

doi: 10.3788/gzxb20184712.1228002

基于 PS@Ag 纳米探针和 Si@Ag 阵列基底的表面增强拉曼散射特性的肿瘤标志物免疫检测

王哲¹, 洪颢¹, 梁照恒¹, 王福艳², 周骏¹

(1 宁波大学 理学院 微电子科学与工程系, 浙江 宁波 315211)

(2 宁波大学 医学院 浙江省病理生理学重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 基于 Ag 包覆聚苯乙烯球(PS@Ag)纳米探针和 Ag 覆盖硅金字塔结构(Si@Ag)阵列基底构建“三明治”免疫结构, 开展表面增强拉曼散射(SERS)特性研究, 实现了肝癌肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)的高灵敏、高特异性的检测。通过硝酸银原位还原生成 PS@Ag 纳米粒子, 再依次链接 4-巯基苯甲酸(4-MBA)及甲胎蛋白抗体(Anti-AFP) 制备得到 PS@Ag 免疫探针。采用 Langmuir-Blodgett 膜技术、等离子体刻蚀和湿法刻蚀技术, 以 PS 球阵列为模版, 刻蚀大面积硅金字塔结构, 再依次沉积 Ag 膜和链接 Anti-AFP 制备得到免疫基底。结果表明, 基于“三明治”免疫结构的 SERS 检测方案具有高灵敏度(检测极限为 $1.75 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和宽的动态范围($2 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。此外, 对临床人体血清样品进行 SERS 免疫检测, 得到了与化学免疫发光法一致的结果, 而且具有更高的灵敏度, 可应用于肝癌的早期检测与诊断。

关键词: 表面增强拉曼散射; 免疫检测; 甲胎蛋白; 金字塔结构

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2018)12-1228002-9

Surface Enhanced Raman Scattering-based Tumor Immunoassay Using PS@Ag Nano-probes and Si@Ag Array Substrate

WANG Zhe¹, FU Hao¹, LIANG Zhao-heng¹, WANG Fu-yan², ZHOU Jun¹

(1 *Department of Microelectronics Engineering, Faculty of Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China*)

(2 *Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China*)

Abstract: A super-sensitive, high-specific immunoassay of tumor marker based on Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) was developed with the sandwich-type immune structure consisted of Ag-covered polystyrene sphere (PS@Ag) probes and Ag-deposited Si pyramid array (Si@Ag) substrate. The PS@Ag immune probe was prepared by successively immobilizing 4-Mercaptobenzoic acid (4-MBA) and Anti-AFP antibodies on the surface of in-situ reduced PS@Ag nanoparticles. The Si pyramid array was fabricated using PS spheres as a template, combining with Langmuir-Blodgett method, reactive ion etching and wet chemical etching techniques. Then, Si @ Ag immune substrate was prepared by successively depositing Ag film and immobilizing Anti-AFP antibodies on the surface of Si pyramid array. The results demonstrate that the constructed immunoassay platform exhibits high sensitivity with the limit of detection of $1.75 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and wide linear range from $2 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. In addition, the detections of serum sample show the SERS-based platform is not only well-consistent with that of chemiluminescent immunoassay but also more sensitive, which could be potentially applied in the

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 61320106014, 61675104, 81501421)和宁波大学王宽诚幸福基金资助

第一作者: 王哲(1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为表面增强拉曼散射及其应用. Email: zhewangscience@163.com

导师(通讯作者): 周骏(1958-), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为纳米功能材料、光电子技术和生物光子学. Email: zhoujun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-19; 录用日期: 2018-08-21

<http://www.photon.ac.cn>

practical clinical diagnoses of cancer.

Key words: Surface-enhanced Raman scattering; Immunoassay; Alpha fetoprotein; Pyramid array

OCIS Codes: 280.1415; 160.4236; 240.6695

0 引言

目前,癌症已经严重威胁人类健康^[1].然而,医学研究表明,大量癌症患者可通过早期发现和治疗达到治愈的目的^[2-3].肿瘤标志物作为一种生物分子,存在于肿瘤患者的组织、体液和排泄物中,可以有效地反映肿瘤在人体内的产生和发展^[4-5].因此通过定量检测肿瘤标志物来实现对癌症的早期筛查和诊断意义重大.现在,有许多方法通过检测血液、尿液和人体组织中的肿瘤标志物来诊断癌症,例如,酶联免疫法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、荧光免疫发光法(Fluorescence-Based Immunoassay, FBIA)和化学免疫发光法(Chemiluminescent, CLIA)^[6-8].尽管这些方法已经获得广泛应用,但是也存在灵敏度低、易荧光淬灭和操作复杂等缺点.而基于贵金属纳米结构表面增强拉曼散射(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)特性的生物传感技术,利用光激发金属纳米结构的表面电子产生局域表面等离子体共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR),检测表面吸附分子的拉曼信号,具有灵敏度高、特异性好和检测范围广的特点^[9-11].因此,开展贵金属纳米结构 SERS 特性的研究,进行肿瘤标志物的免疫检测,是重要的研究热点.

在基于贵金属纳米结构 SERS 特性的免疫检测方法中,构建“三明治”结构(免疫基底-待测物-免疫探针)是重要的研究内容.如 ZHOU 等采用 Si 纳米粒子(Nanoparticles, NPs)免疫探针和 SiC@Ag 免疫基底实现了血清中前列腺特异抗原(Prostate Specific Antigen, PSA)、甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)和糖抗原(Carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)的定量检测^[12];CHENG 等采用磁珠 NPs 和 Au NPs 实现了游离前列腺特异性抗原(free-Prostate Specific Antigen, f-PSA)和复合前列腺特异性抗原(complex-Prostate Specific Antigen, c-PSA)的同时检测^[13].

本文采用原位还原法生成 Ag 包覆聚苯乙烯球纳米粒子(Polystyrene@Ag Nanoparticles, PS@Ag NPs),然后与 4-巯基苯甲酸(4-Mercaptobenzoic acid, 4-MBA)和甲胎蛋白抗体(Anti-AFP)链接制备 PS@Ag 免疫探针;同时,采用 Langmuir-Blodgett (L-B)膜、等离子刻蚀和磁控溅射等多种技术制备 Ag 覆盖的硅金字塔结构,制备出增强性高、均一性好和成本低的 Ag 覆盖的硅金字塔结构(Si@Ag)阵列^[14],然后与 4-MBA 和 Anti-AFP 链接得到 Si@Ag 免疫基底;最后,形成 Si@Ag 免疫基底-AFP-PS@Ag 免疫探针的“三明治”结构,进行肿瘤标志物的定量检测.

1 实验

1.1 试剂与仪器

实验所用试剂均为分析纯:十二烷基硫酸钠(SDS, 98%),氢氧化钠(NaOH, 90%),氢氟酸(HF, 99%),四氢呋喃(THF, 99.9%),丙酮(C_3H_6O , 99%),乙醇(C_2H_6O , 99.5%),硫酸(H_2SO_4 , 99%),氨水($NH_3 \cdot H_2O$, 28%)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP, K30)均购自国药集团化学试剂有限公司;异丙醇(IPA, 99.5%)购于阿拉丁公司;硝酸银($AgNO_3$, 99.5%),三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS, pH=7.6)和磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7)购自 Sigma Aldrich 公司;4-巯基苯甲酸(4-MBA, 99%)购自日本东京化成工业发展有限公司;标记和包被的 Anti-AFP、AFP、前列腺特异性抗原(PSA)和载脂蛋白(Apolipoprotein B, ApoB)均购买自北京科沃中楷生物科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自南京生兴生物技术有限公司;PS 球胶体溶液(1.4 μm , 10% wt)(200 nm, 10% wt)购自上海辉质生物科技有限公司;实验用水是电阻率为 18.2 $M\Omega \cdot cm^{-1}$ 的超纯水.

主要实验仪器是:场发射扫描电子显微镜(SEM, SU-70, Hitachi),便携式拉曼光谱仪(BWS415, B&W Tek Inc.),X-射线衍射仪(XRD, Ru-200b, Bruker),高密度等离子体刻蚀机(ICP-98A, IMECAS),电子束蒸镀系统(AUTO-306, HHV),等离子清洗机(ZEPTO, Diener)和紫外可见吸收光谱仪(TU-1901, Pgeneral).

1.2 PS@Ag 免疫探针的制备

首先,对 PS 球进行磺化改性。取 500 μL 的 PS 球溶液置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中蒸干溶液中水分,然后将得到的 PS 球体粉末加入 5 mL H_2SO_4 溶液中,40 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30 min,接下来在 8000 rpm 转速下离心 10 min,并用去离子水清洗,得到磺化处理后的 PS 球溶液;第二,制备 PS@Ag NPs:将 20 μL 的氨水逐滴加入到 2 mL 的 AgNO_3 溶液(1% w/v)中制备银氨溶液,然后将制备的银氨溶液与 11 mL 的 PVP 溶液(10% wt)和 2 mL 磺化处理后的 PS 球胶体溶液混合,在 200 rpm 转速和 70 $^{\circ}\text{C}$ 下还原反应 12 h,待样品冷却到室温后,将反应溶液分别用去离子水离心清洗 3 次(8000 rpm, 10 min),并超声分散在乙醇中,则 PS@Ag NPs 制备完成;第三,将拉曼标记分子 4-MBA (1 mmol/L)和 Anti-AFP (2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)相继与 PS@Ag NPs 链接,再用牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)包裹裸露的 PS@Ag NPs 表面,即制备得到 4-MBA 标记的 PS@Ag 免疫探针。

1.3 Si@Ag 免疫基底的制备

首先,应用 L-B 膜法在直径为 4 英寸的硅片上平铺一层密堆积 PS 球作为模板,然后应用等离子体刻蚀(Reactive Ion Etching, RIE)技术减小 PS 球的直径,再将硅片浸入刻蚀溶液($\text{NaOH} : \text{IPA} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 3 : 1$)中反应 8 min,则湿法刻蚀得到硅金字塔阵列结构;然后,使用电子束蒸镀系统,在硅金字塔阵列结构的表面沉积 30 nm 厚的银膜(沉积速率为 $0.2 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$,工作压强为 $5 \times 10^{-4} \text{ Pa}$),制备得到大面积 Si@Ag 阵列基底;最后,将制备的 Si@Ag 阵列基底分割成多个面积为 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 的单片基底,并将 20 μL 的 Anti-AFP 溶液($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)滴加到分割后的单片基底表面,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 5 h 后,使 Anti-AFP 与基底链接,再用 BSA 包裹裸露的 Ag 膜,即制备得到 Si@Ag 免疫基底。

1.4 AFP 的检测

首先,在 Si@Ag 免疫基底表面滴加 20 μL 的 AFP 溶液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 5 h 后,分别用 PBS、TBS 溶液和去离子水清洗未与基底链接的 AFP 抗原;然后,再滴加 20 μL 的 PS@Ag 免疫探针溶液到链接抗原的 Si@Ag 免疫基底上,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 12 h 后,分别用 PBS、TBS 溶液和去离子水清洗未链接的免疫探针,经氮气吹干后,即形成由 Si@Ag 免疫基底、AFP 抗原和 PS@Ag 免疫探针组成的“三明治”结构,并应用于 SERS 光谱检测,其完整流程如图 1 所示。

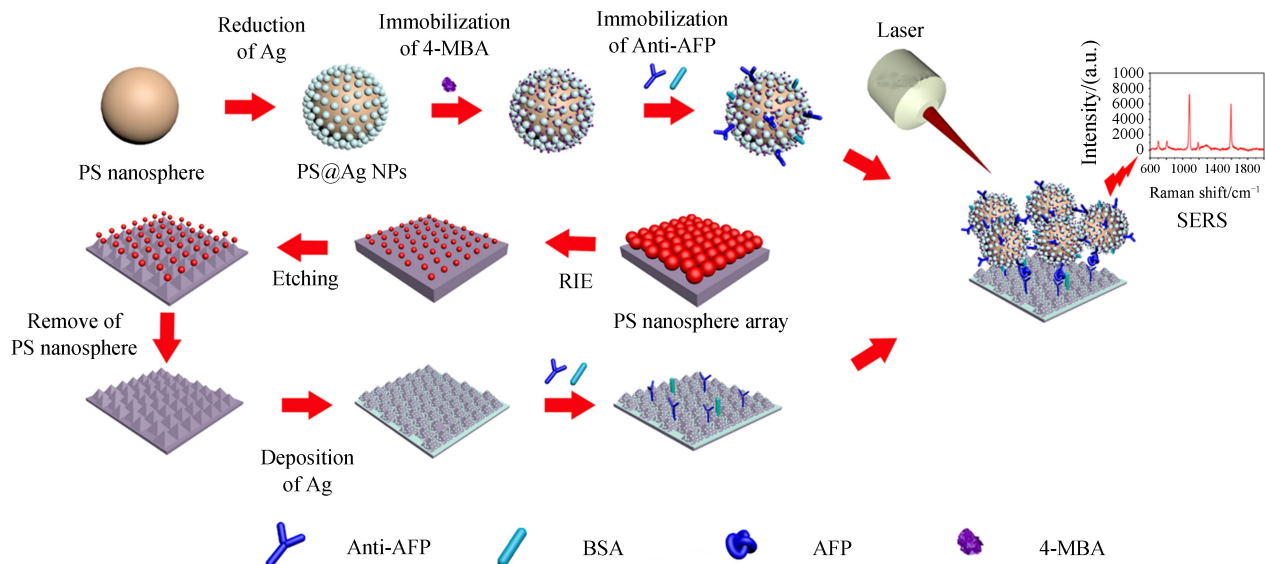


图 1 基于 SERS 的免疫检测示意图
Fig.1 Schematic of SERS-based detection

2 结果与讨论

2.1 PS@Ag NPs 的表征与分析

PS 球的形貌和 PS@Ag NPs 的扫描电镜照片如图 2 所示。由图 2(a)可知,PS 球的平均直径为 200 nm,且呈现出光滑的表面和良好的单分散性;由图 2(b)可知,经过还原反应生成的 PS@Ag 纳米粒子呈现出一

种类草莓状的结构,平均粒径约为 30 nm 的 Ag 颗粒均匀分布在 PS 球表面.分析表明,磺化处理后,PS 球表面带有大量的 $-\text{SO}_3\text{H}$,当加入制备的银氨溶液时, $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ 离子由于电荷作用被吸引到 PS 球表面,在稳定剂和还原剂 PVP 的作用下, $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ 离子被还原成 Ag 颗粒并附着于 PS 球表面,则 PS@Ag NPs 形成^[15].制备的 PS@Ag NPs 的 EDS 谱和 XRD 谱分别如图 2(c)和 2(d)所示.在图 2(c)中,高强度的 Si 和 C 信号分别来自于硅片和 PS 球,Ag 信号来自与 PS 球表面的 Ag 颗粒;图 2(d)中位于 37.9° , 44.1° , 64.3° , 77.2° 和 81.4° 处的衍射峰分别对应于 Ag 的(111), (200), (220), (311)和(222)晶面,表明 Ag 颗粒为面心立方结构.

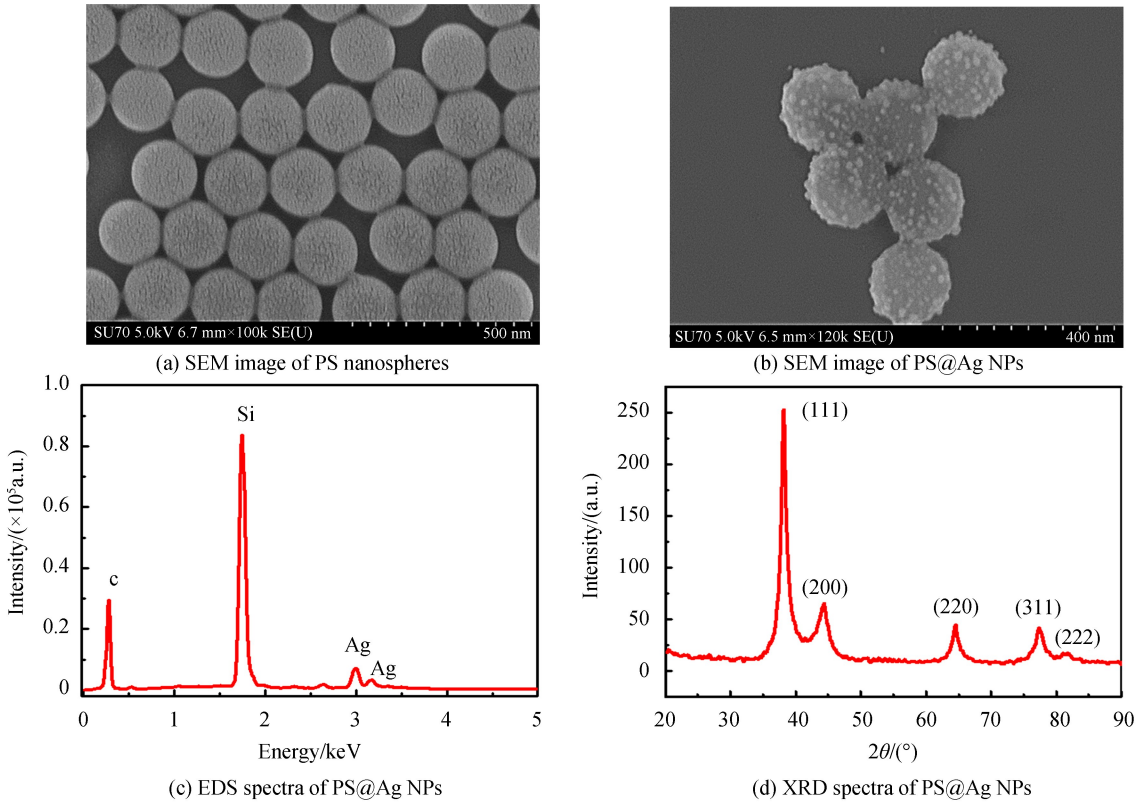


图2 PS 纳米粒子的 SEM 照片以及 PS@Ag NPs 的 EDS 谱和 XRD 谱
Fig.2 SEM images of nanoparticles, EDS and XRD spectra of PS@Ag NPs

2.2 PS@Ag 免疫探针的表征与分析

PS@Ag 免疫探针制备过程由紫外-可见吸收光谱表征.从图 3 可以看出,PS@Ag NPs、4-MBA 标记的 PS@Ag NPs 和 PS@Ag 免疫探针的吸收峰分别位于 542、554 和 560 nm 处.相对于 PS@Ag NPs 的吸收峰,4-MBA 标记的 PS@Ag NPs 和 PS@Ag 免疫探针的吸收峰分别红移了 12 nm 和 8 nm,表明 4-MBA 分子和 Anti-AFP 抗体成功地链接到 PS@Ag NPs 表面.同时,它们的吸收峰的半高宽增加,表明 4-MBA 分子和 Anti-AFP 抗体的链接使 PS@Ag NPs 产生一定程度团聚.

2.3 Si 金字塔阵列的表征和分析

由图 4(a)可见,经 L-B 膜法制备的 PS 纳米球阵列为六角密排结构,PS 球的平均直径为 $1.4 \mu\text{m}$;在图 4(b)中,通过 RIE 刻蚀,PS 球仍保持良好的周期性与均一性,PS 球的平均直径为 $1.05 \mu\text{m}$,球之间的空隙增大,直径缩小了约 25%;从图 4(c)和(d)可以发现,湿法刻蚀后的硅基底呈现金字塔阵列结构,具有良好

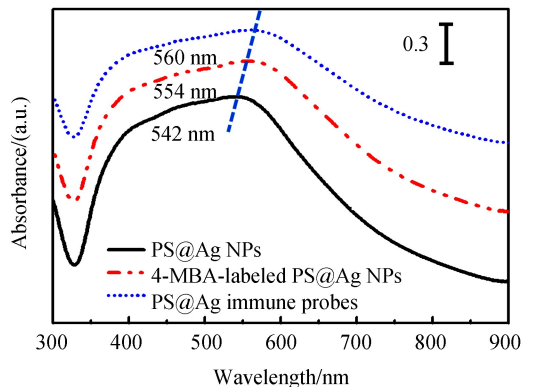


图3 制备的纳米粒子和免疫探针的吸收谱
Fig.3 Absorption spectra of fabricated nanoparticles and immune probes

的周期性,金字塔所占面积为 $1.4 \mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$,相邻间距为纳米量级.

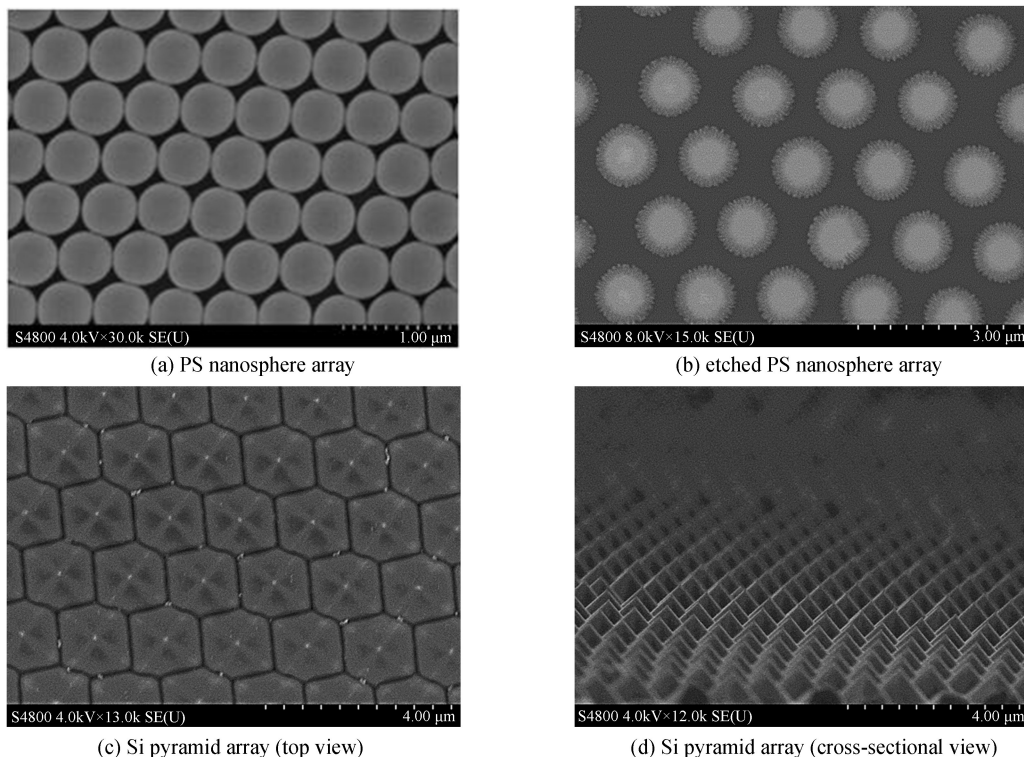


图 4 PS 纳米球阵列, RIE 刻蚀的 PS 球阵列, 湿法刻蚀的硅金字塔阵列和硅金字塔阵列的 SEM 照片
Fig.4 SEM images of PS nanosphere array, etched PS nanosphere array, Si pyramid array and Si pyramid array

2.4 Si@Ag 基底的表征与 SERS 特性分析

Si@Ag 基底的 SEM 照片如图 5 所示.由图 5(a)~(c)可见,随着 Ag 沉积时间的增加,Ag 颗粒的粒径不断增加,硅金字塔表面的粗糙度变大;随着 Ag 沉积时间进一步增加,如图 5(d)~(f)所示,Ag 颗粒积聚成膜,粗糙程度下降.为研究 Ag 的沉积厚度对 Si@Ag 基底 SERS 活性的影响,滴加 $20 \mu\text{L}$ (10 mmol/L) 的 4-MBA 溶液到 Si@Ag 基底表面,在 785 nm 激光波长、 20 mW 激光功率和 10 s 积分时间的实验条件下,对不同 Ag 厚度的 6 种基底进行 SERS 光谱测量,结果如图 6.由图 6(a)可见,随着 Ag 的厚度增加,在 1078 与

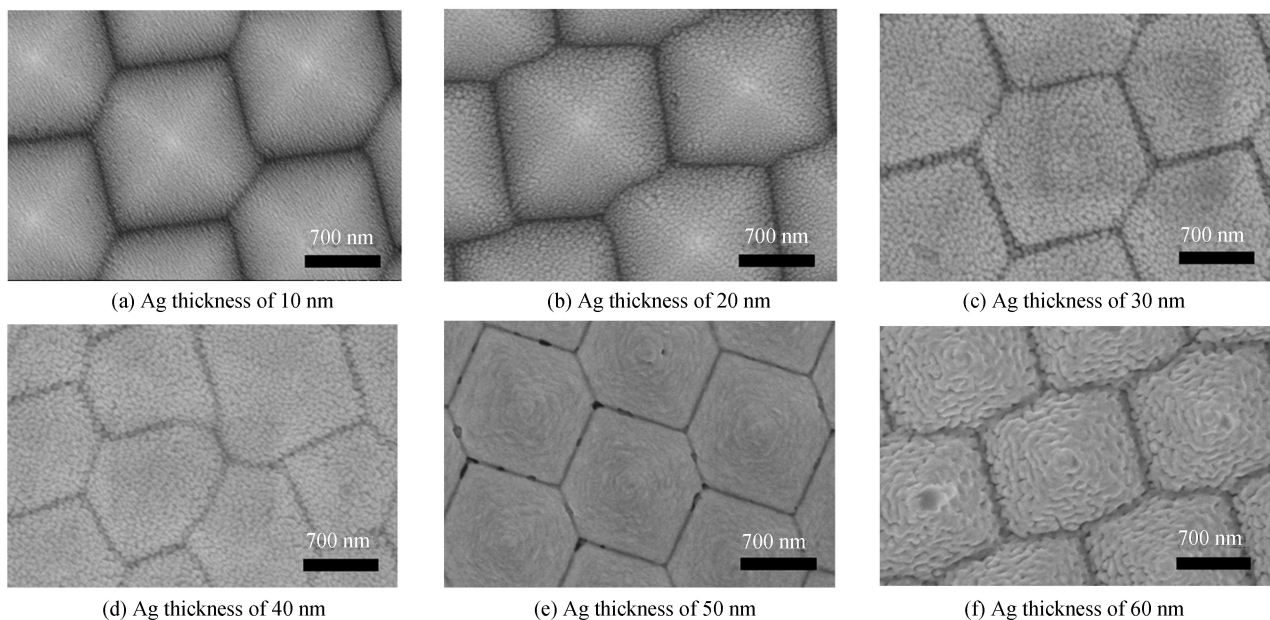


图 5 各种 Ag 沉积厚度的 Si@Ag 基底的 SEM 照片
Fig.5 SEM images of Si@Ag substrates with different Ag thickness

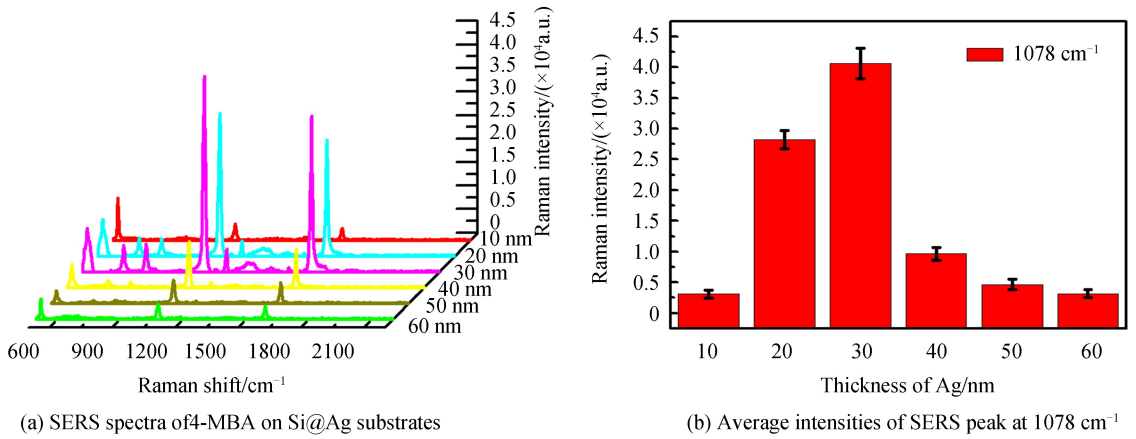


图 6 不同 Si@Ag 基底上 4-MBA 的 SERS 光谱及其对应的 1 078 cm⁻¹ 处拉曼特征峰的平均强度
 Fig.6 SERS spectra of 4-MBA on different Si@Ag substrates and their average intensities of SERS peak at 1 078 cm⁻¹

1 590 cm⁻¹ 处的 4-MBA 的拉曼特征峰强度先增大后减小,并由图 6(b)可以直观地看出,对于 Ag 厚度为 30 nm 的 Si@Ag 基底,其拉曼特征峰强度最大,具有优良的 SERS 增强特性.这种现象可以用沉积在硅金字塔上的 Ag 颗粒之间的 LSPR 耦合来解释.具体地,随着 Ag 沉积厚度的增加,相邻颗粒之间的距离不断减小,当减小到 5~10 nm 左右时,容易产生强烈的 LSPR 耦合,并且在相邻的金字塔缝隙处,Ag 颗粒更易聚集并产生热点效应,同时在金字塔顶端由于尖端效应产生强的电场增强.以上几种效应的叠加,使与 Ag 键合的 4-MBA 的拉曼信号得到极大增强^[15-17].随着 Ag 沉积厚度的进一步增加,单分散的 Ag 颗粒聚集形成膜状结构,粗糙度下降,热点效应减弱,则 SERS 信号强度下降.因此,选定 Ag 的沉积厚度为 30 nm 的 Si@Ag 基底应用于后续实验.

进一步,Si@Ag 基底的 SERS 增强因子按照式(1)计算.

$$EF = (I_{SERS} / N_{SERS}) / (I_{bulk} / N_{bulk}) \quad (1)$$

式中, I_{SERS} 与 I_{bulk} 分别代表 4-MBA 分子的 SERS 特征峰和拉曼特征峰的积分强度; N_{bulk} 与 N_{SERS} 分别表示激光照射光斑内的硅片和 Si@Ag 基底上的 4-MBA 分子数.根据在硅片和 Si@Ag 基底上测量 4-MBA 位于 1 078 cm⁻¹ 处的拉曼峰强度(图 7(a)),分别得到 $I_{bulk} = 4.64 \times 10^3$, $I_{SERS} = 8.6 \times 10^5$;然后,由实验参数(光斑直径 2.4 μm 、激光穿透深度 9.81 μm 和单个 4-MBA 分子所占的面积为 $3.32 \times 10^{-7} \mu\text{m}^2$)^[18-19],计算得到 $N_{bulk} = 8.6 \times 10^{10}$, $N_{SERS} = 1.36 \times 10^7$.则由式(1)即得,Si@Ag 基底的增强因子 $EF = 1.17 \times 10^6$.此外,在 Si@Ag 基底上随机取 25 个测试点,测量得到 4-MBA 位于 1 078 cm⁻¹ 处的拉曼峰强度如图 7(b)所示,各点峰强的相对标准差为 5.48 %,表明基底的均匀性良好.

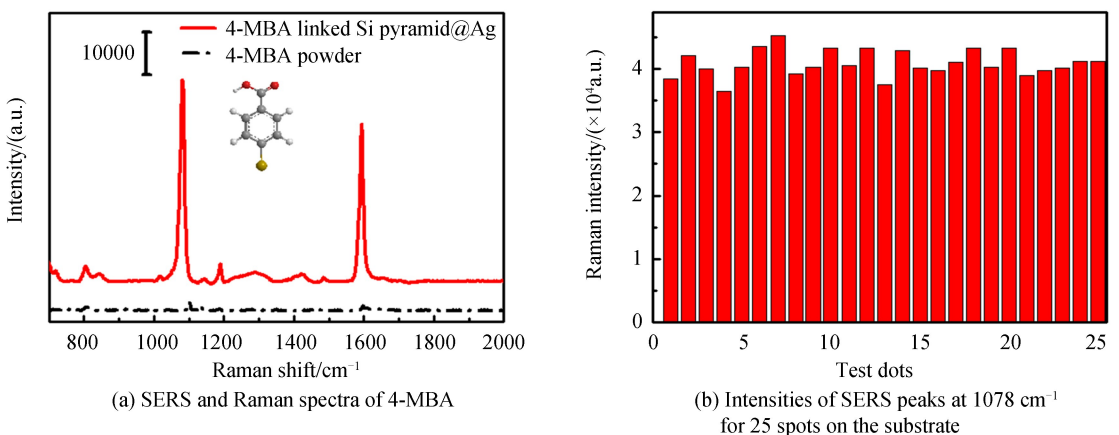


图 7 4-MBA 的 SERS 光谱和拉曼光谱以及在基底上 25 个点的 SERS 峰强度
 Fig.7 SERS and Raman spectra of 4-MBA and the intensities of SERS peaks for 25 spots on the substrate

2.5 AFP 的检测与分析

根据 2.4 节描述的基于“三明治”结构 SERS 特性的免疫检测方案,开展肿瘤标志物 AFP 的定量检测.图 8(a)为不同浓度的 AFP 标准溶液检测的 SERS 光谱.由图 8 可见,随着 AFP 浓度的降低,位于 1078 cm^{-1} 处的 4-MBA 的特征峰强度逐渐降低,表现出强度与浓度的正相关性,其对应的剂量响应曲线如图 8(b)所示,拟合曲线的方程为: $y=1\ 652.114x+24\ 968.803$,相关系数 $R^2=0.988$.此外,在图 8(a)中,当 AFP 的浓度降至 $2\text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,4-MBA 的特征峰仍清晰可辨,显示出高的灵敏度,检测极限达到 $1.75\text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [20].图 8(b)也表明,基于“三明治”结构 SERS 特性的免疫检测展示出宽的动态范围($2\text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 到 $200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

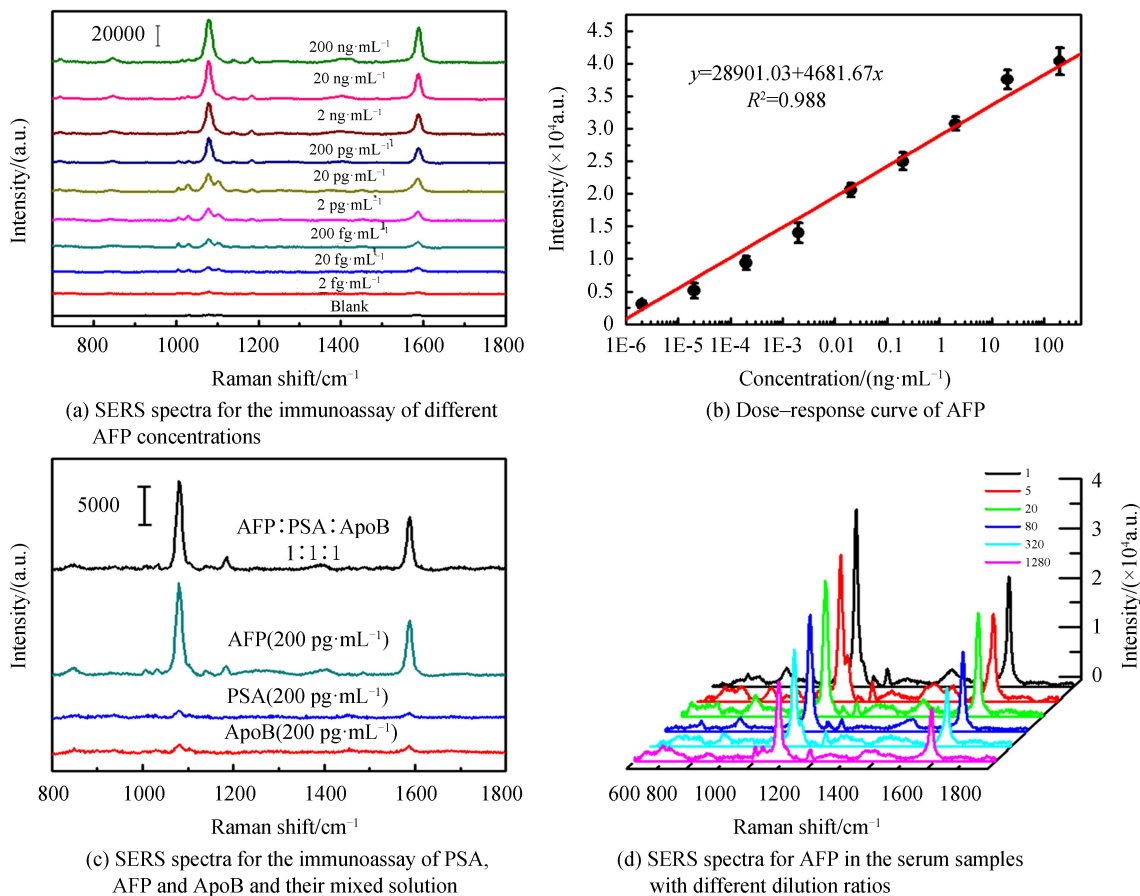


图 8 对应各种样本的 SERS 光谱和 AFP 的剂量-响应曲线

Fig.8 SERS spectra corresponding to various samples and the dose-response curves of AFP

为验证检测结果的特异性,图 8(c)给出了免疫检测实验中得到的 AFP、PSA 和 ApoB 以及它们的混合溶液的 SERS 光谱.由图 8(c)可见,强的 SERS 信号只在 AFP 存在时得以显现,PSA 和 ApoB 并不会对检测的 SERS 强度产生影响.因此,检测具有良好的特异性,可实现对 AFP 的定量检测.

最后,应用基于“三明治”SERS 特性的检测方案开展临床血清样本的检测.如图 8(d)所示,对不同稀释比例的血清样品分别进行 SERS 光谱检测,并由剂量响应曲线(图 8(b))计算相应的 AFP 浓度,结果列于表 1 中.同时,与采用 CLIA 方法的检测结果进行对比,可以看出,基于“三明治”结构 SERS 特性的免疫检测方案与 CLIA 的检测结果基本一致,并且具有更高的灵敏度.因此,基于 PS@Ag 免疫探针和 Si@Ag 免疫基底的 SERS 光谱检测具有好的可靠性.

表 1 血清样品的检测结果
Table 1 Detection results of sample

Diluted ratio	SERS-based immunoassay/(ng · mL ⁻¹)	CLIA/(ng · mL ⁻¹)	Relative error/%
S1(R=1)	12.432 7	11.98	3.78
S2(R=5)	2.588 4	2.55	1.51
S3(R=20)	0.567 5	0.6	5.41
S4(R=80)	0.174 8	0.17	2.82
S5(R=320)	0.039 5	-	
S6(R=1 280)	0.009 5	-	

3 结论

采用 L-B 技术、RIE 和湿法刻蚀技术等,制备出具有优良 SERS 特性的 PS@Ag NPs 和 Si@Ag 基底,并提出了基于 PS@Ag 免疫探针、AFP 和 PS@Ag 免疫基底组成的“三明治”结构 SERS 特性的免疫检测方案。结果表明,该检测方案对 AFP 具有高的检测灵敏度、宽的检测动态范围和好的可靠性,具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2016, **66** (1): 7-30.
- [2] LALLA R V, BOWEN J, BARASCH A, *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy[J]. *Cancer*, 2014, **120**(10): 1453-1461.
- [3] RYERSON B A, EHEMAN R C, ALTEKRUSE S F, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975 - 2012, featuring the increasing incidence of liver cancer[J]. *Cancer*, 2016 **122** (9): 1312-1337
- [4] DUFFY M J, LAMERZ R, HAGLUND C, *et al.* Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers; European group on tumor markers 2014 guidelines update[J]. *International Journal of Cancer*, 2014 **134** (11): 2513-2522.
- [5] DUFFY M J, STURGEON C M, SOLETORMOS G, *et al.* Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers[J]. *Clinical Chemistry*, 2015 **61** (6): 809-820.
- [6] NAOT Y, REMINGTON J S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1980, **142**(5): 757-766.
- [7] RANASINGHE R T, BROWN T. Ultrasensitive fluorescence-based methods for nucleic acid detection: towards amplification-free genetic analysis[J]. *Chemical Communications*, 2011, **47**(13): 3717-3735.
- [8] BRABANT G, VON Z M A, WUSTER C, *et al.* Serum insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study[J]. *Hormone Research in Paediatrics*, 2003, **60**(2): 53-60.
- [9] WANG Yun-qing, YAN Bing, CHEN Ling-xin. SERS tags: novel optical nanoprobes for bioanalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2012, **113**(3): 1391-1428.
- [10] DING Song-yuan, YOU En-ming, TIAN Zhong-qun, *et al.* Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, **46**(13): 4042-4076.
- [11] HAYNES C L, YONZON C R, ZHANG Xiao-yu, *et al.* Surface-enhanced Raman sensors: early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, **36**(6-7): 471-484.
- [12] ZHOU Lu, ZHOU Jun, FENG Zhao, *et al.* Immunoassay for tumor markers in human serum based on Si nanoparticles and SiC@ Ag SERS-active substrate[J]. *Analyst*, 2016, **141**(8): 2534-2541.
- [13] CHENG Zi-yi, CHOI N, WANG R, *et al.* Simultaneous detection of dual prostate specific antigens using surface-enhanced Raman scattering-based immunoassay for accurate diagnosis of Prostate Cancer[J]. *ACS Nano*, 2017, **11**: 4926-4933.
- [14] WANG Xi-xi, YANG Zhen-hai, GAO Ping-qi, *et al.* Improved optical absorption in visible wavelength range for silicon solar cells via texturing with nanopyramid arrays[J]. *Optical Express*, 2017, **25** (9): 10464-10472.
- [15] WANG Yi-chung, DUCHENE J, HUO Feng-wei, *et al.* An in situ approach for facile fabrication of robust and scalable SERS substrates[J]. *Nanoscale*, 2014, **6**: 7232-7236.
- [16] ZHANG Chao, JIANG Shou-zhen, YANG Cheng, *et al.* Gold@silver bimetal nanoparticles/pyramidal silicon 3D substrate with high reproducibility for high-performance SERS[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 25243.
- [17] WANG Pu, LIANG O, ZHANG Wei, *et al.* Ultra-sensitive graphene-plasmonic hybrid platform for label-free detection [J]. *Advanced Materials*, 2013, **25**: 4918-4924.

- [18] WANG Ai-jun, LV Jing-jing, ZHOU Dan-ling, *et al.* Facile synthesis of ultrathin worm-like Au nanowires for highly active SERS substrates[J]. *New Journal of Chemistry*, 2014, **38**: 3395-3400.
- [19] A'LVAREZ-PUEBLA R A. Effects of the excitation wavelength on the SERS spectrum[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012, **3**(7): 857-866.
- [20] SHRIVASTAVA A, GUPTA V B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods[J]. *Chronicles of Young Scientists*, 2011, **2**(1): 21-25.

Foundation item: The National Nature Science Foundation of China (Nos. 61320106014, 61675104, 81501421) and K.C. Wong Magna Fund in Ningbo University

引用格式: WANG Zhe, FU Hao, LIANG Zhao-heng, *et al.* Surface Enhanced Raman Scattering-based Tumor Immunoassay Using PS@Ag Nano-probes and Si@Ag Array Substrate[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, **47**(12): 1228002

王哲, 湫颢, 梁照恒, 等. 基于 PS@Ag 纳米探针和 Si@Ag 阵列基底的 SERS 特性的肿瘤标志物免疫检测[J]. *光子学报*, 2018, **47**(12): 1228002