

# 基于 SERS 光谱技术的甲胎蛋白超灵敏定量检测

王廷银<sup>1</sup>, 王运燚<sup>2</sup>, 林学亮<sup>2</sup>, 许云超<sup>2</sup>, 林惠晶<sup>2</sup>, 刘晓坤<sup>2</sup>, 冯尚源<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>福建师范大学光电与信息工程学院, 福建 福州 350007;

<sup>2</sup>医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

**摘要** 将二维表面增强拉曼(SERS)增强基底与甲胎蛋白适配体相结合,开展甲胎蛋白(AFP)超灵敏定量检测。通过修饰有甲胎蛋白适配体的二维 SERS 基底和修饰有适配体互补序列的银纳米粒子间的碱基互补配对耦联来构筑纳米间隙 SERS“热点”。该适配体互补序列修饰有拉曼信号标记分子 ROX, AFP 的加入会破坏这种纳米间隙“热点”结构,导致标记分子 SERS 信号强度减弱,根据 ROX 的 SERS 光谱信号变化工作曲线实现对 AFP 的超灵敏定量检测。这种检测方法的检测限为 145 fg/mL,较传统临床检测方法提高了一个数量级,此外,设计的这种 AFP SERS 探针具有良好的特异性与抗干扰性能。研究结果表明提出的新型检测方法很有可能为准确检测 AFP 提供一种快速、有效的分析手段。

**关键词** 生物光学; 甲胎蛋白; 适配体; 表面增强拉曼光谱; 超灵敏检测

中图分类号 140.3025

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207026

## Ultrasensitive Quantitative Detection of Alpha-Fetoprotein Based on SERS Spectroscopy

Wang Tingyin<sup>1</sup>, Wang Yunyi<sup>2</sup>, Lin Xueliang<sup>2</sup>, Xu Yunchao<sup>2</sup>,  
Lin Huijing<sup>2</sup>, Liu Xiaokun<sup>2</sup>, Feng Shangyuan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350007, China

**Abstract** In this paper, the ultrasensitive detection of an alpha-fetoprotein (AFP) is performed using a combination of two-dimensional (2D) surface-enhanced Raman scattering (SERS) and an AFP aptamer. We construct SERS "hot spots" through complementary base-pairing between substrates modified with AFP aptamer and silver nanoparticles modified with aptamer complementary sequence. The complementary adaptor sequence is also modified using Raman signal labeled molecule ROX, but the addition of the AFP damages the structure of nano-gap "hot spots", resulting in a decrease in intensity of the SERS signal. The ultrasensitive quantitative detection of AFP is realized using the changed working curve of the SERS signal of ROX. The detection limit of this method is 145 fg/mL, which is one order of magnitude higher than that of the traditional clinical detection method. The designed AFP SERS probe also exhibits good specificity and anti-interference ability. These results show that this new approach may provide a rapid and effective method for the accurate detection of AFP.

**Key words** bio optics; alpha-fetoprotein; aptamer; surface-enhanced Raman spectroscopy; ultrasensitive detection

**OCIS codes** 170.0170; 140.0140

## 1 引 言

甲胎蛋白(AFP)是白蛋白家族中的一种糖蛋

白,甲胎蛋白主要在胎儿肝细胞和卵黄囊中合成<sup>[1]</sup>。人出生后体内的甲胎蛋白含量减少,在血液中一般检测不出,所以认为健康成人体内的甲胎蛋白含量

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-04; 录用日期: 2019-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(61975031, U1605253, U1805263, 81741008)、中国教育部创新团队发展计划(IRT15R10)、福建省自然科学基金(2018J01786)、福建省引导性项目(2019H0009)

\* E-mail: syfeng@fjnu.edu.cn

非常低。研究表明,甲胎蛋白具有运输功能、调节功能和免疫功能等。最重要的是,甲胎蛋白与多种癌症相关性很高,据文献报道甲胎蛋白含量与一些癌症的产生和转移密切相关,这些癌症病人体内的甲胎蛋白含量相比正常人显著增多。甲胎蛋白除了与原发性肝癌相关,与卵巢卵黄囊肿瘤<sup>[2]</sup>、胃癌和结肠癌等疾病也有很强的相关性<sup>[1]</sup>。目前,已将甲胎蛋白作为原发性肝癌(PHC)的重要诊断标志物,主要是检测血液中甲胎蛋白的浓度。由于胎儿的肝细胞可以合成甲胎蛋白,合成的甲胎蛋白从胎儿排泄物经羊水扩散进入母体的血液中,因此母体血液中的甲胎蛋白含量也可以作为胎儿健康情况的指标之一。研究表明,母体甲胎蛋白含量可以作为胎儿年龄评价<sup>[3]</sup>、妊娠情况评估<sup>[4]</sup>的指标。因此,甲胎蛋白作为肿瘤标志物或疾病标志物有着重要的临床研究价值和意义。

目前,甲胎蛋白的检测方法主要包括化学发光免疫分析法(CLIA)<sup>[5]</sup>、时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)<sup>[6]</sup>、放射免疫分析法(RIA)<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附法(ELISA)<sup>[8]</sup>和比色法<sup>[9]</sup>。这些检测方法具有特异性弱、灵敏度低、仪器成本昂贵、检测时间久等缺点,这限制了它们在临床上的应用,因为在实际应用中病人血液样品数目多、甲胎蛋白含量低,需要大范围定时筛查。因此,迫切需要发展一种快速、灵敏、特异性强的检测方法。这在原发性肝癌等癌症的早期检测、癌症预后、癌症转移等方面具有较高的应用价值和意义。

表面增强拉曼(SERS)光谱最早是 Fleischmann 等<sup>[10]</sup>发现的,他们发现吡啶吸附在粗糙的银电极后其拉曼信号获得了极大的增强。后来,学界把这种现象产生的原因归为两种增强机制:电磁场增强和电荷转移增强<sup>[11]</sup>,其中电磁场增强占大部分。拉曼散射本身包含有分子的振动和转动信息,在这种信号增强的机制下,使得 SERS 光谱灵敏度更高、检测限更低、检测耗时更短。因此,SERS 光谱检测被广泛应用于痕量检测<sup>[12-13]</sup>、生物传感<sup>[14-19]</sup>、化学检测<sup>[20]</sup>、考古研究<sup>[21]</sup>和地质勘察<sup>[22]</sup>等领域。并且 SERS 光谱技术具有快速、操作简单、谱峰尖锐、特异性强等优点,在某些情况下甚至能够实现单分子或单颗粒的检测<sup>[23]</sup>。通过组装纳米粒子合理构筑 SERS 热点来提高 SERS 光谱检测和成像的灵敏度、稳定性及重现性,这是将 SERS 应用推向

于临床的关键一步。

核酸适配体是一类可与蛋白等分子特异性结合的 DNA 或 RNA 单链<sup>[24-25]</sup>,甚至有些适配体与蛋白分子的亲和力强于蛋白分子抗原抗体间的结合力。核酸适配体主要通过指数富集系统(SELEX)筛选出特异性强的短序列。它有特异性强、重现性好、能大规模人工合成、成本低、易于修饰等优点,可与 SERS 相结合,从而设计出多种灵敏的生物传感器。

本文将银纳米粒子(AgNPs)组装在氨基化的二氧化硅片上,构建二维 SERS 基底,然后通过巯基将甲胎蛋白适配体修饰在二维 SERS 基底上,将甲胎蛋白适配体的互补序列修饰在另外一批银纳米粒子上,甲胎蛋白适配体的互补序列上同时修饰了拉曼信号标记分子罗丹明(ROX)。两个序列通过碱基互补配对,这使得 ROX 处于两个银纳米粒子之间形成的“热点”位置上,使其拉曼光谱信号大大增强。此时加入甲胎蛋白,它会和适配体发生特异性结合,使得纳米球间隙中的“热点”结构被破坏,ROX 的 SERS 信号强度减小,根据 ROX 的 SERS 信号强度随加入甲胎蛋白浓度增加而减小的变化规律实现对甲胎蛋白的超灵敏定量检测。

## 2 材料与方 法

### 2.1 试剂与仪器

硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )、硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )、无水乙醇( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )、盐酸( $\text{HCl}$ )购于国药集团化学试剂有限公司,硅烷偶联剂( $\gamma$ -氨丙基三乙氧基硅烷)购于山东优索化工科技有限公司,4-巯基苯甲酸(4-MBA)购于上海麦克林生化科技有限公司,二水合柠檬酸钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、30%过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )购于西陇科学股份有限公司,三(2-羧乙基)膦(TCEP)、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,6-巯基-1-己醇(MCH)购于百灵威科技有限公司,二氧化硅片购于江苏飞舟玻塑有限公司,甲胎蛋白、癌胚抗原(CEA)、酪氨酸酶抗原(TYR)购于上海领潮生物科技有限公司,牛血清白蛋白(BSA)购于厦门鹭隆生物科技发展有限公司,本文实验用到的 DNA 序列购于上海生工生物工程股份有限公司,序列详见表 1,加粗部分是互补序列。所用拉曼光谱仪为 Renishaw inVia Raman 显微光谱仪,所用激光器为 785 nm 半导体激光器。

表 1 甲胎蛋白适配体和适配体互补序列对应的碱基序列

Table 1 Base sequences of alpha-fetoprotein aptamer and complementary sequence of the aptamer

DNA	Sequence(5' to 3')
Alpha-fetoprotein aptamer	SH-GTGACGCTCCTAACGCTGACTCAGGTGCAGTTCTCGACTCG GTCTTGATGTGGGTCTCTGTCGTCGGAACCAATC
Complementary sequence of the aptamer	SH-GATTGGTTCGGACGGACAGGACCCA-ROX

### 2.2 银纳米粒子合成

本文使用 Lee 等<sup>[26]</sup>通过柠檬酸钠还原硝酸银制备胶体银的经典方法进行银纳米粒子的制备。具体来说,将 100 mL 的  $\text{AgNO}_3$  溶液(1 mmol/L)剧烈搅拌且加热,等溶液沸腾后加入 3 mL 的质量分数为 1% 的柠檬酸钠溶液,待液体沸腾持续加热搅动 60 min,得到黄绿色的银胶溶液。然后对新制得的银胶多次进行分步离心、分离重悬,最后置于冰箱(4 °C)保存备用。

### 2.3 二维 SERS 基底的制备

如图 1 所示,首先把二氧化硅片裁剪成合适的大小,然后分别用无水丙酮、无水乙醇和超纯水超声

清洗二氧化硅片,各 10 min 左右。取出后干燥,再将二氧化硅片浸泡在新配制的食人鱼(Piranha)溶液(浓硫酸和 30% 过氧化氢按 7:3 体积比例配制的混合液)中,加热到 150 °C 后保持 30 min。等待溶液冷却后,将二氧化硅片取出干燥,即完成了二氧化硅片的表面羟基化。将表面羟基化的二氧化硅片浸泡在有 150  $\mu\text{L}$  硅烷偶联剂的 150 mL 乙醇溶液中,静置 12 h,即完成表面氨基化。再将上述二氧化硅片晾干后放入超纯水中浸泡 8 h,完成硅烷偶联剂氨基基团的质子化。取新合成银纳米粒子 1000  $\mu\text{L}$ ,将质子化后的二氧化硅片在银纳米粒子中浸泡 4 h,然后取出用超纯水清洗。

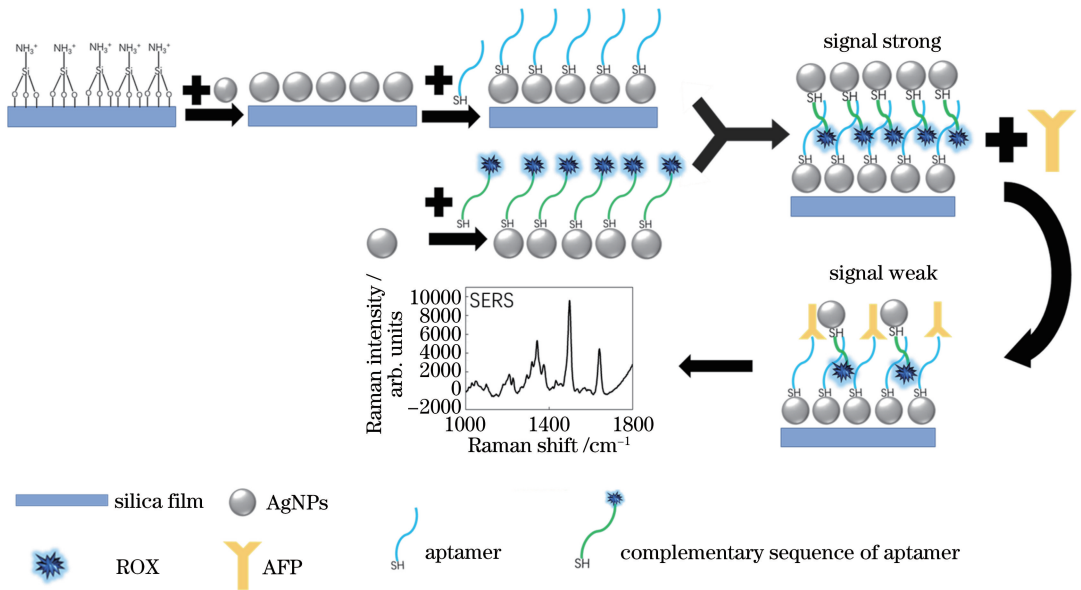


图 1 甲胎蛋白 SERS 光谱检测示意图

Fig. 1 Schematic of SERS spectrum detection of AFP

### 2.4 甲胎蛋白 SERS 传感器的组装

将甲胎蛋白适配体和适配体互补序列分别组装在二维 SERS 基底和银纳米粒子上,参考 Liu 等<sup>[27]</sup>的组装方法。具体来说,就是将甲胎蛋白适配体和适配体互补序列分别加入超纯水中配制成浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  的溶液,将 100  $\mu\text{L}$  甲胎蛋白适配体溶液与二维 SERS 基底放到离心管中浸泡在一起,将 150  $\mu\text{L}$  适配体互补序列溶液与银纳米粒子在离心管中混合在一起,然后同时放置在冰箱(-20 °C)

中,2 h 后取出,等其融化。融化后向各个离心管加入 150  $\mu\text{L}$  6-巯基-1-己醇,反应 2 h。最后,将甲胎蛋白适配体产物和适配体互补序列产物在 95 °C 下水浴 5 min,然后将两者混合反应 4 h。

### 2.5 甲胎蛋白定量检测及特异性分析

如图 1 所示,分别配制 100  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\text{ng/mL}$ 、10  $\text{ng/mL}$ 、1  $\text{ng/mL}$ 、100  $\text{pg/mL}$ 、10  $\text{pg/mL}$ 、1  $\text{pg/mL}$  的甲胎蛋白溶液,然后分别各取 150  $\mu\text{L}$  甲胎蛋白溶液加入到 2.4 节

的甲胎蛋白 SERS 传感器中,对照组采用 PBS 缓冲液,反应 4 h,取出干燥,进行 SERS 光谱检测。分别配制 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲胎蛋白溶液、癌胚抗原溶液、酪氨酸酶抗原溶液和牛血清溶液,对照组采用 PBS 缓冲液,各取 150  $\mu\text{L}$  加入到 2.4 节的甲胎蛋白 SERS 传感器中,反应 4 h 后取出干燥,然后进行 SERS 光谱检测。每个浓度下需要检测 SERS 基底上的 15 个位点,然后取平均值。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 合成的银纳米粒子的表征

先将新合成的银纳米粒子稀释,再使用紫外-可见吸收光谱仪采集光谱,得到的结果如图 2(a) 所示。由图 2(a) 可以看出,本文所合成的银纳米粒子的等离激元共振(LSPR)峰在 412 nm 处。将银纳米粒子滴在铜网上,观察其形态,透射电镜图如图 2

(b) 所示。从图 2(b) 中可以看出,银纳米粒子的直径为  $(115 \pm 15)$  nm,形态较为均匀,大小相近,和先前的文献[28]报道的相符。

#### 3.2 二维 SERS 基底的表征

银纳米粒子在二氧化硅片上组装完成后,喷金,放入扫描电镜下观察形态。从图 3(a) 中可以看出,银纳米粒子表面带有同种电性的电荷,彼此之间相互排斥,分散地分布在二氧化硅片上,保持一定的间距。这样减少了纳米粒子聚集,使得银纳米粒子被较为均匀地组装在二氧化硅片上,提高了二维 SERS 基底的重现性和稳定性。同时,由于银纳米粒子与氨基化二氧化硅片共同孵育时,银纳米粒子是过量的,因此银纳米粒子在这种氨基化程度的二氧化硅片上的组装密度是最大的。从图 3(a) 的扫描电镜(SEM)图上也可以看出这样情况下银纳米粒子的组装密度比较大。

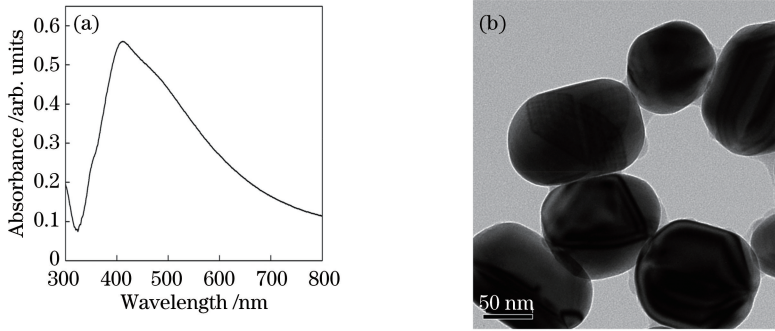


图 2 银纳米粒子的表征结果。(a)紫外-可见吸收光谱;(b)透射电镜图

Fig. 2 Characterization results of AgNPs. (a) Absorption spectrum in ultraviolet and visual band; (b) transmission electron micrograph

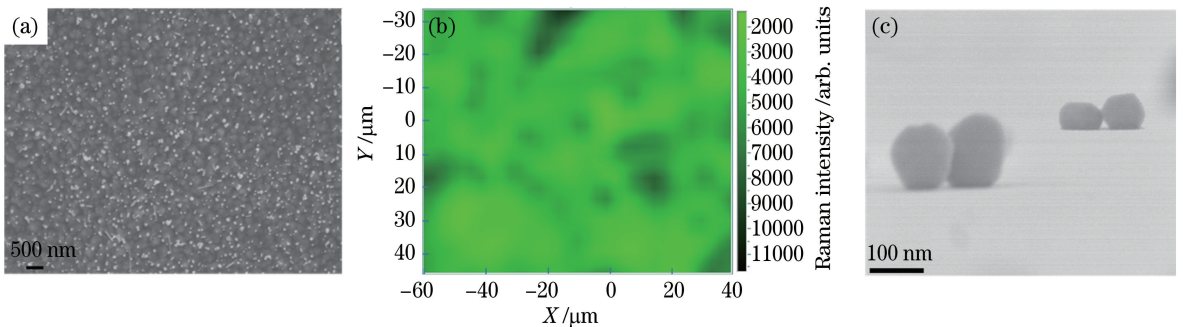


图 3 甲胎蛋白 SERS 传感器的组装表征结果。(a)组装在二氧化硅片上的银纳米粒子的 SEM 图;

(b)吸附在二维 SERS 基底上的 4-巯基苯甲酸的拉曼成像图;(c)二氧化硅片上两个耦合的银纳米粒子的侧面 SEM 图

Fig. 3 Assembly characterization results of AFP SERS sensor. (a) SEM image of silver nanoparticles assembled on silicon dioxide sheets; (b) Raman mapping of 4-mercapto benzoic acid absorbed on 2D SERS substrate; (c) side-SEM image of two coupled silver nanoparticles on a silica sheet

#### 3.3 二维 SERS 基底的灵敏性和重现性

为探究二维 SERS 基底的灵敏性,选用 4-巯基苯甲酸作为信号分子,将 4-巯基苯甲酸溶液滴于

SERS 基底上,孵育 4 h 后进行 SERS 光谱检测。配制了 10 种不同浓度的 4-巯基苯甲酸溶液,各取 1 mL。测得的光谱如图 4(a) 所示,4-巯基苯甲酸溶

液的 SERS 信号强度随着浓度的升高而升高。再将 SERS 信号强度与 4-巯基苯甲酸浓度的对数作了线性拟合[图 4(b)],发现拟合效果良好,相关系数  $R^2 = 0.949$ ,得到的线性回归方程为  $I = 3867.76841 \times \lg(C_{4MBA}) + 44436.80862$ 。其中  $I$  为

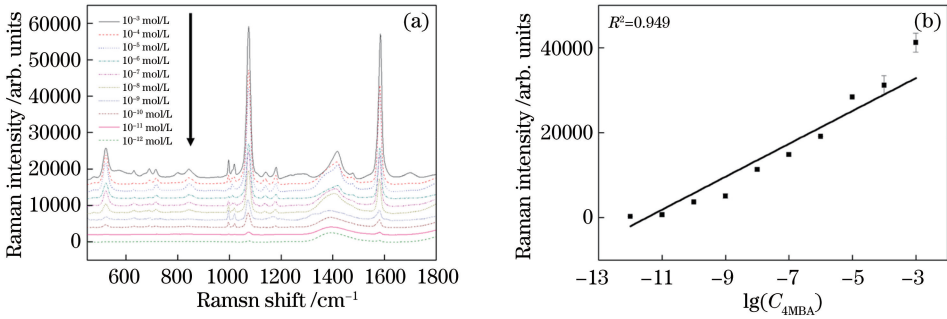


图 4 二维 SERS 基底的灵敏度检测结果。(a)不同浓度的 4-巯基苯甲酸的 SERS 光谱图；  
(b) 4-巯基苯甲酸的浓度对数与其 1075  $\text{cm}^{-1}$  谱峰处 SERS 信号强度的工作曲线

Fig. 4 Sensitivity detection results of 2D SERS substrates. (a) SERS spectra of 4-MBA with different concentrations; (b) SERS intensity at the peak of 1075  $\text{cm}^{-1}$  versus the logarithm of concentration of 4-MBA

4-巯基苯甲酸可以通过巯基形成的 Ag—S 键修饰在二维 SERS 基底上,通过 4-巯基苯甲酸溶液的光谱信号的重现性和均匀性来表征制备得到的二维 SERS 基底的重现性和均匀性。4-巯基苯甲酸组装完成后,在二维 SERS 基底上随机选取约  $80 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  的区域进行拉曼映射,得到的结果如图 3(b)所示,选取的信号通道为 4-巯基苯甲酸光谱的 1075  $\text{cm}^{-1}$  特征峰。4-巯基苯甲酸在二维 SERS 基底上分布得较为均匀,也证实了二维 SERS 基底材料较为均匀。统计 1075  $\text{cm}^{-1}$  特征峰的信号强度,计算得出其相对标准偏差 (RSD) 为 17.5472%,说明二维 SERS 基底具有较好的重现性。

### 3.4 甲胎蛋白定量检测及特异性分析

当甲胎蛋白适配体和适配体互补序列都已经组装在 SERS 基底上后,向体系中加入不同质量浓度的甲胎蛋白,现在临床上认为血清甲胎蛋白含量正常参考值为  $< 25 \text{ ng/mL}$ <sup>[31]</sup>。甲胎蛋白适配体和适配体互补序列之间互补部分的碱基数目为甲胎蛋白适配体的 1/3,甲胎蛋白适配体会有较长的黏性末端,处于亚稳状态。甲胎蛋白加入后会和甲胎蛋白适配体发生特异性结合,适配体互补序列被置换下来,信号分子 ROX 的 SERS 光谱信号减小。因为在甲胎蛋白适配体和适配体互补序列的体系中,ROX 处于两个银纳米粒子的纳米间隙(约 25.5 nm, 1 bp 约等于 0.34 nm, bp 为碱基

1075  $\text{cm}^{-1}$  峰处的 SERS 信号强度,1075  $\text{cm}^{-1}$  峰可归属为 4-巯基苯甲酸的 C = O 伸缩振动模式<sup>[29]</sup>,  $\lg(C_{4MBA})$  为 4-巯基苯甲酸溶液浓度的对数。参考先前文献<sup>[30]</sup>的检测限计算方法,经计算,这种检测方法的浓度检测限约为 850 fmol/L。

对)中,如图 3(c)所示。两个纳米球和纳米球间形成的纳米间隙能构成 SERS“热点”结构,在热点中有非常强的电磁场增强效应,因此在热点中的拉曼标记分子的信号非常强。当甲胎蛋白加入后,这样的纳米间隙结构被破坏,导致 ROX 的 SERS 光谱信号减小。加入不同质量浓度的甲胎蛋白,ROX 的 SERS 光谱信号减弱程度自然会不一样。用  $\Delta I$  来表示 ROX SERS 信号强度减少值,实验结果如图 5 所示。需要指出的是,这里用的二维 SERS 基底和灵敏性检测的基底不是同一批。向相同条件体系中各加入 150  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的甲胎蛋白。从图 5(a)中可以看出,随着质量浓度的增加,ROX 的 SERS 信号强度逐渐减弱。选取 ROX 的 1645  $\text{cm}^{-1}$  特征峰作分析,其中 1345, 1503, 1645  $\text{cm}^{-1}$  谱峰可归属为 ROX 的环 C—C 的伸缩振动<sup>[32]</sup>。对未加甲胎蛋白的对照组和各个甲胎蛋白质量浓度下 ROX 的 1645  $\text{cm}^{-1}$  特征峰强度求差值,得到  $\Delta I$ 。对信号减少值  $\Delta I$  与甲胎蛋白浓度的对数  $\lg(C_{AFP})$  作线性拟合,结果如图 5(b)所示,拟合相关系数为  $R^2 = 0.922$ ,线性关系为  $\Delta I = 481.54316 \cdot \lg(C_{AFP}) + 6216.03242$ 。参考先前文献<sup>[30]</sup>的检测限计算方法,经计算分析与实验验证,这种方法的甲胎蛋白质量浓度检测限 (LOD) 约为 145  $\text{fg/mL}$ ,和前面提到的临床上常见的传统检测甲胎蛋白的方法相比,检测限提高了一个数量级<sup>[7]</sup>。

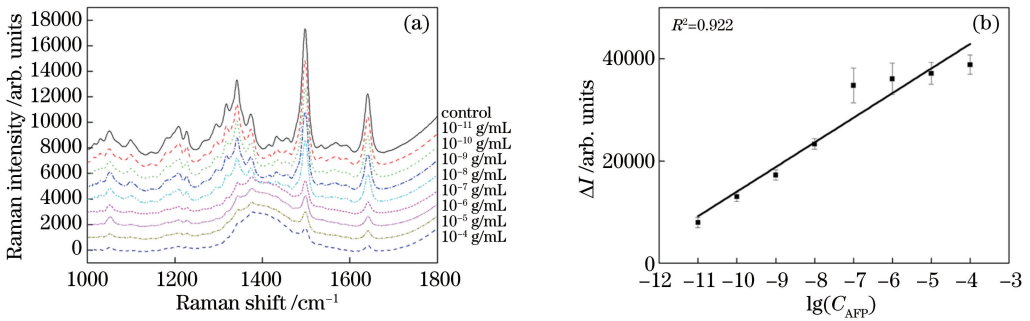


图 5 甲胎蛋白检测结果。(a)不同质量浓度的甲胎蛋白作用下的 ROX SERS 光谱图；  
(b)甲胎蛋白质量浓度对数与 1645 cm<sup>-1</sup> 谱峰处 ROX SERS 光谱强度之间的线性关系

Fig. 5 AFP test results. (a) ROX SERS spectra with different AFP mass concentrations; (b) linear relationship between logarithm of AFP mass concentration and intensity of ROX SERS spectrum at 1645 cm<sup>-1</sup>

为了验证所设计的甲胎蛋白 SERS 传感器的特异性以及抗干扰能力,分别向组装好的 SERS 传感器中加入等质量的甲胎蛋白、BSA、CEA、TYR 以及 PBS 缓冲液,培养 4 h 后,进行 SERS 光谱检测,检测结果如图 6 所示。通过观察拉曼标记分子 ROX 的 SERS 信号强度变化发现:加入 BSA、CEA、TYR 后检测到的 ROX 拉曼信号强度基本上和对照组相

同,即以上三组干扰组和对照组 ROX 的 1503 cm<sup>-1</sup> 谱峰信号强度基本相同;而加入甲胎蛋白后检测到标记分子 ROX 的 SERS 信号强度变成很低。因此验证了本文所设计的甲胎蛋白 SERS 传感器具有特异性与抗干扰能力。这样的结果得益于甲胎蛋白适配体与甲胎蛋白之间的特异性吸附能力以及良好的亲和力。

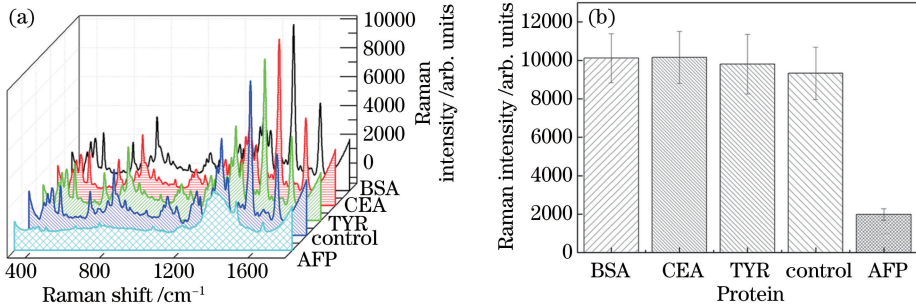


图 6 特异性检测结果。(a)甲胎蛋白特异性检测 SERS 光谱图；  
(b)加入等量的不同蛋白后 ROX 1503 cm<sup>-1</sup> SERS 信号谱峰强度变化

Fig. 6 Specificity test results. (a) SERS spectra of AFP specific detection; (b) intensity variation of SERS signal peak of ROX at 1503 cm<sup>-1</sup> after adding equal amount of different proteins

## 4 结 论

本文将银纳米粒子连接在修饰有硅烷偶联剂的二氧化硅片上,作为本文实验的二维 SERS 增强基底,并对其形貌、灵敏度、重现性进行了表征,发现这些性能较好,并将其运用在甲胎蛋白的检测上。通过将甲胎蛋白适配体和适配体互补序列组装在二维 SERS 基底和银纳米粒子上来组装本文的甲胎蛋白 SERS 检测传感器,同时形成“热点”结构,纳米间隙的长度约为 25.5 nm,通过加入不同浓度的甲胎蛋白与传感器反应,得到不同的 SERS 信号。这种检测方法的检测限为 145 fg/mL,较传统检测方法提高了一个数量级,而且这种检测方法具有良好的特

异性与抗干扰能力。本文方法有望运用于血液中甲胎蛋白含量的检测。

## 参 考 文 献

[1] Zhou X P, Zhang L. Progress in detection and clinical application of serum AFP[J]. Internal Medicine of China, 2015, 10(2): 264-266.  
周晓萍, 张玲. 血清甲胎蛋白检测方法及应用研究进展[J]. 内科, 2015, 10(2): 264-266.

[2] Guo Y L, Zhang Y L, Zhu J Q. Prognostic value of serum  $\alpha$ -fetoprotein in ovarian yolk sac tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. Molecular and Clinical Oncology, 2015, 3(1): 125-132.

[3] Wan X H, Wen J P, Song X. Analysis of AFP,  $\beta$ -

- hCG and uE3 levels in pregnant women during normal singleton pregnancy and twin pregnancy[J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2011, 26(36): 5750-5751.
- 万晓华, 文江平, 宋新. 正常单胎妊娠与双胎妊娠孕妇孕中期 AFP、 $\beta$ -hCG 和 uE3 水平分析[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(36): 5750-5751.
- [4] He S Q. Study of serum AFP level with pregnant women[J]. *China Modern Doctor*, 2010, 48(7): 28-29.
- 何素琼. 156 例孕妇血清 AFP 水平研究[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(7): 28-29.
- [5] Wang Y H. Comparison of clinical effects of different serological tests for alpha-fetoprotein[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2012, 9(5): 598-599.
- 王燕华. 甲胎蛋白不同血清学检测方法的临床效果比较[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(5): 598-599.
- [6] Yang F A, Lin R J, Ru L J, et al. Comparison of the efficacy of time-resolved fluorescence immunoassay and radioimmunoassay for detection of  $\alpha$ -fetoprotein [J]. *Journal of Guangdong Medical College*, 2009, 27(4): 391-392.
- 杨凤爱, 林荣军, 茹辽金, 等. 时间分辨荧光免疫分析法与放射免疫分析法检测甲胎蛋白的效能比较[J]. *广东医学院学报*, 2009, 27(4): 391-392.
- [7] Chen H W, Wu Y. Determination of serum  $\alpha$ -fetoprotein by TRFIA, RIA and ELISA[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2008, 33(5): 629-630, 640.
- 陈海蔚, 伍勇. 3 种不同方法检测甲胎蛋白的比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(5): 629-630, 640.
- [8] Chen W W, Liu X H, Wu L M, et al. The comparability of AFP in health with different method [J]. *Medical Innovation of China*, 2013, 10(16): 67-68.
- 陈卫文, 刘雪辉, 吴丽美, 等. 不同方法检测正常人群血清甲胎蛋白比较[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(16): 67-68.
- [9] Huang X H. Explore the gold standard method and immune chemiluminescence detection of AFP in healthy application [J]. *Guide of China Medicine*, 2013, 11(24): 34-35.
- 黄晓华. 探讨金标法和免疫发光法检测甲胎蛋白在健康体检中的应用[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(24): 34-35.
- [10] Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26(2): 163-166.
- [11] Morton S M, Ewusi-Annan E, Jensen L. Controlling the non-resonant chemical mechanism of SERS using a molecular photoswitch [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, 11(34): 7424-7429.
- [12] Liu X J, Liu M M, Lu Y D, et al. Facile Ag-film based surface enhanced Raman spectroscopy using DNA molecular switch for ultra-sensitive mercury ions detection[J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(8): 596.
- [13] Dong Z H, Liu Y, Qin Y Y, et al. Fabrication of fiber SERS probes by laser-induced self-assembly method in a meniscus and its applications in trace detection of pesticide residues[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(8): 0804009.
- 董子豪, 刘晔, 秦琰琰, 等. 激光诱导液面自组合法制备光纤 SERS 探针及其农药残留检测应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(8): 0804009.
- [14] Xi G Q, Chen Y P, Chen G, et al. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopic assay of immunohistochemically stained human colon cancer tissue[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2011, 38(9): 0904001.
- 席刚琴, 陈燕坪, 陈刚, 等. 基于表面增强拉曼光谱的结肠癌组织免疫分析[J]. *中国激光*, 2011, 38(9): 0904001.
- [15] Feng S Y, Zheng Z C, Xu Y J, et al. A noninvasive cancer detection strategy based on gold nanoparticle surface-enhanced Raman spectroscopy of urinary modified nucleosides isolated by affinity chromatography[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91: 616-622.
- [16] Lin X L, Wang L N, Lin H J, et al. A novel urine analysis technique combining affinity chromatography with Au nanoparticle based surface enhanced Raman spectroscopy for potential applications in non-invasive cancer screening[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): e201800327.
- [17] Liu M, Liu X, Huang Z, et al. Rapid discrimination of colon cancer cells with single base mutation in KRAS gene segment using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(3): e201800332.
- [18] Lin D, Lin Y C, Yang S W, et al. Organometallic-constructed tip-based dual chemical sensing by tip-enhanced Raman spectroscopy for diabetes detection [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(49): 41902-41908.
- [19] Lin D, Gong T X, Hong Z Y, et al. Metal carbonyls for the biointerference-free ratio metric surface-enhanced Raman spectroscopy-based assay for cell-free circulating DNA of Epstein-Barr virus in blood [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(12): 7139-7147.
- [20] Chen Y, Yan X, Zhang X, et al. Surface-enhanced

- Raman spectroscopy quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons based on support vector machine algorithm [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(3): 0311005.
- 陈阳, 严霞, 张旭, 等. 基于支持向量机算法的多环芳烃表面增强拉曼光谱的定量分析[J]. *中国激光*, 2019, 46(3): 0311005.
- [21] Shen D W, Zheng F, Wu N, et al. Trend analysis of Raman application in cultural relics and archaeological research [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(9): 2657-2664.
- 沈大娟, 郑菲, 吴娜, 等. 拉曼光谱在文物考古领域的应用态势分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(9): 2657-2664.
- [22] Yao Y, Sun Q. Raman quantitative measurements for carbon isotopic composition in CO<sub>2</sub>-rich fluid inclusion: a preliminary study[J]. *Advances in Earth Science*, 2016, 31(10): 1032-1040.
- 药瑛, 孙楠. 应用于流体包裹体 CO<sub>2</sub> 碳同位素组成的拉曼光谱定量研究探讨[J]. *地球科学进展*, 2016, 31(10): 1032-1040.
- [23] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, 275 (5303): 1102-1106.
- [24] Osborne S E, Ellington A D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(2): 349-370.
- [25] Mairal T, Özalp V C, Sánchez P L, et al. Aptamers: molecular tools for analytical applications [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390(4): 989-1007.
- [26] Lee P C, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, 86(17): 3391-3395.
- [27] Liu B W, Liu J W. Freezing directed construction of bio/nano interfaces: reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflakes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(28): 9471-9474.
- [28] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(8): 3974-3983.
- [29] Guerrini L, Pazos E, Penas C, et al. Highly sensitive SERS quantification of the oncogenic protein c-Jun in cellular extracts [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(28): 10314-10317.
- [30] Meng X Y, Wang H Y, Chen N, et al. A graphene-silver nanoparticle-silicon sandwich SERS chip for quantitative detection of molecules and capture, discrimination, and inactivation of bacteria [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(9): 5646-5653.
- [31] Liu S, Lei P Y, Xiong F. Investigation of the alpha fetoprotein content and reference value range of 6 months to 2 years old healthy children in Chongqing with chemiluminescence [J]. *Journal of Pediatric Pharmacy*, 2017, 23(6): 3-5.
- 刘杉, 雷培芸, 熊丰. 化学发光法检测重庆地区 6 个月至 2 岁健康儿童甲胎蛋白含量及参考值范围的确定 [J]. *儿科药理学杂志*, 2017, 23(6): 3-5.
- [32] Xia Y F, Gao P Y, Qiu X W, et al. Aptasensor based on triplex switch for SERS detection of cytochrome c [J]. *Analyst*, 2012, 137(24): 5705-5709.