

基于微流控热泳的生物传感技术^{*}

刘超^a 田飞^a 邓瑾琦^a 孙佳姝^{*,a,b}

(^a 国家纳米科学中心 北京市纳米生物医学检测工程技术研究中心 北京 100190)

(^b 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 复杂生命体系中关键分子及微纳生物粒子的高灵敏、高特异检测,对理解多层次多尺度生物学过程、阐明疾病发生发展机制和探索新型生物标志物等具有重要意义。微流控生物传感器整合了微流控技术和生物传感技术的诸多优势,在微量生物样本精准测量方面取得了显著进展。近年来,微流控热泳生物传感技术(Thermomicrofluidic biosensing)利用物质在局域温度梯度场中的热泳定向迁移现象,并结合均相生物传感及信号放大新策略,实现了复杂样本中生物分子及微纳生物粒子的快速、高灵敏、原位检测。重点阐述了以热泳为核心的微流控传感技术,包括微量热泳、热泳-对流耦合、热泳-扩散泳耦合以及热泳-电泳耦合等方法,总结了不同传感方法的原理、特点及其在生物分子(蛋白、核酸等)与微纳生物粒子(细胞外囊泡、病毒、细胞等)检测中的应用,并探讨了微流控热泳技术在生物医学检测领域中面临的挑战与未来发展方向。

关键词 热泳; 微流控; 多物理场耦合; 生物传感

Thermomicrofluidic Biosensing Systems^{*}

Liu, Chao^a Tian, Fei^a Deng, Jinqi^a Sun, Jiashu^{*,a,b}

(^a Beijing Engineering Research Center for BioNanotechnology, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190)

(^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract The sensitive and specific detection of key molecules and biological micro/nanoparticles in complex biological systems is of great significance for understanding biological processes at multiple levels and scales, uncovering the mechanisms of disease onset and development, and exploring novel biomarkers. Microfluidic biosensors with advantages of microfluidics and biosensing have made significant progress in the precise detection of biological samples with small volumes. Recent years, thermomicrofluidic biosensing that combines thermophoretic migration in a temperature gradient and homogeneous signal amplification strategies has realized rapid, sensitive, *in situ* detection of biomolecules and biological micro/nanoparticles in complex biological systems. Different thermomicrofluidic biosensing strategies, including microscale thermophoresis (MST), thermophoresis-convection coupling, thermophoresis-diffusiophoresis coupling, and thermophoresis-electrophoresis coupling were presented. The fundamentals, features, and applications of these strategies in detecting biomolecules (protein, nucleic acids, *etc.*) and biological micro/nanoparticles (extracellular vesicles, viral particles, cells, *etc.*) were summarized. The challenge and future directions for the application of thermomicrofluidic sensing in biomedical detection were discussed.

Keywords thermophoresis; microfluidic; multi-physics coupling; biosensing

1 引言

复杂生命体系中存在多种生物分子(蛋白、核酸等)与微纳生物粒子(细胞、细胞外囊泡及病毒等),它们携带丰富的生物信息并参与生命活动过程^[1-5]。关键生物分子与微纳粒子的高灵敏检测,对阐明重大疾病(癌症、

神经退行性疾病和自体免疫性疾病等)发生发展机制以及探索无创、快速、精准疾病诊断方法等具有重要意义^[6-11]。生物样本中组分复杂,异质性强,而对于低丰度靶标的精准测量,通常需要使用大量样本、复杂前处理过程及昂贵检测方法等^[12-13],因此,亟需发展快速、高灵敏、高特异的生物传感技术,满足复杂样本中关键

^{*} Dedicated to the 10th anniversary of the Youth Innovation Promotion Association, CAS.

^{*} E-mail: sunjs@nanoctr.cn; Tel.: 010-82545621; Fax: 010-82545621

Received December 31, 2021; published February 23, 2022.

Project supported by the National Key R&D Program of China (Nos. 2020YFA0210800, 2021YFA0909400), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22025402, 91959101, 21904028, 22104026, 22174030) and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA16021200).

^{*} 庆祝中国科学院青年创新促进会十年华诞。

项目受国家重点研发计划(Nos. 2020YFA0210800, 2021YFA0909400)、国家自然科学基金(Nos. 22025402, 91959101, 21904028, 22104026, 22174030)及中国科学院战略性先导科技专项(No. XDA16021200)资助。

靶标检测的需求。

近年来,随着微流控技术和生物传感器件的快速发展^[14-15],整合两种方法诸多优势的微流控热泳生物传感系统(Thermomicrofluidic Biosensing Systems)在微量生物样本的快速、均相、精准检测方面取得了显著进展^[16-19]。微流控热泳技术(Thermomicrofluidics)通过激光局部加热等方式在微尺度空间产生温度梯度场,利用生物分子或微纳粒子的热泳定向迁移,实现核酸、蛋白、细胞外囊泡、病毒和细胞等的高精度操控与富集。由于微流控热泳器件特征尺度小,可以在较低的激光功率及温度变化下产生显著的温度梯度,有效降低生物分子和粒子的热损伤以及对传感分析的影响^[16](表 1)。传统的生物传感依赖固液界面上探针与靶标的识别,识别效率受限于物质的扩散,并且需要多步清洗、封闭等操作降低界面上的非特异性吸附^[20]。基于均相生物传感的微流控热泳技术可以有效克服以上瓶颈,以热泳为核心的多场耦合生物传感方法,包括微量热泳、热泳-对流耦合、热泳-扩散泳耦合以及热泳-电泳耦合等,已被应用于蛋白、核酸、细胞外囊泡及病毒等生物标志物的快速、高灵敏、高特异检测,为重大疾病的精准诊断提供了新工具(图 1)。

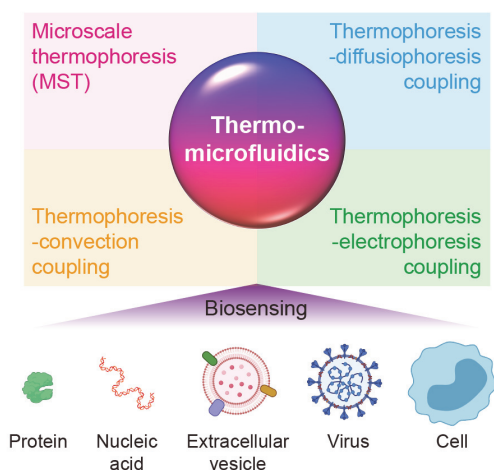


图 1 基于微流控热泳的生物传感

Figure 1 Thermomicrofluidics for biosensing
Figure partially created using BioRender

表 1 微流控热泳温度梯度产生方法

Table 1 Methods of generating temperature gradient in thermomicrofluidic biosensing systems

加热方式	激光波长/nm	功率密度/(mW·μm ⁻²)	温度梯度/(K·μm ⁻¹)	检测温度/°C	应用	文献
水体加热	1480	—	≈0.1	<35	生物分子、EV 蛋白检测	[37-41]
水体加热	1480	≈0.01	0.3~1	28~42	EV 蛋白/核酸、病毒抗原检测	[50, 53-54, 56-57, 63]
Cr 基底加热	1064	—	≈0.1	33	DNA 检测	[64]
Cr 基底加热	808	≈0.01	≈1.8	≈30	淀粉样纤维生长动力学研究	[44]
Au 基底加热	532	<0.1	≈0.6	25	原位 SERS	[69]
Au 基底加热	532	≈0.02	5~30	33	单颗粒操控与暗场光学表征	[70]
Au 基底加热	532	0.06	3.5~8.5	27	单细胞操控	[71]

2 微量热泳技术(MST)

2.1 原理

微量热泳技术(Microscale Thermophoresis, MST)通过检测物质在微观温度梯度场中的热泳运动及荧光强度变化,实现靶标的定量检测(图 2)^[21-23]。热泳迁移速率定义为 $\mu = -D_T \nabla T$, 其中 D_T 为热泳迁移系数, ∇T 为温度梯度。考虑热泳造成浓度 c 不均匀分布时,颗粒质量流量 J 由热泳定向迁移与 Brownian 扩散决定: $J = -cD_T \nabla T - D \nabla c$ ^[24], 其中 D 为 Brownian 扩散系数(Brownian diffusion coefficient), ∇c 为颗粒浓度梯度。当热泳与 Brownian 扩散达到稳态平衡时,颗粒浓度分布 $c = c_0 \exp(S_T \Delta T)$ 。其中 Soret 系数(Soret coefficient)表征了颗粒热泳的相对强度与方向(S_T 大于 0, 趋向冷端; 小于 0, 趋向热端)(表 2)。生物样本通常是具有电解

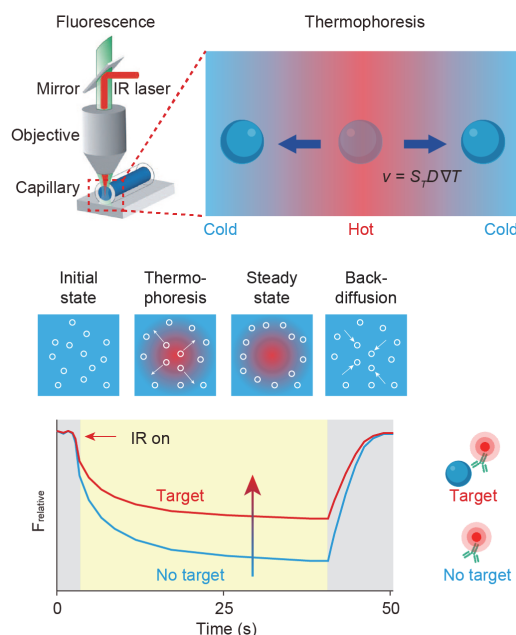


图 2 微量热泳技术(MST)的工作原理

通过检测物质在微观温度梯度场中的热泳运动及荧光强度变化,实现靶标的定量检测

Figure 2 Working principle of microscale thermophoresis (MST)

The quantitative detection of targets relies on the monitoring of thermophoresis-induced fluorescence distribution at the laser heating region

表2 常见颗粒和分子的 Soret 系数

Table 2 Soret coefficient for common molecules and particles

颗粒分子	尺寸	溶液环境	Soret 系数/K ⁻¹	文献
聚苯乙烯颗粒 (羧基修饰)	200 nm	1 mmol·L ⁻¹ Tris	0.7	[28]
聚苯乙烯颗粒 (羧基修饰)	92 nm	水	0.23	[29]
聚苯乙烯颗粒	100 nm	10 mmol·L ⁻¹ Tris	0.35	[60]
聚苯乙烯颗粒	100 nm	10 mmol·L ⁻¹ Tris + PEG 6K (w=5%)	-1.5	[60]
SDS 胶束	5 nm	10 mmol·L ⁻¹ NaCl	0.024 (25 °C)	[51]
CTAC 胶束	—	水	≈0.1	[32]
HepG2 EVs	≈100 nm	PBS	0.03	[69]
Aβ40 fibril	≈2 μm	6 mmol·L ⁻¹ NaCl (pH=8.4)	≈2.6	[44]
溶菌酶	14 kDa	100 mmol·L ⁻¹ NaCl (pH=4.65)	0.0013 (27 °C)	[30]
DNA (SYBR Green I 标记)	5.6 kbp	10 mmol·L ⁻¹ Tris (pH=7.8)	0.14 (24 °C)	[24]
λ-DNA (SYBR Green I 标记)	48.5 kbp	10 mmol·L ⁻¹ Tris (pH=7.8)	0.4	[31]
PEG	6 kDa	10 mmol·L ⁻¹ Tris	0.046	[60]

质存在的水溶液环境, S_T 可表达为:

$$S_T = \frac{A}{kT} \left(\frac{\sigma_{\text{eff}}^2 \lambda_{\text{DH}} \beta}{4\epsilon\epsilon_0 T} - S_{\text{hyd}} \right) \quad (1)$$

其中 A 为颗粒表面积, k 为 Boltzmann 常数, σ_{eff} 为表面有效电荷密度, λ_{DH} 为 Debye-Hückel 长度, ϵ 介电常数, ϵ_0 为真空介电常数, β 为介电常数随温度变化率, h_{hyd} 为溶剂化熵^[25]. 荧光探针识别靶标后, 靶标和探针尺寸、构象、电荷及溶剂化状态发生改变, 影响其热泳运动^[17,26-32]. 通过测量温度梯度下的荧光强度分布(即浓度分布), 可以定量检测靶标浓度.

2.2 应用

MST 已被广泛应用于生物分子间相互作用的定量表征以及生物分子的快速、原位检测^[33-36]. 在 MST 检测过程中, 仅需将靶标分子与探针的混合溶液导入玻璃毛细管, 通过红外激光(1480 nm)局部加热产生强温度梯度场, 在数十秒内, 分子的热泳定向运动与 Brownian 扩散达到稳态平衡, 在激光照射区域形成浓度变化(图 2). 当靶标分子与探针结合后, S_T 变化将以指数幂次的方式放大, 引起激光加热处的荧光信号变化. Pyun 课题组^[37]利用 MST 技术实现了 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的原位检测. 通过基因编辑在大肠杆菌外膜(OM)表面展示蛋白 Z 域, 制备 CRP 抗体修饰的 OM 脂质体(直径约 100 nm). 在溶液相中, CRP 与 OM 脂质体、偶联异硫氰酸荧光素(FITC)的 CRP 检测抗体形成夹心复合物, 通过 MST 测量 FITC 荧光信号变化, 定量 CRP 浓度. 该方法能够直接测量血清样本中 CRP 含量, 动态范围为 3~25 μg·mL⁻¹, 检出限(LoD, 空白样本信号加 3 倍标准偏差所对应浓度)为 3 μg·mL⁻¹, 并用于炎症疾病的临床诊断(阈值 33 μg·mL⁻¹). 通过制备表面展示 Ro 抗

原或 La 抗原的 OM 脂质体, MST 实现了血清中 Ro 抗体或 La 抗体的定量检测, 并用于系统性红斑狼疮的诊断. 其中, 基于 Ro 抗体的检测灵敏度(阳性样本被正确分类的比例)为 100%, 特异性(阴性样本被正确分类的比例)为 87.5%; 基于 La 抗体的检测灵敏度为 93.3%, 特异性为 87.5%(图 3a)^[38]. MST 还可用于生化反应过程中活性分子产物的实时原位测量. 通过 Atto655 标记的周质结合蛋白(Periplasmic-binding proteins, PBP)识别无机磷酸盐(Pi), MST 实现了肌球蛋白(Myosin)和肌原纤维(Myofibrils)水解 ATP 过程中的 Pi 生成速率的实时检测(图 3b)^[39]. 相比于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)耦合检测, MST 具有样本消耗量低(10 μL)及灵敏度高(<1 nmol·L⁻¹·s⁻¹)的优势. 近期, Braun 课题组^[40]扩展了 MST 的检测功能, 实现了分子识别的亲合力与反应动力学的同时测量(图 3c). 通过综合监控激光加热前分子结合导致的荧光淬灭、激光加热解离以及关闭激光后分子重新结合与扩散的荧光变化, 获得平衡常数(K_d)、结合速率常数(k_{on})与解离速率常数(k_{off}). 利用该方法测量了短链 DNA 在不同离子强度、链长、温度、分子拥挤环境下杂交过程的 k_{on} (10⁴~10⁶ mol⁻¹·L·s⁻¹)和 k_{off} (10⁻⁴~10⁻¹ s⁻¹).

肿瘤 EV 是肿瘤细胞分泌的具有磷脂双分子层结构的囊泡状小体, 携带了肿瘤细胞来源的蛋白质、核酸等分子信息, 稳定的存在于外周血等体液中, 是“液体活检”的重要靶标之一^[6,41]. Yang 课题组^[42]利用 MST 技术实现了肿瘤细胞外囊泡(Extracellular vesicle, EV)表面蛋白的定量检测. 该方法使用靶向程序性死亡配体 1 (PD-L1)的荧光核酸适体标记肿瘤 EV, 由于核酸适体与 EV-核酸适体复合物在温度场下的分布不同, 通过 MST 测量激光加热区域的荧光信号变化, 实现 EV 表面 PD-L1 的定量检测. 该方对 EV PD-L1 检测的动态范围

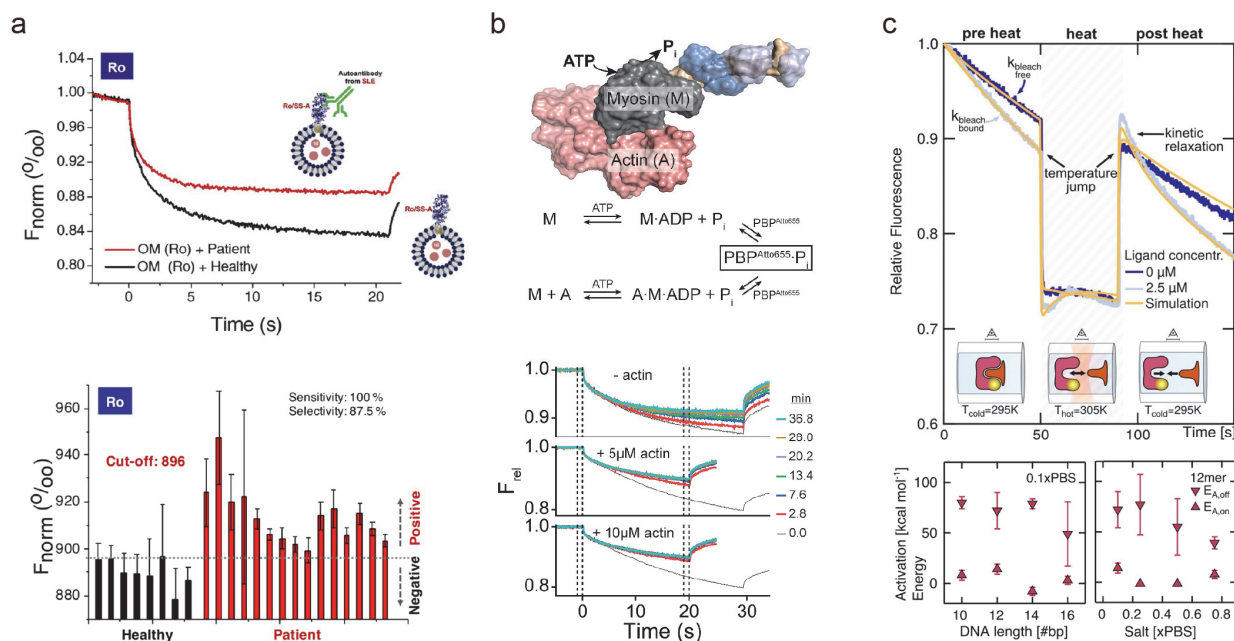


图3 微量热泳(MST)的生物分子检测

(a)基于 MST 的血清 Ro 抗体检测与系统性红斑狼疮诊断. 已获得参考文献[38]的转载许可, 版权所有© 2020 Elsevier. (b)基于 MST 的肌球蛋白水解 ATP 过程中无机磷酸盐(Pi)产物实时检测. 已获得参考文献[39]的转载许可, 版权所有© 2020 Elsevier. (c)基于 MST 的 DNA 杂交亲和力与反应动力学测量. 已获得参考文献[40]的转载许可, 版权所有© 2021 Wiley-VCH GmbH

Figure 3 Microscale thermophoresis (MST)-based biosensing

(a) MST-detection of serum Ro antibody for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Reprinted with permission from Ref. [38]. Copyright © 2020 Elsevier. (b) MST for real-time detection of inorganic phosphate (Pi) during ATP turnover by myosin. Reprinted with permission from Ref. [39]. Copyright © 2020 Elsevier. (c) MST for simultaneous measurement of binding affinity and kinetics. Reprinted with permission from Ref. [40]. Copyright © 2021 Wiley-VCH GmbH.

和 LoD 分别为 $0 \sim 354$ 和 $17.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$. 在临床血浆样本检测中, EV PD-L1 的表达水平能够有效区分癌症患者(34 例, 涵盖肺癌、胃癌、前列腺癌和尿路上皮癌等)与健康对照(22 例), AUC 为 0.999. Cichos 课题组^[43]将热泳作为一种有效的分子操控手段, 在微尺度腔室中利用热泳实现了单个淀粉样纤维的长时间捕获与生长动力学研究^[44-45]. 发现旋转扩散系数是影响纤维生长的重要因素, 精度可达 10 nm , 并成功观测到纤维断裂后碎片成核的次级生长过程. 该方法克服了原有界面固定方法影响纤维生长过程的瓶颈, 实现了自然状态下淀粉样蛋白纤维生长过程的原位表征, 为淀粉样原纤维与蛋白质错误折叠相关疾病的研究提供了新方法. 由于 MST 中的热泳效应受限于温度梯度场的空间尺度(通常为数十微米), 极大影响了有效测量体积及检测灵敏度. 因此, 需要将热泳与其他方法结合, 增加作用范围, 提高检测灵敏度.

3 热泳-对流耦合

3.1 原理

相比于 MST 单纯依赖热泳的检测方式, 热泳与对流的耦合能够实现较大体积样本中目标分子或生物颗粒的高效操控与汇聚, 可用于微量生物标志物的分离、富集与高灵敏检测(图 4). 当溶液体系的垂直高度较大

时(通常高于数百微米), 由于溶液热膨胀导致的浮力将引发自然对流(Convection), 从而影响更大尺度空间内(毫米级乃至宏观尺度)的颗粒运动^[46-50]. 微流控生物传感中的热泳-对流耦合主要利用红外激光局部加热较高微腔中的溶液, 由于中间高度溶液温度较高, 颗粒在热泳作用下向温度较低的周围区域迁移, 同时环状对流将颗粒从周围区域携带至激光加热区域的底面, 在对流与热泳平衡作用下, 颗粒高效汇聚至底面^[24]. 由于对流对颗粒施加的黏性阻力与尺寸 a 呈正比, 而热泳力与尺寸呈更高次方比($\propto a^2$), 热泳与对流耦合策略能够实现尺寸选择性的靶标操控与富集.

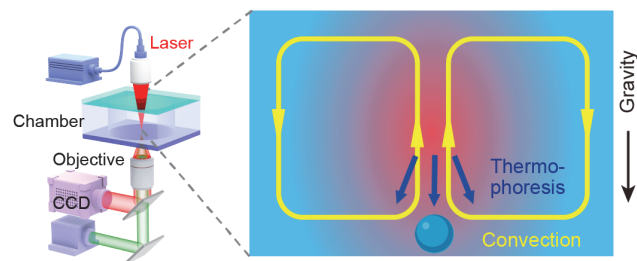


图4 热泳-对流耦合的传感原理

温度梯度引发趋向冷端的定向热泳与环形自然对流, 使靶标快速、稳定汇聚在微腔室底面低温处

Figure 4 Mechanism of biosensing based on thermophoresis-convection coupling

The thermophobic thermophoresis and toroid natural convection induced by the localized temperature gradient result in rapid accumulation of biomolecules and bioparticles at the cold bottom region

3.2 应用

近年来,我们课题组^[19]发展了基于热泳-对流耦合的微流控热泳传感技术,实现了复杂生物样本中 EV 的快速、原位、高灵敏检测. EV 样本与荧光探针孵育后携带荧光信号,在微腔室中(高度 240~400 μm , 蓝宝石基底,导热系数 $35 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$),通过红外激光加热产生温度梯度,在热泳与对流的耦合作用下, EV 迅速汇聚至微腔底部低温处. EV-荧光探针复合体(平均直径 $\approx 100 \text{ nm}$)能够在 10 min 被汇聚 10^3 倍,有效放大 EV 表面的荧光信号,实现 EV 携带分子靶标的定量测量. 由于样本中游离的蛋白、核酸或探针的尺寸较小(几纳米),无法在热泳-对流耦合下汇聚,有效降低了对 EV 检测的干扰.

结合热泳富集与核酸适体识别的微流控热泳核酸适体传感技术(TAS),成功实现了微量($1 \mu\text{L}$)血清或血浆样本中 EV 膜蛋白的高灵敏、定量、快速、低成本检测(图 5a)^[51]. 核酸适体是单链功能性寡核苷酸,能够折叠成独特的三级结构并高特异、高亲和地识别分子靶标,具有尺寸小、位阻小及热稳定性高等优势,可以良好地匹配微流控热泳传感^[42,52]. 我们利用荧光标记的核酸适体特异性识别 EV 表面肿瘤相关膜蛋白,并通过 TAS 测

量 EV 蛋白表达. TAS 的 LoD 为 $\approx 10^7 \text{ EV}\cdot\text{mL}^{-1}$,比酶联免疫吸附测定法(ELISA)方法低 10^3 倍. 我们将 TAS 应用于 232 份血清样品检测,涵盖 6 种高发癌症类型(乳腺癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌及前列腺癌)及健康对照,获得了 EV 表面 7 种肿瘤相关蛋白表达图谱(CD63、PTK7、EpCAM、LZH8、HER2、PSA、CA125). 利用机器学习算法计算 EV 蛋白特征(7 种蛋白表达水平的加权求和),实现了 6 种癌症的自动分类、I 期癌症精准诊断以及前列腺根治术后的复发监控. TAS 还被用于乳腺癌血浆 EV 的蛋白测量(图 5a)^[53]. 基于 EV 表面 8 种乳腺癌相关蛋白表达,获得 EV 蛋白特征,用于区分转移性乳腺癌(MBC)患者、非转移性乳腺癌患者和年龄配对的健康对照者,准确率高达 91.1%. 在训练队列、验证队列及前瞻队列研究中, EV 蛋白特征可用于 MBC 的疗效监控,对治疗后疾病进展(PD)与稳定/部分缓解(SD/PR)的区分准确率为 88.5%. 治疗前 MBC 患者的基线 EV 蛋白特征,与无进展生存期(PFS)显著相关,其中前列腺癌生物标志物 EV PSMA 可以作为 MBC 患者 PFS 的独立预后因素.

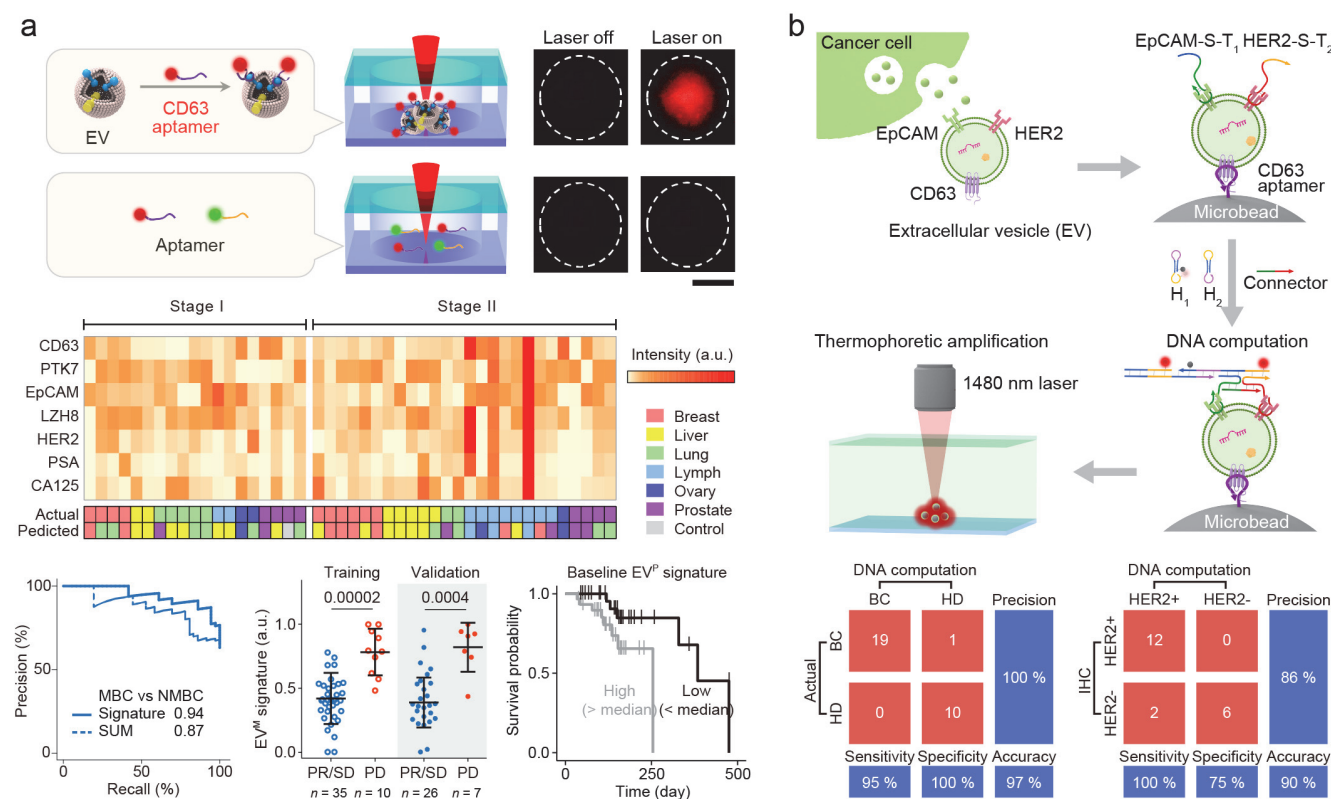


图 5 基于热泳-对流耦合的细胞外囊泡(EV)蛋白检测

(a)基于热泳适体传感器(TAS)的肿瘤 EV 表面蛋白检测. 已获得参考文献[51, 53]的转载许可, 版权所有© 2019 Nature Publishing Group 和© 2021 Nature Publishing Group. (b)基于热泳-对流耦合的 EV 表面 DNA 逻辑运算. 已获得参考文献[54]的转载许可, 版权所有© 2021 American Chemical Society.

Figure 5 Detection of proteins of extracellular vesicles (EVs) by thermophoresis-convection coupling

(a) Thermophoretic aptasensor (TAS) for profiling surface proteins on tumor EVs in EV-based liquid biopsy. Reprinted with permission from Ref. [51, 53]. Copyright © 2019 Nature Publishing Group and © 2021 Nature Publishing Group. (b) Thermophoresis-mediated DNA computation for the detection of multiple protein markers on single EVs. Reprinted with permission from Ref. [54]. Copyright © 2021 American Chemical Society.

近期, 热泳-对流耦合策略还被拓展至 EV 表面的 DNA 分子逻辑运算, 实现了单 EV 水平蛋白标志物的共表达测量(图 5b)^[54]. 通过设计 2 条包含核酸适体序列、连接序列(Connector)和立足序列(Toehold)的单链 DNA 探针, 并以泛肿瘤标志物 EpCAM 和乳腺癌标志物 HER2 作为输入信号(Input), 构建 DNA 分子逻辑门(AND); 利用杂交链式反应(Hybridization chain reaction, HCR)和热泳-对流耦合策略, 放大输出信号(Output), 实现乳腺癌 EV (HER2+, EpCAM+)的高灵敏精准检测. 在乳腺癌病人血清样本中, EV 表面 DNA 逻辑运算可用于乳腺癌精准诊断与 HER2 分子分型.

EV 携带肿瘤细胞的 miRNA 及 mRNA, 在转录和转录后水平调控肿瘤增殖与转移, 是一种重要的癌症诊断标志物^[55]. 我们课题组^[56]利用纳米耀斑(Nanoflare)作为检测探针, 结合热泳-对流耦合的 EV 高效富集, 发展了 EV miRNA 高灵敏、定量、原位检测技术(TSN)(图 6a). 纳米耀斑是表面修饰核酸探针的金纳米颗粒, 通过被动输运进入 EV 后, 可以特异性地识别靶标 miRNA 并产生荧光信号; 进一步通过热泳-对流耦合作用快速汇聚 EV, 从而有效放大其中纳米耀斑产生的荧光信号. TSN

对血清样本中 EV miRNA 的 LoD 低至 $0.36 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 接近定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR). 利用 TSN 技术测量乳腺癌 EV miRNA 表达图谱, 发现 EV miR-375 可用于 ER+乳腺癌的早期诊断. 通过设计新型 DNA 四面体探针, 热泳-对流耦合方法还可用于 EV mRNA 的高灵敏测量(DTTA)(图 6b)^[57]. DNA 四面体探针具有较高的结构刚性, 可通过被动输运高效进入 EV; DNA 四面体的双悬臂可以特异识别 EV 中靶标 PSA mRNA, 产生荧光共振能量转移(FRET)信号. 在热泳-对流耦合作用下, 快速汇聚 EV 并放大其中的 FRET 信号, 对 EV PSA mRNA 的 LoD 低至 $14 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$. 我们将 DTTA 应用于前列腺癌的临床样本检测, 发现血清中 EV PSA mRNA 表达, 可以有效区分前列腺癌患者(PCa)与前列腺良性增生患者(BPH), 曲线下面积(AUC)为 0.93, 显著优于血清生物标志物 PSA (AUC 0.74). 与 qRT-PCR 相比, TSN 和 DTTA 无需 EV 裂解、RNA 提取及反转录等复杂操作, 即可实现 EV RNAs 的高灵敏、原位测量, 并且可以有效排除非 EV 来源 RNA 的信号干扰. 基于热泳-对流耦合的生物传感依赖靶标颗粒自身热泳性质(S_T), 难以直接检测尺寸较小或表面电荷密度较弱的生物分子.

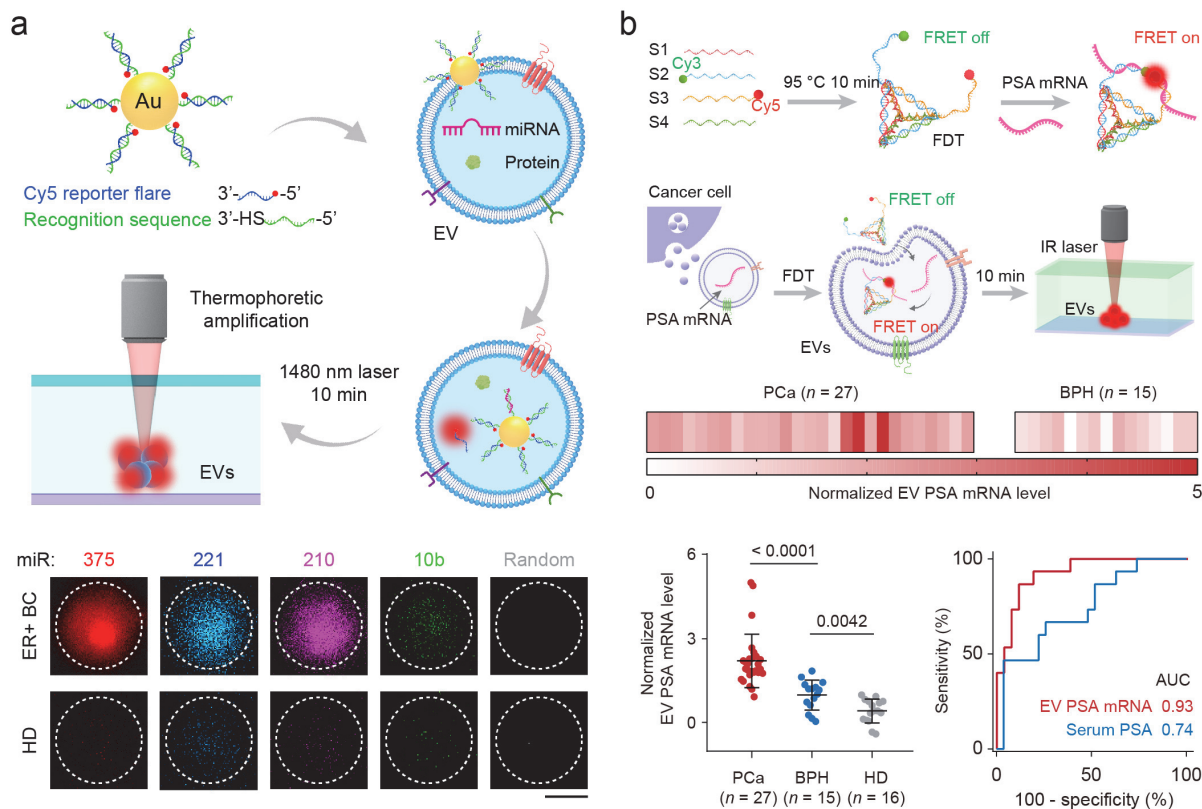


图 6 基于热泳-对流耦合的 EV RNA 检测

(a) 结合纳米耀斑(Nanoflare)的热泳传感器(TSN)用于 EV miRNA 的原位检测. 已获得参考文献[56]的转载许可, 版权所有© 2020 American Chemical Society. (b) 结合能量共振转移 DNA 四面体探针(FDT)的热泳传感器(DTTA)用于 EV mRNA 的高灵敏测量. 已获得参考文献[57]的转载许可, 版权所有© 2021 Elsevier.

Figure 6 Detection of EV RNAs by the coupling of thermophoresis-convection coupling

(a) Thermophoretic sensor implemented with nanoflares (TSN) for *in situ* detection of EV miRNAs and detection of estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer. Reprinted with permission from Ref. [56]. Copyright © 2020 American Chemical Society. (b) Thermophoretic sensor implemented with FRET-based DNA tetrahedron (DTTA) for *in situ*, sensitive detection of EV mRNA and precise diagnosis of prostate cancer. Reprinted with permission from Ref. [57]. Copyright © 2021 Elsevier.

4 热泳-扩散泳耦合

4.1 原理

扩散泳是指颗粒在分子浓度梯度中的定向迁移。当样本中处存在高浓度溶质分子时, 溶质在热泳作用下产生浓度梯度, 并对目标颗粒施加扩散泳力(图 7)^[58-59]。例如, 聚合物溶质(如聚乙二醇, PEG)会在温度梯度作用下快速向冷端热泳扩散, 在溶液内形成与温度梯度方向相反的梯度浓度。由于聚合物分子与颗粒表面存在排斥力, 颗粒受到指向低溶质浓度方向的扩散泳力^[60-62]。扩散泳力 F_{diff} 与正比于溶质浓度 c_0^{PEG} ,

$$F_{\text{diff}} = 3\pi\eta a D S_T \nabla T, \quad S_T = S_T^p - 2\pi \left(S_T^{\text{PEG}} - \frac{1}{T} \right) a \lambda^2 c_0^{\text{PEG}} \quad (2)$$

其中 S_T^p 是颗粒固有 Soret 系数, S_T^{PEG} 为 PEG 分子的 Soret 系数, a 为颗粒尺寸, λ 为排阻作用的尺度(约等于 PEG 分子回旋直径)。在溶质浓度足够大时($w > 5\%$, 以 PEG 为例), 扩散泳力取代颗粒自身热泳成为主要作用。热泳与扩散泳耦合的优势在于, 针对自身热泳性质较弱的目标颗粒, 依然能够实现高效的操控与汇聚。

4.2 应用

基于 PCR 的病毒核酸检测灵敏度高, 但是检测时间长, 步骤繁琐, 在核酸扩增过程中容易造成气溶胶污染。病毒抗原检测方法无需病毒裂解, 直接测量病毒表面蛋白, 检测时间短, 但灵敏度低。我们课题组^[63]开发了一种基于核酸适体识别和 PEG 增强的热泳-扩散泳耦合传感技术, 用于新型冠状病毒的一步、快速、定量抗原检测(图 8a)。在含有假病毒的咽拭子样本中, 加入靶

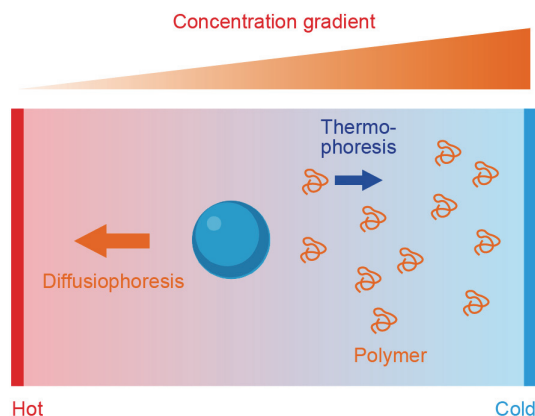


图 7 热泳-扩散泳耦合的传感原理

温度梯度引起溶质分子(通常是聚合物)热泳并形成分子浓度梯度, 目标颗粒受到指向低溶质浓度方向(即指向热端)的扩散泳力。

Figure 7 Mechanism of biosensing based on thermophoresis-diffusiophoresis coupling

Localized temperature gradient induces a solute concentration gradient, and the resulting diffusiophoresis drives particles toward the hot region.

向突变蛋白的荧光核酸适体和 PEG 分子(8 kDa, $w=6\%$)后, 利用激光局部加热, 同时产生温度梯度场及 PEG 浓度梯度场。在 15 min 内, 协同核酸适体对病毒抗原的高效识别以及热泳-扩散泳耦合的病毒汇聚(2100 倍), 放大病毒表面核酸适体的荧光信号, 实现病毒抗原的快速、定量测量, LoD 达到 $176 \text{ TU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ($26 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的突变蛋白)。该方法具有灵敏度高、特异性强、操作简单快速、无需前处理及成本低等诸多优势, 为 SARS-CoV-2 的检测提供了新工具。

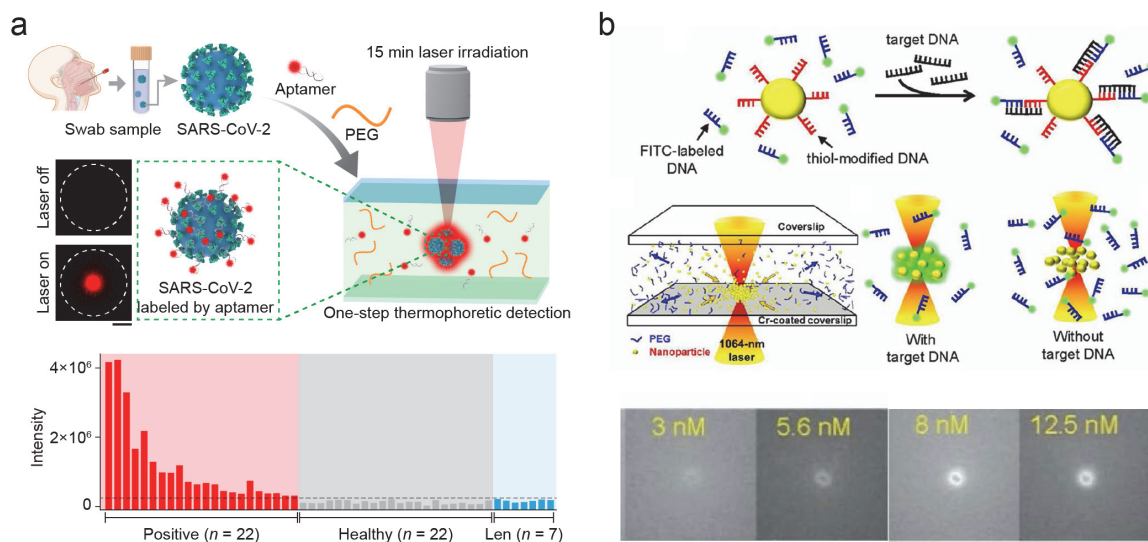


图 8 基于热泳-扩散泳耦合的生物传感

(a) 基于核酸适体识别与 PEG 增强的微流控热泳传感器, 用于新冠病毒一步法快速检测。已获得参考文献[63]的转载许可, 版权所有© 2021 American Chemical Society. (b) 基于核酸探针与 PEG 的 DNA 热泳检测。已获得参考文献[64]的转载许可, 版权所有© 2015 American Chemical Society.

Figure 8 Biosensing mediated by the thermophoresis-diffusiophoresis coupling

(a) One-step PEG-enhanced thermophoretic assay for detection of SARS-CoV-2 viral particles. Reprinted with permission from Ref. [63]. Copyright © 2021 American Chemical Society. (b) PEG-enhanced thermophoretic detection of target DNA by the size-dependent accumulation of sandwiched hybrid of target DNA, DNA-modified AuNP, and FITC-labeled DNA. Reprinted with permission from Ref. [64]. Copyright © 2015 American Chemical Society.

热泳-扩散泳耦合策略还可用于游离核酸的快速检测(图 8b)^[64]. 均相检测体系包含表面修饰单链 DNA 的金纳米颗粒探针(直径 20 nm)与 FITC 偶联的单链 DNA 探针, 靶标核酸通过碱基互补与金纳米颗粒和荧光探针形成夹心复合体. 进一步加入 PEG (10 kDa, $w=15\%$) 并利用激光局部加热, 在热泳-扩散泳耦合作用下, 大尺寸的复合体被高效汇聚在激光加热区域, 放大复合体的荧光信号; 尺寸较小的 DNA 荧光探针无法汇聚, 从而有效降低背景信号干扰. 该方法无需靶标固定和多步清洗等操作, 对 29 nt DNA 的 LoD 小于 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 热泳-扩散泳耦合策略中, 为了维持温度梯度场下聚合物溶质的浓度梯度, 需要避免对流作用. 因此, 该方法的有效汇聚范围与检测灵敏度略低于热泳-对流耦合方法.

5 热泳-电泳耦合

5.1 原理

在温度梯度中, 电解质在热泳作用下由热端向冷端迁移, 不同离子的热泳迁移速率差异将导致正负电荷在微尺度空间的分离, 从而产生静电场(热电效应, Thermoelectric effect)(图 9)^[26,65-66]. 目标分子或生物颗粒在热电场中做电泳迁移, 迁移方向由热电场方向与颗粒自身带电性质决定. 在微流控热泳体系中产生热电场的有效策略是在溶液中引入离子型表面活性剂^[67]. 以十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)为例, 在大于临界胶束浓度(CMC, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 同时存在带正电的胶束($S_T \approx 0.1 \text{ K}^{-1}$)与游离 Cl^- ($S_T = 10^{-4} \text{ K}^{-1}$). 由于 CTAC 胶束与 Cl^- 的热泳迁移能力存在巨大差异, 沿着温度梯度场中引起正负离子的空间分离, 获得从冷端指向热端的热电场. 此外, 界面熵驱动力(Interfacial-entropy-driven

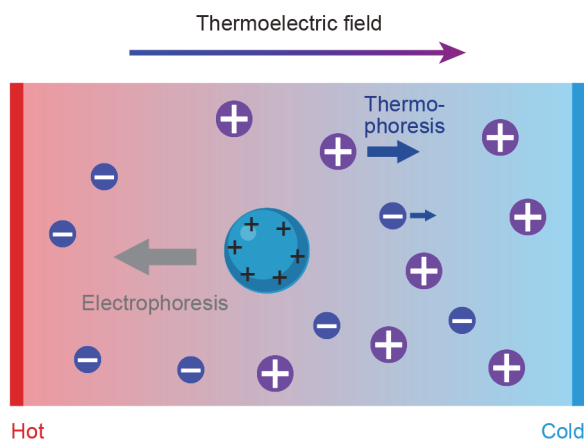


图 9 热泳-电泳耦合的传感原理

温度梯度导致具有差异化热泳迁移速率的正负离子发生空间分离, 产生静电场(热电场, Thermoelectric field). 靶标分子或生物颗粒在热电场中发生电泳定向迁移.

Figure 9 Mechanism of biosensing based on thermophoresis-electrophoresis coupling

Localized temperature gradient can induce a thermoelectric field upon the differentiated thermophoretic mobility of positive and negative charge, subsequently resulting in electrophoresis of analyte for manipulation and sensing.

force)也是热泳-电泳作用来源^[68]. 在溶质颗粒-溶剂界面处, 溶剂分子被吸附, 形成排布有序的双电层(Electric double layer), 具有较低的介电常数. 在温度梯度下, 热扰动增加了界面熵, 破坏了界面双电层结构有序性, 提高介电常数, 并产生与温度梯度平行的介电常数梯度. 在介电常数梯度作用下, 溶质颗粒将从冷端向热端电泳迁移.

5.2 应用

基于热泳-电泳耦合原理, Zheng 课题组^[69]发展了一种热泳光镊系统(Opto-thermophoretic tweezer), 实现了等离激元纳米材料的快速组装与原位表面增强拉曼传感(SERS)(图 10a). 在金纳米颗粒悬浮液中加入 CTAC(浓度高于 CMC), 同时存在带正电的 CTAC 胶束离子、带负电的 Cl^- 离子以及表面吸附 CTAC 后带正电的金纳米颗粒. 将悬浮液导入微腔, 通过 532 nm 激光局部加热微腔金基底产生强温度梯度场($10^7 \text{ K} \cdot \text{m}^{-1}$), 以及指向激光加热区域的热电场, 使带正电的纳米颗粒向热端做电泳迁移. 该方法可以在液相中定点组装金纳米三角(AuNT, 边长 150 nm), 并作为 SERS “热点” 实现了分子靶标(罗丹明 6G)的快速(10 s)、原位检测, LoD 约 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 通过调整 CTAC 浓度调控及热泳光镊捕获的势阱刚度等, 该技术可以在单颗粒水平定点捕获尺寸低至 60 nm 的多种金属纳米颗粒(AuNR, AuNS 和 AgNS), 实现原位暗场光学测量^[70].

热泳光镊技术还可用于细胞的无损操控. 与金属纳米颗粒不同, 引入 CTAC 等离子型表面活性剂将破坏生物膜结构. 细胞膜磷脂双分子层表面暴露带负电的亲水基团, 导致细胞膜表面附近水分子层具有固定的分子取向, 即膜-溶液界面熵较低. 温度梯度导致的界面熵驱动效应下, 微腔中悬浮的细胞向加热点处迁移并被捕获(图 10b)^[71]. 利用数字微镜阵列(DMD)对激光加热区域进行时空编程, 可对数十个细胞(酵母菌、大肠杆菌等)进行精准、动态控制, 达到亚微米级空间分辨率. 在未来研究中, 可以进一步引入对流策略, 实现更大空间范围内的单细胞精准操控与高通量检测, 实现单细胞的组学分析. 该技术进而被应用于脂质囊泡的捕获与动态操纵(图 10b)^[72]. 热泳光镊操控中的光热转换效率高, 与传统光镊依赖高能光束($10 \sim 100 \text{ mW} \cdot \mu\text{m}^{-2}$)产生光学梯度力相比, 激光功率密度($0.1 \text{ mW} \cdot \mu\text{m}^{-2}$)降低了 2~3 个数量级, 提高了操控技术的生物相容性^[16,66]. 相比于其他方法, 热泳-电泳耦合策略需要在微流控芯片基底镀贵金属纳米颗粒实现等离子加热; 因此, 芯片的制备要求和成本相对较高.

6 总结与展望

近年来, 基于微流控热泳的生物传感领域快速发展, 主要包括微量热泳技术、热泳-对流耦合、热泳-扩

散泳耦合以及热泳-电泳耦合等策略,检测对象涵盖了分子、细胞外囊泡、病毒、细胞等多尺度生物标志物,并在恶性肿瘤等重大疾病的精准诊断领域展现出巨大临床应用潜力(表 3)。微量热泳技术结合了荧光检测的精准性与热泳的灵活性,可以快速获取检测分子间相互作用等信息,有望应用于全自动、高通量的疾病靶点和探针筛选。基于热泳-对流耦合与热泳-扩散泳耦合的生物传感技术,通过结合数字微镜系统等多光束操控手段及

多色荧光探针,可以有效提高检测通量及多指标检测能力。基于热泳-电泳耦合的光热镊技术,在单细胞组学分析等领域,具有较好的应用潜力。实现更大空间范围内的单细胞精准操控与高通量检测,实现单细胞的组学分析。此外,利用微流控器件易于多物理场耦合的优势,可协同热泳与磁场、声场、流体动力学效应等,探索微流控热泳传感技术在不同应用场景下的普适性。

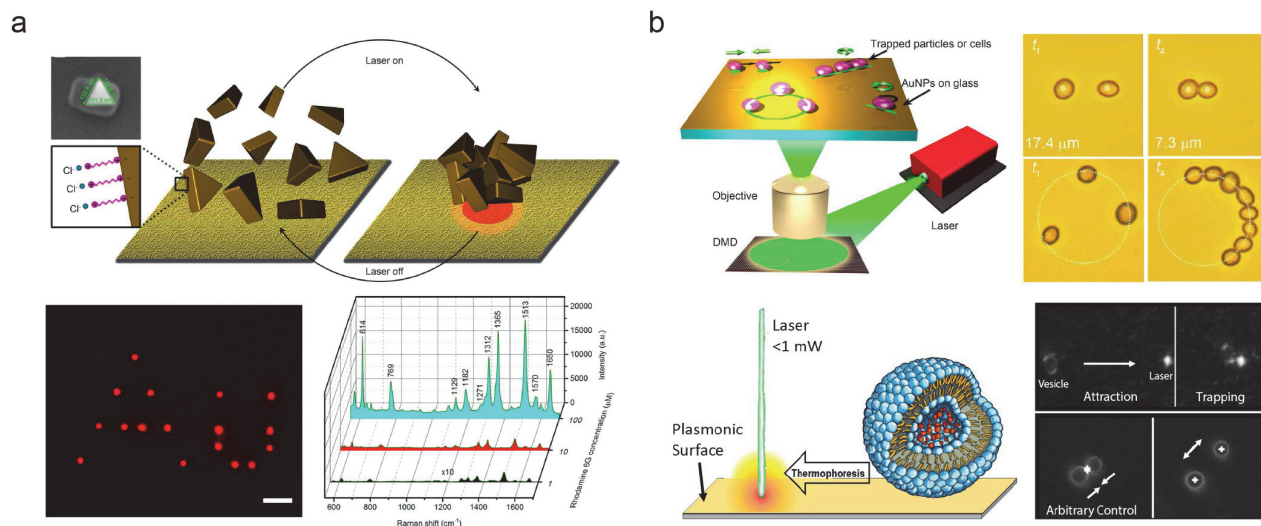


图 10 基于热泳-电泳耦合的传感与生物颗粒操控

(a) 基于热泳光镊的原位表面增强拉曼散射(SERS). 已获得参考文献[69]的转载许可, 版权所有© 2016 American Chemical Society. (b) 基于热泳光镊的细胞及脂质囊泡精准操控. 已获得参考文献[71, 72]的转载许可, 版权所有© 2017 American Chemical Society 和© 2018 American Chemical Society.

Figure 10 Sensing and bioparticle manipulation based on thermophoresis-electrophoresis coupling

(a) Thermophoretic tweezer for plasmonic nanoparticle assembly and *in situ* surface-enhanced Raman scattering (SERS). Reprinted with permission from Ref. [69]. Copyright © 2016 American Chemical Society. (b) Thermophoretic tweezer for real-time and programmable manipulation of cells and lipid vesicles. Reprinted with permission from Ref. [71, 72]. Copyright © 2017 American Chemical Society and Copyright © 2018 American Chemical Society.

表 3 微流控热泳传感技术总结

Table 3 Summary of different thermomicrofluidic biosensing strategies

传感原理	优势	局限性	适用靶标与应用场景	主要设计因素	文献
微量热泳技术	应用靶标范围广	灵敏度较低、方法单一	蛋白、核酸、生物小分子、EV 测量	探针类型、基团修饰、缓冲液性质	[37-41]
热泳-对流耦合	灵敏度高、无需复杂前处理	依赖靶标自身热泳性质	EV 蛋白/核酸检测	靶标与探针尺寸差别、芯片高度、导热性质	[50, 53-54, 56-57]
热泳-扩散泳耦合	不依赖靶标自身热泳性质、检测速度快	汇聚范围小、灵敏度较低	病毒颗粒、DNA 检测	靶标与探针尺寸差别、PEG 浓度、分子量	[63-64]
热泳-电泳耦合	单颗粒操控、空间分辨率高	芯片成本高、激光光路设计复杂	单细胞、单纳米颗粒操控	颗粒自身电学性质、电解质种类	[69-72]

作者简介



刘超, 国家纳米科学中心研究员. 2010 年 6 月于河北工业大学获得工学学士学位, 2016 年 1 月于中国科学院大学获得理

学博士学位, 2016 年加入国家纳米科学中心. 主要研究方向为微流控分离分析与肿瘤液体活检.



田飞, 国家纳米科学中心特别研究助理. 于 2011 年 6 月获得河北工业大学工学学士学位, 于 2019 年 6 月获得河北工

业大学工学博士学位。主要研究方向为基于微流控技术的循环肿瘤靶标分离分析与病原体检测。



邓瑾琦, 国家纳米科学中心任特别研究助理。于2016年6月在武汉大学化学与分子科学学院取得理学学士学位, 于2021年6月在中国科学院大学中丹学院取得理学博士学位, 专业为纳米科学与技术。研究方向为基于微流控技术的生化分析。



孙佳姝, 国家纳米科学中心研究员, 国家杰出青年科学基金(2020年)和国家优秀青年科学基金获得者(2016年)。主要研究方向为微流控分离分析技术与纳米生物医学研究。提出了微流控热泳测量的新理念, 实现循环肿瘤标志物的高灵敏定量检测。已发表SCI收录论文90余篇, 引用5,600余次, 并多次被Nature子刊等作为研究亮点报道。有10余项微流控相关发明专利授权。

References

- [1] Wan, J. C. M.; Massie, C.; Garcia-Corbacho, J.; Mouliere, F.; Brenton, J. D.; Caldas, C.; Pacey, S.; Baird, R.; Rosenfeld, N. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 223.
- [2] Borrebaeck, C. A. K. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 199.
- [3] Tian, F.; Liu, C.; Lin, L.; Chen, Q.; Sun, J. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2019**, *117*, 128.
- [4] Kalluri, R.; LeBlau, V. S. *Science* **2020**, *367*, eaau6977.
- [5] Kevadiya, B. D.; Machhi, J.; Herskovitz, J.; Oleynikov, M. D.; Blomberg, W. R.; Bajwa, N.; Soni, D.; Das, S.; Hasan, M.; Patel, M.; Senan, A. M.; Gorantla, S.; McMillan, J.; Edagwa, B.; Eisenberg, R.; Gurumurthy, C. B.; Reid, S. P. M.; Punyadeera, C.; Chang, L.; Gendelman, H. E. *Nat. Mater.* **2021**, *20*, 593.
- [6] Möller, A.; Lobb, R. J. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 697.
- [7] Lim, C. Z. J.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Zhao, H.; Stephenson, M. C.; Ho, N. R. Y.; Chen, Y.; Chung, J.; Reilhac, A.; Loh, T. P.; Chen, C. L. H.; Shao, H. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1144.
- [8] Tsokos, G. C. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 605.
- [9] Ma, Q.-L.; Feng, N.; Ju, H.-X. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 1213 (in Chinese). (马秋琳, 冯楠, 鞠熀先, 化学学报, **2020**, *78*, 1213.)
- [10] Li, Y.-Y.; Peng, Y.; Lu, H.-J. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 705 (in Chinese). (李月悦, 彭叶, 陆豪杰, 化学学报, **2021**, *79*, 705.)
- [11] Li, Y.; Wang, Y.; Xie, X.-L.; Zhang, J.; Tang, B. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 36 (in Chinese). (李勇, 王栩, 解希雷, 张建, 唐波, 化学学报, **2021**, *79*, 36.)
- [12] Wu, L.; Qu, X. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2963.
- [13] Kwong, G. A.; Ghosh, S.; Gamboa, L.; Patriotis, C.; Srivastava, S.; Bhatia, S. N. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 655.
- [14] Lu, J.-M.; Wang, H.-F.; Pan, J.-Z.; Fang, Q. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 809 (in Chinese). (卢佳敏, 王慧峰, 潘建章, 方群, 化学学报, **2021**, *79*, 809.)
- [15] Su, Y.-Y.; Peng, T.-H.; Xing, F.-F.; Li, D.; Fan, C.-H. *Acta Chim. Sinica* **2017**, *75*, 1036 (in Chinese). (苏莹莹, 彭天欢, 邢菲菲, 李迪, 樊春海, 化学学报, **2017**, *75*, 1036.)
- [16] Lin, L.; Hill, E. H.; Peng, X.; Zheng, Y. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1465.
- [17] Niether, D.; Wiegand, S. *J. Phys.-Condens. Matter* **2019**, *31*, 503003.
- [18] Chen, J.; Loo, J. F.-C.; Wang, D.; Zhang, Y.; Kong, S.-K.; Ho, H.-P. *Adv. Opt. Mater.* **2020**, *8*, 1900829.
- [19] Tian, F.; Han, Z.; Deng, J.; Liu, C.; Sun, J. *View* **2021**, *2*, 20200148.
- [20] Gooding, J. J.; Gaus, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 11354.
- [21] Wienken, C. J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 100.
- [22] Baaske, P.; Wienken, C. J.; Reineck, P.; Duhr, S.; Braun, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2238.
- [23] Asmari, M.; Ratih, R.; Alhazmi, H. A.; El Deeb, S. *Methods* **2018**, *146*, 107.
- [24] Braun, D.; Libchaber, A. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 188103.
- [25] Duhr, S.; Braun, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 19678.
- [26] Würger, A. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 108302.
- [27] Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342.
- [28] Duhr, S.; Braun, D. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 168301.
- [29] Putnam, S. A.; Cahill, D. G.; Wong, G. C. L. *Langmuir* **2007**, *23*, 9221.
- [30] Iacopini, S.; Piazza, R. *Europhys. Lett.* **2003**, *63*, 247.
- [31] Duhr, S.; Arduini, S.; Braun, D. *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* **2004**, *15*, 277.
- [32] Piazza, R.; Guarino, A. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 208302.
- [33] Seidel, S. A. I.; Wienken, C. J.; Geissler, S.; Jerabek-Willemsen, M.; Duhr, S.; Reiter, A.; Trauner, D.; Braun, D.; Baaske, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10656.
- [34] Shang, X.; Marchioni, F.; Evelyn, C. R.; Sipes, N.; Zhou, X.; Seibel, W.; Wortman, M.; Zheng, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 3155.
- [35] Möller, F. M.; Kieß, M.; Braun, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5363.
- [36] Liu, T.; Zhang, H.; Sun, L.; Zhao, D.; Liu, P.; Yan, M.; Zaidi, N.; Izadmehr, S.; Gupta, A.; Abu-Amer, W.; Luo, M.; Yang, J.; Ou, X.; Wang, Y.; Bai, X.; Wang, Y.; New, M. I.; Zaidi, M.; Yuen, T.; Liu, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 7683.
- [37] Lee, G.-Y.; Min, P.; Kang, M.-J.; Langer, K.; Jose, J.; Pyun, J.-C. *Sens. Actuator, B* **2018**, *258*, 1131.
- [38] Lee, G.-Y.; Bong, J.-H.; Jung, J.; Kang, M.-J.; Jose, J.; Pyun, J.-C. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *156*, 112110.
- [39] Franz, P.; Gassl, V.; Topf, A.; Eckelmann, L.; Iorga, B.; Tsiavalariis, G. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *169*, 112616.
- [40] Stein, J. A. C.; Ianeselli, A.; Braun, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 13988.
- [41] Xu, R.; Rai, A.; Chen, M.; Suwakulsiri, W.; Greening, D. W.; Simpson, R. J. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 617.
- [42] Huang, M.; Yang, J.; Wang, T.; Song, J.; Xia, J.; Wu, L.; Wang, W.; Wu, Q.; Zhu, Z.; Song, Y.; Yang, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 4800.
- [43] Braun, M.; Bregulla, A. P.; Günther, K.; Mertig, M.; Cichos, F. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 5499.
- [44] Fränzl, M.; Thalheim, T.; Adler, J.; Huster, D.; Posseckardt, J.; Mertig, M.; Cichos, F. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 611.
- [45] Braun, M.; Cichos, F. *ACS Nano* **2013**, *7*, 11200.
- [46] Duhr, S.; Braun, D. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 131921.
- [47] Baaske, P.; Weinert, F. M.; Duhr, S.; Lemke, K. H.; Russell, M. J.; Braun, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9346.
- [48] Mast, C. B.; Schink, S.; Gerland, U.; Braun, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 8030.
- [49] Kreysing, M.; Keil, L.; Lanzmich, S.; Braun, D. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 203.
- [50] Mast, C. B.; Braun, D. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 188102.
- [51] Liu, C.; Zhao, J.; Tian, F.; Cai, L.; Zhang, W.; Feng, Q.; Chang, J.; Wan, F.; Yang, Y.; Dai, B.; Cong, Y.; Ding, B.; Sun, J.; Tan, W. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 183.
- [52] Zhang, L.; Wan, S.; Jiang, Y.; Wang, Y.; Fu, T.; Liu, Q.; Cao, Z.; Qiu, L.; Tan, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2532.
- [53] Tian, F.; Zhang, S.; Liu, C.; Han, Z.; Liu, Y.; Deng, J.; Li, Y.; Wu, X.; Cai, L.; Qin, L.; Chen, Q.; Yuan, Y.; Liu, Y.; Cong, Y.; Ding, B.; Jiang, Z.; Sun, J. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2536.

- [54] Li, Y.; Deng, J.; Han, Z.; Liu, C.; Tian, F.; Xu, R.; Han, D.; Zhang, S.; Sun, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 1290.
- [55] O'Brien, K.; Breynne, K.; Ughetto, S.; Laurent, L. C.; Breakefield, X. *O. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 585.
- [56] Zhao, J.; Liu, C.; Li, Y.; Ma, Y.; Deng, J.; Li, L.; Sun, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 4996.
- [57] Han, Z.; Wan, F.; Deng, J.; Zhao, J.; Li, Y.; Yang, Y.; Jiang, Q.; Ding, B.; Liu, C.; Dai, B.; Sun, J. *Nano Today* **2021**, *38*, 101203.
- [58] Abécassis, B.; Cottin-Bizonne, C.; Ybert, C.; Ajdari, A.; Bocquet, L. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 785.
- [59] Rasmussen, M. K.; Pedersen, J. N.; Marie, R. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2337.
- [60] Jiang, H.-R.; Wada, H.; Yoshinaga, N.; Sano, M. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 208301.
- [61] Maeda, Y. T.; Buguin, A.; Libchaber, A. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 038301.
- [62] Maeda, Y. T.; Tlusty, T.; Libchaber, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17972.
- [63] Deng, J.; Tian, F.; Liu, C.; Liu, Y.; Zhao, S.; Fu, T.; Sun, J.; Tan, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 7261.
- [64] Yu, L.-H.; Chen, Y.-F. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2845.
- [65] Dietzel, M.; Hardt, S. *Phys. Rev. Lett.* **2016**, *116*, 225901.
- [66] Li, J.; Zheng, Y. *Acc Mater. Res.* **2021**, *2*, 352.
- [67] Lin, L.; Zhang, J.; Peng, X.; Wu, Z.; Coughlan, A. C. H.; Mao, Z.; Bevan, M. A.; Zheng, Y. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1700458.
- [68] Lin, L.; Peng, X.; Mao, Z.; Wei, X.; Xie, C.; Zheng, Y. *Lab Chip* **2017**, *17*, 3061.
- [69] Lin, L.; Peng, X.; Wang, M.; Scarabelli, L.; Mao, Z.; Liz-Marzán, L. M.; Becker, M. F.; Zheng, Y. *ACS Nano* **2016**, *10*, 9659.
- [70] Lin, L.; Wang, M.; Peng, X.; Lissek, E. N.; Mao, Z.; Scarabelli, L.; Adkins, E.; Coskun, S.; Unalan, H. E.; Korgel, B. A.; Liz-Marzán, L. M.; Florin, E.-L.; Zheng, Y. *Nat. Photonics* **2018**, *12*, 195.
- [71] Lin, L.; Peng, X.; Wei, X.; Mao, Z.; Xie, C.; Zheng, Y. *ACS Nano* **2017**, *11*, 3147.
- [72] Hill, E. H.; Li, J.; Lin, L.; Liu, Y.; Zheng, Y. *Langmuir* **2018**, *34*, 13252.

(Zhao, C.)