

引用格式: PENG Le, ZHOU Lu, QING Yan-ping, *et al.* High Sensitivity Detection of Gene-like Tumor Markers Based on SERS Characteristics of Hollow Sea-urchin Gold Nanoparticles and Noble Metal/semiconductor Substrate [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2020, 49(8):0817002

彭乐,周露,卿艳平,等.基于空心海胆状金纳米粒子和银/氧化锌纳米结构 SERS 特性的基因类肿瘤标志物高灵敏检测[J].光子学报,2020,49(8):0817002

基于空心海胆状金纳米粒子和银/氧化锌纳米结构 SERS 特性的基因类肿瘤标志物高灵敏检测

彭乐¹,周露²,卿艳平³,佟丽莹¹,梁照恒¹,沈颢¹,周骏¹

(1 宁波大学 物理科学与技术学院,微电子科学与工程系,浙江 宁波 315211)

(2 天津大学 精密仪器与光电工程学院 太赫兹研究中心,天津 300072)

(3 宁波大学 医学院 附属医院,浙江 宁波 315020)

摘要:基因类肿瘤标记物 microRNA(miRNA)的痕量检测对于癌症早期诊断具有重要应用价值.根据空心海胆状金纳米粒子和银/氧化锌(Ag/ZnO)纳米结构的表面增强拉曼散射特性,并基于碱基互补配对原理构建探针-核酸-基底组成的“三明治”结构,提出了一种基因类肿瘤标志物 miRNA 的高灵敏定量检测方案.首先将捕获 DNA 与修饰 4-巯基苯甲酸(4-MBA)的空心海胆状金纳米粒子链接作为探针,同时在 Ag/ZnO 纳米结构上修饰靶 DNA,经与 miRNA-106a 互补杂交后进行 SERS 信号检测,获得相应的剂量-响应曲线.实验结果表明,在 $1 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的检测范围内,对 miRNA-106a 的检测限达到 $1.84 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$.同时,采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应方法验证了基于空心海胆状金纳米粒子和 Ag/ZnO 纳米结构 SERS 特性的 miRNA 检测方案的可靠性.

关键词:表面增强拉曼散射;Ag/ZnO 纳米结构;空心海胆状金纳米粒子;基因类肿瘤标志物;MicroRNA
中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/gzxb20204908.0817002

High Sensitivity Detection of Gene-like Tumor Markers Based on SERS Characteristics of Hollow Sea-urchin Gold Nanoparticles and Noble Metal/semiconductor Substrate

PENG Le¹, ZHOU Lu², QING Yan-ping³, TONG Li-ying¹, LIANG Zhao-heng¹, FU Hao¹,
ZHOU Jun¹

(1 Department of Microelectronics Engineering, School of Physical & Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

(2 Center for Terahertz Waves, College of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(3 Affiliated Hospital, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315020, China)

Abstract: Trace detection of genetic tumor marker microRNA (miRNA) has important application value for early diagnosis of cancer. According to the Surface-enhanced Raman Scattering characteristics of hollow sea urchin gold nanoparticles and Ag/ZnO nanostructures, and based on the principle of complementary base pairing, a "sandwich" structure of probe-nucleic acid-substrate is constructed and a highly sensitive

基金项目:国家自然科学基金(No. 61675104)

第一作者:彭乐(1993-),女,硕士研究生,主要研究方向为表面增强拉曼散射光谱技术及其应用. Email: 253714184@qq.com

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

收稿日期:2020-02-18;录用日期:2020-05-25

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

quantitative detection scheme for genetic tumor marker miRNA is proposed. First, the captured DNA is linked to the hollow sea urchin gold nanoparticles modified with 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) as a probe. At the same time, the target DNA is modified on the Ag/ZnO nanostructure, and the SERS signal is detected to obtain the corresponding dose-response curve after complementary hybridization with miRNA-106a. The experimental results show that the detection limit of miRNA-106a reached $1.84 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ within the detection range of $1 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}\sim 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Meanwhile, the reliability of the miRNA detection scheme based on the hollow sea urchin gold nanoparticles and Ag/ZnO nano-structure SERS characteristics was verified by the Real-time quantitative Polynucleotide Chain Reaction (RT-qPCR) method.

Key words: Surface-enhanced Raman scattering; Ag/ZnO nanostructure; Hollow sea-urchin gold nanoparticles; Gene-like tumor marker; MicroRNA

OCIS Codes: 170.5660; 240.6695; 160.1435; 170.1610

0 引言

目前,恶性肿瘤的发病率逐年增高,对人类健康造成极大危害^[1-2].同时,大量医学实践表明,癌症的早期诊断和及时治疗是治愈恶性肿瘤和提高患者5年生存率的关键^[3-4].实际上,已经发现的多种肿瘤标志物为癌症的早期筛查和诊断提供了重要的检测手段.特别是作为一种内源非编码小分子(18~22 nt)的微小核糖核酸 microRNA (miRNA),其表达失控与恶性肿瘤的发生和发展密切相关,成为重要的基因类肿瘤标志物^[5].例如,CALIN G A等在慢性淋巴细胞白血病中发现了miRNA异常表达的直接证据,相对于正常细胞,B细胞慢性淋巴细胞白血病中位于染色体13q14中的miRNA-15和miRNA-16的表达水平显著降低^[6].MICHAEL M Z等在结直肠癌组织中发现miRNA的异常表达,与正常组织相比,miRNA-143和miRNA-145在腺瘤和结直肠肿瘤组织中为低表达^[7].TSUJIURA M等检测了胃癌患者的血浆miRNA浓度,与健康样本相比,胃癌患者血浆中miRNA(miR-17-5p、miR-21、miR-106a、miR-106b)的浓度显著高于对照组,可作为胃癌的肿瘤标志物^[8].RAHIMI A等通过生物信息学预测和实验验证研究,表明人类CDH4基因中的has-miR-B43具有与乳腺癌潜在转移相关的功能^[9].近年来,人们开发出多种有效的基因类肿瘤标志物miRNA的检测技术,如实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)^[10]、荧光成像法^[11]和印迹法^[12]等.由于临床血清中miRNA种类多、含量较低和萃取后容易降解,而现有技术操作复杂、耗时以及存在扩增程序引起的序列偏移风险等,难以满足癌症早期诊断的高通量痕量检测需求,有必要开展新的高灵敏度、高特异性和快速的基因类肿瘤标志物miRNA的检测技术研究^[13-14].

另一方面,表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman Scattering, SERS)光谱具有分子指纹谱识别功能,是一门生物兼容性好、灵敏度高的无损检测技术,在化学、生物和医学等领域有广泛应用^[15-16].由于尖端效应,在金属纳米结构的尖端或者缝隙处具有增强的电磁场,会导致聚集其周围的分子产生强的SERS信号^[17-18].然而,由于合成单分散性的贵金属纳米粒子和制备具有均匀高密度活性热点的SERS基底上的困难,导致SERS光谱检测的拉曼信号强度产生波动,信号的重现性问题成为其实际应用的挑战之一^[19-20].随着SERS光谱研究的深入,人们在IB族金属(金、银、铜)纳米结构的基础上,将SERS活性基底的制备扩展到非IB族材料,包括金属氧化物(半导体、电镀金属、卤化银等)^[21-22].实际上,源于贵金属纳米粒子的电磁场增强和金属氧化物的电荷转移机制的协同效应,各种金或银装饰的金属氧化物复合纳米结构已被证明是优异的SERS基底,可以获得稳定、可重复和高强度的SERS信号^[23-24].因此,制备新颖的贵金属和金属氧化物半导体的复合纳米结构,应用于肿瘤标志物的SERS光谱检测,将为癌症的早期诊断提供一种新方法.

本文通过改进的化学还原法合成空心海胆状金纳米粒子(Hollow Sea Urchin Gold Nanoparticles, HSU-GNPs)^[25],并将HSU-GNPs分别与拉曼标记分子4-巯基苯甲酸(4-MBA)和寡核苷酸5'-NH₂-ssDNA链接制备HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA探针;采用水热法在Zn片表面原位生长ZnO纳米铅笔结构,并在表面磁控溅射沉积银纳米粒子制备Ag/ZnO纳米结构,再用3'-NH₂-ssDNA修饰得到Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA基底;最后,通过碱基互补配对将肿瘤标志物miRNA-106a分别与HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA探针和Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA基底杂交构成“三明治”复合结构,以进行SERS信

号检测.实验结果表明,在 $1\text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}\sim 1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度检测范围内,可以对 miRNA-106a 进行高灵敏和高特异性检测.

1 实验

1.1 试剂与仪器

实验所用试剂均为分析纯:氯金酸($\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、硝酸银(AgNO_3)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)与 N-羧基琥珀亚胺(NHS)购于 Sigma Aldrich 公司;4-巯基苯甲酸(4-MBA)购于日本东京化学有限公司;抗坏血酸(Vitamin C)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、11-巯基十一烷酸(11-MUA)与 11-巯基十一烷醇(11-MU)均购于上海阿拉丁化学有限公司;TE 缓冲溶液购自苏州泽科生物科技有限公司;丙酮、Zn 片(99.9%, $0.15\sim 0.25\text{ mm}$)和乙醇购于中国国药集团化学试剂有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)水、 NH_2 修饰的与 miRNA-106a 互补配对的寡核苷酸($5'$ - NH_2 -ssDNA 和 $3'$ - NH_2 -ssDNA)、miRNA-106a、miRNA-mimics 以及 miRNA-21 均购自上海杰瑞生物工程有限公司(所有的寡核苷酸序列如表 1).实验所用超纯水的电阻率为 $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

表 1 寡核苷酸序列
Table 1 Oligonucleotides sequences

Name	Sequences
miRNA-106a	$5'$ -AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG- $3'$
Non-complementary-miRNA-21	$5'$ -UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA- $3'$
Non-complementary-miRNA mimics	$5'$ -UUGUACUACACAAAAGUACUG- $3'$
$5'$ - NH_2 -ssDNA	$5'$ - NH_2 -AAAAACTACCTICACT- $3'$
$3'$ - NH_2 -ssDNA	$5'$ -CTAAICTTTTTAAAAA- NH_2 - $3'$

实验所用的主要仪器:场发射扫描电子显微镜(SU-70,Hitachi)、透射电子显微镜(JEOL2100,JEOL)、实时荧光定量 PCR 仪(Step One Plus,ABI);磁控溅射镀膜机(TA13-XD,Kurt J. Lesker)、X 射线衍射仪(D8 Discover,BRUKER);紫外可见近红外分光光度计(LAMBDA,北京建科源科技有限公司)、高速离心机(TGL-20M,中国鲁祥益离心机有限公司)、恒温混匀仪(T-MSD,宁波拓普森科学仪器有限公司)、便携式拉曼光谱仪(BWS415,B&W Tek).

1.2 HSU-GNPs@4-MBA@ $5'$ - NH_2 -ssDNA 探针的制备

HSU-GNPs@4-MBA@ $5'$ - NH_2 -ssDNA 探针的制备流程如图 1 所示.制备步骤如下:1)在文献[25]的基础上,考虑 AgNO_3 被 AA 还原成 Ag 原子后形成 Ag 纳米粒子,再与加入的 HAuCl_4 发生置换反应,则 Ag 纳米粒子周围形成 Au 壳和枝,并由电子迁移导致 Ag 纳米粒子溶解,形成 HSU-GNPs.具体为,将 $6\text{ }\mu\text{L}$ 0.1 mol/L 的 AgNO_3 溶液注入离心管,再先后快速注入 1 mL 10 mmol/L 的抗坏血酸水溶液和 1 mL 3 mmol/L 的 HAuCl_4 水溶液;接着快速搅拌 20 s ,当溶液呈深蓝色后即制备得到 HSU-GNPs.2)将 HSU-GNPs 溶液以 $8\text{ }000\text{ rpm}$ 离心 15 min ,以除去过量的抗坏血酸并将离心沉淀物分散在 3 mL 去离子水中;再将制备的 4-MBA 乙醇溶液($10\text{ }\mu\text{L}$, 1 mmol/L)加入到 3 mL 纯化的 HSU-GNPs 溶液中,静置 1 h ,使 4-MBA 分子与 HSU-GNPs 纳米粒子完全链接;随后,以 $8\text{ }000\text{ rpm}$ 离心 15 min ,除去未链接的 4-MBA 分子,并将离心管底部沉降的 4-MBA 标记的 HSU-GNPs 纳米粒子(HSU-GNPs@4-MBA)超声分散在 2 mL 去离子水中.3)通过羧基和氨基反应,将 $5'$ - NH_2 -ssDNA 修饰在 HSU-GNPs@4-MBA 纳米粒子表面,制备 HSU-GNPs@4-MBA@ $5'$ - NH_2 -ssDNA 探针.首先,将 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的 EDC 溶液(10 mmol/L ,PBS 溶剂)加入到 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的 NHS 溶液(10 mmol/L ,PBS 溶剂)中以制备 EDC/NHS 混合物溶液($2\text{ }\mu\text{L}$, 10 mmol/L);接着,在室温下将 EDC/NHS 混合物溶液加入到 2 mL 的 HSU-GNPs@4-MBA 纳米粒子溶液中,静置 40 min 以活化 HSU-GNPs@4-MBA 纳米粒子表面的羧基;随后,将 $500\text{ }\mu\text{L}$ 活化羧基的 HSU-GNPs@4-MBA 纳米粒子溶液与 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 $5'$ - NH_2 -ssDNA 溶液($10\text{ }\mu\text{mol/L}$,TE 溶剂)混合,并在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 5 h 后,再将制备的 HSU-GNPs@4-MBA@ $5'$ - NH_2 -ssDNA 探针以 $2\text{ }500\text{ rpm}$ 离心 15 min ,并重复循环三次进行纯化.最后,将离心沉淀物在超声波下振

荡分散在 500 μL 的 PBS 溶液, 作为 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针溶液保存备用.

1.3 Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底的制备

Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底的制备流程如图 1. 第一步, 首先裁剪出 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的 Zn 片, 浸入丙酮溶液并经超声振荡清洗 20 min, 再用去离子水和乙醇循环冲洗 6 次; 然后, 量取 30 mL 去离子水, 并与清洗干净的 Zn 片一起放入 50 mL 的高压反应釜中, 将反应釜密封放入真空干燥箱中, 在 180 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 h 后自然冷却至室温; 接着, 取出反应后的 Zn 片, 并用去离子水清洗 4 次后放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 的真空干燥箱中 1 h, 即得到 ZnO 纳米铅笔结构. 第二步, 通过磁控溅射, 在 ZnO 纳米铅笔结构的表面沉积 Ag 薄膜, 制备 Ag/ZnO 纳米结构. 磁控溅射的参数分别是 5×10^{-4} Pa 背景真空度, 0.5 Pa 溅射压力, 20 sccm 氩气流量. 第三步, 在 Ag/ZnO 纳米结构的表面修饰 3'-NH₂-ssDNA. 首先, 将 Ag/ZnO 纳米结构浸入 2 mL 100 mmol/L 的 11-MUA 和 100 mmol/L 的 11-MU 的混合溶液中过夜, 使其羧基化; 然后, 将羧基化的 Ag/ZnO 纳米结构浸入 50 mmol/L NHS 和 200 mmol/L EDC 的混合溶液中过夜, 以活化羧基; 接着, 将羧基活化的 Ag/ZnO 纳米结构浸入含有 $1 \mu\text{mol/L}$ 3'-NH₂-ssDNA 的 PBS 溶液中过夜, 制备得到的 Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底, 再使用 PBS 和去离子水循环 3 次洗涤后干燥. 最后, 将 Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底置于 PBS 溶液中保存备用.

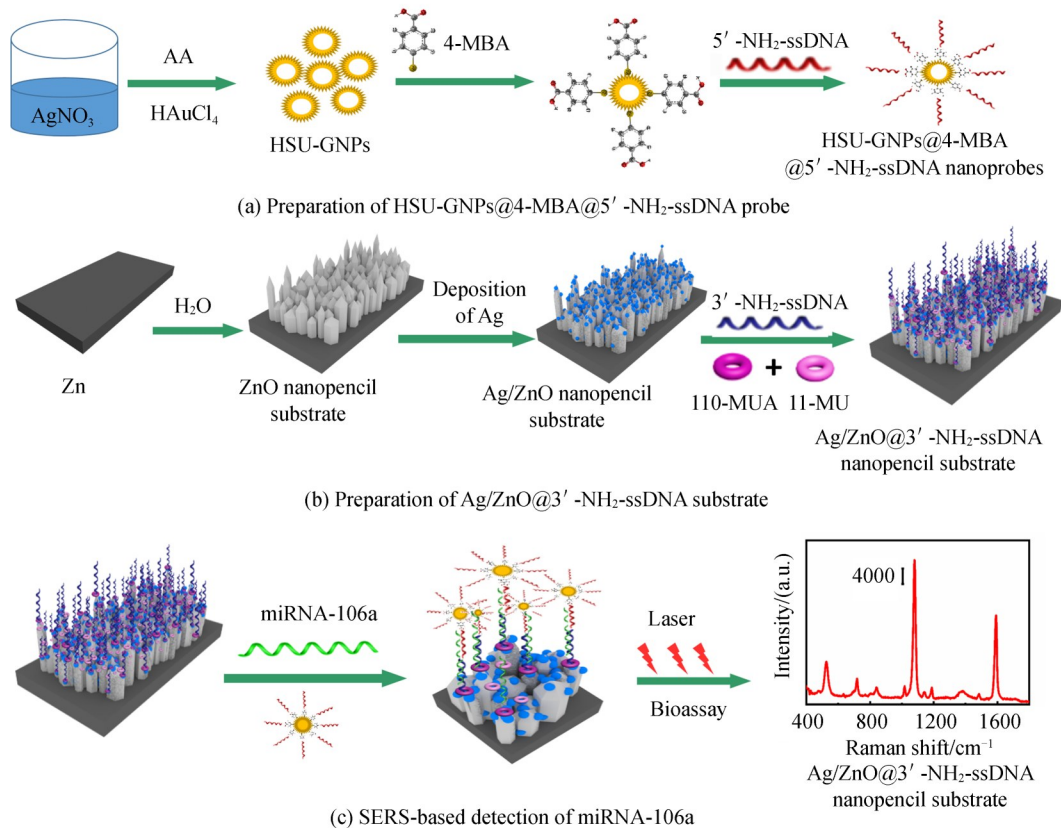


图 1 “三明治”结构检测平台的构建及 SERS 检测方案

Fig. 1 Construction of the sandwich structure detect platform and SERS-based bioassay protocol

1.4 miRNA-106a 的 SERS 检测

基于 HSU-GNPs 和 Ag/ZnO 纳米结构 SERS 特性的 miRNA 检测方案如图 1 所示. 首先, 将 miRNA-106a 用 30 μL 的 DEPC 水稀释成不同浓度的 7 份样品溶液 (从 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $1 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 10 倍为一个稀释梯度), 并分别与 50 μL 的 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针溶液混合后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h. 接下来, 将制备的 Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底浸入到以上孵育后的混合物溶液, 在通过混匀仪在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 250 rpm 的控制条件下反应 2 h. 然后, 通过 DNA 的碱基互补配对形成由 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针, miRNA-106a 和 Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底组成的“三明治”复合结构. 最后, 用 PBS 缓冲溶液和去离子水循环清洗三次后, 将形成的“三明治”复合结构保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下, 用于其后的 SERS 生物检测.

2 结果与讨论

2.1 HSU-GNPs 和 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针的表征

图 2(a) 为 HSU-GNPs 的 SEM 照片, 从中可以看出 HSU-GNPs 的平均粒径 70~120 nm, 且形貌为海胆状. 图 2(b) 为 HSU-GNPs 的 TEM 照片, 从中可以看出 HSU-GNPs 为空心海胆状纳米粒子. 图 2(c) 为 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针的制备过程中的紫外-可见吸收光谱, 从中可以看出 HSU-GNPs、HSU-GNPs@4-MBA 和 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针的吸收峰分别位于 747 nm、762 nm 和 912 nm, 对应吸收峰的红移与展宽表明合成的三种粒子的粒径逐渐增大, 也表明 4-MBA 分子和单链 DNA 分子依次成功地与 HSU-GNPs 相链接, 最后形成 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针. 图 2(d) 为 HSU-GNPs 的 EDS 能谱图, 其中, HSU-GNPs 的成分是 Au, 而 C、N、O 源于 HSU-GNPs 的制备过程, Si 来自测试硅片.

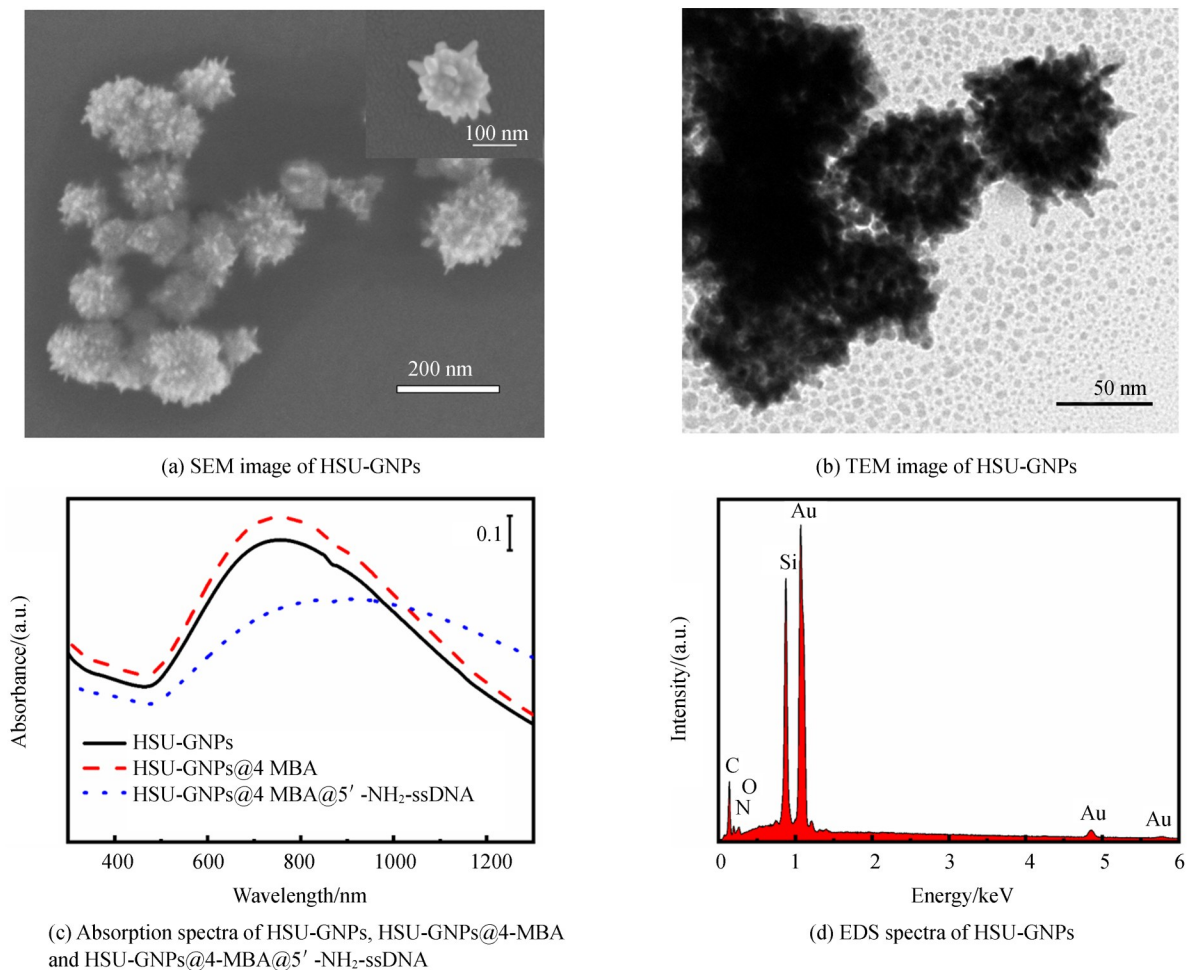


图 2 HSU-GNPs 的扫描电镜图、透射电镜图和能谱图, 以及 HSU-GNPs、HSU-GNPs@4-MBA 与 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针的紫外-可见吸收光谱

Fig. 2 SEM and TEM images, EDS spectrum of HSU-GNPs, and the UV-vis absorption spectra of HSU-GNPs, HSU-GNPs@4-MBA and HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA probes.

2.2 Ag/ZnO 纳米结构的形貌表征与特性分析

图 3 给出了实验制备的 ZnO 纳米铅笔结构和在不同的磁控溅射时间下制备的 Ag/ZnO 纳米结构的扫描电镜照片. 由图 3(a) 可见, Zn 片上 ZnO 棒体为六棱柱状, 直径大小在 50 nm 至 150 nm 范围, 棒顶端是锥形六面体, 外形类似铅笔, 则直观地称为纳米铅笔结构. 从图 3(b)~(f) 可以看出, 随着溅射时间的增加, 纳米铅笔结构 ZnO 的笔芯处慢慢被银纳米粒子覆盖, 使得尖的铅笔芯变成粗糙的帽子结构, 且铅笔间的间距逐渐减小, 直至在纳米铅笔结构 ZnO 的表层形成银膜, 成为纳米铅笔结构的 Ag/ZnO 纳米结构. 同时, 对 Ag/ZnO 纳

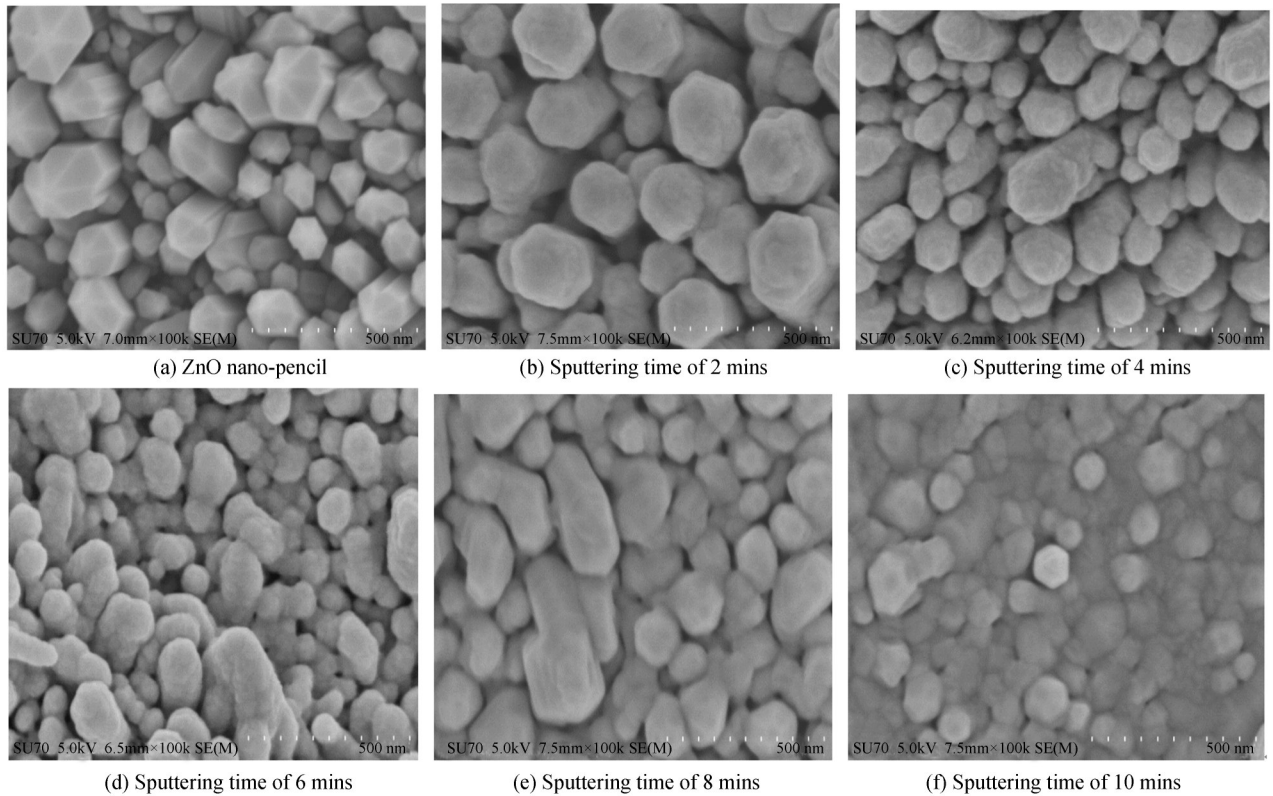


图3 ZnO纳米铅笔结构以及不同磁控溅射时间下制备的Ag/ZnO纳米结构的扫描电镜图

Fig. 3 SEM images of the ZnO nano-pencil structure and Ag/ZnO nanostructure prepared at different magnetron sputtering time

米结构的成分进行X射线衍射表征.如图4所示,位于 34.5° 和 36.2° 处的衍射峰分别对应于ZnO的(002)和(101)晶面,位于 38.1° 和 43.5° 处的衍射峰表明单晶银的存在^[26].

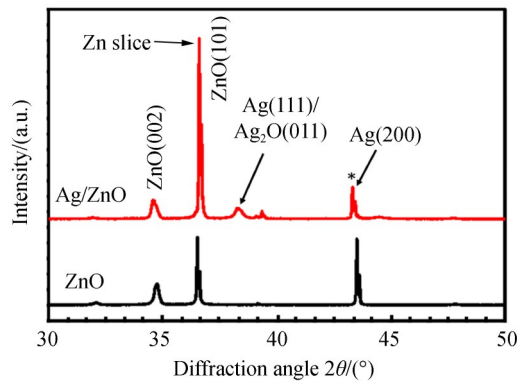


图4 ZnO和Ag/ZnO基底的X射线衍射图

Fig. 4 X-rays diffraction patterns of ZnO and Ag/ZnO substrates

进一步,为研究Ag/ZnO纳米结构的SERS特性,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,测量在不同磁控溅射时间下制备的Ag/ZnO纳米结构表面上修饰的4-MBA分子的SERS光谱,结果如图5所示.由图5(a)可知,Ag/ZnO纳米结构比ZnO纳米铅笔结构具有更强的SERS活性.这来源于物理增强和化学增强的协同作用,即:一方面,沉积在ZnO纳米铅笔结构表层的Ag纳米粒子的电磁效应,使得4-MBA的SERS信号增强;另一方面,作为N型半导体的ZnO,其表面富集的电子会注入Ag的费米能级,使得Ag/ZnO复合体达到新的电荷平衡,导致Ag的费米能级升高,从而在4-MBA分子吸附的Ag/ZnO体系中有利于电子从金属向拉曼标记分子4-MBA转移,形成来自金属氧化物半导体与贵金属和标记分子之间电荷转移机制的化学增强效应,得到更大的SERS信号^[27-28].同时,图5(b)清楚地表明,位于 1078 cm^{-1}

处的SERS峰强度随着银的溅射时间增加逐渐增加,在溅射时间为8 min时达到最大,然后减小.这是由于聚集的Ag纳米粒子产生更多的“热点”,导致电磁增强^[29].然而,过长的溅射时间会使Ag纳米粒子密度增加直至形成薄膜,导致SERS性能下降.因此,选择8 min溅射时间下制备的Ag/ZnO纳米结构用于后续的实验.

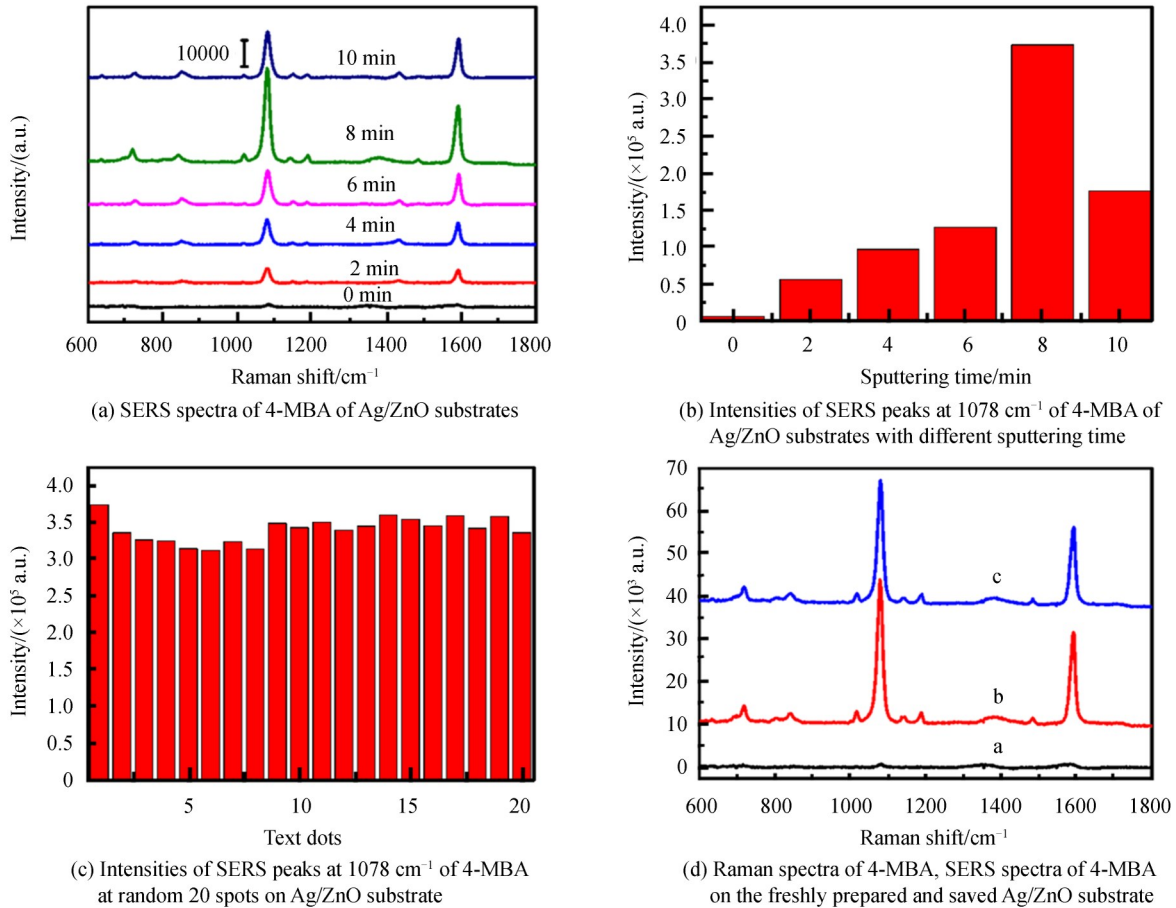


图5 各种Ag/ZnO纳米结构上的4-MBA的SERS光谱和SERS特征峰强度,4-MBA粉末的Raman光谱(线a)以及在新旧Ag/ZnO上4-MBA的SERS光谱(线b和c)

Fig.5 SERS spectra and the intensities of SERS peaks of 4-MBA attached on various Ag/ZnO nanostructures,) Raman spectrum of 4-MBA powder (line a), SERS spectra of 4-MBA on the freshly prepared and saved Ag/ZnO (line b and c)

为进一步评价Ag/ZnO纳米结构的性能,在选取的Ag/ZnO纳米结构上修饰4-MBA后,随机检测20个测试点的SERS光谱,则位于1 078 cm⁻¹的SERS峰强度如图5(c)所示,可见Ag/ZnO纳米结构具有良好的均匀性.同时,如图5(d)所示,将新制备的和旧的Ag/ZnO纳米结构的SERS光谱进行对比,也表明Ag/ZnO纳米结构的稳定性很好.此外,根据方程 $EF = (I_{SERS}/I_{bulk}) \times (N_{bulk}/N_{SERS})$ 确定Ag/ZnO纳米结构的拉曼增强因子(Enhancement Factor, EF)^[29],其中 I_{SERS} 和 I_{bulk} 分别是吸附在Ag/ZnO纳米结构上4-MBA分子的SERS特征峰和吸附在石英片上4-MBA粉末的拉曼特征峰的积分面积, N_{SERS} 和 N_{bulk} 分别是包含在激光照射光斑内的Ag/ZnO纳米结构上和石英片上的4-MBA分子数.那么,从图5(d)中位于1 078 cm⁻¹处特征峰的计算,得到 $I_{SERS} = 9.20 \times 10^5$ 和 $I_{bulk} = 2.35 \times 10^4$.同时,由实验参数:激光的穿透深度为1.86 μm,激光光斑的直径和有效面积分别为1.473 μm和0.945 μm²,自组装单层中4-MBA分子占据的面积为 2.0×10^9 cm²·mol⁻¹,4-MBA粉末密度为1.5 g·cm⁻³,4-MBA分子量为154.19 g·mol⁻¹,计算得到 $N_{SERS} = 1.35 \times 10^7$ 和 $N_{bulk} = 7.32 \times 10^{11}$.最后,计算得到Ag/ZnO纳米结构的 $EF = 2.12 \times 10^6$.这表明所制备的Ag/ZnO纳米结构具有很强的SERS活性,适用于有效的拉曼检测.

2.3 miRNA-106a的检测与分析

根据图1所示的检测方案,在785 nm波长的激光下测量由HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA探

针、miRNA-106a和Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA基底组成的“三明治”复合结构中4-MBA的SERS信号,检测样品的miRNA-106a含量.图6(a)给出了对应不同浓度miRNA-106a样品(1 fmol·L⁻¹~1 nmol·L⁻¹)的SERS光谱,可见SERS特征峰强度随着样品中miRNA-106a浓度的减少而下降,而在miRNA-106a浓度降低到1 fmol·L⁻¹时,与不包含miRNA-106a的空白样品的SERS光谱相对照,仍然有微弱的SERS特征峰信号被检测到.图8(b)给出了位于1 078 cm⁻¹处的SERS特征峰强度与miRNA-106a浓度的对应关系,拟合曲线方程 $y = 2.5570 \times 10^5 \exp(x/3.45997) - 2815.24$,相关系数 $R^2 = 0.99257$,并按照空白测定法得到其检测极限LOD=1.84 fmol·L⁻¹ [30].

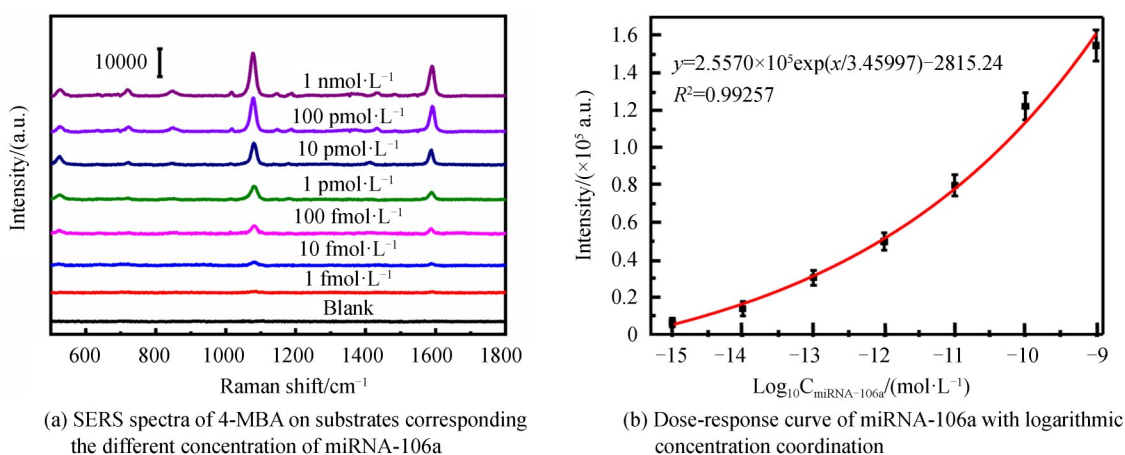


图6 miRNA-106a样品对应的4-MBA的SERS光谱和剂量-响应曲线

Fig. 6 SERS spectra of 4-MBA and the dose-response curves corresponding for the miRNA-106a samples

此外,为验证miRNA-106a检测的特异性,分别配制浓度为1 nmol·L⁻¹的miRNA-21、miRNA-mimics和miRNA-106a溶液,按照上述步骤进行检测,结果如图7所示.从图7可以看出,仅对应于miRNA-106a样品检测到强的SERS信号,而在非互补miRNA(miRNA-21和miRNA-mimics)的样品中观察到非常弱的SERS特征峰信号.因此,利用HSU-GNPs和Ag/ZnO纳米结构SERS特性构建的探针-肿瘤标志物-基底的“三明治”复合结构测定平台对于miRNA-106a检测具有高特异性.

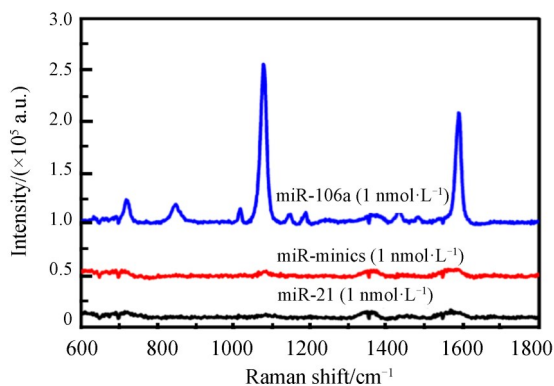


图7 对应不同检测物的SERS光谱

Fig. 7 SERS spectra corresponding to different analytes

最后,采用RT-qPCR技术验证检测结果的可靠性.配制不同浓度的6个肿瘤标志物miRNA-106a样本溶液,分别利用基于SERS技术的检测方案和RT-qPCR技术进行检测,结果列于表2中.从表2可见,基于SERS技术的检测方案得到的结果与RT-qPCR技术的测试数据保持一致,同时对更低浓度的样品仍显示出检测能力.因此,基于SERS技术构建的“三明治”复合结构的生物测定方案是检测miRNA-106a的一种有效策略.

表 2 miRNA-106a 的检测结果
Table 2 Detection results of miRNA-106a

Sample	SERS	RT-qPCR	Relative deviation
1	7.651 pmol·L ⁻¹	7.493 pmol·L ⁻¹	2.06%
2	35.829 fmol·L ⁻¹	34.815 fmol·L ⁻¹	2.83%
3	22.702 fmol·L ⁻¹	25.353 fmol·L ⁻¹	-11.67%
4	15.635 fmol·L ⁻¹	15.541 fmol·L ⁻¹	0.06%
5	13.724 fmol·L ⁻¹	14.216 6 fmol·L ⁻¹	-3.59%
6	2.058 2 fmol·L ⁻¹	—	—

3 结论

本文开发了一种新的基于 SERS 技术的基因类肿瘤标志物的测定方案,即利用 HSU-GNPs@4-MBA@5'-NH₂-ssDNA 探针、Ag/ZnO@3'-NH₂-ssDNA 基底和 miRNA-106a 构建的“三明治”复合结构,进行 miRNA-106a 的检测.实验结果表明,提出的基于 SERS 技术进行 miRNA-106a 的检测方案,不仅动态检测范围大,而且检测灵敏度高、检测特异性强和检测可靠性好.此外,通过调整探针和基底中修饰的互补 DNA 单链序列,提出的检测方案还可以扩展到其他 miRNA 的检测.因此,基于 HSU-GNPs 和 Ag/ZnO 纳米结构的 SERS 特性构建的“三明治”复合结构的生物检测方案,对于开展基因类肿瘤标志物的检测和癌症早期诊断具有很好的应用潜力.

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMARARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, **68**(6): 394-424.
- [2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. *International Journal of Cancer*, 2019, **144**(8): 1941-1953.
- [3] ROBISON L L, HUDSON M M. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2013, **14**(1): 61-70.
- [4] STEWART B W, WILD C P. World cancer report 2014 [M]. Lyon: IARC Nonserial Publication, 2014.
- [5] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, **116**: 281-297.
- [6] CALIN G A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99** (24): 15524-15529.
- [7] MICHAEL M Z, OCONNOR S M, van HOLST PELLEKAAN N G, *et al.* Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. *Molecular Cancer Research*, 2003, **1**(12): 882-891.
- [8] TSUJIURA M, ICHIKAWA D, KOMATSU S, *et al.* Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. *British Journal of Cancer*, 2010, **102**(7): 1174-1179.
- [9] RAHIMI A, SEDIGHI R, EMADI-BAYGI M, *et al.* Bioinformatics prediction and experimental validation of a novel microRNA: hsa-miR-B43 within human CDH4 gene with a potential metastasis-related function in breast cancer[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, **121**: 1307-1316.
- [10] JONSTRUP S P, KOCH J, KJEMS J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification[J]. *RNA*, 2006, **12**(9): 1747-1752.
- [11] BABAK T, ZHANG W, MORRIS Q, *et al.* Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference[J]. *RNA*, 2004, **10**(11): 1813-1819.
- [12] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKL W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, **294**(5543): 853-858.
- [13] CHENG L, SHARPLES R A, SCICLUNA B J, *et al.* Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood[J]. *Journal of Extracellular Vesicles* 2014, **3**: 23743.
- [14] FU Hao, TONG Li-ying, LIANG Zhao-heng, *et al.* Silver-covered Si corona-pillar array substrate: fabrication, SERS characteristic analysis and detection of tumor marker miRNA-106a[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2019, **40**(3): 317-325.
- [15] 洪颖, 佟丽莹, 梁照恒, 等. 银覆盖冠状硅柱阵列基底的制备、SERS 特性分析及肿瘤标志物 miRNA-106a 的检测[J]. *发光学报*, 2019, **40**(3): 317-325.
- [15] LI J, ZHU Z, ZHU B, *et al.* Surface-enhanced Raman scattering active plasmonic nanoparticles with ultrasmall interior

- nanogap for multiplex quantitative detection and cancer cell imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(15): 7828-7836.
- [16] FU Hao, LÜ Wei-feng, GAO Yong-feng, *et al.* Highly sensitive detection of tumor marker miRNA-21 based on sandwich SERS structure and enzymatic cleavage technique[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2019, **48**(7): 0717003.
洪颢, 吕伟烽, 高永峰, 等. 基于三明治 SERS 结构和酶剪切技术的肿瘤标志物 miRNA-21 的高灵敏检测[J]. *光子学报*, 2019, **48**(7): 0717003
- [17] IM H, BANTZ K C, NATHAN C, *et al.* Vertically oriented sub-10-nm plasmonic nanogap arrays[J]. *Nano Letters*, 2010, **10**(6): 2231-2236.
- [18] ZHANG Hao-peng, JIANG Tao, GAO Yong-feng, *et al.* Single molecule detection by sers of a spaser-based bowtie nanoantenna[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, **41**(9): 201-206.
张昊鹏, 姜涛, 高永峰, 等. 表面等离子体受激辐射放大领结型纳米天线的 SERS 单分子探测[J]. *中国激光*, 2014, **41**(9): 201-206.
- [19] WUSTHOLZ K L, HENRY A I, MCMAHON J M, *et al.* Structure-activity relationships in gold nanoparticle dimers and trimers for surface-enhanced raman spectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**(31): 10903-10910.
- [20] ZRIMSRK A B, HENRY A I, DUYNE R P V. Single molecule surface-enhanced raman spectroscopy without nanogaps [J]. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2013, **4**(19): 3206-3210.
- [21] WANG X T, SHI W S, SHE G W, *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) on transition metal and semiconductor nanostructures[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, **14**(17): 5891-5901.
- [22] JOSHIA P, SANTHANAM V. Paper-based SERS active substrates on demand[J]. *RSC Advances*, 2016, **6**: 68545-68552
- [23] KATRIN K. Chemical contribution to SERS enhancement: an experimental study on a series of polymethine dyes on silver nanoaggregates[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2016, **120**(37): 21076-21081.
- [24] MA Hao, WANG He, LI Peng, *et al.* Interfacial charge transfer in TiO₂/PTCA/Ag revealed by surface-enhanced raman spectroscopy[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2018, **122**(27): 15208-15213.
- [25] LI Jun-peng, ZHOU Jun, JIANG Tao, *et al.* Controllable synthesis and SERS characteristics of hollow sea-urchin gold nanoparticles[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, **16**: 25601-25608.
- [26] SIMON Q, BARRECA D, GASPAROTTO A, *et al.* Ag/ZnO nanomaterials as high performance sensors for flammable and toxic gases. *Nanotechnology*, 2011, **23**(2): 025502.
- [27] ZHANG Xiao-lei, YU Zhi, JI Wei, *et al.* Charge-transfer effect on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) in an ordered Ag NPs/4-Mercaptobenzoic Acid/TiO₂ system [J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2015, **119**(39): 22439-22444.
- [28] YI Zao, XU Xi-bin, KANG Xiao-li, *et al.* Fabrication of well-aligned ZnO@Ag nanorod arrays with effective charge transfer for surface-enhanced Raman scattering[J]. *Surface & Coatings Technology*, 2017, **324**: 257-263.
- [29] LI Shuai, LI Da-wei, ZHANG Qing-yu, *et al.* Surface enhanced Raman scattering substrate with high-density hotspots fabricated by depositing Ag film on TiO₂-catalyzed Ag nanoparticles[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2016, **689**: 439-445.
- [30] SHRIVASTAVA A, GUPTA V. 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.