

Detection of Oral Pathogens Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer

Zichen Xu¹ Yuan He² Wenfeng Xu¹ Hua Lin^{2*} Xiaoling Liao¹

1. Chongqing University of Science and Technology, 1a. School of Materials and New Energy, 1b. Chongqing Key Laboratory of Nano/Micro Composite Materials and Instruments, Chongqing, 401331, China

2. Chongqing Center for Disease Control and Prevention (Chongqing Academy of Preventive Medicine), 2a. Chongqing Disease Prevention and Public Health Research Center Construction Program, 2b. Chongqing Key Laboratory of Highly Pathogenic Microbes, Chongqing 400707, China

Abstract

The accurate, sensitive and rapid detection of oral pathogenic bacteria is of great clinical significance for the early diagnosis, precise treatment and effective prevention of various oral diseases. In recent years, with the continuous advancement of fluorescence detection technology, diagnostic strategies based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) have demonstrated significant advantages in the quantitative analysis of various pathogenic bacteria in complex oral environmental samples, featuring rapidity, simplicity, good stability, and high sensitivity. Given the research foundation of FRET technology in the field of microbial detection, this paper focuses on the latest progress in its application for the detection of key pathogens in complex oral biological samples. It elaborates on the design of FRET probes, the optimization of detection performance, and application examples, systematically explains the core principles of detection, analyzes the selection criteria of receptor-donor fluorescence pairs suitable for oral matrices, and discusses the influence of key fluorescence properties on detection performance. Finally, it **objectively** reviews the main challenges faced by FRET technology in the field of point-of-care testing (POCT) for oral pathogenic bacteria, as well as the future development prospects combined with artificial intelligence.

Keywords

fluorescence resonance energy transfer; fluorescent probe; biosensor; detection of oral pathogens; periodontal pathogens

基于荧光共振能量转移的口腔致病菌检测方法

徐紫宸¹ 何源² 徐文峰¹ 凌华^{2*} 廖晓玲¹

1. 重庆科技大学 a. 材料与新能源学院; b. 纳米/微复合材料与器械重庆市重点实验室, 中国·重庆 401331

2. 重庆市疾病预防控制中心/重庆市预防医学科学院 a. 重庆市疾病预防与公共卫生研究中心; b. 高致病性病原微生物重庆市重点实验室, 中国·重庆 400707

摘要

口腔致病菌的准确、灵敏且快速检出, 对多种口腔疾病的早期诊断、精准治疗和有效预防具有重要临床意义。近年来, 荧光检测技术不断进步, 基于荧光共振能量转移(FRET)的诊断策略在复杂口腔环境样本中对各类致病菌的定量分析展现出显著优势, 具备快速、简便、稳定性好、灵敏度高特点。鉴于FRET技术在微生物检测领域的研究基础, 本文聚焦其在复杂口腔生物样本中检测关键病原体的最新进展, 重点阐述FRET探针设计、检测效能优化及应用实例, 系统说明其检测核心原理, 分析适用于口腔基质的受体-供体荧光对选择标准, 并探讨荧光特性对检测性能的影响。最后, 客观评述FRET技术在口腔致病菌即时诊断(POCT)领域面临的挑战, 以及结合人工智能的未来发展前景。

关键词

荧光共振能量转移; 荧光探针; 生物传感器; 口腔致病菌检测; 牙周病原体

1 引言

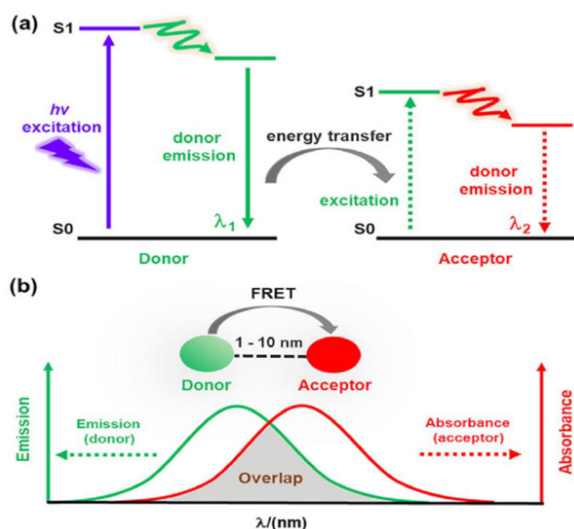
人体作为万亿微生物的宿主, 部分细菌在特定条件下可转化为致病菌引发感染, 准确识别病原体是精准医疗的基石。细菌等病原体引发的口腔感染性疾病呈上升趋势, 威胁公共卫生^[1,2]。WHO数据显示, 牙源性疾病影响全球近35亿人, 严重感染可致全身并发症^[3], 且牙周病原体与心血管疾病等系统性疾病相关, 早期检测可有效防控重症感染。口

腔感染疾病谱系广泛^[4]。传统致病菌检测依赖培养与生化鉴定, 虽为金标准, 但存在耗时长、灵敏度低、无法检测不可培养微生物等问题^[5-6], 亟需开发高效即时检测技术。近二十年, 生物传感器技术整合生物识别与信号转换系统, 实现病原体快速检测^[7], 其高特异性与灵敏度可在复杂口腔样本中识别痕量目标物。其中, 荧光共振能量转移(FRET)技术具备高效、高特异性等优势, 可通过供体-受体对能

量转移机制降低背景干扰,实现复杂样本中高灵敏度病原检测。

本文系统评述 FRET 技术在口腔病原体检测中的最新进展,解析其原理与策略,探讨挑战与发展方向,为开发相关检测装置及口腔感染防控提供理论支撑。

2 荧光共振能量转移 (FRET)



FRET 是基于受体与供体长程偶极 - 偶极耦合的非辐射能量传递过程。光激发供体后能量转移至受体,供体荧光减弱;若受体为荧光团,则会“开启”发射自身荧光(图 1a)。高性能 FRET 传感器要求供体与受体光谱充分重叠,且二者间距在 1-10 nm 范围内,具有距离依赖性(图 1b)。因此 FRET 可作为纳米“分子标尺”,用于复杂生物基质(如口腔样本)中致病菌的动态监测,其高效能量转移能力可实现超灵敏检测。

图 1 FRET 的总体机制。(a) 供体 - 受体对均为荧光团时 FRET 过程示意图, S₁ 和 S₀ 表现出荧光团的激发态和

【基金项目】重庆市科技局自然科学基金面上项目(项目编号: CSTB2023NSCQ-MSX1060);重庆市科技局自然科学基金面上项目(项目编号: CSTB2025NSCQ-GPX0921)高致病性病原微生物重庆市重点实验室开放课题,重庆市市级公共卫生重点专(学)科建设项目(项目编号: 2025ZDSYS007);重庆市教委科学技术研究计划项目(项目编号: KJ2025015131873189);重庆科技大学人才引进科研启动项目(项目编号: ckrc20250607)。

【作者简介】徐紫宸(1997-),女,中国陕西汉中,人,博士研究生,讲师,从事生物功能材料研究。

【通讯作者】凌华(1967-),男,中国四川成都,人,硕士研究生,主任技师,从事病原微生物实验室检测研究。

基态。(b) 下方图示供体发射光谱与受体吸收光谱的重叠区域,上方图示 FRET 供体 - 受体对的间距要求 Fig 1 Overall mechanism of FRET.

2.1 基于 FRET 诊断技术中的纳米材料

随着纳米科学与技术的发展,多种荧光纳米材料被合成并应用于检测领域。FRET 凭借高量子产率、强发光等优势成为理想选择;氧化石墨烯、金纳米粒子等则可作为高效猝灭剂用于受体端。半导体纳米粒子是纳米技术研究前沿,其中量子点由金属核与表面修饰材料构成,稳定性和发光性能优异,在生物成像与分析中潜力巨大。但其在 FRET 体系中存在局限:较大粒径限制空间分辨率,单分子结合制约检测通量,表面包覆层增大供体 - 受体间距,阻碍能量转移。典型检测设计中,猝灭剂与量子点表面探针特异性结合以满足 FRET 间距要求,引发荧光猝灭;目标物竞争结合探针使猝灭剂解离, FRET 受阻,荧光信号恢复。

2.2 FRET 衍生传感器中受体 - 供体对的选择

通常所有荧光团均可作为 FRET 供体,但需保证受体吸收光谱与其发射光谱充分重叠。构建 FRET 体系需评估供体的斯托克斯位移、量子效率及摩尔消光系数,高量子效率与大摩尔消光系数影响发射性能,大斯托克斯位移可降低自猝灭干扰、提升灵敏度。复杂基质检测中,近红外激发能降低背景干扰,是实用化首选。供体 / 受体的稳定性与溶解度影响诊断性能,低溶解度抑制 FRET 效率与灵敏度,稳定性不足易引发假阳性与重现性问题。多种材料可构建致病菌 FRET 探针,荧光纳米粒子因大斯托克斯位移、高量子效率等优势成为优选供体。高效受体也可选用高摩尔消光系数荧光团,核心挑战是创新构建细菌响应元件,形成高效 FRET 检测通道。

3 FRET 衍生探针在食源性病原微生物测定中的应用

口腔致病微生物是牙源性感染的主要诱因,亦是危害公共卫生的重要生物威胁,聚焦基于 FRET 的生化传感系统,旨在实现复杂口腔样本中关键病原菌(牙髓卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌、具核梭杆菌)的高灵敏、高特异性检测。

3.1 牙髓卟啉单胞菌的检测

牙髓卟啉单胞菌(*P. endodontalis*)是牙髓及根尖周感染的关键厌氧病原体,可引发持续性炎症和骨质破坏。传统培养法耗时(5-7天)且灵敏度低,亟需开发快速、高灵敏的检测方法。

目前研究者已根据牙髓卟啉单胞菌生化性质,对检测技术进行了多角度优化。例如,采用牙髓卟啉单胞菌特异性适配体(如外膜蛋白 OmpA)。改用多粘菌素 B(靶向革兰氏阴性菌脂多糖),提高对牙髓卟啉单胞菌外膜的高亲和力。目前检测限可达到 5 cfu/mL,检测线性范围在 1×10^1

至 1×10^7 cfu/mL。较常规 PCR (检测限 = 100 cfu/mL) 灵敏度提升 20 倍。实际样本 (唾液 / 龈沟液) 检测中对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌等口腔共生菌无交叉反应, 结果经 qPCR 靶向 *rpoB* 基因验证一致性 >95%。

3.2 伴放线聚集杆菌的检测

伴放线聚集杆菌 (*A. actinomycetemcomitans*) 作为革兰氏阴性兼性厌氧菌, 是侵袭性牙周炎和青少年牙周炎的关键病原体。在口腔环境中, 细菌通过 ArcAB 双组份系统调控抗氧化基因增强对巨噬细胞产生活性氧的抵抗能力, 进而提升其在宿主体内的存活率。此外, 其分泌的分散素 B (Dispersin B) 可降解生物膜基质多糖, 促进细菌从生物膜中释放并扩散至深层组织, 引发系统性感染。

目前 FRET 双识别探针可采用靶向 B 型菌株外膜蛋白 Omp29 的高亲和力适配体 ($K_d=8.7$ nM), 结合替考拉宁 (Teicoplanin) 特异性结合革兰阴性菌肽聚糖层, 双靶点规避血清型交叉反应。以近红外量子点为供体, 金纳米为受体, 显著增强检测信噪比。龈下菌斑样本实际检测限低至 3 cfu/mL, 且回收率达 94.2%–108.1% (RSD<3.5%), 结果经 qPCR 验证一致性 >97%。(表 1)。

表 1 伴放线聚集杆菌的检测方法对比

	FRET	qPCR	传统培养
检测时间	25 分钟	2–4 小时	5–7 天
检测限 (cfu/mL)	3	100	10
分型鉴别	√	×	×
复杂程度	低 (一步离心)	中 (DNA 提取)	高 (厌氧培养)

3.3 具核梭杆菌的检测

具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 作为一种革兰氏阴性厌氧杆菌, 广泛定植于牙周袋非附着菌斑中, 通过外膜蛋白介导的共聚作用与牙龈卟啉单胞菌、血链球菌等协同形成生物膜, 是牙周炎和牙龈炎的关键病原体。

基于 FRET 的双识别探针技术, 目前可采用具核梭杆菌外膜蛋白 Omp29 的特异性适配体, 其对该菌体表面凝集蛋白具有高亲和力。引入抗 FadA 单克隆抗体修饰金纳米颗粒, 与适配体形成双靶点结构, 显著提升对口腔共生菌 (如牙龈卟啉单胞菌) 的特异性规避能力。以羧基化 CdSe/ZnS 量子点 (QD605, 发射峰 605 nm) 作为能量供体, 金纳米修饰抗 FadA 抗体作为受体。目前可在 1×10^{-1} 至 1×10^{-8} cfu/mL 范围内线性响应, 检测限 (LOD) 低至 3 CFU/mL (缓冲体系), 较 qPCR 灵敏度提升 33 倍。

4 小结与展望

基于 FRET 的传感系统作为能量转移驱动的光化学新兴技术, 在口腔致病微生物的可靠、经济、精准及快速早期预警方面展现出广阔前景。本文系统性综述了 FRET 传感器在复杂口腔样本中检测关键病原体的最新进展, 并解析其核心原理、光谱特性与受体-供体配对选择策略, 旨在深化研究者对 FRET 检测技术前沿的理解, 推动创新性、高可靠、快速精准且经济的 FRET 微生物筛查体系在口腔感染诊断中的应用转化。

尽管 FRET 技术在口腔微生物检测中已证实具备高效性、高灵敏度及快速响应优势, 其临床转化仍面临三重挑战: 1) 多重检测瓶颈。口腔生物膜多菌种共存特性要求发展多重 FRET 检测。现有研究虽已实现 2-3 种病原体同步检测, 但四至五重检测仍受限于光谱干扰, 上转换纳米粒子与量子点等最佳发射体的谱宽仅 30-50 nm, 开发窄谱发射新型荧光团是突破此瓶颈的关键路径; 2) 信号稳定性缺陷: 经典有机荧光团易发生光漂白, 无机纳米荧光团虽具抗漂白性, 却在复杂口腔样本中易引发非特异性结合, 导致痕量检测时假阳性风险升高, 优化策略包括开发光稳定有机探针或对无机纳米材料实施表面功能化修饰; 3) 检测元件局限性: 抗体/适配体虽可提升选择性, 但存在重现性差、易生物降解及成本高等缺陷。亟需引入高稳定、高选择性且经济的检测元件 (如肽核酸 / 人工模拟酶) 以推进 FRET 探针的临床实用化。

参考文献

- [1] Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X.-P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49, 5110–5139.
- [2] Zhang, X.; Hu, Y.; Yang, X.; Tang, Y.; Han, S.; Kang, A.; Deng, H.; Chi, Y.; Zhu, D.; Lu, Y. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 138, 111314.
- [3] Shen, Y.; Wu, T.; Wang, Y.; Zhang, S.-L.; Zhao, X.; Chen, H.-Y.; Xu, J.-J. *Anal. Chem.* 2021, 93, 4042–4050.
- [4] Kaur, A.; Dhakal, S. *Trends Anal. Chem.* 2020, 123, 115777.
- [5] Hofmann, F. J.; Bodnarchuk, M. I.; Dirin, D. N.; Vogelsang, J.; Kovalenko, M. V.; Lupton, J. M. *Nano Lett.* 2019, 19, 8896–8902.
- [6] Sadanandan, S.; V. S. M.; Ramkumar, K.; Pillai, N. P.; P. A.; P. J. S.; V. D.; K. R.; R. J. S.; Sreejaya, M. M. *Food Control.* 2023, 148, 109510.
- [7] Laraib, U.; Sargazi, S.; Rahdar, A.; Khatami, M.; Pandey, S. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, 195, 356–383.