

基于表面增强拉曼光谱的结肠癌组织免疫分析

席刚琴¹ 陈燕坪^{2*} 陈刚³ 郑雄伟³ 冯尚源¹ 俞允¹ 林筱茜¹ 陈荣¹

¹福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007
²福建医科大学教学医院福建省肿瘤医院, 福建 福州 350014
³福建省肿瘤医院病理科, 福建 福州 350014

摘要 通过表面增强拉曼散射(SERS)标记抗体检测结肠癌组织切片上癌胚抗原(CEA)的表达,探讨 SERS 标记免疫检测技术用于临床分析结肠癌组织切片中蛋白质表达的可行性。采用种子生长法合成 Ag 壳 Au 核复合纳米粒子,将 4-巯基苯甲酸(4-MBA)作为标记分子吸附于纳米粒子表面,制备出 SERS 探针;再将这种探针与 CEA 单克隆抗体相结合形成 SERS 免疫探针;最后通过 SERS 标记的抗体与结肠癌组织切片上相应的抗原发生特异性结合,对滴加探针的组织切片进行 SERS 检测和成像。结肠癌腺上皮出现很强的 SERS 信号,而除了少数非特异性吸附产生的信号之外,间质及正常上皮中几乎不出现 SERS 信号。通过 SERS 成像可以清晰地看到结肠癌腺上皮显示红色,表明结肠癌腺上皮高表达 CEA,而间质及正常上皮几乎显示黑色和深蓝色,只有极个别点为红色,表明间质及正常上皮基本不表达 CEA。研究表明,SERS 标记抗体检测分析技术具有高灵敏度和高特异性,有望应用于结肠癌组织切片中蛋白质表达的分析,成为结肠癌辅助诊断的一种重要方法。

关键词 光谱学;表面增强拉曼散射;免疫分析;纳米粒子;表面增强拉曼散射成像;结肠癌;组织切片

中图分类号 R318.51;Q631 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201138.0904001

Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopic Assay of Immunohistochemically Stained Human Colon Cancer Tissue

Xi Gangqin¹ Chen Yanping² Chen Gang³ Zheng Xiongwei³ Feng Shangyuan¹
Yu Yun¹ Lin Xiaoqian¹ Chen Rong¹

¹Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Provincial Key Laboratory of Photonic Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China
²Teaching Hospital Fujian Provincial Tumor Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350014, China
³Pathology Department, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou, Fujian 350014, China

Abstract To explore the feasibility of surface-enhanced Raman scattering (SERS) labeled immunoassay technology for clinical analysis protein expression in colon cancer tissue sections, we develop 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) labeled Au/Ag core-shell nanoparticles (NPs) as assay platform for the detection of carcinoembryonic antigen (CEA) in colon cancer tissue samples. Firstly, Raman active molecule 4-MBA is adsorbed on Ag shell Au core bimetallic NPs, and then the SERS-tagged nanoprobe is modified with CEA monoclonal antibody, forming CEA-SERS probes. Finally, according to the theory of specific binding of SERS-tagged antibody and the corresponding antigen, SERS spectra and imaging are performed in tissue sections after dropping the SERS-tagged immuno-nanoprobe. Data show that colon cancer epithelium appears strong SERS signals, while stroma and normal epithelium do not appear SERS signals, except a few non-specific adsorption signals. As can be clearly seen from the SERS images, the colon cancer

收稿日期: 2011-04-14; **收到修改稿日期**: 2011-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(60778046,60910106016)、福建省科技项目(2008J0016,2009J01276)和卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划(WKJ2008-2-046)资助课题。

作者简介: 席刚琴(1986—),女,硕士研究生,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: piano_2005@163.com

导师简介: 陈荣(1950—),男,教授,博士生导师,主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: chenr@fjnu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: kelf2006@126.com

epithelium highly expresses CEA, while stroma and normal epithelium do not. In conclusion, due to high sensitivity and high specificity of SERS-tagged immuno-nanoprobes, the SERS labeled immunoassay technology is promising for the analysis of the protein expression in colon cancer tissue sections and has the potential to be developed into a significant aiding tool for pathological diagnosis of colon cancer.

Key words spectroscopy; surface-enhanced Raman scattering; immunoassay; nanoparticles; surface-enhanced Raman scattering imaging; colon cancer; tissue section

OCIS codes 140.3550; 170.6510; 180.5655; 240.6695

1 引 言

拉曼散射是光子非弹性散射,由于分子振动或转动能级跃迁产生,可以在分子水平分析生物组织、细胞的物质组成及含量变化。研究生物分子结构常用的激光拉曼光谱技术具有快速、无损、灵敏度高等特点,已成功应用于生命科学、生化材料以及药物的检测和分析^[1~5]。然而普通拉曼散射信号较弱。表面增强拉曼光谱(SERS)可使信号增强 $10^6 \sim 10^{14}$ 倍,具有极高的探测灵敏度和分辨率^[6,7],可实现单分子检测,目前已被广泛应用于人体组织、细胞、血液的检测分析,国内外相关课题组都开展了有意义的研究^[8~10]。

免疫检测技术作为一种有效的生物检测方法已被广泛应用。目前免疫组化是检测组织中蛋白质表达最常用的方法,它通过抗原和标记抗体的特异性结合来检测组织切片上的分析物,为临床提供重要的诊断和预后信息。常用的标记物有荧光染料、酶、放射性混合物等,但均有一定的局限性,如放射性标记物,具有放射性污染,对人体健康有损害;酶作为标记物,需要 3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐二水物(DAB)显色及复染,实验步骤繁琐,且 DAB 具有致癌性;荧光染料的谱峰较宽(大于 50 nm),分子间的信号会发生重叠,容易发生光漂白,灵敏度不高,实验步骤繁琐等^[11]。随着纳米技术的发展,出现了以 SERS 为基础的光学标记^[12~14],它是一类新的免疫标记物。与传统的荧光染料相比较,除了拉曼光谱的谱峰窄(小于 2 nm),具有高度的分子特征性之外,还有其独特的优势^[14],如,不发生光漂白,多种标记单一激发光源,易与背景自发荧光信号区分,灵敏度更高,选择性更强,操作更简便(无需二抗、显色)等,使其成为免疫检测理想的标记物。此外,拉曼探针的丰富性及非重叠性为多组分检测提供了可能^[11,15]。

近年来,SERS 标记的免疫检测已经成为生物医学领域研究的热点,尤其是肿瘤的诊断。2006 年,Schlücker 等^[16]首次采用 SERS 探针技术实现了原位检测人前列腺组织切片中的前列腺特异性抗

原(PSA)的表达,这为研究细胞及组织中蛋白质表达和空间分布提供了新颖的方法。在此基础上,研究人员采用抗体结合的复合有机-无机纳米粒子(COIN)在人前列腺组织切片中实现了 PSA 和 CK18 等多种抗原的多组分分析^[11],拓展了 SERS 免疫检测技术在肿瘤诊断上的应用价值。

结肠癌是世界上第三大恶性肿瘤,也是常见的消化道恶性肿瘤之一。每年约有 100 万的新增病例和超过 50 万的死亡病例。目前癌胚抗原(CEA)是唯一一个推荐用于结肠癌患者常规临床检测的分子标志物^[17],被广泛应用于结肠癌和其他胃肠道癌症的筛查,判断疗效,监测复发和转移。CEA 抗体具有较高的特异性,存在于某些恶性肿瘤组织(如结肠癌、胃癌等)中,在正常结肠组织中也有少量 CEA 存在。Ji 等^[18]研究表明,Ag 壳 Au 核复合纳米粒子粒径分布均匀,SERS 增强因子比 Au 高。目前,尚未见 SERS 免疫检测技术应用于结肠癌的研究报道。因此本文采用 4-巯基苯甲酸(4-MBA)标记的 Ag 壳 Au 核复合纳米粒子为 SERS 探针,检测结肠癌组织切片 CEA 的表达,并结合 SERS 成像技术,探讨 SERS 标记免疫检测技术用于临床分析结肠癌组织切片中蛋白质表达的可行性。

2 实验器材与方法

2.1 实验试剂和仪器

4-MBA、硝酸银(AgNO_3)、柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和氯金酸(HAuCl_4)均为分析纯化学用品,购自上海国药集团化学试剂有限公司;鼠 anti-CEA MAb(克隆号为 ZC23)购自福州中杉金桥生物技术有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自南京凯基生物科技发展有限公司;硼酸盐缓冲液(BBS, 2 mmol/L, pH 9.0)、氯化钠(NaCl)、磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2~7.4)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

实验均使用超纯水,由 MILLIPORE 公司的 Simplicity 水纯化系统制得,电阻率大于 18.0 $\text{M}\Omega/\text{cm}$;紫外/可见(UV-Vis)光谱测定采用

美国珀金埃尔默公司的 Lambda950 紫外/可见/近红外分光光度计;透射电子显微镜(Hitachi model H-800)用于观察纳米颗粒形貌;高速离心机(Sigma 2-16PK)用于样品的提纯;Renishaw inVia 型共焦显微拉曼光谱仪测量组织切片的拉曼光谱。

2.2 实验方法

2.2.1 SERS 标记抗体的制备

Ag 壳 Au 核纳米粒子制备是采用种子生长法合成的^[18]。首先采用 Frens^[19]的方法制备 Au 纳米粒子;然后取 5 mL 的 Au 纳米粒子加水至 100 mL 搅拌加热至沸腾后加入 1 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液,保持沸腾,然后每隔 5 min 加入 500 μL 的 AgNO_3 (浓度为 1.0×10^{-2} mol/L) 一共 10 次,自然冷

却,即得到 Ag 壳 Au 核复合纳米粒子。

往 10 mL Ag 壳 Au 核纳米粒子中加入 40 μL (浓度为 1.0 mmol/L) 4-MBA 分子,剧烈搅拌 12 h 后,4-MBA 分子通过羧基连接到金属表面^[18]。通过 10000 r/min 离心 10 min 去掉上清液,然后将吸附 4-MBA 分子的纳米粒子重悬于 BBS 缓冲液中,重复几次以便充分洗去游离的 4-MBA。接着加入 anti-CEA MAb (体积比 15 mL/L),室温下孵育 1 h,通过静电和疏水作用吸附到胶体表面^[20],离心去除未反应的抗体,再重悬于 BBS 缓冲液中。最后加入质量分数为 5% 的 BSA/PBS 封闭液室温下反应 1 h,离心弃上清液后重悬于 BBS 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 存放备用。图 1(a) 为 SERS 标记抗体制备的示意图。

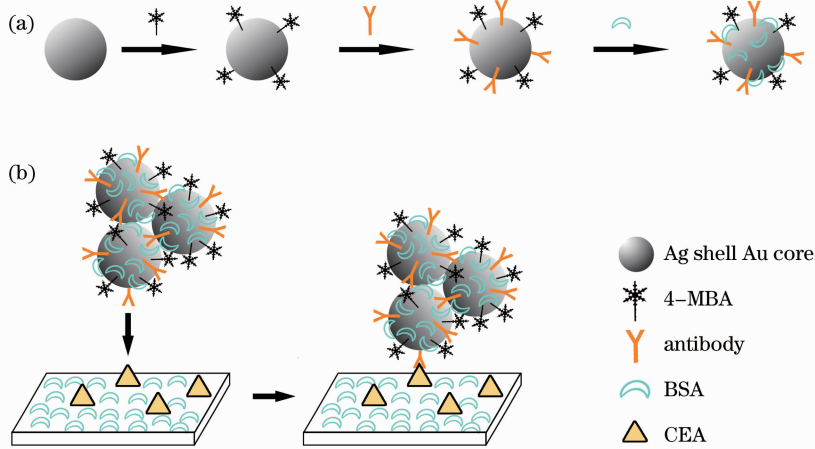


图 1 (a) SERS 标记纳米粒子的制备;(b)免疫反应过程

Fig. 1 (a) Preparation of SERS-tagged immunoprobes; (b) immunoassay protocol

2.2.2 组织切片的处理

将厚度约 4 μm 的甲醛固定石蜡包埋的结肠癌组织切片(结肠癌组织均来自于福建省肿瘤医院病理科)置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烤 2 h,然后经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,接着用 pH 值为 6.0 的枸橼酸钠缓冲液进行高压修复抗原,最后滴加 50 μL 的 BSA 封闭液,于室温孵育 30 min。

2.2.3 SERS 标记抗体与组织切片的免疫反应

将制备好的 SERS 标记抗体滴加到切片上,并将切片置于湿盒内室温下孵育 60 min,然后用 PBS 缓冲液和浓度为 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液冲洗切片,并用氮气吹干。如图 1(b) 所示,标记抗体与组织切片上的待测抗原发生特异性结合。

2.2.4 SERS 检测和成像

激发光波长 785 nm,激发光功率 5 mW,CCD 取谱时间 10 s,用 20 \times 物镜测量组织切片的 SERS 信号,对每条信号光谱的原始数据通过软件进行多项式拟合扣除荧光背景,从而获取 SERS 光谱。

SERS 成像是在组织切片上一定区域面积内进行逐点扫描,此区间上每个扫描点的间距是 1 μm (20 \times 20 个像点),然后根据所获取的 SERS 光谱的某个特征拉曼峰(1586 cm^{-1}) 的强度变化并利用拉曼光谱软件对 SERS 谱峰面积进行拟合获得 SERS 成像图,每个像点的特征拉曼峰的强度用不同的颜色表示,红色表示拉曼峰的强度最高,黑色代表拉曼峰的强度最低,从而构建出某种生化成分在组织切片上的空间分布图。实验共观察了 25 例结肠癌标本,每个标本重复实验 3 次,每例至少检测 10 个视野。

3 结果与讨论

3.1 SERS 标记纳米粒子的表征

图 2(a) 是 Ag 壳 Au 核复合纳米粒子的透射电镜(TEM)图。从图中可以清晰地看出核壳结构,Au 核的平均粒径约为 13 nm,Ag 壳厚度约 10 nm,整个复合结构的纳米粒子粒径约为 30 nm。

图 2(b)是经 4-MBA 修饰的核壳结构纳米粒子的 TEM 图,与图 2(a)相比,接上 4-MBA 后分散性降低。这说明加入 4-MBA 后纳米粒子在一定程度上发生聚集,但并没有出现团聚现象,这与加入 4-MBA 的浓度有关。经过多次实验表明 1 mL 纳米胶体溶液中加入 4 μ L 浓度为 1.0 mmol/L 4-MBA,

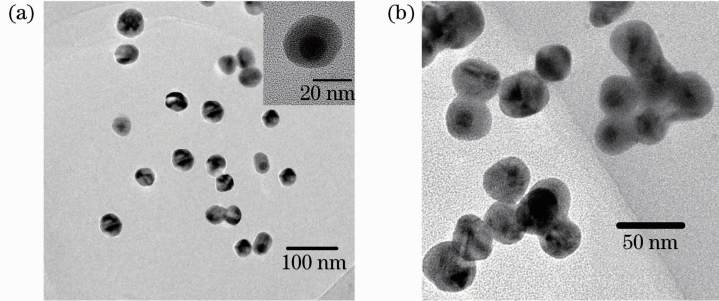


图 2 (a)金银核壳纳米粒子 TEM 图;(b)有 4-MBA 修饰的核壳纳米粒子 TEM 图

Fig. 2 (a) TEM micrograph of Au/Ag core-shell nanoparticles; (b) TEM image of composite nanoparticles with 4-MBA

图 3 是纯核壳结构纳米粒子和经 4-MBA 标记后的核壳结构纳米粒子紫外/可见吸收光谱。如图 3 所示,纯核壳结构纳米粒子的表面等离子体共振吸收峰为 395 nm,经 4-MBA 标记后的核壳结构纳米粒子表面等离子体共振吸收峰为 406 nm。这说明经 4-MBA 标记后的核壳纳米粒子的吸收峰发生了红移。4-MBA 吸附后,一方面核壳结构纳米粒子的粒径发生微小变化,引起纳米粒子等离子体共振吸收峰轻微红移,但长波方向并没有出现新的聚集体的吸收峰,说明纳米粒子没有发生明显团聚现象^[21];另一方面也使纳米粒子的吸光度降低了。图 2和图 3 都说明 4-MBA 使核壳结构纳米粒子发生了一定程度的聚集,但无明显团聚现象^[20]。

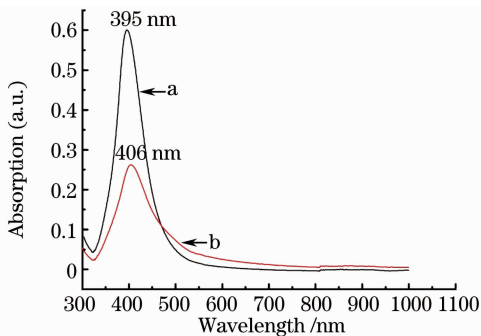


图 3 纯金银核壳纳米粒子 a 和经 4-MBA 修饰的金银核壳纳米粒子 b 的紫外/可见吸收光谱图

Fig. 3 UV-visible absorption spectra of pure Au/Ag core-shell nanoparticles colloid (a), and Au/Ag core-shell nanoparticles with 4-MBA (b)

3.2 SERS 免疫检测

为了说明以 4-MBA 标记以及抗体修饰过的

纳米粒子既不发生聚集,又能出现较强的 SERS 信号,并且也为下一步抗体结合留出一定空位^[21]。由于 SERS 信号的强弱可以反映待测抗原浓度的高低,因此如果在测量前,SERS 标记免疫探针颗粒发生团聚,无法清洗干净,那么虽然增强了 SERS 信号,但却无法准确地检测 CEA,将给测量造成误差。

SERS 免疫探针用于组织切片免疫检测的可行性,将这种探针滴加到结肠癌组织切片上检测结肠癌组织中 CEA 的表达。图 4(a)是结肠癌组织的某一范围的白光显微图,其中 E 是结肠癌腺上皮细胞,S 为间质,L 为腺腔。图 4(b)是癌旁正常组织的显微图。图 4(c)给出图 4(a)中 3 个不同区域的 SERS 光谱图,可以看到 E 区有很强的 SERS 信号,表明结肠癌腺上皮高表达 CEA;S 区基本不出现 SERS 信号,这是由于间质不表达 CEA,组织与探针之间不存在抗原抗体特异性的结合,因此测不到探针的信号,但偶尔会因为非特异性吸附,在间质中出现个别较弱的 SERS 信号;L 区基本没有探针的 SERS 信号,只有玻璃的背景信号(1365 cm^{-1})。图 4(d)是结肠癌组织的 SERS 成像图,从图中可以看出,红色区域是拉曼信号最强的地方,主要位于腺上皮,表明癌变的腺体高表达 CEA;黄色、绿色区域的信号相对较弱,位于腺体周边,说明 CEA 低表达;深蓝色、黑色区域几乎没有可靠的拉曼信号,说明腺腔、间质不表达 CEA,而间质中出现了少量的红点,可能是由于非特异性吸附所致(彩图见电子版)。从图 4(f)SERS 成像图与组织切片的叠加图,可以看出 SERS 成像图中 CEA 的表达模式与预期的表达模式基本一致。图 4(e)是癌旁正常组织的 SERS 成像图,可以看出正常的结肠组织几乎全部显示深蓝色及黑色,极少数为蓝色的点;从图 4(g)SERS 成像图与组织切片的叠加图也可以看出,CEA 在正常的结肠腺体中基本不表达。共观察了 25 例结肠癌标本,每个标本重复实验 3 次,每例至少检测 10 个视

野,发现结肠癌腺体上基本都有很强的探针信号,而间质、腺腔及正常结肠组织几乎没有拉曼信号,偶尔有个别正常腺体低表达 CEA。实验结果表明了 SERS 标记免疫纳米粒子检测结肠癌腺体中 CEA 的表达具有较高的灵敏性(结肠癌组织腺体几乎每一个点都有很强的 SERS 信号出现)和特异性(结肠

癌腺腔、间质以及正常结肠组织中几乎没有信号或者极少的非特异性吸附的 SERS 信号出现)。SERS 免疫检测结合 SERS 成像技术可以直观地看到结肠癌组织中 CEA 的表达及空间分布情况,这一新型的免疫检测技术有望应用于组织蛋白质表达的分析,为临床和科研提供准确的信息。

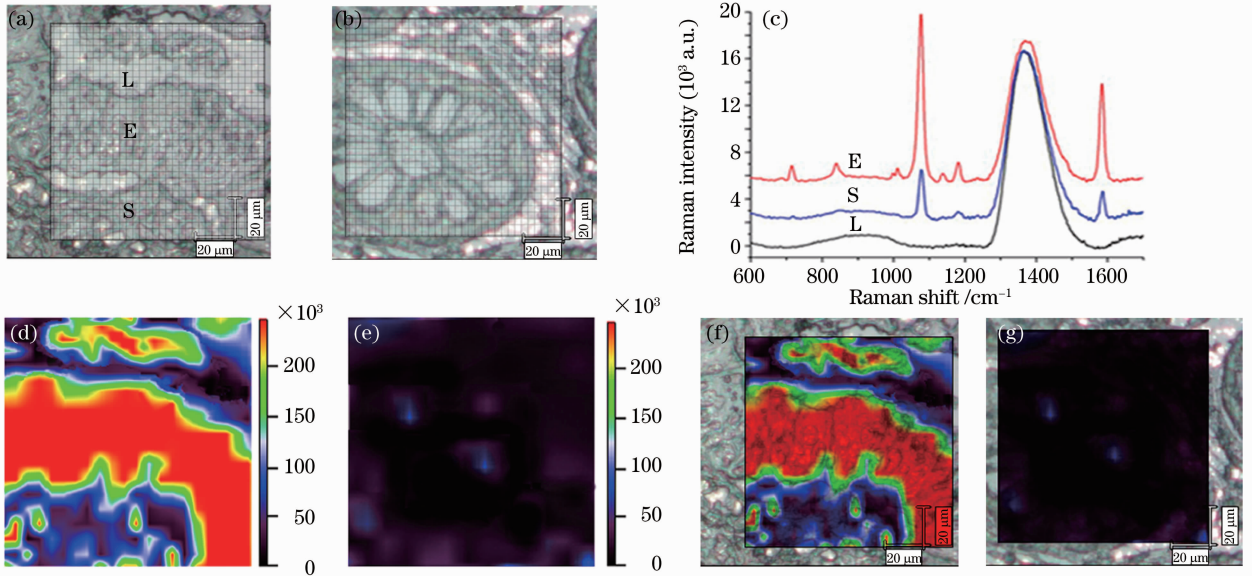


图 4 (a),(b)结肠癌组织和癌旁正常组织的某一区域的白光图;(c)对应(a)中不同区域的 SERS 图;(d),(e)结肠癌组织和正常组织的 SERS 成像图;(f),(g)结肠癌组织和正常组织的 SERS 成像图与白光图的叠加图

Fig. 4 (a), (b) Brightfield images of cancer and normal tissue sections; (c) SERS spectra from three regions of cancer tissue sections in (a); (d), (e) SERS images of cancer and normal tissue sections; (f), (g) overlay charts of SERS images and brightfield images of cancer and normal tissue sections

4 结 论

以 4-MBA 为标记分子,Ag 壳 Au 核复合纳米粒子为增强基底,开展了结肠癌组织切片上 CEA 表达的研究,并证实该新型结构具有较高 SERS 活性以及良好的灵敏性和生物特异性,可实现高效的 SERS 免疫检测。此外 SERS 成像技术能更直观、准确地观察结肠癌组织 CEA 的表达。SERS 标记的免疫检测技术以其简便、快速、高灵敏度及高特异性有望成为结肠癌临床病理诊断的重要辅助工具。

参 考 文 献

- 1 Feng Shangyuan, Chen Rong, Li Yongzeng *et al.*. Surface enhanced Raman spectroscopy of Dangshen decoction[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(1): 121~124
冯尚源, 陈 荣, 李永增 等. 党参煎剂表面增强拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2010, **37**(1): 121~124
- 2 Yang Changhu, Zeng Xiaoying, Yuan Jianhui *et al.*. Application of Raman spectrum in water quality analysis[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(8): 1169~1172
杨昌虎, 曾晓英, 袁剑辉 等. 激光拉曼光谱在水质分析中的应用[J]. *中国激光*, 2008, **35**(8): 1169~1172

- 3 Lin Wenshuo, Chen Rong, Li Yongzeng *et al.*. Near infrared Raman spectra analysis of rhizoma dioscoreae[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(5): 1095~1097
林文硕, 陈 荣, 李永增 等. 山药近红外拉曼光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(5): 1095~1097
- 4 Gao Zehong, Yu Jinggong, Liu Fuxiang *et al.*. Micro-Raman spectra for lipids C-H in colorectal tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 605~608
高泽红, 于晶功, 刘福祥 等. 结肠直肠癌组织中脂类伸缩振动的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2010, **37**(2): 605~608
- 5 L. Lyon, C. Keating, A. Fox *et al.*. Raman spectroscopy[J]. *Anal. Chem.*, 1998, **70**(12): 341~362
- 6 S. Feng, R. Chen, J. Lin *et al.*. Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**(11): 2414~2419
- 7 S. Feng, J. Lin, M. Cheng *et al.*. Gold nanoparticle based surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of cancerous and normal nasopharyngeal tissues under near-infrared laser excitation [J]. *Appl. Spectrosc.*, 2009, **63**(10): 1089~1094
- 8 Han Hongwen, Yan Xunling, Ban Ge *et al.*. Surface-enhanced Raman spectra analysis of serum from diabetes mellitus and complication[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1122~1125
韩洪文, 闫循领, 班 戈 等. 糖尿病及并发症血清的表面增强拉曼光谱[J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1122~1125
- 9 J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig *et al.*. Following the dynamics

- of pH in endosomes of live cells with SERS nanosensors[J]. *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**(16): 7421~7426
- 10 Liu Renming, Zi Xingfa, Wu Yanchun *et al.*. Studies and preparation of surface enhanced Raman scattering substrate of two-dimensional silver nanofilms[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2657~2661
刘仁明, 自兴发, 武延春 等. 二维纳米结构银膜表面增强拉曼散射基底的制备与研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2657~2661
- 11 L. Sun, K. Sung, C. Dentinger *et al.*. Composite organic-inorganic nanoparticles as Raman labels for tissue analysis[J]. *Nano Lett.*, 2007, **7**(2): 351~356
- 12 S. Xu, X. Ji, W. Xu *et al.*. Surface-enhanced Raman scattering studies on immunoassay[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2005, **10**(3): 031112
- 13 J. Gong, J. Jiang, H. Yang *et al.*. Novel dye-embedded core-shell nanoparticles as surface-enhanced Raman scattering tags for immunoassay[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2006, **564**(2): 151~157
- 14 Guo Hongyan, Lu Linghui, Wu Chao *et al.*. SERS tagged gold nanorod probes for immunoassay application[J]. *Acta Chim. Sinica*, 2009, **67**(14): 1603~1608
郭红燕, 芦玲慧, 吴超 等. SERS 标记的金纳米棒探针用于免疫检测[J]. *化学学报*, 2009, **67**(14): 1603~1608
- 15 Ge Ming, Bao Fang, Yao Jianlin *et al.*. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to multiplex labelled-immunoassay [J]. *Acta Chim. Sinica*, 2009, **67**(20): 2285~2289
葛明, 鲍芳, 姚建林 等. 表面增强拉曼光谱应用于标记免疫多组分检测[J]. *化学学报*, 2009, **67**(20): 2285~2289
- 16 S. Schlücker, B. Küstner, A. Punge *et al.*. Immuno-Raman microspectroscopy: in situ detection of antigens in tissue specimens by surface-enhanced Raman scattering[J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2006, **37**(7): 719~721
- 17 Tang Sumei, Yang Tiesheng. Colon cancer related tumor markers and clinical significance [J]. *Chin. J. Lab. Diagn.*, 2009, **13**(8): 1128~1133
唐素玫, 杨铁生. 结肠癌相关肿瘤标志物及临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2009, **13**(8): 1128~1133
- 18 X. Ji, S. Xu, L. Wang *et al.*. Immunoassay using the probe-labeled Au/Ag core-shell nanoparticles based on surface-enhanced Raman scattering [J]. *Colloids and Surfaces A*, 2005, **257-258**: 171~175
- 19 G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. *Nature Phys. Sci.*, 1973, **241**(105): 20~22
- 20 S. Xu, X. Ji, W. Xu *et al.*. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering [J]. *The Analyst*, 2004, **129**(1): 63~68
- 21 C. Song, Z. Wang, R. Zhang *et al.*. Highly sensitive immunoassay based on Raman reporter-labeled immuno-Au aggregates and SERS-active immune substrate [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**(4): 826~831