHANG QX, ZHOU MM, ZHANG YL, SI YX, ZHANG D, GUO Y, FANG YX. Flexible needle-type microbiosensor for real-time monitoring traditional acupuncture-mediated adenosine release *in vivo*[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2023, 235: 115383.
- [20] ZHANG D, MA JJ, MENG XW, XU ZF, ZHANG J, FANG YX, GUO Y. Electrochemical aptamer-based microsensor for real-time monitoring of adenosine *in vivo*[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1076: 55-63.
- [21] ALISSA M, HJAZI A. Utilising biosensor-based approaches for identifying neurotropic viruses[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2024, 34(1): e2513.
- [22] SEZGINTÜRK MK. Commercial Biosensors and Their Applications: Clinical, Food, and Beyond[M].

- Amsterdam: Elsevier, 2020: 1-28.
- [23] LEE G, LEE J, KIM J, CHOI HS, KIM J, LEE S, LEE H. Single microfluidic electrochemical sensor system for simultaneous multi-pulmonary hypertension biomarker analyses[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7545.
- [24] DELL'OLIO F, CONTEDECA D, DE PALO M, CIMINELLI C. Design of a new ultracompact resonant plasmonic multi-analyte label-free biosensing platform[J]. *Sensors*, 2017, 17(8): 1810.
- [25] ZHANG ZG, ZHOU J, DU X. Electrochemical biosensors for detection of foodborne pathogens[J]. *Micromachines*, 2019, 10(4): 222.
- [26] SWEETY, KUMAR D. Electrochemical immunosensor based on titanium dioxide grafted MXene for EpCAM antigen detection[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 652(Pt A): 549-556.
- [27] GRIESHABER D, MACKENZIE R, VÖRÖS J, REIMHULT E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures[J]. *Sensors*, 2008, 8(3): 1400-1458.
- [28] RAMYA M, SENTHIL KUMAR P, RANGASAMY G, UMA SHANKAR V, RAJESH G, NIRMALA K, SARAVANAN A, KRISHNAPANDI A. A recent advancement on the applications of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors[J]. *Chemosphere*, 2022, 308(Pt 2): 136416.
- [29] PAVLA M. Main streams in the construction of biosensors and their applications[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2017, 12(8): 7386-7403.
- [30] POLICE PATIL AV, CHUANG YS, LI CZ, WU CC. Recent advances in electrochemical immunosensors with nanomaterial assistance for signal amplification[J]. *Biosensors*, 2023, 13(1): 125.
- [31] HU YZ, LIN J, PENG LJ, WANG Y, WU SH, JI XM, LV H, WU J, ZHANG Y, WANG S. Nanobody-based electrochemical immunoassay for sensitive detection of peanut allergen Ara h 1[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(19): 7535-7545.
- [32] LEE S, GONZALEZ-SUAREZ AM, HUANG XH, CALVO-LOZANO O, SUVAKOV S, LECHUGA LM, GAROVIC VD, STYBAYEVA G, REVZIN A. Using electrochemical immunoassay in a novel microtiter plate to detect surface markers of preeclampsia on urinary extracellular vesicles[J]. *ACS Sensors*, 2023, 8(1): 207-217.
- [33] ZHANG JH, LIU MJ, ZHOU F, YAN HL, ZHOU YG. Homogeneous electrochemical immunoassay using an aggregation-collision strategy for alpha-fetoprotein detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(5): 3045-3053.
- [34] KUNPATEE K, KHANTASUP K, KOMOLPIS K, YAKOH A, NUANUALSUWAN S, SAIN MM, CHAIYO S. Ratiometric electrochemical lateral flow immunoassay for the detection of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2023, 242: 115742.
- [35] MIJAJLOVIĆ A, OGNJANOVIĆ M, MANOJLOVIĆ D, VLAHOVIĆ F, ĐURĐIĆ S, STANKOVIĆ V, STANKOVIĆ D. $\text{Eu}_2\text{O}_3@ \text{Cr}_2\text{O}_3$ nanoparticles-modified carbon paste electrode for efficient electrochemical sensing of neurotransmitters precursor L-DOPA[J]. *Biosensors*, 2023, 13(2): 201.
- [36] PAVLINA S, MARKETAR, DALIBOR H, JAROMIR H, IVO P, VOJTECH A, RENE K. Voltammetry of adiponectin and its interactions with collagen on a carbon paste electrode at femtogram level[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, 7(1): 1-12.
- [37] SHANBHAG MAHESH M, MANASA G, MASCARENHAS RONALD J, MONDAL K, SHETTI NAGARAJ P. Fundamentals of bio-electrochemical sensing[J]. *Chemical Engineering Journal Advances*, 2023, 16: 100516.
- [38] OJEDA I, BARREJÓN M, ARELLANO LM, GONZÁLEZ-CORTÉS A, YÁÑEZ-SEDEÑO P, LANGA F, PINGARRÓN JM. Grafted-double walled carbon nanotubes as electrochemical platforms for immobilization of antibodies using a metallic-complex chelating polymer: application to the determination of adiponectin cytokine in serum[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 74: 24-29.
- [39] ARENAS CB, SÁNCHEZ-TIRADO E, OJEDA I, GÓMEZ-SUÁREZ CA, GONZÁLEZ-CORTÉS A, VILLALONGA R, YÁÑEZ-SEDEÑO P, PINGARRÓN JM. An electrochemical immunosensor for adiponectin using reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose hybrid as electrode scaffold[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 223: 89-94.
- [40] İNCE B, SEZGINTÜRK MK. A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples[J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2021, 328: 129051.
- [41] ÖZCAN B, SEZGINTÜRK MK. Highly sensitive and single-use biosensing system based on a GP electrode for analysis of adiponectin, an obesity biomarker[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2021, 7(8): 3658-3668.
- [42] DUOC PND, BINH NH, HAU TV, THANH CT, TRINH PV, TUYEN NV, QUYNH NV, TU NV, DUC CHINH V, THI THU V, THANG PD, MINH PN,

- CHUC NV. A novel electrochemical sensor based on double-walled carbon nanotubes and graphene hybrid thin film for arsenic (V) detection[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 400: 123185.
- [43] LI MC, MEI CT, XU XW, LEE SY, WU QL. Cationic surface modification of cellulose nanocrystals: toward tailoring dispersion and interface in carboxymethyl cellulose films[J]. *Polymer*, 2016, 107: 200-210.
- [44] KHAN MZH. Effect of ITO surface properties on SAM modification: a review toward biosensor application[J]. *Cogent Engineering*, 2016, 3(1): 1170097.
- [45] DEMIRBAKAN B, SEZGINTÜRK MK. An electrochemical immunosensor based on graphite paper electrodes for the sensitive detection of creatine kinase in actual samples[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022, 921: 116656.
- [46] PENG J, CHEN Q, WU CC. The role of adiponectin in cardiovascular disease[J]. *Cardiovascular Pathology*, 2023, 64: 107514.
- [47] YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, TSUCHIDA A, YOKOMIZO T, KITA S, SUGIYAMA T, MIYAGISHI M, HARA K, TSUNODA M, MURAKAMI K, OHTEKI T, UCHIDA S, TAKEKAWA S, WAKI H, TSUNO NH, SHIBATA Y, TERAUCHI Y, FROGUEL P, TOBE K, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects[J]. *Nature*, 2003, 423: 762-769.
- [48] YAMAUCHI T, IWABU M, OKADA-IWABU M, KADOWAKI T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 28(1): 15-23.
- [49] BRAZACA LC, JANEGITZ BC, CANCINO-BERNARDI J, ZUCOLOTTI V. Transmembrane protein-based electrochemical biosensor for adiponectin hormone quantification[J]. *ChemElectroChem*, 2016, 3(6): 1006-1011.
- [50] REBELO TSCR, PEREIRA CM, SALES MGF, NORONHA JP, SILVA F. Protein imprinted material electrochemical sensor for determination of Annexin A3 in biological samples[J]. *Electrochimica Acta*, 2016, 190: 887-893.
- [51] YANG X, YIN ZZ, ZHENG GJ, ZHOU M, ZHANG HY, LI JY, CAI WR, KONG Y. Molecularly imprinted miniature electrochemical biosensor for SARS-CoV-2 spike protein based on Au nanoparticles and reduced graphene oxide modified acupuncture needle[J]. *Bioelectrochemistry*, 2023, 151: 108375.
- [52] DABROWSKI M, LACH P, CIEPLAK M, KUTNER W. Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 102: 17-26.
- [53] CHEN LX, XU SF, LI JH. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(5): 2922-2942.
- [54] CUI M, SUN XF, LIU R, DU MG, SONG XM, WANG S, HU W, LUO XL. A dual-responsive electrochemical biosensor based on artificial protein imprinted polymers and natural hyaluronic acid for sensitive recognition towards biomarker CD44[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 371: 132554.
- [55] AYERDURAI V, CIEPLAK M, KUTNER W. Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for food contaminants determination[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 158: 116830.
- [56] MUGO SM, ROBERTSON SV, LU WH. A molecularly imprinted electrochemical microneedle sensor for multiplexed metabolites detection in human sweat[J]. *Talanta*, 2023, 259: 124531.
- [57] RAHMAN S, BOZAL-PALABIYIK B, UNAL DN, ERKMEN C, SIDDIQ M, SHAH A, USLU B. Molecularly imprinted polymers (MIPs) combined with nanomaterials as electrochemical sensing applications for environmental pollutants[J]. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2022, 36: e00176.
- [58] MIHAILESCU CM, STAN D, SAVIN M, MOLDOVAN CA, DINULESCU S, RADULESCU CH, FIRTAT B, MUSCALU G, BRASOVEANU C, ION M, DRAGOMIR D, STAN D, ION AC. Platform with biomimetic electrochemical sensors for adiponectin and leptin detection in human serum[J]. *Talanta*, 2020, 210: 120643.
- [59] LIU YQ, ZHU W, HU JM, SHEN AG. Recent advances in plasmonic Prussian blue-based SERS nanotags for biological application[J]. *Nanoscale Advances*, 2021, 3(23): 6568-6579.
- [60] HAM J, YUN BJ, KOH WG. SERS-based biosensing platform using shape-coded hydrogel microparticles incorporating silver nanoparticles[J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2021, 341: 129989.
- [61] REZA KK, SINA AAI, WUETHRICH A, GREWAL YS, HOWARD CB, KORBIE D, TRAU M. A SERS microfluidic platform for targeting multiple soluble immune checkpoints[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 126: 178-186.
- [62] DING SY, YOU EM, TIAN ZQ, MOSKOVITS M. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(13): 4042-4076.
- [63] ALESSANDRI I, LOMBARDI JR. Enhanced Raman scattering with dielectrics[J]. *Chemical Reviews*, 2016,

- 116(24): 14921-14981.
- [64] 温桂清, 梁爱惠, 蒋治良. 纳米催化-表面增强拉曼散射光谱检测环境污染物进展[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2022, 40(5): 199-215.
WEN GQ, LIANG AH, JIANG ZL. Progress of nanocatalysis surface-enhanced Raman scattering spectroscopy in the analysis of environmental pollutants[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2022, 40(5): 199-215 (in Chinese).
- [65] 丁松园, 吴德印, 杨志林, 任斌, 徐昕, 田中群. 表面增强拉曼散射增强机理的部分研究进展[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(12): 2569-2581.
DING SY, WU DY, YANG ZL, REN B, XU X, TIAN ZQ. Some progresses in mechanistic studies on surface-enhanced Raman scattering[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2008, 29(12): 2569-2581 (in Chinese).
- [66] TUCKMANTEL BIDO A, BROLO AG. Digital SERS protocol using Au nanoparticle-based extrinsic Raman labels for the determination of SARS-CoV-2 spike protein in saliva samples[J]. ACS Applied Nano Materials, 2023, 6(17): 15426-15436.
- [67] WANG XL, WANG M, JIANG T, WANG FY, QING YP, BU SZ, ZHOU J. Dual-functional Fe₃O₄@SiO₂@Ag triple core-shell microparticles as an effective SERS platform for adipokines detection[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 535: 24-33.
- [68] KIM W, BANG A, KIM S, LEE GJ, KIM YH, CHOI S. Adiponectin-targeted SERS immunoassay biosensing platform for early detection of gestational diabetes mellitus[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 213: 114488.
- [69] MANZ A, GRABER N, WIDMER HM. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1990, 1(1/2/3/4/5/6): 244-248.
- [70] LIN XX, CHEN QS, LIU W, LI HF, LIN JM. A portable microchip for ultrasensitive and high-throughput assay of thrombin by rolling circle amplification and hemin/G-quadruplex system[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 56: 71-76.
- [71] DELGADO SMT, KINAHAN DJ, SANDOVAL FS, JULIUS LAN, KILCAWLEY NA, DUCRÉE J, MAGER D. Fully automated chemiluminescence detection using an electrified-lab-on-a-Disc (eLoaD) platform[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(20): 4002-4011.
- [72] WANG XR, XIE YS, LIN L. Recent development of microfluidic biosensors for the analysis of antibiotic residues[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 157: 116797.
- [73] SUN DL, FAN TT, LIU F, WANG FX, GAO D, LIN JM. A microfluidic chemiluminescence biosensor based on multiple signal amplification for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157:H7[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 212: 114390.
- [74] WU WS, NGUYEN BTT, LIU PY, CAI GZ, FENG SL, SHI YZ, ZHANG BR, HONG YZ, YU RZ, ZHOU XH, LIU AQ, ZHANG Y, YAP EPH, CHIN LK. Single *Escherichia coli* bacteria detection using a chemiluminescence digital microwell array chip[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 215: 114594.
- [75] KUMAR PS, MADAPUSI S, GOEL S. 3D printed microfluidic chemiluminescence PoC device with self-powering and integrated incubating system: validation via ALP detection on disposable μ PADs[J]. Microchemical Journal, 2023, 189: 108518.
- [76] LI F, GUO L, HU YT, LI ZM, LIU JC, HE JB, CUI H. Multiplexed chemiluminescence determination of three acute myocardial infarction biomarkers based on microfluidic paper-based immunodevice dual amplified by multifunctionalized gold nanoparticles[J]. Talanta, 2020, 207: 120346.
- [77] LI FY, WANG W, LI HL, YANG M, WU J, ZHANG L, GAO JY, PU QS. A low-cost portable microfluidic chemiluminometer for point-of-care testing of adiponectin for early risk assessment of diabetes[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 380: 133384.

(本文责编 郝丽芳)