

光学学报

基于新型纳米材料的 SERS 免疫层析技术研究进展

刘真真, 刘晓娟, 孙岩松^{**}, 肖瑞^{*}

中国人民解放军军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071

摘要 基于表面增强拉曼散射(SERS)的免疫层析检测技术是一种前沿研究技术,主要利用纳米材料制得的SERS标志材料取代传统的胶体金,综合了SERS高通量、高灵敏度和免疫层析简便、快速的双重优势,满足了定量检测的需求。其中,高性能纳米材料是SERS免疫层析技术实现高灵敏度检测的关键,研究人员通过设计和优化纳米材料的粒径、形态、结构等制备出具有强SERS增强性能的SERS基底,以提高检测灵敏度。本文首先介绍了SERS免疫层析技术的基本原理;然后,综述了用于SERS免疫层析技术的几种SERS基底以及SERS免疫层析技术在不同检测物质中的应用;最后,讨论并展望了SERS免疫层析技术未来发展趋势。

关键词 表面增强拉曼散射; 免疫层析; 现场快速检测; 多重检测

中图分类号 O657 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/AOS230922

1 引言

重大新发突发传染病、食源性疾病、动物疫病、外来生物入侵等生物安全威胁不断涌现,随着人类社会的发展,呈现从简单到复杂、从偶发到频发、防范难度逐渐加大的趋势,已成为人类发展面临的新型安全威胁^[1]。现有的检测技术主要有聚合酶链式反应(PCR)^[2]、质谱分析(MS)技术^[3]、DNA测序技术^[4]、酶联免疫吸附(ELISA)技术^[5]、电镜技术^[6]、免疫层析技术^[7]等,尽管这些技术具有高灵敏、高特异性等优势,但存在操作步骤繁琐、分析时间长、成本高、灵敏度低、需要先进的仪器和经验丰富的工作人员等缺点。亟需开发一种高灵敏度、高准确性、简便、快速的检测技术,用于保障人类生命健康。

光的散射现象分为弹性散射和非弹性散射,拉曼散射是一种非弹性散射,是一种当光子与分子发生碰撞时传播频率和方向均发生改变的现象。1928年印度科学家Raman等^[8]首次通过汞灯照射液态苯的实验证实了光的非弹性散射的存在,并以此荣获诺贝尔奖。不同的物质分子会产生不同特征频率的拉曼光谱,但是物质本身的拉曼信号很弱,极大限制了其广泛应用。1974年,Fleischmann等^[9]对光滑银电极表面进行粗糙化处理后,首次获得吸附在银电极表面上单分子层吡啶分子的高质量拉曼光谱,但他们当时只是将这种现

象简单地归因于电极粗糙,电极有效面积增大使得分子吸附量增加造成的,并没有对这一现象进行深入的物理学分析。1977年,Jeanmaire等^[10]通过一系列的研究发现单个吡啶分子在粗糙银表面上的拉曼散射信号强度是其在溶液中的 10^6 倍,这显然是由某种物理效应造成的。这种与金、银、铜等贵金属粗糙表面相关的表面增强效应为表面增强拉曼散射(SERS)效应,与传统的拉曼散射信号相比,其信号强度可提升 $10^4\sim 10^7$ 倍^[11]。SERS检测法分为非标检测和标志检测两类。非标检测法是将样品与金属纳米材料(如胶体银纳米颗粒)混合,利用金属的拉曼增强作用直接增强其自身的拉曼散射信号,利用待检物的特异性拉曼指纹图谱进行快速、原位、无损检测^[12]。但这种方法需要利用统计学方法(如主成分分析法等)对获得的结果进行处理,分析拉曼光谱的细微差异。标志检测法是将抗体、适配体、核酸等生物识别元件修饰在贵金属纳米颗粒上制备SERS标签(tags),并利用附着在纳米颗粒表面的拉曼报告分子提供拉曼信号,从而实现对微量生物活性物质间接检测的方法^[13]。当拉曼报告分子被吸附到粗糙的贵金属(金、银、铜等)表面时,由于电磁增强和化学增强效应,它们的拉曼信号得到极大增强^[14]。SERS作为一种高灵敏的分析技术,具有高灵敏度、抗光漂白、窄光谱带宽、多通道检测等优势,目前已广泛应用于小分子、核酸、蛋白、病毒、细菌、细胞和活体检

收稿日期: 2023-05-04; 修回日期: 2023-06-02; 录用日期: 2023-06-08; 网络首发日期: 2023-06-28

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301102)、国防科技卓越青年科学基金

通信作者: *ruixiao203@163.com; **sunys6443@126.com

测等生化分析领域^[15-17]。

免疫层析(ICA)技术以其携带方便、操作简单、成本低、检测时间短等优势被认为是目前最具潜力的现场快速检测(POCT)方法,已被广泛应用于临床诊断、食品安全、药物检测等领域^[18-20]。免疫层析试纸条主要由样品垫、结合垫、硝酸纤维素(NC)膜和吸水垫4个部分组成,并在NC膜上包覆检测线和质控线。免疫层析技术的检测原理是利用毛细管作用使待检样品溶液在免疫层析试纸条上流动,并在NC膜的检测线处发生抗原-抗体的特异性结合反应,从而实现检测的目的,检测方法主要包括双抗体夹心法和竞争法。检测流程为:将样品滴加在样品垫上,待检样品在毛细管作用下向前移动;流经结合垫时,样品中的目标检测物(targets)被其上的 tags 特异性捕获,形成 targets-tags 免疫复合物,并继续向前移动;流经检测线时,检测线上预先包覆的检测抗体将特异性地捕获 targets,从而将与 targets 相连的 tags 截留在检测线上,而多余未结合 targets 的 tags 将继续向前移动并被质控线上包覆的抗体捕获。传统的免疫层析技术以胶体金为显色底物,敏感性低、特异性不高,且以肉眼判定检测结果,无法实现对目标物的定量检测。为了解决这些问题,研究者将 PCR、微流控、SERS 和量子点荧光等检测技术应用于免疫层析体系,在很大程度上提高了免疫层析检测的灵敏度和特异性,并且实现了定量检测^[21-24]。

SERS 免疫层析(SERS-ICA)技术是一种将 SERS 标志检测法与免疫层析技术相结合的技术,兼具 SERS 的高通量、高灵敏度和免疫层析的简便、快速等特点,近年来已成为检测领域的研究热点。SERS tags 在 SERS-ICA 的检测过程中起到关键作用:一方面,其上的生物识别元件可以特异性地捕获目标物;另一方面,其上的拉曼报告分子可以提供较强的 SERS 信号,通过采集分析试纸条检测线上的 SERS 信号可定量分析样本中目标物的浓度。本文综述了近年来应用于 SERS-ICA 的不同 SERS 基底,详细阐述了 SERS-ICA 在不同检测物质中的应用,并对该技术的发展进行了展望。

2 应用于 SERS-ICA 的 SERS 基底材料

SERS tags 通常由 3 个部分组成,即 SERS 基底、生物识别元件和拉曼报告分子。制备出 SERS 增强能力强、稳定性高的 SERS 基底是实现高灵敏检测的关键。许多研究都集中开发具有高密度“热点”的纳米材料,通过在 SERS 基底上构筑多维度、高密度的“热点”来增强 SERS 信号。SERS 基底的制备方法主要分为自下而上法和自上而下法,包括水热法、原位生长法、紫外光诱导法、超快激光法和飞秒激光直写法等^[25-29]。近年来,研究者设计制备出不同形态、结构的高性能 SERS 基底,用作 SERS 基底的纳米材料按照维度可分为零维、一维、二维和三维纳米材料(图 1)。本文将分

类介绍应用于 SERS-ICA 的不同维度的 SERS 纳米材料。

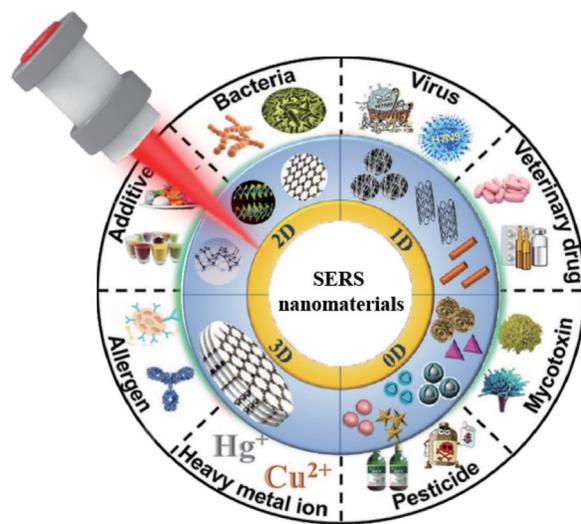


图 1 不同维度 SERS 纳米材料及其应用^[30]

Fig. 1 SERS nanomaterials in various dimensions and their applications^[30]

2.1 零维纳米材料

零维纳米材料是指材料在空间每一个维度的尺寸都在纳米尺度(0.1~100 nm)内的纳米材料。目前已经报道的用于 SERS-ICA 的 SERS 纳米材料通常是零维纳米材料,主要是基于贵金属的纳米颗粒。银具有更强的等离子体峰和粒子间近场耦合效应,SERS 增强能力强,但是其化学稳定性低、抗氧化能力弱、不易储存^[31]。相反,金具有优异的光学稳定性、良好的生物相容性和较强的抗氧化能力,但其 SERS 增强能力比银弱。为了改善这一问题,研究者提出通过改变金的形貌产生尖端和粗糙的表面(如三角形、立方体、星形和海胆状等),利用贵金属的纳米缝隙和尖端产生的“热点”效应增强拉曼信号。2016年,Maneeprakorn 等^[32]利用对苯二酚还原法合成出具有大量短而尖分支的球形金纳米星(Au NS),如图 2(a)所示。Au NS 表面带有大量尖锐的尖端结构,一方面可以减少抗体-抗原结合时的位阻效应,同时这些尖端具有很强的电磁场增强效应,可以产生较强的 SERS 信号。由图 2(a)所示材料紫外-可见(UV-vis)吸收光谱可知:Au NS 在 598 nm 处产生一个吸收峰,经拉曼报告分子 4-氨基苯硫酚(ATP)修饰后其吸收峰轻微红移至 608 nm;当抗体与 Au NS-ATP 偶联后,吸收峰再次轻微红移至 616 nm。这些结果表明 ATP 和抗体成功修饰在 Au NS 上。此外,研究者还设计并合成出核-壳结构的纳米材料作为 SERS 增强基底材料。2018年,Jia 等^[33]利用柠檬酸钠还原法制备出金核银壳纳米颗粒(Au@Ag NPs),如图 2(b)所示,Au@Ag NPs 比单纯的胶体 Au 或 Ag 的分散性更好、性质更稳定,且不同金属之间的耦合效应进一步增强了局域电磁场强度,

从而显著增强了其上拉曼报告分子的 SERS 信号, 进而提高了检测灵敏度。由图 2(b) 所示的不同材料的 UV-vis 吸收光谱可知, Au NPs 在 525 nm 处有一个明显的吸收峰, 而在 Au NPs 表面包覆一层 Ag 壳后, 其吸收峰发生蓝移, 但 Au/DTNB@Ag/DTNB 的 UV-vis 光谱与 Au@Ag/DTNB 的一致, 表明在 Ag 壳内嵌入一层 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB) 并不影响 Au@Ag NPs 吸收峰的波长。2019 年, Deng 等^[34]通过在 Ag NPs 表面涂覆一层无机材料二氧化硅(SiO₂)制得 Ag@SiO₂核-壳纳米材料, 如图 2(c) 所示。位于壳层的 SiO₂ 具有化学惰性和光学透明的特征, 既可以增强 Ag NPs 的稳定性, 又不会影响 Ag NPs 本身的化学性质和等离子体共振活性, 极大拓宽了 Ag NPs 在不同生物样本中的应用范围。从图 2(c) 所示的 UV-vis 光谱可以看出: 合成的 Ag NPs 在 414 nm 处呈现出一个特征吸收峰; 当 Ag NPs 被 4-巯基苯甲酸(4-MBA) 修饰后, 由于折射率和材料表面介质的变化, 其吸收峰出现明显红移。另外, 对于含有不同厚度硅壳的 Ag-MBA@SiO₂

NPs, 其吸收峰发生红移(417~445 nm), 而且随着硅壳厚度的增加, 其吸收峰红移更加明显。

近年来, 磁性纳米颗粒由于具有优异的磁富集能力, 通过磁分离可以省略复杂的样品预处理过程, 已有大量研究结合磁性纳米颗粒与贵金属材料制备出用于 SERS-ICA 的磁性 SERS 基底。2023 年, Liu 等^[23]利用聚乙烯亚胺介导的种子生长法合成四氧化三铁核金壳磁性纳米颗粒(Fe₃O₄@Au MNPs), 如图 2(d) 所示, 在外加磁场的帮助下, 磁性 SERS tags 可以将目标物从复杂样品(如血清和食品样品等)中捕获并富集, 无需繁琐的样品预处理过程。富集后的目标物被重悬于缓冲液后再进行检测, 消除了样品中杂质的干扰, 提高了 SERS 检测的灵敏度。从图 2(d) 所示的 UV-vis 光谱可以看出: Fe₃O₄-Au seeds 与 Fe₃O₄@Au MNPs 的特征吸收峰与 Fe₃O₄ 相比均发生明显红移, 表明种子和金壳已成功合成; DTNB 修饰前后纳米材料的吸收峰所处的波长一致, 再次表明拉曼报告分子的修饰并不会影响纳米材料吸收峰的波长。

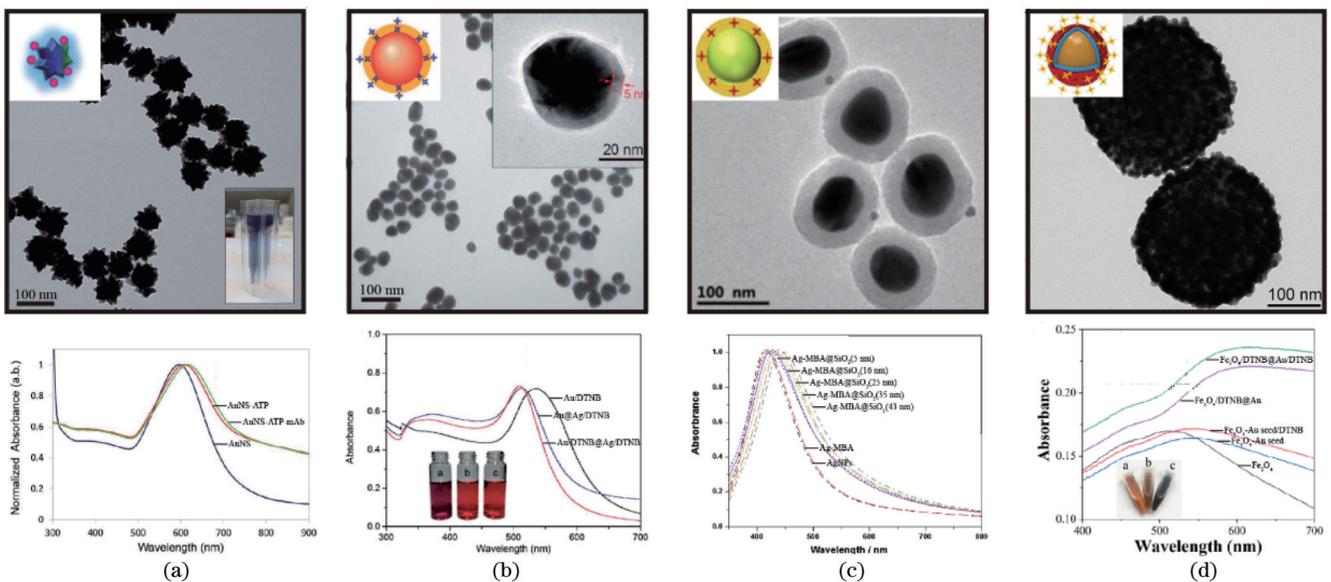


图 2 应用于 SERS-ICA 的零维 SERS 纳米材料的透射电子显微镜(TEM)图像及 UV-vis 光谱。(a) 金纳米星^[32]; (b) 金核银壳纳米颗粒^[33]; (c) 银核二氧化硅壳纳米颗粒^[34]; (d) 四氧化三铁核金壳磁性纳米颗粒^[23]

Fig. 2 TEM images and UV-vis spectra of 0D SERS nanomaterials applied in SERS-ICA. (a) Gold nanostars^[32]; (b) Au@Ag nanoparticles^[33]; (c) Ag@SiO₂ nanoparticles^[34]; (d) Fe₃O₄@Au MNPs^[23]

2.2 一维纳米材料

一维纳米材料是指材料在空间 3 个维度中有 1 个维度的尺寸不在纳米尺度内的纳米材料, 如金/银纳米棒等。金纳米棒(Au NR)的纵向和横向有两个等离子体共振吸收峰, 而且可以通过调整长径比将局域表面等离子体共振(LSPR)的峰值调至近红外区域^[35]。另外, 与球形 Au NPs 相比, Au NR 因其非球形粒子表面电磁场的各向异性分布而具有更强的 SERS 增强能力, 而且比表面积更大。2020 年, Lu 等^[36]利用改进的种子生长法合成出 LSPR 峰位于 785 nm 的 Au NR,

TEM 图像如图 3(a) 所示, 这与生物样本检测常用的近红外激发波长一致, 进一步提升了共振增强效果, 而且有效减少了生物样本背景荧光的干扰。不同长径比的 Au NR 的 UV-vis 光谱如图 3(b) 所示, 4 种不同尺寸的 Au NR 的 LSPR 峰值波长分别为 690、740、785、825 nm。用相同浓度的 DTNB 对这 4 种 Au NR 进行超声处理并检测其拉曼信号, 结果如图 3(c) 所示, 可以看到, Au NR-785 的 SERS 信号强度是 Au NR-825 的 2.1 倍, 是 Au NR-690 和 Au NR-740 的 3 倍。Au NR-785 这一优异的 SERS 活性可归因于 Au NR 的等

离子体耦合效应产生的最佳表面增强拉曼共振散射 (SERS) 响应。Lu 等^[36]还在 Au NR 的表面包覆一层牛血清白蛋白作为保护壳,从而增强了材料的稳定性,拓宽了其在复杂生物样本中的应用范围。但 Au NR 的“热点”只分布在两端,这就限制了它们的信号增强效果。2019 年, Khlebtsov 等^[37]将拉曼报告分子嵌入核壳纳米材料中制备间隙增强拉曼标签(GERTs), TEM 图像如图 3(d)所示。首先,利用改进的种子介导法制备出 Au NR;然后,将拉曼报告分子吸附在 Au NR 表面,再以其为核心包覆一层金壳,从而得到 GERTs。所制备的 GERTs 信号强度可增强 10^{11} 倍,比拉曼报告分子

吸附在等离子体粒子表面的标签要提高一个数量级;将拉曼报告分子包覆在金壳内,可以使内部分子的 SERS 响应不受纳米粒子聚集或周围条件的影响。如图 3(e)所示,在 Au NR 包覆一层金壳后,其等离子体峰从 830 nm 蓝移至 550 nm,表明 GERTs 已成功合成。2019 年,张晓蕾等^[38]利用化学还原法,以柠檬酸三钠为还原剂,将硝酸银中的银离子还原在碳纳米管上,制备出碳纳米管/银纳米颗粒(CNTs/AgNPs)复合材料,其扫描电子显微镜(SEM)图像如图 3(f)所示。计算得到 CNTs/AgNPs 对罗丹明 6G(R6G)的 SERS 增强因子(EF)为 1.5×10^6 ,具有较强的 SERS 增强能力。

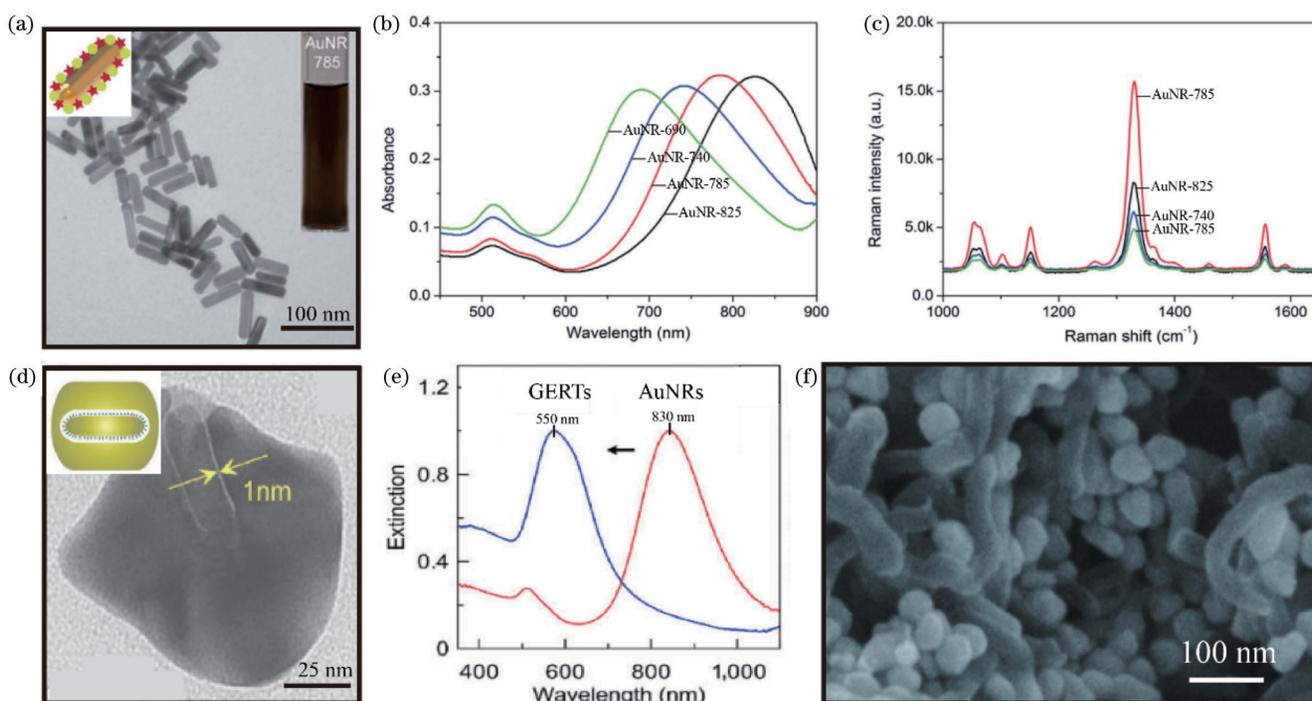


图 3 应用于 SERS-ICA 的一维 SERS 纳米材料的性能表征。(a) Au NR 的 TEM 图像^[36];不同长径比的 Au NR 的(b)UV-vis 光谱和(c)拉曼光谱^[36];GERTs 的(d)TEM 图像及(e)归一化消光光谱^[37]; (f)CNTs/AgNPs 的 SEM 图像^[38]

Fig. 3 Characterization of 1D SERS nanomaterials applied in SERS-ICA. (a) TEM image of Au NPs^[36]; (b) UV-vis spectra and (c) Raman spectra of Au NRs with different aspect ratios^[36]; (d) TEM image and (e) normalized extinction spectra of GERTs^[37]; (f) SEM image of CNTs/AgNPs^[38]

2.3 二维纳米材料

二维纳米材料是指材料在空间 3 个维度中有 2 个维度的尺寸不在纳米尺度内的纳米材料,如石墨烯、二硫化钼等。二维纳米材料具有独特的纳米片结构、比表面积大、生物相容性好等优势,将成为 SERS 基底的下一步研究重点^[39]。2021 年, Barveen 等^[40]利用光还原法将 Au NPs 修饰在碳化钛(TiC)二维纳米片上(TiC/Au-NPs),通过化学和电磁机制的协同作用有效增强拉曼报告分子的拉曼信号。TiC/Au-NPs 的 TEM 图像如图 4(a)所示,在 TiC 表面的 Au NPs 纳米级间隙形成了大量热点,且 Au NPs 的存在使 TiC 的表面更加粗糙,表面积明显增大,从而可以容纳更多的拉曼报告分子。图 4(b)所示为 TiC/Au-NPs 的能量色散

X 射线(EDX)光谱,可以明显看到 TiC/Au-NPs 的表面存在 Ti、C 和 Au 元素,表明 Au NPs 成功结合在 TiC 纳米片上。2022 年, Shen 等^[41]利用两步种子生长法合成出金壳包覆的氧化石墨烯(GO@Au)纳米片,如图 4(c)所示。该纳米片不仅具有足够数量的热点结构,还具有较大的表面积,可以承载更多的拉曼报告分子和捕获抗体,从而增强了抗原捕获能力和层析试纸条检测线上的拉曼信号;GO 具有良好的机械柔韧性和优异的水分散性,可以快速捕获抗体并紧密粘附在目标检测物的表面,在试纸条上顺利流动;GO 的化学增强机制与金的“热点”增强效应可提供强而稳定的 SERS 信号。如图 4(d)所示,合成的 GO@Au 纳米片的 UV-vis 光谱带从 556 nm 红移至 621 nm,表明 Au 壳的相邻

Au NPs 具有强耦合效应。2020 年, Liu 等^[42]提出一种基于二维钛碳烯(MXene)/二硫化钼(MoS₂)@Au NPs 的三元体系的协同校准 SERS 技术, 利用其自身的 3 个特征拉曼峰(对应于 MoS₂ 的 382 cm⁻¹ 和 402 cm⁻¹ 以及 MXene 的 611 cm⁻¹) 的平均强度作为基准进行检

测, 线性拟合优度可达 0.9995。MXene/MoS₂@Au NPs 的 TEM 图像如图 4(e) 所示, 通过精确的合成控制技术, 粒子间隙为 2.2 nm 的 Au NPs 均匀且密集地固定在 MXene/ MoS₂ 表面, 形成了大量 SERS“热点”, 显著增强了报告分子的拉曼信号。

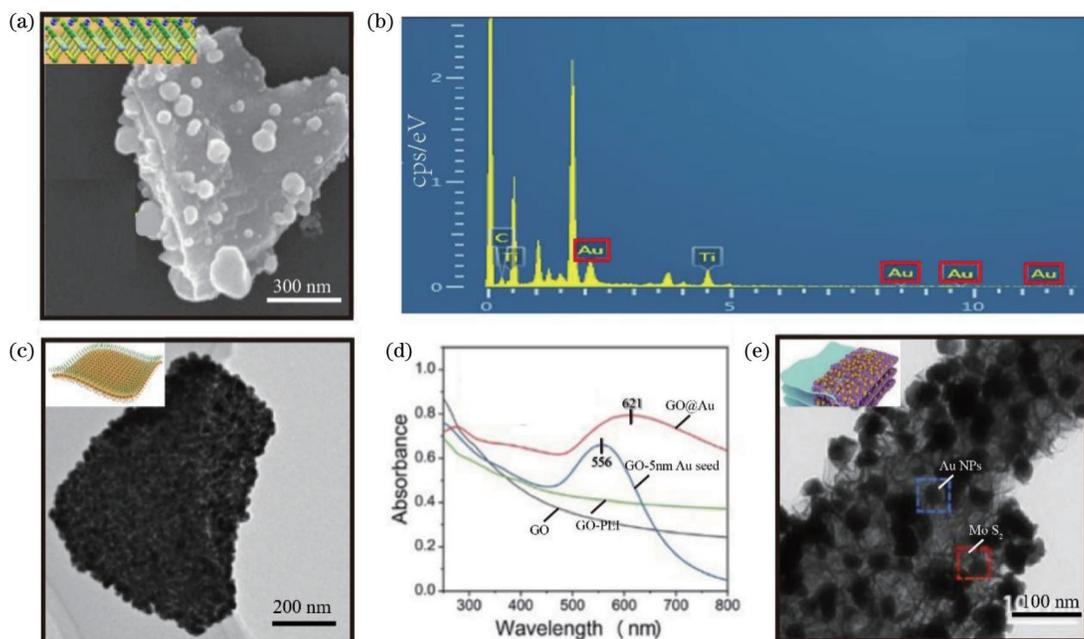


图 4 应用于 SERS-ICA 的二维 SERS 纳米材料的性能表征图。TiC/Au-NPs 的(a) TEM 图像及(b) EDX 光谱^[40]; GO@Au 纳米片的(c) TEM 图像及(d) UV-vis 光谱^[41]; (e) MXene/MoS₂@Au NPs 的 TEM 图像^[42]

Fig. 4 Characterization of 2D SERS nanomaterials applied in SERS-ICA. (a) TEM image and (b) EDX spectrum of TiC/Au-NPs^[40]; (c) TEM image and (d) UV-vis spectra of GO@Au nanosheets^[41]; (e) TEM of MXene/MoS₂@Au NPs^[42]

2.4 三维纳米材料

三维纳米材料是指材料在空间 3 个维度的尺寸都不在纳米尺度内的纳米材料。三维纳米材料大多是以二维纳米材料为基础并结合零维或一维纳米材料制得的。以二维纳米材料为纳米间隙制得的三维 SERS 基底, 其“热点”不仅存在于水平方向的金属纳米颗粒之间, 也存在于垂直方向的纳米颗粒之间^[43]。然而, 目前已经报道的应用于 SERS-ICA 的三维纳米材料较少。2022 年, Wang 等^[44]以二维纳米材料 GO 为核, 先基于种子生长法在其表面生长一层粗糙的金壳得到 GO@Au, 再通过静电相互作用将大量 30 nm 的 Ag NPs 固定在 GO@Au 纳米片的 PEI 层上, 以此获得三维膜状 SERS 免疫标签(GO@Au/Ag), 其 TEM 图像如图 5(a) 所示。图 5(b) 所示的元素映射结果表明 GO@Au/Ag 纳米片是由富含碳(C)和氧(O)的内核与 Au 和 Ag 的外壳组成的。GO@Au/Ag 纳米片的仿真模型如图 5(c) 所示, GO@Au/Ag 纳米片上的 Au 和 Ag 粒子的间隙为 0.5 nm。另外, 所制得的 GO@Au/Ag 具有更大的表面积和更多的 SERS“热点”, 从而能够产生更强的 SERS 信号, 进而提高 SERS 检测的灵敏度。Zheng 等^[45]采用相似的种子生长法在 GO@Au 的表面吸附 30 nm Au NPs, 制得基于 GO 的三维金纳米

膜(GO@Au/Au), 其 TEM 图像如图 5(d) 所示, 拉曼光谱如图 5(e) 所示。与 GO@Au/Ag 纳米片相比, GO@Au/Au 的化学稳定性更强, 不易发生氧化。通过计算, GO@Au-Au 对报告分子 DTNB 的 EF 为 3.54×10^8 , SERS 的增强性能较强。2020 年, Singh 等^[46]采用简单的水热法制备三维 MoS₂ 纳米花(3D-MoS₂), 以 MoS₂ 纳米片为基础, 在不同反应时间下可以获得具有不同表面积的 3D-MoS₂ 纳米花。反应时间为 16 h 时制得的 3D-MoS₂ 纳米花的 TEM 图像如图 5(f) 所示, 纳米片的堆叠程度较低, 形成了较蓬松的纳米花。3D-MoS₂ 纳米花可显著增强拉曼报告分子的 SERS 信号, 而且其表面积可调的特性使其应用范围更广。

3 SERS-ICA 技术的检测应用

近年来, SERS-ICA 技术因其高灵敏、高特异和可定量检测的优势, 已被用于细菌、病毒、药物、毒素、重金属、违禁添加剂等目标物的现场快速检测。SERS-ICA 的检测流程主要分为 4 个部分: SERS tags 的制备、试纸条的组装、试纸条上的特异性反应及试纸条上 SERS 信号的采集和分析。如图 6(a) 所示, 首先, 在纳米材料上修饰具有特征拉曼信号的拉曼报告分子(提

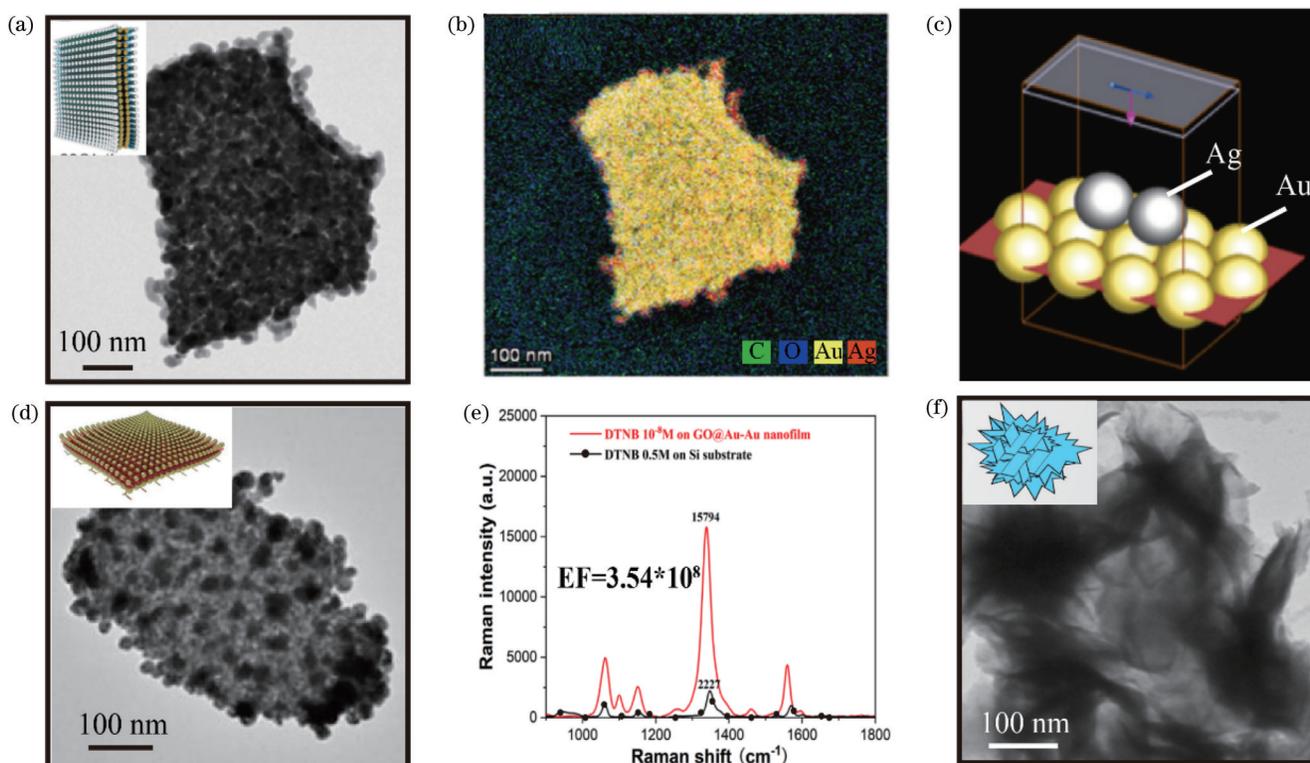


图5 应用于SERS-ICA的三维SERS纳米材料的性能表征。GO@Au/Ag纳米片的(a)TEM图像、(b)元素映射图及(c)仿真模型图^[44];GO@Au/Au纳米片的(d)TEM图像及(e)拉曼光谱^[45]; (f)3D-MoS₂纳米花的TEM图像^[46]

Fig. 5 Characterization of 3D SERS nanomaterials applied in SERS-ICA. (a) TEM image, (b) elemental mapping image, and (c) simulation model of GO@Au/Ag^[44]; (d) TEM image and (e) Raman spectra of GO@Au/Au nanosheets^[45]; (f) TEM image of 3D-MoS₂ nanoflowers^[46]

供SERS信号),并结合特异性的识别元件(如抗体、适配体等)获得SERS tags。将上述制得的SERS tags滴加在结合垫上并组装在试纸条底板的对应位置,将样品垫、NC膜(喷涂有质控线和检测线)和吸水垫也组装在试纸条底板上,经裁切后即获得可用于快速定量检测的SERS-ICA试纸条。如图6(b)所示,将样品溶液滴加在试纸条的样品垫上,溶液在毛细管力的作用下向前移动,样品中的目标检测物(target、IL-6和PCT)与结合垫上的SERS tags发生特异性的捕获反应并形成target-tags免疫复合物。该免疫复合物继续向前移动,当流经检测线时,检测线处预先包覆的抗体将特异性识别目标检测物,并将该免疫复合物固定在检测线处,样品中的目标检测物的浓度越高,所形成的免疫复合物越多,结合在检测线上的SERS tags也越多。相反,若样品中不含目标检测物时,就不会形成target-tags免疫复合物,相应地,SERS tags也不会留在检测线上。利用拉曼信号探测器对检测线上的SERS信号进行采集,根据不同浓度目标检测物对应的SERS强度绘制标准拟合曲线,从而可以对含有未知浓度目标检测物的样本进行高灵敏定量检测。

3.1 在病原菌中的检测应用

快速精准的病原学检测对预防疾病和指导临床用药至关重要。2015年,Zhang等^[48]设计了一种分层花

状Au NPs特异性SERS探针,并应用于免疫层析检测大肠杆菌O157:H7,如图7(a)所示。该方法利用分层花状Au NPs取代传统的胶体金,对大肠杆菌O157:H7的检测限(LOD)为10³ CFU/mL。2018年,Wang等^[49]报道了一种用于高致病病原菌检测的新型高灵敏SERS-ICA技术,如图7(b)所示。利用种子生长法合成胶体金纳米颗粒,并修饰上异硫氰基-孔雀石绿(MGITC)作为SERS tags。SERS tags既可以通过观察检测线上的颜色变化初步定性判断样本中细菌的浓度,还可以通过分析检测线上的SERS信号强度来高灵敏、定量检测细菌含量。该方法的检测时间短(仅需15 min),且加样体积小(只需40 μL)。该方法对鼠疫耶尔森菌、土拉弗朗西斯菌和炭疽芽孢杆菌的LOD分别为43.4、45.8、357 CFU/mL。2020年,Shi等^[50]提出一种可快速检测食源性细菌大肠杆菌O157:H7的生物传感器技术,如图7(c)所示。以SiO₂为核心,利用种子生长法在其表面生成一层金壳,并修饰双层拉曼报告分子DTNB,该功能化粒子一方面可以提供更强的SERS信号,另一方面可以提供更多的与抗体共价结合的羧基化位点,从而提高抗原捕获能力。该检测方法可在15 min内完成对大肠杆菌O157:H7的检测,LOD低至50 CFU/mL,而且在自来水、牛奶、尿液、生菜提取物和牛肉等生物样品中也具有良好的检

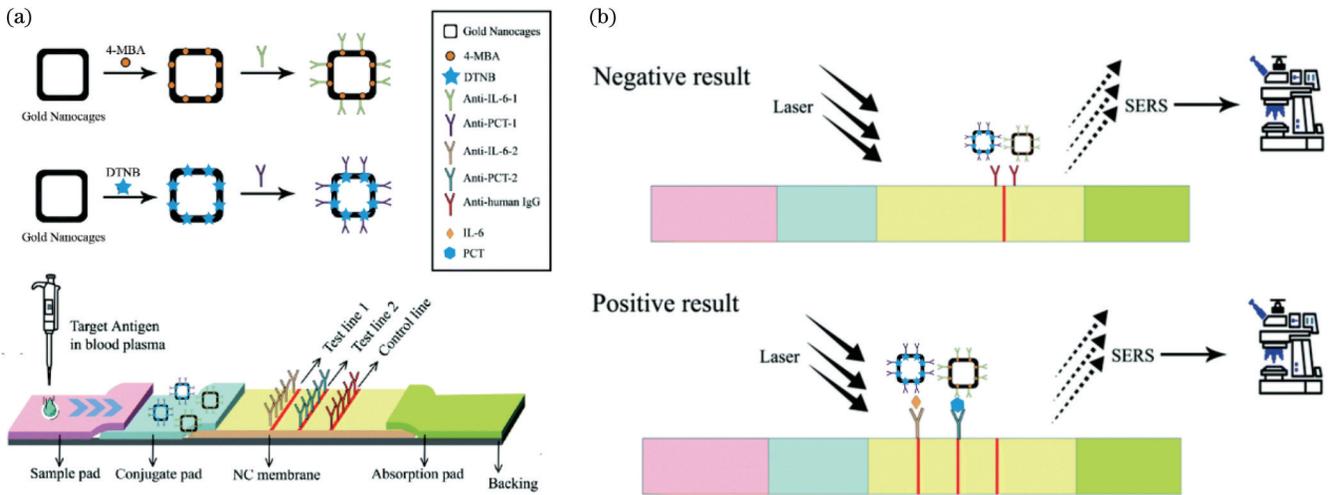


图 6 SERS-ICA 检测 IL-6 和 PCT 的原理图^[47]。(a)SERS tags 的制备及试纸条的组装;(b)在有/无 IL-6 和 PCT 情况下 SERS-ICA 的检测原理

Fig. 6 Schematic of SERS-ICA for the detection of IL-6 and PCT^[47]. (a) Preparation of SERS tags and assembly of strips; (b) detection principle of SERS-ICA in the presence and absent of IL-6 and PCT

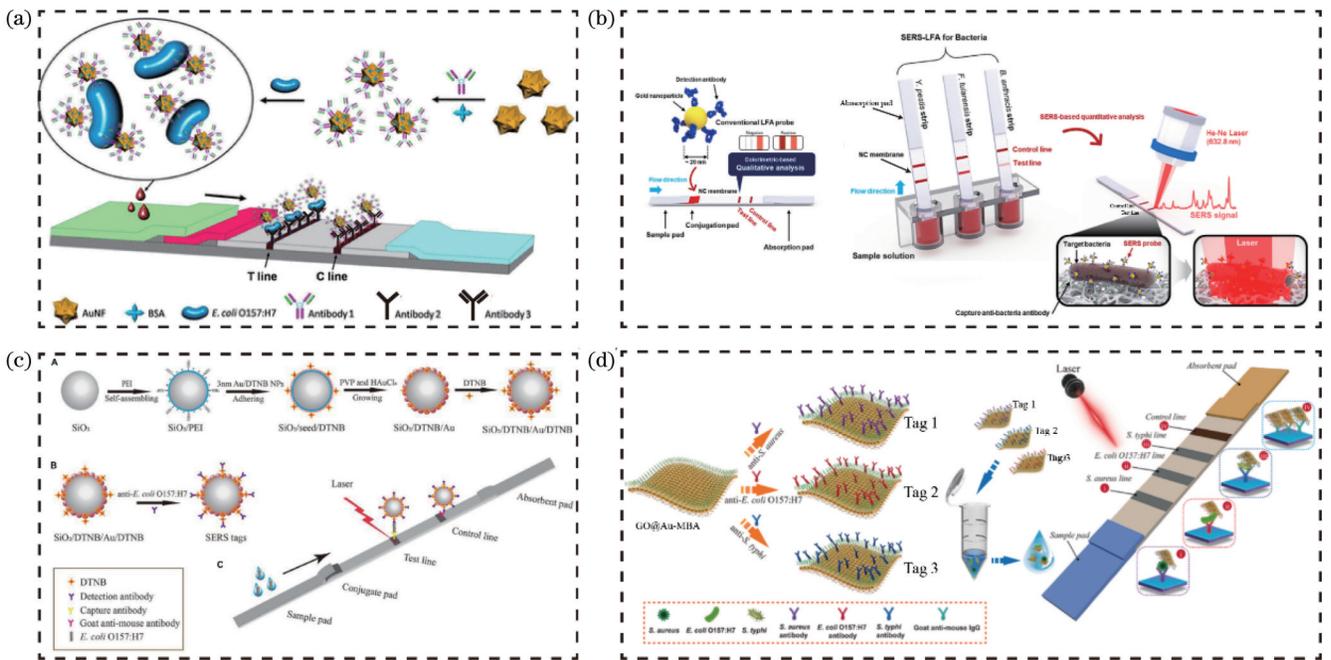


图 7 SERS-ICA 检测细菌原理图。(a)基于分层花状金 SERS 探针检测大肠杆菌 O157:H7^[48];(b)基于胶体金 SERS 探针检测鼠疫耶尔森菌、土拉弗朗西斯菌和炭疽芽孢杆菌原理图^[49];(c)基于 SiO₂@Au SERS 探针检测大肠杆菌 O157:H7^[50];(d)基于 GO@Au SERS 探针检测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌^[41]

Fig. 7 Schematic of SERS-ICA for bacteria detection. (a) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 via SERS probe based on hierarchical flowerlike Au NPs^[48]; (b) detection of *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, and *Bacillus anthracis* via SERS probe based on colloidal Au NPs^[49]; (c) detection of *Escherichia coli* O157:H7 via SERS probe based on SiO₂@Au NPs^[50]; (d) detection of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella typhimurium* via SERS probe based on GO@Au nanosheets^[41]

出效果。2022年,Shen等^[41]提出一种基于改进的具有多通道分析能力和高灵敏度的SERS传感技术,并将其用于同时检测3种细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7、鼠伤寒沙门菌),如图7(d)所示。该方法将二维膜状SERS标签引入免疫层析系统中,二维膜状

SERS标签具有巨大的表面积、优异的稳定性和SERS性能。与传统的球形纳米标签不同,此二维膜状SERS标签可以快速特异性地粘附在细菌细胞上,提高了细菌-纳米标签复合物在试纸条上的分散性,而且标签上存在大量的“热点”进一步增强了SERS信号。

该方法可在 20 min 内完成对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7、鼠伤寒沙门菌的检测, LOD 分别为 8、10、10 cell/mL。2022 年, Tu 等^[51]利用凝集素修饰的磁性纳米标签对食品和环境样品中的食源性致病菌进行广谱捕获, 并利用免疫层析试纸条检测线上的特异性抗体进行特异性检测, 实现了单增李斯特菌、空肠弯曲杆菌和金黄色葡萄球菌 3 种常见食源性细菌的广谱高灵敏度检测, LOD 低至 10 cell/mL。

3.2 在病毒检测中的应用

不同的病毒可能会引起相似的临床症状, 对引起感染的病毒进行早期快速和精确的诊断, 是防止感染病毒传播和指导治疗的关键。2021 年, Jia 等^[52]以 Au@Ag 核壳纳米材料为 SERS 增强基底, 并修饰双层拉曼报告分子 DTNB 制备 SERS tags, 用于高灵敏检测西尼罗病毒非结构蛋白 1。LOD 为 0.1 ng/mL, 比可视化信号灵敏度提高了 100 倍, 检测灵敏度与荧光定量逆转录-PCR 相当。2022 年, Lu 等^[53]以 20 nm 胶

体金纳米颗粒为 SERS 基底, 构建双模式 SERS-ICA 技术用于甲型流感病毒 (H1N1) 和新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的高精度诊断, 如图 8(a) 所示。通过在同一个试纸条喷涂两条检测线, 分别用于检测两种病毒, 实现 H1N1 和 SARS-CoV-2 的同时检测, LOD 分别为 23 HAU/mL 和 5.2 PFU/mL。对 39 例样本 (28 例 SARS-CoV-2 阳性, 6 例 H1N1 阳性, 5 例阴性) 进行临床试验, 评估该方法的临床疗效, 发现其假阴性率明显优于商业化的胶体金免疫层析技术。2019 年, Wang 等^[54]利用 Fe₃O₄@Ag 作为磁性 SERS tags, 在同一个试纸条上同时检测 H1N1 和腺病毒, 如图 8(b) 所示。利用磁性 SERS tags 的特异性捕获和磁富集性能, 对 H1N1 和腺病毒实现同时富集检测, LOD 分别为 50 PFU/mL 和 10 PFU/mL, 其灵敏度比胶体金免疫层析技术提高了 2000 倍。此外, 磁性 SERS-ICA 还可以直接用于真实生物样品检测, 无需对样品进行预处理, 操作简单、快速、稳定。

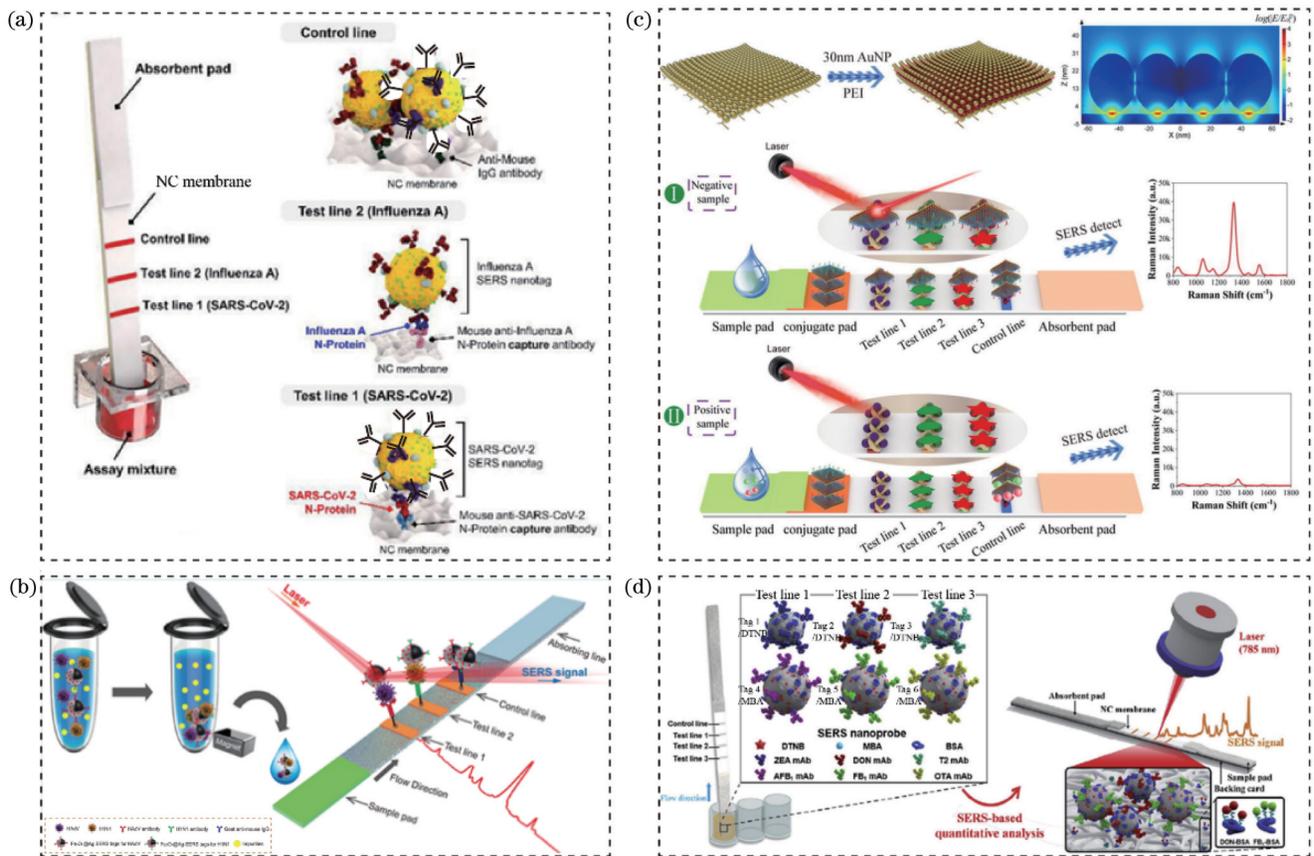


图 8 SERS-ICA 检测病毒原理图。(a) 双模式 SERS-ICA 同时检测 H1N1 和 SARS-CoV-2 病毒^[53]; (b) 基于 Fe₃O₄@Ag 磁性 SERS 标签检测 H1N1 病毒和腺病毒^[54]; (c) 基于 GO@Au 的三维纳米标签检测伏马菌素 B1、黄曲霉毒素 B1 和玉米赤霉烯酮^[45]; (d) 多重 SERS-ICA 试纸条检测 6 种真菌毒素^[55]

Fig. 8 Schematic of SERS-ICA for virus detection. (a) Dual-mode SERS-ICA for simultaneous detection of H1N1 and SARS-CoV-2 virus^[53]; (b) detection of H1N1 virus and adenoviruses via magnetic SERS tags based on Fe₃O₄@Ag^[54]; (c) detection of fumonisin B1, aflatoxin B1, and zearalenone via 3D nanosheets tags based on GO@Au^[45]; (d) detection of six mycotoxins via multiplex SERS-ICA strips^[55]

3.3 在毒素检测中的应用

低剂量的毒素即可引起人类和动物中毒或死亡,

因此开发一种快速、高灵敏的检测技术极其重要。

2016 年, Hwang 等^[56]报道了一种新型的 SERS-ICA 生

物传感器,并将其用于高灵敏、快速检测液体样本中的葡萄球菌肠毒素(SEB),以标志拉曼报告分子的中空金纳米球(HGNs)为SERS检测探针,取代传统的胶体金纳米颗粒。该方法对SEB的LOD为0.001 ng/mL,其灵敏度比ELISA法提高了约3个数量级。2022年,Jia等^[57]开发了一种基于SiO₂@Au NPs的SERS-ICA生物传感器,用于高灵敏、特异性检测蓖麻毒素(ricin)、SEB和A型肉毒素(BoNT/A)。所制备的基于SiO₂@Au NPs的SERS tags具有质量轻、粒径均匀、分散性好、SERS增强性能强的特点。该方法对ricin、SEB和BoNT/A的检测限分别为0.1、0.05、0.1 ng/mL,其灵敏度比基于胶体金的免疫层析试纸条提高了100倍。为了实现试纸条的多重检测,研究者利用具有不同特征拉曼光谱的拉曼报告分子分别标志不同的SERS tags,实现在一条检测线上完成多个目标物质的多重检测。2022年,Zheng等^[45]建立了一种SERS-ICA技术,使用基于GO的三维金纳米片(GO@Au-Au)作为薄膜型SERS tags,用于高灵敏检测未经处理的复杂样品中的3种真菌毒素,如图8(c)所示。将30 nm Au NPs结合在GO@Au二维纳米片上,显著提高了薄膜型SERS标签的SERS活性和比色信号。该方法可以在20 min内完成对伏马菌素B1、黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的检测,LOD分别为0.529、0.745、5.90 pg/mL。2020年,Zhang等^[55]建立了一种多重SERS-ICA生物传感器,并将其用于玉米中6种真菌毒素的高灵敏检测,如图8(d)所示。利用两个特征拉曼报告分子DTNB和4-MBA对Au@Ag核壳纳米材料进行功能化修饰,制备SERS检测探针。在试纸条上设置3条检测线,每条检测线上包覆2种真菌毒素的半抗原偶联物。该方法可以在20 min内完成对6种真菌毒素的检测,即黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、伏马菌素B1、脱氧镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A和T-2毒素,它们的LOD分别为0.96 pg/mL、6.2 pg/mL、0.26 ng/mL、0.11 ng/mL、15.7 pg/mL和8.6 pg/mL。利用所建立的方法对5个玉米样品中的真菌毒素进行检测,其检测结果与液相色谱-质谱法的检测结果一致,检测值的变化小于17%。双拉曼标签和三重检测线的使用极大提高了当前免疫层析试纸条的多路复用能力。

3.4 在核酸检测中的应用

SERS-ICA还可用于DNA、RNA等核酸分子的检测。2016年,Fu等^[58]首次提出利用寡核苷酸(检测DNA探针)和拉曼报告分子(MGITC)对Au NPs进行功能化修饰来制备SERS tags,并将其用于靶向检测HIV-1的DNA,如图9(a)所示。该方法基于“三明治”型杂交反应(结合DNA的Au NPs-靶DNA-捕获DNA),将检测DNA共价结合在Au NPs上并喷涂在结合垫上,将链霉亲和素-生物素修饰的捕获DNA固

定在试纸条的检测线上。当样品中含有目标DNA时,它首先会与固定在Au NPs上的检测DNA杂交,然后在流经检测线时,与其上固定的捕获DNA进行二次杂交,形成“三明治”复合物。通过检测试纸条检测线上拉曼信号的变化即可实现对HIV-1 DNA的高灵敏定量检测,检测范围为8 pg/mL~64 ng/mL,经计算其LOD为0.24 pg/mL,其检测灵敏度与其他比色法和荧光法相比至少提高了1000倍。2019年,Zhang等^[59]开发了一种基于SERS纳米标签的微阵列免疫层析技术(LFM),并将其用于11种常见呼吸道病原体的核酸检测,将微阵列与ICA试纸条相结合,如图9(b)所示。以尼罗河蓝A(NBA)和亚甲基蓝(NBA)修饰的Ag^{MB}@Au和Ag^{NBA}@Au两种SERS标签分别标志不同呼吸道病原体的核酸序列,并将上述病原体的待检核酸序列固定在免疫层析试纸条NC膜的2×3微阵列(6个检测点)中,其中在5个检测点上检测2种核酸,在剩余的1个检测点仅检测1种核酸。甲型流感病毒、1型副流感病毒、3型副流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、伯纳特氏立克次氏体、嗜肺军团菌、乙型流感、2型副流感病毒、腺病毒、肺炎衣原体和肺炎支原体的LOD分别为0.031、0.030、0.038、0.038、0.040、0.039、0.035、0.032、0.040、0.039、0.041 pmol/L。该方法将多重检测集成到一个试纸条上,明显减少了检测所需的样本量、试剂消耗,降低了材料成本,缩短了检测持续时间等。这种SERS-LFM作为高通量呼吸道病原体核酸检测平台,具有超高灵敏度、宽检测范围、低成本、短检测时间、易操作的优势,在个性化医疗保健中具有良好的应用前景。2021年,Wang等^[60]利用基于SERS-ICA与催化发夹自组装(CHA)信号放大策略的新型生物传感平台实现了microRNA-21的高灵敏定量检测。根据microRNA-21的序列设计了两个发夹DNA探针,其中一个通过硫醇-金相互作用偶联在Au@Ag NPs上。修饰到发夹DNA探针另一端的生物素由于形成发夹结构时靠近Au@Ag NPs而无法与检测线上的链霉亲和素结合。当待检物中含有靶标microRNA-21时,发夹结构解开,生物素被暴露出来,且会触发CHA级联反应,将连接在Au@Ag NPs上的生物素暴露出来,利用生物素与链霉亲和素之间的相互作用,将固定有发夹DNA探针和生物素的Au@Ag纳米标签截留在检测线上,通过分析检测线上的SERS信号可定量检测microRNA-21的浓度。该方法对microRNA-21的检测LOD为84 fmol/L,与没有CHA辅助的SERS-ICA相比,检测灵敏度提高了3个数量级。2022年,Pang等^[61]将成簇的规律性间隔短回文重复序列(CRISPR)技术与SERS-ICA技术相结合,并用于HIV-1的双链DNA(dsDNA)的高灵敏检测,如图9(c)所示。通过结合高灵敏的SERS tags和CRISPR-Cas12a的靶向信号扩增能力,无需任何预扩增步骤即可实现对HIV-1 dsDNA的直接定量

检测, LOD 为 0.3 fmol/L, 比传统的比色免疫层析方法提高了 4 个数量级, 比目前报道的 CRISPR 介导的无扩增核酸检测方法提高了 3 个数量级。该方法的

整个检测过程可在 1 h 内完成, 而且基于 Cas12a 的靶特异性, HIV-1 单碱基耐药突变 (M184V) 的识别率可低至 0.01%。

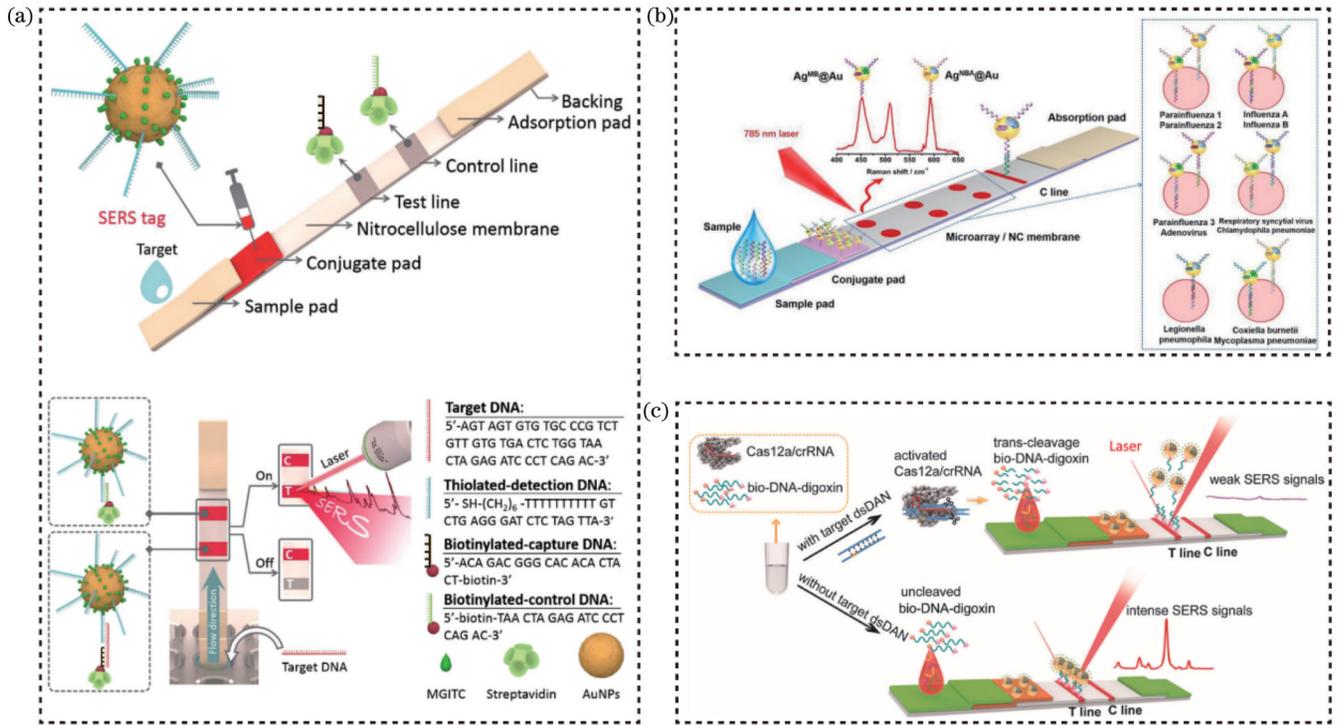


图 9 SERS-ICA 检测核酸原理图。(a) 基于 MGITC-Au NPs 的 SERS-ICA 检测 HIV-1 的 DNA^[58]; (b) 基于 SERS 的微阵列免疫层析技术检测呼吸道病原体^[59]; (c) 基于 CRISPR-Cas12a 的 SERS-ICA 检测 HIV-1^[61]

Fig. 9 Schematic of SERS-ICA for the detection of nucleic acids. (a) SERS-ICA for the detection of HIV-1 based on MGITC-Au NPs^[58]; (b) SERS-based lateral flow microarray for the detection of respiratory tract infections^[59]; (c) CRISPR-Cas12a-based SERS-ICA for the detection of HIV-1^[61]

3.5 在蛋白检测中的应用

传染病、癌症等重大疾病的早期诊断对降低死亡率具有重要意义。2021 年, Chen 等^[62]开发了一种超灵敏的 SERS-ICA 技术, 利用带有间隙结构的增强拉曼标签 (GERTs) 同时检测抗 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG。将拉曼报告分子 4-MBA 修饰在核和壳之间的内部纳米间隙中, 利用核-壳之间 1 nm 的间隙产生 SERS“热点”, 所得信号比传统纳米标签增强了大约 30 倍; 且这种多层纳米结构可以保护拉曼报告分子免受外部影响, 并最大限度地降低其被解吸的影响。该方法对 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 的 LOD 分别为 1 ng/mL 和 0.1 ng/mL, 其灵敏度与比色法相比提高了 2 个数量级。随后, Liu 等^[63]将基于 SiO₂@Ag 的双通道 SERS-ICA 用于同时高灵敏检测抗 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG, 如图 10(a) 所示。先在 SiO₂@AgNPs 上修饰双层 DTNB, 再在其表面结合可特异性结合抗 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 的 SARS-CoV-2 刺突 (S) 蛋白制备 SERS tags, 所制备的 SERS tags 具有优异的 SERS 性能、良好的分散性和较强的稳定性。该方法对 SARS-CoV-2 S 蛋白抗体的 LOD 为 1 pg/mL。利用 COVID-19 的阴性 (49 例) 和阳性 (19 例) 血清样本进行临床实

际样本验证, 针对不同稀释倍数的临床血清样本, IgM 和 IgG 联合检测的准确性为 0.997~1。2020 年, Lu 等^[36]将基于 SERRS 的免疫层析检测技术用于定量检测甲胎蛋白 (AFP), 对肿瘤进行早期诊断。所制备的 Au NRs 在 785 nm 激光的激发下发生共振, SERRS 性能达到最强。该方法对 AFP 的 LOD 低至 9.2 pg/mL, 其灵敏度比基于 Au NPs 的 SERS-ICA 方法和 ELISA 方法分别提高了 100 和 10 倍。

2018 年, Zhang 等^[64]将基于银核金壳双金属 SERS 纳米标签的多通道免疫层析技术用于多重定量检测 3 种心肌标志物, 对急性心肌梗死 (AMI) 进行早期诊断。该方法将拉曼报告分子 NBA 嵌入到双金属 Ag@Au 的内部间隙中制备 SERS tags, LSPR 产生的电磁场增强作用使得制备的 SERS tags 具有较强的拉曼信号。该方法对肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌红蛋白 (Myo) 的 LOD 分别为 0.55、0.44、3.2 pg/mL, 均低于临床临界值。利用该方法对临床收集的 AMI 患者样本进行检测, 其检测结果与 FDA 批准的化学发光免疫分析法 (CLIA) 的检测结果具有良好的线性相关性。随后, Khlebtsov 等^[37]开发了一种基于非球形间隙增强拉曼标签 (GERTs) 的

新型 SERS-ICA 技术,并将其用于 cTnI 检测。该方法同样将拉曼报告分子对硝基苯硫酚(NBT)嵌入到金纳米棒核和金壳的纳米间隙内制备 SERS tags,其 SERS 响应能力比其他常见的 SERS tags (如 Au NRs、纳米星、在表面吸附报告分子的金壳等)高一个数量级。该方法对 cTnI 的 LOD 为 0.1 ng/mL,其灵敏度比传统的胶体金免疫层析方法提高了 30 倍。2020 年, Xiao 等^[65]利用一种集成化多通道免疫层析反应柱搭配专用的 SERS 信号读取仪来同时自动检测多个样品或单个样品的多个标志物,如图 10(b)所示。该方

法采用 Au NR 作为 SERS tags,并利用开发的便携式多路 SERS-ICA 信号读取仪实现了对 3 种癌症标志物抗原的高灵敏、特异性检测,对 AFP、癌胚抗原(CEA)和前列腺抗原(PSA)的 LOD 低至 0.01 ng/mL,比可视化信号灵敏度提高了 1000 倍。同时检测了 45 例上述 3 种癌症患者的临床血清样本,阳性样本检出率为 100%。该方法只需将样品加入到集成化多通道免疫层析柱中间的加样孔内,即可实现对多个样品的自动化同时检测,为 SERS-ICA 在现场快速检测中的多路复用、自动化和高灵敏检测应用奠定了良好的基础。

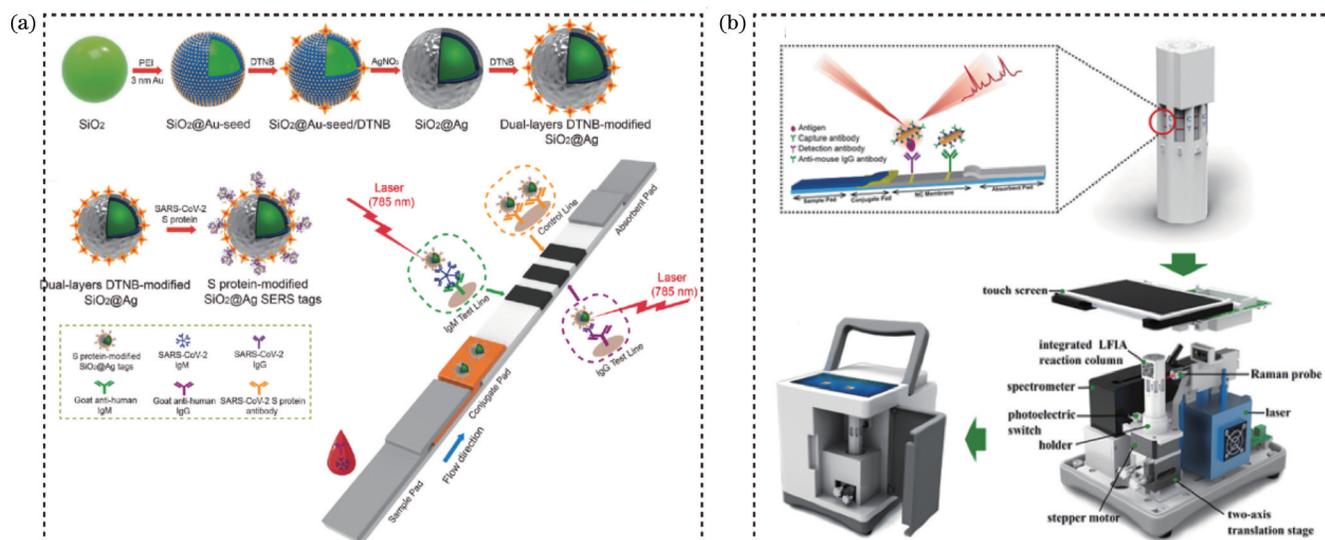


图 10 SERS-ICA 用于检测蛋白原理图。(a)基于 SiO₂@Ag 的 SERS-ICA 同时检测抗 SARS-CoV-2 IgM/IgG^[63]; (b)基于多通道免疫层析反应柱的便携式 SERS-ICA 信号读取仪检测癌症标志物抗原^[65]

Fig. 10 Schematic of SERS-ICA for protein detection. (a) Simultaneous analysis of anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG via the SERS-ICA based on SiO₂@Ag^[63]; (b) detection of cancer marker antigens via portable SERS-ICA reader based on multichannel ICA reaction column^[65]

4 展 望

SERS-ICA 作为一种前沿研究技术,具有高通量、高灵敏度、高特异性和可定量的优势,近年来在分子诊断领域的应用范围越来越广泛,具有良好的发展前景。在 SERS-ICA 检测技术中,SERS tag 的制备至关重要,它决定了 SERS-ICA 检测结果的灵敏度和特异性等要素。SERS tag 通常是由用于拉曼增强的金属纳米颗粒、拉曼标志分子以及生物识别元件(抗体、DNA 等)3 个部分构成。其中,高性能的拉曼增强基底材料是 SERS 技术实现高灵敏检测的关键,研究人员通过设计和合成不同维度的 SERS 增强基底来提高检测的灵敏度。除了制备高性能的 SERS 基底外,影响 SERS-ICA 检测灵敏度的其他因素包括高效生物识别元件的筛选、纳米材料在试纸条上迁移以及信号放大策略等。随着这些问题的逐步解决,SERS-ICA 的检测性能将进一步提升,不久的将来将实现广泛的商业化应用。

参 考 文 献

- [1] 刘杰,任小波,姚远,等. 我国生物安全问题的现状分析及对策[J]. 中国科学院院刊, 2016, 31(4): 387-393.
Liu J, Ren X B, Yao Y, et al. Tendency and strategy of China's biological security[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2016, 31(4): 387-393.
- [2] Yu L, Wang J Y, Li X L, et al. Simultaneous detection of SARS-CoV-2 and pandemic (H1N1) 2009 virus with real-time isothermal platform[J]. Heliyon, 2021, 7(7): e07584.
- [3] Doern C D, Butler-Wu S M. Emerging and future applications of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2016, 18 (6): 789-802.
- [4] Pankhurst L J, del Ojo Elias C, Votintseva A A, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study[J]. The Lancet Respiratory Medicine, 2016, 4(1): 49-58.
- [5] Liu Y R, Tan Y Y, Fu Q Y, et al. Reciprocating-flowing on-a-chip enables ultra-fast immunobinding for multiplexed rapid ELISA detection of SARS-CoV-2 antibody[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112920.
- [6] Richert-Pöggeler K R, Franzke K, Hipp K, et al. Electron microscopy methods for virus diagnosis and high resolution

- analysis of viruses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3255.
- [7] Shiu C M, Wang J J, Yu F Y. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid one-step immunochromatographic strip for fumonisin B1 in grain-based food and feed samples[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(6): 1020-1026.
- [8] Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation [J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [9] 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.
- [10] Jeanmaire D L, Van Duyne R P. Surface Raman spectroelectrochemistry[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1977, 84(1): 1-20.
- [11] Wang C W, Li P, Wang J F, et al. Polyethylenimine-interlayered core-shell-satellite 3D magnetic microspheres as versatile SERS substrates[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(44): 18694-18707.
- [12] Li J, Wang C W, Kang H Q, et al. Label-free identification carbapenem-resistant *Escherichia coli* based on surface-enhanced resonance Raman scattering[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(9): 4761-4765.
- [13] Israelsen N D, Wooley D, Hanson C, et al. Rational design of Raman-labeled nanoparticles for a dual-modality, light scattering immunoassay on a polystyrene substrate[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2016, 10(1): 1-12.
- [14] Porter M D, Lipert R J, Siperko L M, et al. SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 1001-1011.
- [15] Lane L A, Qian X M, Nie S M. SERS nanoparticles in medicine: from label-free detection to spectroscopic tagging[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(19): 10489-10529.
- [16] Wang Y Q, Yan B, Chen L X. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(3): 1391-1428.
- [17] Ding S Y, Yi J, Li J F, et al. Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials [J]. *Nature Reviews Materials*, 2016, 1: 16021.
- [18] Wang C W, Shi D W, Wan N, et al. Development of spike protein-based fluorescence lateral flow assay for the simultaneous detection of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG [J]. *The Analyst*, 2021, 146(12): 3908-3917.
- [19] Wu Z. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* by a SERS-based lateral flow immunochromatographic assay [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(5): 1086-1091.
- [20] Wu T, Li J X, Zheng S A, et al. Magnetic nanotag-based colorimetric/SERS dual-readout immunochromatography for ultrasensitive detection of clenbuterol hydrochloride and ractopamine in food samples[J]. *Biosensors*, 2022, 12(9): 709.
- [21] Chen M H, Luo R, Li S H, et al. Paper-based strip for ultrasensitive detection of OSCC-associated salivary microRNA via CRISPR/Cas12a coupling with IS-primer amplification reaction[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(19): 13336-13342.
- [22] Wang D M, He S G, Wang X H, et al. Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(12): 1150-1158.
- [23] Liu Z Z, Wang C W, Zheng S, et al. Simultaneously ultrasensitive and quantitative detection of influenza A virus, SARS-CoV-2, and respiratory syncytial virus via multichannel magnetic SERS-based lateral flow immunoassay[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2023, 47: 102624.
- [24] Zhuang J W, Zhao Z Y, Lian K, et al. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 207: 114167.
- [25] 王岩, 孙恩奇, 杨学弦, 等. 水热法制备 $\text{Mo}_{1-x}\text{W}_x\text{S}_2$ 合金材料及晶体结构的研究[J]. *光学学报*, 2022, 42(4): 0416001.
- Wang Y, Sun E Q, Yang X X, et al. Preparation of $\text{Mo}_{1-x}\text{W}_x\text{S}_2$ alloy material and crystal structure by hydrothermal synthesis[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(4): 0416001.
- [26] 刘二伟, 杨增玲, 韩鲁佳, 等. 原位生长法制备 $\text{Cu}_2\text{O-Ag}$ 基底及 SERS 活性研究[J]. *光学学报*, 2021, 41(7): 0724002.
- Liu E W, Yang Z L, Han L J, et al. Fabrication and SERS activity of $\text{Cu}_2\text{O-Ag}$ substrate by *in situ* growth[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(7): 0724002.
- [27] 蒋沐, 朱永, 张洁. 二氧化钛/银复合结构的制备和拉曼增强实验[J]. *光学学报*, 2022, 42(4): 0429001.
- Jiang M, Zhu Y, Zhang J. Titanium dioxide/silver composite structure prepared and Raman enhancement experiment[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(4): 0429001.
- [28] Yu J, Yang H, Wu J, et al. Ultrafast laser fabrication of surface-enhanced Raman scattering sensors [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2023, 50(3): 220333.
- [29] Yin Z, Ni C, Wu S, et al. Femtosecond laser direct writing processing of SERS substrates and applications [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2023, 50(3): 220322.
- [30] Huang Z C, Zhang A M, Zhang Q A, et al. Nanomaterial-based SERS sensing technology for biomedical application[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(24): 3755-3774.
- [31] Zhang K H, Wang C W, Rong Z, et al. Silver coated magnetic microflowers as efficient and recyclable catalysts for catalytic reduction[J]. *New Journal of Chemistry*, 2017, 41(23): 14199-14208.
- [32] Maneepakorn W, Bamrungsap S, Apiwat C, et al. Surface-enhanced Raman scattering based lateral flow immunochromatographic assay for sensitive influenza detection [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(113): 112079-112085.
- [33] Jia X F, Wang C W, Rong Z, et al. Dual dye-loaded Au@Ag coupled to a lateral flow immunoassay for the accurate and sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(38): 21243-21251.
- [34] Deng D D, Yang H, Liu C, et al. Ultrasensitive detection of diclofenac in water samples by a novel surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based immunochromatographic assay using $\text{Ag}^{\text{MBA}}/\text{SiO}_2\text{-Ab}$ as immunoprobe[J]. *Sensors and Actuators B*, 2019, 283: 563-570.
- [35] Chen Z Y, Sun Y E, Shi J Y, et al. Facile synthesis of Au@Ag core-shell nanorod with bimetallic synergistic effect for SERS detection of thiabendazole in fruit juice[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131276.
- [36] Lu L C, Yu J L, Liu X X, et al. Rapid, quantitative and ultrasensitive detection of cancer biomarker by a SERS-based lateral flow immunoassay using bovine serum albumin coated Au nanorods[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(1): 271-281.
- [37] Khlebtsov B N, Bratashov D N, Byzova N A, et al. SERS-based lateral flow immunoassay of troponin I by using gap-enhanced Raman tags[J]. *Nano Research*, 2019, 12(2): 413-420.
- [38] 张晓蕾, 张洁, 朱永. CNTs/AgNPs 复合结构的微流控表面增强拉曼散射实验[J]. *中国激光*, 2019, 46(10): 1011001.
- Zhang X L, Zhang J, Zhu Y. Microfluidic surface-enhanced Raman scattering experiment using CNTs/AgNPs composite structure[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(10): 1011001.
- [39] Gao D H, Yang X H, Teng P P, et al. On-line SERS detection of bilirubin based on the optofluidic in-fiber integrated GO/Ag NPs for rapid diagnosis of jaundice[J]. *Talanta*, 2021, 234: 122692.
- [40] Barveen N R, Wang T J, Chang Y H. A photochemical approach to anchor Au NPs on MXene as a prominent SERS substrate for ultrasensitive detection of chlorpromazine[J]. *Microchimica Acta*, 2021, 189(1): 1-12.
- [41] Shen W Z, Wang C G, Zheng S, et al. Ultrasensitive

- multichannel immunochromatographic assay for rapid detection of foodborne bacteria based on two-dimensional film-like SERS labels[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 437: 129347.
- [42] Liu L, Shangguan C J, Guo J L, et al. Ultrasensitive SERS detection of cancer-related miRNA-182 by MXene/MoS₂@AuNPs with controllable morphology and optimized self-internal standards[J]. *Advanced Optical Materials*, 2020, 8(23): 2001214.
- [43] Zhang C, Li C H, Yu J, et al. SERS activated platform with three-dimensional hot spots and tunable nanometer gap[J]. *Sensors and Actuators B*, 2018, 258: 163-171.
- [44] Wang C W, Wang C G, Li J X, et al. Ultrasensitive and multiplex detection of four pathogenic bacteria on a bi-channel lateral flow immunoassay strip with three-dimensional membrane-like SERS nanostickers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 214: 114525.
- [45] Zheng S, Wang C G, Li J X, et al. Graphene oxide-based three-dimensional Au nanofilm with high-density and controllable hotspots: a powerful film-type SERS tag for immunochromatographic analysis of multiple mycotoxins in complex samples[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 448: 137760.
- [46] Singh J, Kumar S, Soni R K. Synthesis of 3D-MoS₂ nanoflowers with tunable surface area for the application in photocatalysis and SERS based sensing[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2020, 849: 156502.
- [47] Xia J, Lu D, Liu Y F, et al. Prediction of premature rupture of membranes via simultaneous detection of prolactin and interleukin-6 by a SERS-based immunochromatographic assay [J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44(39): 17099-17111.
- [48] Zhang L, Huang Y J, Wang J Y, et al. Hierarchical flowerlike gold nanoparticles labeled immunochromatography test strip for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2015, 31(19): 5537-5544.
- [49] Wang R, Kim K, Choi N, et al. Highly sensitive detection of high-risk bacterial pathogens using SERS-based lateral flow assay strips[J]. *Sensors and Actuators B*, 2018, 270: 72-79.
- [50] Shi L L, Xu L, Xiao R, et al. Rapid, quantitative, high-sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 by gold-shell silica-core nanospheres-based surface-enhanced Raman scattering lateral flow immunoassay[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 596005.
- [51] Tu Z J, Cheng S Y, Dong H, et al. Universal and ultrasensitive detection of foodborne bacteria on a lateral flow assay strip by using wheat germ agglutinin-modified magnetic SERS nanotags [J]. *RSC Advances*, 2022, 12(42): 27344-27354.
- [52] Jia X F, Liu Z Z, Peng Y J, et al. Automatic and sensitive detection of West Nile virus non-structural protein 1 with a portable SERS-LFIA detector[J]. *Microchimica Acta*, 2021, 188(6): 1-9.
- [53] Lu M D, Joung Y, Jeon C S, et al. Dual-mode SERS-based lateral flow assay strips for simultaneous diagnosis of SARS-CoV-2 and influenza a virus[J]. *Nano Convergence*, 2022, 9(1): 1-12.
- [54] Wang C W, Wang C G, Wang X L, et al. Magnetic SERS strip for sensitive and simultaneous detection of respiratory viruses[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(21): 19495-19505.
- [55] Zhang W J, Tang S S, Jin Y P, et al. Multiplex SERS-based lateral flow immunosensor for the detection of major mycotoxins in maize utilizing dual Raman labels and triple test lines[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 393: 122348.
- [56] Hwang J, Lee S, Choo J. Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(22): 11418-11425.
- [57] Jia X F, Wang K L, Li X Y, et al. Highly sensitive detection of three protein toxins via SERS-lateral flow immunoassay based on SiO₂@Au nanoparticles[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2022, 41: 102522.
- [58] Fu X L, Cheng Z Y, Yu J M, et al. A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 78: 530-537.
- [59] Zhang D, Huang L, Liu B, et al. Rapid and ultrasensitive quantification of multiplex respiratory tract infection pathogen via lateral flow microarray based on SERS nanotags[J]. *Theranostics*, 2019, 9(17): 4849-4859.
- [60] Wang W J, Li Y, Nie A X, et al. A portable SERS reader coupled with catalytic hairpin assembly for sensitive microRNA-21 lateral flow sensing[J]. *Analyst*, 2021, 146(3): 848-854.
- [61] Pang Y F, Li Q, Wang C W, et al. CRISPR-cas12a mediated SERS lateral flow assay for amplification-free detection of double-stranded DNA and single-base mutation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 429: 132109.
- [62] Chen S L, Meng L W, Wang L T, et al. SERS-based lateral flow immunoassay for sensitive and simultaneous detection of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies by using gap-enhanced Raman nanotags[J]. *Sensors and Actuators B*, 2021, 348: 130706.
- [63] Liu H F, Dai E H, Xiao R, et al. Development of a SERS-based lateral flow immunoassay for rapid and ultra-sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG in clinical samples[J]. *Sensors and Actuators B*, 2021, 329: 129196.
- [64] Zhang D, Huang L, Liu B, et al. Quantitative and ultrasensitive detection of multiplex cardiac biomarkers in lateral flow assay with core-shell SERS nanotags[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 106: 204-211.
- [65] Xiao R, Lu L C, Rong Z, et al. Portable and multiplexed lateral flow immunoassay reader based on SERS for highly sensitive point-of-care testing[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112524.

Research Progress on SERS Immunochromatographic Assay Technology Based on Novel Nanomaterials

Liu Zhenzhen, Liu Xiaoxian, Sun Yansong^{**}, Xiao Rui^{*}

Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, PLA Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract

Significance Developing an early rapid and highly sensitive diagnostic technology is of great significance to the prevention and treatment of diseases. However, current detection methods require tedious steps, long analytical time, high cost, advanced instruments, and skillful personnel, even with high sensitivity and specificity. Immunochromatographic assay (ICA) is currently recognized as the most promising method for point of care testing (POCT) due to its portability, simple operation, low cost, and short detection time. However, traditional ICA is judged by the visual detection results produced by colloidal gold nanoparticles, and can merely achieve qualitative and semi-quantitative detection. To overcome the disadvantages of low sensitivity and non-quantitative detection, researchers apply PCR, fluorescent probes, and surface-enhanced Raman scattering (SERS) to immunochromatographic systems, greatly improving the sensitivity and quantitative detection properties of ICA. SERS is an excellent analytical method with high sensitivity, against photobleaching, narrow bandwidth, and multi-channel detection.

SERS-ICA is the research on cutting-edge technologies and has become a research hotspot in related fields recently, which combines the advantages of SERS including high throughput and sensitivity, and ICA featuring simpleness and rapid speed. SERS immuno-tags prepared by nanomaterials are employed to replace the traditional colloidal gold nanoparticles and can provide SERS signals for quantitative detection. SERS immuno-tags are mainly composed of three parts containing noble metal nanomaterials (e. g. , gold, silver), Raman report molecules, and specific recognition elements (e. g. , antibodies, aptamer, nucleic acids). Notably, Raman report molecules are adopted to provide the characteristic Raman signals, and their SERS signal intensities will be greatly enhanced while approaching the rough surface of the noble metal nanomaterials. Additionally, the specific recognition elements are applied to specifically recognize and capture the targets from the sample solutions. Quantitative detection of SERS-ICA is achieved by collecting and analyzing the SERS signals on the test line of the strips produced by the intercepted SERS immuno-tags.

Progress High-performance SERS tags play a key role in SERS-ICA detection. Many studies concentrate on developing the nanomaterials with high density "hot spots", and improving the SERS signals by constructing multi-dimensional and high-density "hot spots" on the SERS substrates. To improve the detection sensitivity, in recent years, researchers have synthesized the SERS substrates with strong SERS enhanced performances by designing and optimizing the particle sizes, morphology and structures of the nanomaterials (Figs. 2-5). Raman report molecules and antibodies are successively conjugated on the SERS substrates to prepare functionalized SERS immuno-tags. The as-prepared SERS immuno-tags can specifically capture the target antigen to form the immunocomplex of tags-antigen and migrate on the ICA strips by capillary action towards the absorbent pad. In addition, the detection antibodies precoated on the test line of the ICA strips can specifically identify the target antigen and capture the immunocomplex of tags-antigen. Therefore, visual band and SERS signals can be found on the test line due to the formation of antibody-antigen-antibody sandwich composite structure. Then, the SERS signals on the test line are collected by the Raman detector, and the calibration curves of the SERS signal intensities and the corresponding concentrations of target antigen are plotted for quantitative analysis of the unknown target concentration in the sample. For improving the detection efficiency of SERS-ICA, researchers have set up multiple testing lines or testing dots on one ICA strip (Figs. 6-10). Meanwhile, based on the characteristic Raman fingerprint spectra, different Raman report molecules with uncrossed characteristic Raman shifts are modified on the SERS substrates to distinguish different targets on the same sites and this feature is applied to SERS-ICA (Figs. 8-9). Moreover, the as-reported integrated multi-channel immunochromatography reaction column greatly improves the multiplexing and automation detection properties of SERS-ICA (Fig. 10).

Conclusions and Prospects We briefly introduce the basic principles of SERS and ICA and summarize several different SERS substrates for SERS-ICA and the application of SERS-ICA in different detection fields. It is of significance for increasing the detection sensitivity of SERS-ICA to improve the antigen-capture ability of the SERS tags and SERS enhanced properties of the SERS substrates. Finally, the future development trend of SERS-ICA detection technology is prospected.

Key words surface-enhanced Raman scattering; immunochromatographic assay; point of care testing; multiplex detection