

基于新型 NIR-SERS 基底的肝癌血清 NIR-SERS 光谱研究

刘仁明¹ 刘瑞明¹ 武延春² 柳振全³ 张德清³ 自兴发¹ 司民真¹

¹ 楚雄师范学院光谱技术应用研究所, 云南 楚雄 675000
² 楚雄彝族自治州人民医院, 云南 楚雄 675000
³ 云南师范大学物理与电子科学系, 云南 昆明 650092

摘要 基于一种新型、高效、生物相容性近红外表面增强拉曼散射(NIR-SERS)基底,采用便携式近红外拉曼光谱仪分别对健康人和肝癌病患者的血清进行了 NIR-SERS 光谱研究。实验发现,健康人与肝癌患者的血清 NIR-SERS 光谱存在显著差异:1)健康人血清 NIR-SERS 光谱中位于 630、720、812 和 1578 cm^{-1} 附近的谱峰在肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中变得很弱,甚至消失;2)健康人血清 NIR-SERS 光谱中位于 1130 cm^{-1} 和 1204 cm^{-1} 附近的谱峰在肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中分别蓝移到 1135 cm^{-1} 和 1269 cm^{-1} 附近,同时在 558 cm^{-1} 附近出现一新的较强拉曼峰;3)对健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中位于 300、630、1130 和 1578 cm^{-1} 等处的拉曼峰相对峰强度比研究发现,相对峰强度比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 可以作为较好的区分健康人和肝癌患者的 NIR-SERS 光谱诊断指标,这为基于 SERS 光谱技术进行肝癌光谱诊断提供了初步的实验依据。

关键词 光谱学;近红外表面增强拉曼散射;肝癌;血清;纳米银膜

中图分类号 O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201131.0630001

Investigations on NIR-SERS Spectra of Serum for Liver Cancer Based on NIR-SERS Substrate

Liu Renming¹ Liu Ruiming¹ Wu Yanchun² Liu Zhenquan³ Zhang Deqing³
Zi Xingfa¹ Si Minzhen¹

¹ Application Institute of Spectroscopic Technology, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000, China
² The People's Hospital of Chuxiong, Chuxiong, Yunnan 675000, China
³ Department of Physics and Electronics, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650092, China

Abstract Investigations on near infrared surface-enhanced Raman scattering (NIR-SERS) spectra of the serum for patients with liver cancer and healthy persons based on Ag nanofilms prepared by using electrostatic self-assembly are reported. Analysis indicates NIR-SERS spectra of the sera between healthy persons and liver cancer patients are different. Firstly, Raman bands at 630, 720, 812 and 1578 cm^{-1} become weaker (even disappear) in NIR-SERS spectra of the sera for cancer liver patients but stronger in NIR-SERS spectra of the sera for healthy persons. Secondly, Raman bands at 1130 cm^{-1} and 1204 cm^{-1} in NIR-SERS spectra of the sera for healthy persons have blue shifts to 1135 cm^{-1} and 1269 cm^{-1} in NIR-SERS spectra of sera for cancer liver patients, respectively. Meanwhile, a new Raman band at 558 cm^{-1} appears in NIR-SERS spectra of liver cancer patients. Additionally, striking spectral differences are obvious in NIR-SERS spectra in the intensity ratios at 630/300, 1130/300, and 1578/300 cm^{-1} . These three peak-intensity ratios of liver cancer patients with values of 0.848 ± 0.042 , 1.094 ± 0.118 , 0.914 ± 0.070 , respectively, are more notable (mean \pm S. D., $n = 15$, $P < 0.01$) compared with those of healthy persons (1.985 ± 0.487 , 1.568 ± 0.286 , 1.189 ± 0.108 , respectively). The results show that the intensity relative peak-ratios at 630/300, 1130/300, and 1578/300 cm^{-1} can be used to discriminate liver cancer patients from healthy persons, which

收稿日期: 2010-11-04; 收到修改稿日期: 2011-01-21

基金项目: 国家自然科学基金(11064001, 10864001)、云南省科技厅应用基础面上项目(2008ZC159M)资助课题。

作者简介: 刘仁明(1979—), 男, 硕士, 讲师, 主要从事纳米材料光散射及生物医学光子学实验及理论等方面的研究。

E-mail: liurenmingok@126.com

indicate these three intensity ratios can be served as NIR-SERS spectral criteria for the diagnosis of cancer liver.

Key words spectroscopy; near-infrared surface-enhanced Raman scattering(NIR-SERS); liver cancer; serum; Ag nanofilm

OCIS codes 300.6450; 290.5860; 240.6695; 170.4580

1 引 言

肝癌是全球3大肿瘤死因之一。我国是肝癌的高发地区,肝癌的发病率占全球的50%以上,已占恶性肿瘤发病率的第2位,其死亡率占恶性肿瘤死亡率的第1位。除少数患者由于发现早,无转移而采取手术切除治疗外,大多数肝癌病人都摆脱不了死亡。因此肝癌的早期诊断就成为患者最为迫切的需要,有着重大的意义。目前,一般临床上对肝癌的诊断主要采用细胞形态学和组织化学的方法,这些方法一般较为费时、繁琐,且给患者带来较大的痛苦。肝脏具有多种物质的代谢功能,是人体的代谢中枢,同时还具有分泌、排泄和生物转化等功能,当肝脏发生病变时,会引起多种物质的代谢失常,从而对血清产生影响。拉曼光谱技术简便、快速、灵敏、无损,在生命科学领域有很大的应用潜力^[1,2]。血清的拉曼光谱研究^[3~5]表明,该技术可用于血清分子构象变化研究,但由于血清中生物大分子的拉曼散射截面很小,不容易得到其有效的拉曼散射信号,大大限制了拉曼光谱技术在该领域的应用和推广^[6]。在生物大分子表面增强拉曼散射(SERS)研究中,激发光波长也是一个重要因素^[7]。在血清的SERS研究中,采用近红外激发光源可以有效避免血清中蛋白分子“光致损伤”,同时可以抑制血清中蛋白分子较强的荧光发射^[8]。近年来,近红外表面增强拉曼散射(NIR-SERS)光谱技术,以其独特优势成为研究生物大分子结构的有力手段而备受研究者关注^[9~11]。本文基于课题组前期制备的稳定、高效和生物兼容性 NIR-SERS 基底,采用近红外(785 nm)激发光波长对肝癌患者和健康人的血清进行了 NIR-SERS 分析,发现两者的 NIR-SERS 光谱具有显著的差异性。

2 实验部分

2.1 仪器与参数设置

小型台式离心机(TGL216G);电子扫描显微镜(S-505,荷兰飞利浦公司),加速电压设置为30 kV;便携式拉曼光谱仪(R-3000TM,美国海洋光学公司),用785 nm、功率为65 mW的半导体激光器作为光源,激光光斑直径为90 μm ,仪器的分辨率为

2 cm^{-1} ,光谱测定范围为200~2000 cm^{-1} ,扫描时间为16 s。UV-vis 分光光度计(T-1901,北京普析通用仪器有限公司),分辨率设为2 nm,狭缝宽度设为0.5 nm。样品为表面镀有纳米银薄膜的载玻片,参比为同等规格的干净载玻片。

2.2 实验样品

血清样品:实验选取被确诊为肝癌患者的新鲜血液15例,健康人的新鲜血液15例。每例病人取3 mL新鲜血液,不加任何抗凝剂,放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的洁净环境中1 h使其凝结,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下用高速离心机(4000 r/min)离心20 min,提取最上层的清液即获得血清。将获取的血清分装于离心管中并保存于一20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中以备实验使用。

化学样品:硝酸银(质量分数99.8%),浓硫酸(质量分数98%),聚乙烯醇(质量分数95%),银电极(质量分数99.9%),双氧水(质量分数30%),载玻片,氨水(质量分数28%),去离子水(电阻率为18.0 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.3 实验方法

采用静电自组装技术,在表面经过特殊处理的玻璃基底上生长纳米银薄膜作为SERS基底,并利用电子扫描显微镜对其相貌进行表征。前期实验结果表明,该纳米银薄膜对人血清和血红蛋白具有良好的SERS增强效应^[3,12,13]。本文中分别将健康人和肝癌患者的血清与去离子水按1:20的比例稀释成待测样品,然后取稀释过血清溶液50 μL 滴在二维纳米银薄膜上,形成直径1 cm的均匀液体膜,在高纯氮气氛围中干燥。然后,采用便携式拉曼光谱仪对样品进行SERS光谱测量。

2.4 数据处理

所有 NIR-SERS 光谱均用 Raman Spectrum, Originpro 8.0, SPSS 10.0 等软件进行处理和统计分析。同时所有 NIR-SERS 谱采用 Chen 等^[8]的方法进行了荧光扣除。

3 结果与讨论

二维纳米银膜的扫描式电子显微照片扫描式电子显微照片(SEM)形貌如图1(a)所示。纳米银膜表面纳米粒子的平均粒径约为(100 \pm 20) nm,其粒

径的分散性如图 2 所示。可以看出纳米粒子的粒径分布较广,但主要粒径集中于 120 nm 附近(共统计 226 个纳米银粒子),其粒径大于制备该纳米银膜所用的正电性胶态纳米银粒子透射电镜(TZM)形貌的平均粒径(50 ± 8) nm[图 1(b)]。同时,纳米银膜表面上相邻的纳米银粒子间可以形成活性纳米结^[12],处于这些紧密相邻的纳米银粒子之间的电磁场可以得到巨大的增强,增强因子可达到 $10^{14} \sim 10^{15}$ ^[14,15]。图 3 为该纳米银膜和正电性胶态纳米银粒子的紫外-可见光谱。从光谱图中可以看出,正电性纳米银粒子的等离子体共振峰位于 420 nm 处,而纳米银薄膜的等离子体共振在紫外-可见光谱中

表现为一共振带(400~900 nm),一直延伸到近红外区。红外光谱是介于可见光和中红外之间的电磁辐射波,美国材料检测协会(ASTM)将近红外光谱区定义为 780~2526 nm 的区域。从图 3 可以看出,胶态纳米银粒子的粒径分布较为狭窄,也即胶态纳米银粒子的大小分布均匀,因此在 420 nm 附近出现了银纳米粒子的特征性等离子体共振峰;对于纳米银薄膜来讲,组成薄膜的银纳米粒子的粒径分布较宽,因此在较大范围出现了等离子体共振带。该共振带实质上应为多个等离子体共振峰相互叠加的结果,在近红外区有相应的等离子共振峰。

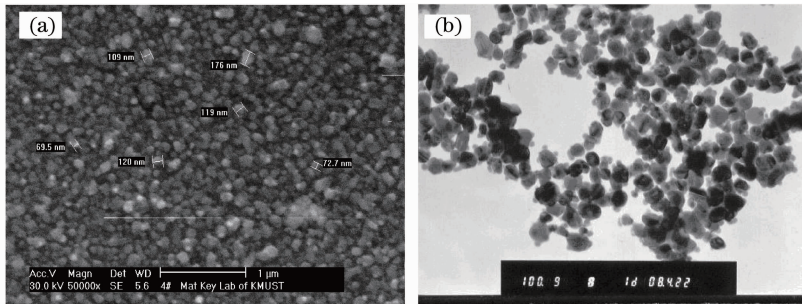


图 1 利用静电自组装技术制得的纳米银薄膜的 SEM 形貌图(a)和制备银膜所用的胶态纳米银粒子的 TEM 形貌图(b)
Fig. 1 (a) SEM image of Ag nanofilm prepared by using electrostatic self-assembly and (b) TEM image of Ag colloidal nanoparticles

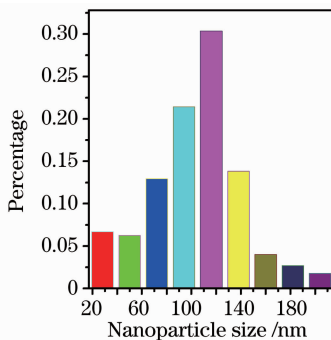


图 2 纳米银膜表面纳米银粒子的粒径分布
Fig. 2 Size distribution of Ag nanoparticles on the surface of Ag nanofilm

在生物大分子拉曼光谱检测中,当激发光波长小于 514.5 nm 时会导致生物大分子“光致损伤”,即便激发光的强度很弱;当激发光波长大于 660 nm 时则不会导致这些大分子“光致损伤”,即便是激发光的功率密度达到 $1.27 \times 10^8 \text{ W/m}^2$ ^[7]。同时,生物大分子具有较强的荧光特性,小于 514.5 nm 的激发光很容易引起生物分子较强的荧光发射而不易获得有效的拉曼信号。因此,在生物大分子的拉曼光谱检测中,采用近红外激发光源可以有效避免生物大分子“光致损伤”和荧光发射。基于本课题组制备

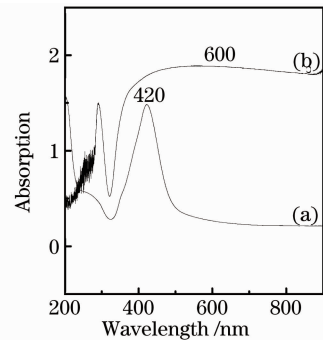


图 3 纳米银薄膜(a)和胶态纳米银粒子(b)的紫外-可见吸收光谱

Fig. 3 UV-vis absorption spectra of (a) Ag nanofilm and (b) Ag colloidal nanoparticles
的纳米银薄膜,其等离子体共振带处于 400~900 nm,采用了波长处于近红外光谱区边缘的 785 nm 激光作为激发光源。一方面可以避免血清中蛋白分子的“光致损伤”,同时,该波长处于纳米银薄膜的等离子体共振带内,可以更有效地引起拉曼散射共振增强效应。另外,该波长可以降低蛋白分子的荧光效应^[8]。

图 4 是健康人血清(质量分数 4.8%)分别基于玻璃基底、加入 10^{-1} mol/L KBr 的正电性胶态纳米

银粒子和纳米银薄膜的拉曼光谱。可以看到,在玻璃基底上几乎得不到任何血清的拉曼信号,其拉曼信号被荧光所覆盖;当在血清中加入适量的正电性纳米银胶,即使再加入 KBr 作为凝聚剂,其拉曼信号依然很微弱。图 4(c)是基于纳米银膜的健康人血清的 NIR-SERS 光谱,可以看出该纳米银膜对人血清的拉曼散射增强是显著的。为了考察该 NIR-SERS 基底的光谱重复性,研究了同一健康人的血

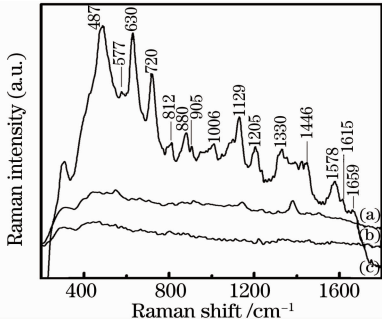


图 4 健康人血清分别基于玻璃基底(a)、胶态纳米银粒子和(b)纳米银薄膜(c)的拉曼散射光谱

Fig. 4 Raman spectra of human serum based on (a) glass substrate, (b) colloidal Ag nanoparticles, and (c) Ag nanofilm, respectively

清基于相同条件下制备的不同纳米银膜的 NIR-SERS 光谱(图 5)。可以看出,这些纳米银膜的光谱重复性较好,相同条件下所制备的不同纳米银膜间对人血清 NIR-SERS 光谱的影响比较小。基于 NIR-SERS 基底,分别对 15 个健康人和 15 个肝癌患者的血清进行了 NIR-SERS 光谱检测,其典型的光谱图如图 6 所示(为了便于观察,图中部分谱线经过了向上/下的平移处理,并且所有 NIR-SERS 光谱都已扣除了其荧光背景,同图 7)。

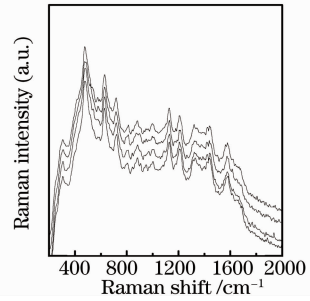


图 5 同一健康人血清分别基于相同条件下制备的不同纳米银薄膜的 NIR-SERS 光谱

Fig. 5 NIR-SERS spectra of the same human serum sample based on different Ag nanofilms prepared under the same conditions

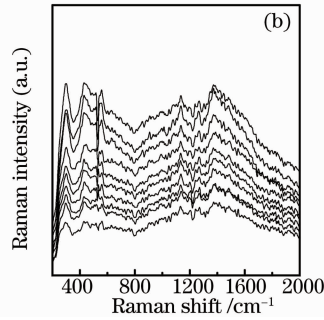
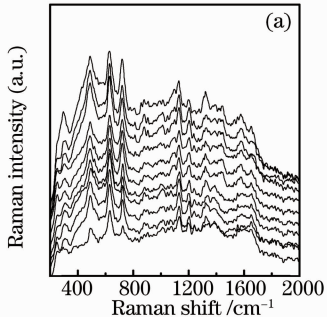


图 6 基于纳米银薄膜的健康人(a)和肝癌患者(b)血清的典型 NIR-SERS 光谱

Fig. 6 Typical NIR-SERS spectra of (a) the serum for healthy persons and (b) liver cancer patients based on different Ag nanofilms

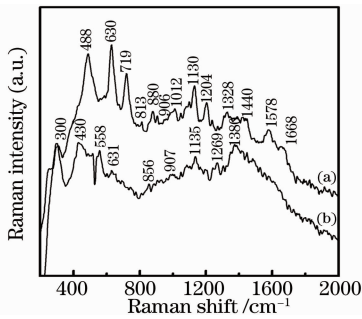


图 7 健康人(a)和肝癌患者(b)血清基于纳米银薄膜的 NIR-SERS 光谱

Fig. 7 NIR-SERS spectra of human serum for (a) healthy and (b) liver cancer patient based on Ag nanofilm

图 7 展示了健康人和肝癌患者血清基于相同纳米银膜的典型 NIR-SERS 光谱。从中可以看出,两者具有差异性:1)健康人血清 NIR-SERS 光谱中位于 630、720、812 和 1578 cm^{-1} 附近的谱峰在肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中变的很弱,甚至消失;2)健康人血清 NIR, SERS 光谱中位于 1130 cm^{-1} 和 1204 cm^{-1} 附近的谱峰在肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中分别蓝移到 1135 cm^{-1} 和 1269 cm^{-1} 附近;同时,在 558 cm^{-1} 附近出现一新的拉曼峰。这些谱峰位置和强度的变化,说明了与之相联系的基团结构、构象以及在肝癌患者血清中相对含量的发生了显著的变化。表 1 中列出了人血清基于该纳米银膜的

NIR-SERS 光谱谱带的初步归属。

表 1 人血清 NIR-SERS 光谱拉曼谱带的初步归属

Table 1 Preliminary assignments of Raman bands for NIR-SERS spectra of human serum

Raman bands / cm^{-1}	Preliminary assignments
488	$\nu(\text{S}-\text{S})$
558	$\nu(\text{S}-\text{S})$, HSA
630	$\delta(\text{C}-\text{C}=\text{O})$
719	$\nu(\text{C}-\text{S})$
813	Tyr
880	Tyr
906	$\nu(\text{C}-\text{C})$, peptide
1012	$\nu(\text{CH}_3)$, Phe
1130	$\nu(\text{C}-\text{C})$, Tyr
1204	Tyr or Phe
1328	Trp
1440	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, Trp
1578	Phe
1668	Amide I, HSA

人血清白蛋白是细胞外主要的疏运蛋白,在人血浆中的质量浓度约 40 mg/mL ^[16],该蛋白中包含有 17 个二硫键,这些二硫键的伸缩振动就反映在拉曼光谱 $480\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ 区域^[17,18]。人血清 SERS 光谱中位于 $812, 880, 1128 \text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼峰源自于血清蛋白中酪氨酸残基的振动^[19],位于 1330 cm^{-1} 和 1445 cm^{-1} 附近的拉曼峰则归属于蛋白质中色氨酸残基的振动^[20],而位于 1006 cm^{-1} 和 1578 cm^{-1} 附近的拉曼峰则归属于蛋白质中苯丙氨酸残基的振动^[21]。血清中缩氨酸基团 C-C 键的伸缩振动位于 $900\sim 950 \text{ cm}^{-1}$ 的拉曼谱带^[22],而位于 1615 cm^{-1} 、 1656 cm^{-1} 附近拉曼峰则是源自于人血清白蛋白中酰胺 I 的 α -螺旋结构振动^[17-19]。健康人血清 NIR-SERS 光谱中位于 $630, 720, 812$ 和 1578 cm^{-1} 附近的谱峰分别归属于 C-C=O 基团弯曲振动、C-S 键的伸缩振动、血清白蛋白中酪氨酸残和苯丙氨酸残基的振动。实验发现,肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中这几个谱峰变得很弱甚至消失;这表明,肝癌患者血清蛋白中对应的一些基团(如 C-C=O, C-S)和氨基酸残基在一定程度上遭到了破坏。位于 579 cm^{-1} 附近的谱峰可以归属于血清白蛋白中双硫键的伸缩振动,相比于健康人,肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中位于该处的谱峰显著加强,再者,该处的谱峰也可能来自于肝部肿瘤排泄到血清中的某种标记物,何种标记物有待进一步的探索。实验中还发现,健康人血清 NIR-SERS 光谱中位于 1130 cm^{-1} 和 1204 cm^{-1} 附近的谱峰在肝癌患者血清 NIR-SERS

光谱中分别蓝移到 1135 cm^{-1} 和 1269 cm^{-1} 附近。位于 1130 cm^{-1} 和 1204 cm^{-1} 附近的谱峰源于血清蛋白中酪氨酸残基和苯丙氨酸残基的振动,肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱中这 2 个谱峰的蓝移充分表明了血清蛋白中酪氨酸残基和苯丙氨酸残基结构、构象发生了变化。从以上分析中可以看出:相比于正常人,一方面肝癌患者血清中一部分蛋白的某些基团其结构、构象在分子层面上发生了一定的变化;另外,肝癌患者的血清中可能含有癌细胞的某种代谢产物,可作为肝癌标记物。

对健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱谱峰的相对强度比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 进行了统计研究, t -检验的结果表明:健康人和肝癌患者的 NIR-SERS 光谱谱峰的相对强度比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 存在显著的差异性,可以作为区分两者的有效光谱指标。表 2 中列出了 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 3 个相对峰强比的平均值(Mean $\pm s$),同时,对 2 个样本的平均值进行了 t -检验,显著水平设为 $0.01 (P=0.01)$ 。健康人血清 NIR-SERS 光谱谱峰的相对强度比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 的平均值分别为: 1.985 ± 0.487 , 1.568 ± 0.286 , 1.189 ± 0.108 ;肝癌患者的这几个谱峰相对强度比的平均值则分别为: 0.848 ± 0.042 , 1.094 ± 0.118 , 0.914 ± 0.070 。 t -检验结果发现两者的这 3 个相对峰强比值差异性显著,其 P 值均小于 0.01 ,如表 2 所示。图 8 展示了健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱相对峰强比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 的平均值,可以直观地看出两者的显著差异性。从以上的分析可以看出:健康人和肝癌

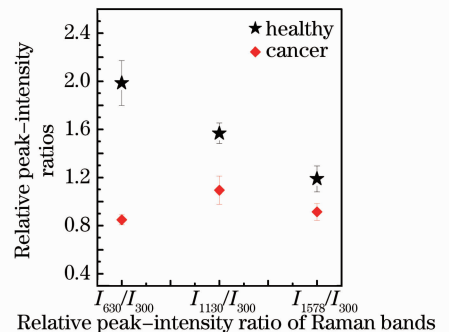


图 8 健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱位于 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 $I_{1578}/I_{300} \text{ cm}^{-1}$ 处的相对峰强比的统计平均

Fig. 8 Statistical average of relative peak-intensity ratios for Raman bands at I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} and $I_{1578}/I_{300} \text{ cm}^{-1}$ in the NIR-SERS spectra of serum for healthy persons and liver cancer patients

患者血清 NIR-SERS 光谱具有差异性,而且相对峰强比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 可以作为区分健康人和肝癌患者的有效光谱指标,这为肝癌的 SERS 光谱技术诊断提供了初步的实验依据。

表 2 健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱位于

I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} cm^{-1} 处的相对峰强比值平均值及 t -检验结果 ($P < 0.01$)

Table 2 Average values of the relative peak-intensity ratios for Raman bands at I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} and I_{1578}/I_{300} cm^{-1} in the NIR-SERS spectra of serum for healthy persons and liver cancer patients ($P < 0.01$)

	Mean \pm s		t -value	P -value
	Normal	Liver Cancer		
I_{630}/I_{300}	1.985 \pm 0.487	0.848 \pm 0.042	8.999	0.0000*
I_{1130}/I_{300}	1.568 \pm 0.286	1.094 \pm 0.118	5.928	0.0000*
I_{1578}/I_{300}	1.189 \pm 0.108	0.914 \pm 0.070	8.264	0.0000*

s is standard deviation

4 结 论

基于前期研制的稳定、高效、生物兼容性 NIR-SERS 基底,分别对 15 个肝癌患者和 15 个健康人的血清进行了 NIR-SERS 光谱的采集和统计分析。实验发现,两者的 NIR-SERS 光谱具有较为显著的差异性。同时,对健康人和肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱谱峰的相对强度比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 进行了统计研究,并进行了 t -检验。实验结果表明:健康人和肝癌患者氧合血红蛋白 SERS 光谱的相对峰强比 I_{630}/I_{300} 、 I_{1130}/I_{300} 和 I_{1578}/I_{300} 可以作为区分健康人和肝癌患者的有效光谱指标,这为肝癌的 SERS 光谱技术诊断提供了初步的实验依据。本文采用的样本数量有限,今后将继续增加样本数量,进一步研究基于 SERS 光谱技术的肝癌患者血清 NIR-SERS 光谱特性,为临床上进行肝癌的 SERS 光谱诊断提供科学的实验依据。

参 考 文 献

- Jichun Zhu, Yanhui Zhang, Liangping Wu *et al.*. Dependence of surface-enhanced Raman scattering from calf thymus DNA on anions[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(7): 526~529
- Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu *et al.*. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1043~1048
艾敏, 刘军贤, 姚辉璐等. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱[J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1043~1048
- R. M. Liu, X. F. Zi, Y. P. Kang *et al.*. Surface-enhanced Raman scattering study of human serum on PVA-Ag nanofilm prepared by using electrostatic self-assembly [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2010, **42**(2): 137~144
- Zhao Wanli, Zhang Yi, Li Rui *et al.*. Study of Raman spectrum in

- diagnosis of malignant cancer[J]. *Laser J.*, 2008, **29**(3): 72~73
赵万利, 张毅, 李睿等. 拉曼光谱快速诊断恶性肿瘤研究[J]. *激光杂志*, 2008, **29**(3): 72~73
- 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
- Dahu Qi, Andrew J. Berger. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid core optical fiber Raman spectroscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2007, **46**(10): 1725~1734
- G. J. Puppels, J. H. F. Olminkhof, G. M. J. Segers-Nolten *et al.*. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light [J]. *Exp. Cell Res.*, 1991, **195**(2): 361~367
- S. Y. Feng, R. Chen, J. Q. 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
- S. Y. Feng, J. Q. 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
- S. Mahajan, M. Abdelsalam, Y. Suguwara *et al.*. Tuning plasmons on nano-structured substrates for NIR-SERS[J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**(1): 104~109
- S. Keren, C. Zavaleta, Z. Cheng *et al.*. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**(15): 5844~5849
- Liu Renming, Zi Xingfa, Wu Yanchun *et al.*. Preparation of surface enhanced Raman scattering substrate of two-dimension 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
- R. M. Liu, M. Z. Si, Y. P. Kang *et al.*. A simple method for preparation of Ag nanofilm used as active, stable, and biocompatible SERS substrate by using electrostatic self-assembly [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **343**(1): 52~57
- H. X. Xu, M. Käll. Surface-plasmon-enhanced optical forces in silver nanoaggregates[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **89**(24): 246802
- H. X. Xu, J. Aizpurua, M. Käll *et al.*. Electromagnetic contributions to single molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering[J]. *Phys. Rev. E*, 2000, **62**(3): 4318~4324
- S. Nie, S. R. Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Science*, 1997, **275**(5303): 1102~1106
- V. J. C. Lin, J. L. Koenig. Raman studies of bovine serumalbumin[J]. *Biopolymers*, 1976, **15**(1): 203~218
- H. Fabian, P. Anzenbacher. New developments in Raman spectroscopy of biological systems[J]. *Vib. Spectrosc.*, 1993, **4**(2): 125~148
- A. I. Ivanov, E. A. Korolenko, E. V. Korolik *et al.*. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **408**(1): 69~77
- S. Stewart, P. M. Fredericks. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface[J]. *Spectroch. Acta A*, 1999, **55**(728): 1641~1660
- H. Y. Han, Y. F. Jia, Z. C. Wang *et al.*. Analytical technique for label-free multi-protein detection based on western blot and surface-enhanced Raman scattering [J]. *Anal. Chem.*, 2008, **80**(8): 2799~2804
- M. C. Chen, R. C. Lord. Laser Raman spectroscopic studies of the thermal unfolding of ribonuclease[J]. *Biochemistry*, 1976, **15**(9): 1889~1897