

基于金纳米杆/PMMA 基底 SERS 特性的高灵敏肿瘤标志物无标记检测

佟丽莹¹, 洪 颖¹, 彭 乐¹, 李庆宁², 石清华³, 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. 宁波大学医学院生物化学与分子生物学系, 浙江 宁波 315211

3. 宁波大学医学院附属医院, 浙江 宁波 315020

摘 要 高品质贵金属纳米结构基底的制备是应用表面增强拉曼散射(SERS)技术进行高灵敏生物检测的关键。采用改进的 Langmuir-Blodgett 方法, 通过在金纳米杆(Au NRs)溶胶注入乙醇, 使得 Au NRs 迁移至溶胶与甲苯的交界面, 并用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)固定交界面处的 Au NRs, 形成大面积分布、均匀致密排列的二维畴状 Au NRs/PMMA 纳米结构薄膜基底。然后, 采用等离子体清洗技术处理制备的基底, 使得金纳米杆(Au NRs)的表面裸露, 以增强基底的 SERS 特性。实验表明, Au NRs/PMMA 基底具有优良的 SERS 特性, 在 785 nm 波长的激光照射下, 增强因子可以达到 5.49×10^6 。此外, 利用制备的 Au NRs/PMMA 基底, 开展前列腺癌肿瘤标志物——前列腺特异性抗原(PSA)的高灵敏无标记定量检测研究。在 PSA 的无标记检测过程中, 首先对 PSA 标准溶液和新生牛血清进行 SERS 光谱的直接检测, 得到 PSA 分别位于 823, 1 080, 1 385, 1 586 和 1 640 cm^{-1} 处的主要的拉曼特征峰; 其次, 通过对 PSA 标准溶液、临床男性血清样本及女性血清样本的 SERS 光谱进行测量和分析, 筛选出在 PSA 的 SERS 光谱中与血清中 PSA 含量相关的拉曼特征峰, 它们是分别位于 649, 680 以及 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰。进一步, 通过对与 PSA 同属糖蛋白的肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)以及与 PSA 同源的人腺体激肽释放酶 2(hK2)进行 SERS 光谱检测和分析, 发现位于 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰对于 PSA 具有高的特异性, 将其作为临床血清样本中 PSA 无标记定量检测的具有特异性的拉曼特征峰, 并以此为依据, 对不同 PSA 浓度的标准溶液进行检测, 得到位于 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰强度与 PSA 样本溶液中 PSA 的浓度相关的剂量-响应曲线。最后, 开展临床血清样本的应用检测。结果表明, 基于 Au NRs/PMMA 基底的 SERS 检测结果与化学发光免疫分析(CLIA)方法的检测结果一致, 且具有比 CLIA 更高的检测灵敏度, 最低检测极限为 $0.06 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且无标记检测范围为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 基于 Au NRs/PMMA SERS 基底的高灵敏肿瘤标志物无标记检测具有重要应用前景。

关键词 表面增强拉曼散射; 金纳米杆; 前列腺特异性抗原; 无标记检测

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)03-0784-07

引 言

由于老龄化程度的加剧以及环境和生活习惯的改变, 癌症的病发率和致死率在逐年增长, 严重威胁人类健康。根据 2017 年 2 月国家癌症中心发布的数据, 我国 2013 年新发恶性肿瘤病例 368.2 万例, 死亡病例 222.9 万例, 形势十分严峻^[1]。随着生命科学和医疗技术的进步, 癌症已非不治之症, 通过早期诊断和治疗, 那些预后性好的癌症如前列腺癌

和乳腺癌, 具有极高的生存率^[2]。然而, 由于大多数患者处于癌症早期时, 往往没有明显的临床症状, 影像学检查不明显, 当得到临床确诊时, 患者已处于癌症的中晚期, 治疗成功率低。因此, 癌症的早期检测、诊断和治疗成为提高癌症患者生存率的关键。多年来, 经过人们的不懈努力, 在肿瘤诊断检测方面, 已经取得巨大的进展, 一批高技术手段已获得临床应用, 如酶联免疫测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 放射免疫测定(radioimmunoassay, RIA), 化学发光免疫分析法(chemiluminescence enzyme im-

收稿日期: 2018-03-19, 修订日期: 2018-07-14

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

作者简介: 佟丽莹, 女, 1993 年生, 宁波大学理学院微电子科学与工程系硕士研究生 e-mail: vivien_tong@163.com

* 通讯联系人 e-mail: zhoujun@nbu.edu.cn

munoassay, CLIA)等,但是这些检测过程需要昂贵的仪器,操作复杂,开展高通量的快速检测受到限制^[3-5]。

表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)作为一种无损和超灵敏的光谱分析技术,可以极大增强位于贵金属纳米结构表面或附近目标分子的拉曼信号,已被广泛应用于环境监测,化学分析和生物传感等领域^[6-7]。贵金属纳米结构独特的 SERS 增强特性主要归因于局域表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)引起的电磁场增强,从而利用 SERS 基底开展肿瘤标志物检测具有极大的优势^[8-10]。目前,基于 SERS 技术的肿瘤标志物检测主要分为两类:间接检测和直接检测,即有标记检测与无标记检测^[11-12]。间接检测一般是通过化学键合作用或者生物的特异性结合将待测分子与拉曼分子标记的贵金属纳米粒子链接,通过测量标记分子的 SERS 光谱强度间接表征待测物的含量。虽然拉曼标记分子的 SERS 效应显著,其呈现的特征拉曼峰的宽度窄、强度大,因而检测灵敏度高,但是间接检测也有一些难以避免的缺点,如探针容易团聚所造成的定量检测误差。相对于间接检测而言,无标记检测的优势在于无需借助拉曼标记分子,仅通过高品质 SERS 基底直接获得肿瘤标志物的 SERS 即可进行成分和含量分析,从而成为肿瘤标志物分子结构分析和定量检测的重要手段。例如,李绍新等将前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)溶液与银纳米粒子胶体按照 1:1 的体积比配制后进行 SERS 检测,并采用多元统计方法处理 SERS 数据,成功地分析了健康人与前列腺癌患者血清中 PSA 的 SERS 特征^[13]。Chaloupková 等制备了二型谷氨酸羧肽酶抑制剂(Glutamate carboxypeptidase II inhibitor, Anti-GCP II)修饰的 Fe₃O₄@Anti-GCP II @Ag 纳米粒子,通过前列腺特异性膜抗原(Glutamate carboxypeptidase II, GCP II)与 Anti-GCP II 抗体特异性结合,直接检测 GCP II 的 SERS 信号,其检测极限低至 0.48 ng · mL⁻¹^[14]。由于肿瘤标志物的拉曼信号非常微弱,需要借助贵金属纳米结构获得较强的 SERS,才能得到有效的检测结果。因此,制备出性能良好的 SERS 基底是开展肿瘤标志物的无标记检测研究的关键。

本研究采用改进的 Langmuir-Blodgett 方法^[15]和等离子体清洗技术制备出大面积的金纳米杆/聚甲基丙烯酸甲酯(Au NRs/PMMA)基底,开展 PSA 的无标记检测研究,并应用于临床血清样本的定量检测,具有极高的灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计(LAMBDA 950, PerkinElmer); 便携式拉曼光谱仪(BWS415, B&W Tek Inc.); 场发射扫描电子显微镜(SU-70, Hitachi); 台式高速冷冻离心机(TGL-20M, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 等离子清洗机(ZEPTO, Diener); 超声波清洗机(KS-120EI, 宁波海曙科生超声设备有限公司); 磁力搅拌器(ZNCL-GS, 河南爱博特科技发展有限公司)。

氯金酸(HAuCl₄ · 3H₂O, ≥99.9%)、硼氢化钠

(NaBH₄)、硝酸银(AgNO₃)、对巯基苯甲酸(4-MBA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)购于 Sigma Aldrich 公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、油酸钠(NaOl)购于阿拉丁试剂有限公司; 抗坏血酸(AA)购于天津博迪化工股份有限公司; 无水乙醇(C₂H₅O, 99.5%)购于国药集团化学试剂有限公司; 前列腺特异性抗原(PSA)标准溶液(0.1 mg · mL⁻¹)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)标准溶液(0.1 mg · mL⁻¹)及抗原稀释液(新生牛血清)购于北京科跃中楷生物技术有限公司; 人腺体激肽释放酶 2(human glandular kallikrein-2, hK2)标准溶液(1 mg · mL⁻¹)购于 Abcam 公司; 甲苯(C₆H₅CH₃, ≥99.5%)购于杭州高晶精细化工有限公司; 盐酸(HCl, 36%)购于浙江中星化工试剂有限公司; 女性和男性血清样本采集自宁波大学医学院附属医院。

1.2 材料制备

1.2.1 金纳米杆的制备

采用 Joshua 晶种法制备 Gold nanorods, Au NRs^[16], 具体步骤如下: (1)将 HAuCl₄ 溶液(0.5 mmol · L⁻¹, 5 mL)和 CTAB 溶液(0.2 mol · L⁻¹, 5 mL)振荡混合后, 迅速加入 600 μL 浓度为 0.1 mol · L⁻¹ 冰浴的 NaBH₄, 静置 2 h 即得到金种溶液; (2)将各为 2.5 mL 的 CTAB(0.1 mol · L⁻¹)和 NaOl(0.4 mmol · L⁻¹)溶液搅拌均匀并加热至 50 °C 后冷却至室温; 再向混合溶液中加入 180 μL 的 AgNO₃(4 mmol · L⁻¹), 静置 15 min 后, 加入 2.5 mL 的 HAuCl₄(1 mmol · L⁻¹)并搅拌 90 min, 待溶液变为无色后, 加入 21 μL 纯度为 36% 的 HCl, 静置 15 min 后, 加入 12 μL 的 AA(0.1 mol · L⁻¹), 并迅速加入 4 μL 金种溶液; (3)将上述制备的混合溶液静置 12 h 后, 即得到长径比为 3:1 的 Au NRs。

1.2.2 Au NRs/PMMA 基底的制备

Au NRs/PMMA 基底的制备流程如图 1 所示, 具体操作如下: 首先, 取 14 mL 的 Au NRs 溶液(0.348 nmol · L⁻¹)置于离心机中以 8 000 r · min⁻¹ 的速度离心 15 min, 去除上清液后再溶于 14 mL 的超纯水中, 超声振荡 10 min 后, 再重复一次离心过程以去除过多的 CTAB, 得到单分散的 Au NRs 溶胶; 然后, 将 Au NRs 溶胶置于广口烧杯中, 加入 10 mL 的甲苯溶液, 得到上下分层的混合溶液; 再用机械注射泵向下层的 Au NRs 溶胶中缓慢加入无水乙醇, 随着乙醇注入量的增加, Au NRs 逐渐上浮至混合溶液的分界面, 并排列成二维畴结构; 待下层溶液澄清后, 再加入 7 mL 的溶有 PMMA(1.8 mg)的甲苯溶液, 静置 12 h 后使 Au NRs 的二维畴结构固定; 当甲苯彻底挥发后, 溶液液面上即形成 Au NRs/PMMA 薄膜; 随后, 取出 Au NRs/PMMA 薄膜并放置在硅片(3 cm × 3 cm)上, 经真空干燥箱在 80 °C 下烘干 8 h; 最后, 为增强 Au NRs 的 SERS 特性, 利用等离子体清洗机在功率为 35 W 和压强为 30 Pa 的条件下对 Au NRs/PMMA 薄膜刻蚀处理 5 min 使得 Au NRs 裸露在薄膜表面, 至此 Au NRs/PMMA 基底制备完毕。后续实验中, 将基底切割使用。

1.3 光谱测量

吸收光谱测量: 采用紫外可见分光光度计对 1.2.2 节中制备的单分散的 Au NRs 溶液和干燥后的 Au NRs/PMMA 薄膜进行紫外-可见光谱测量。

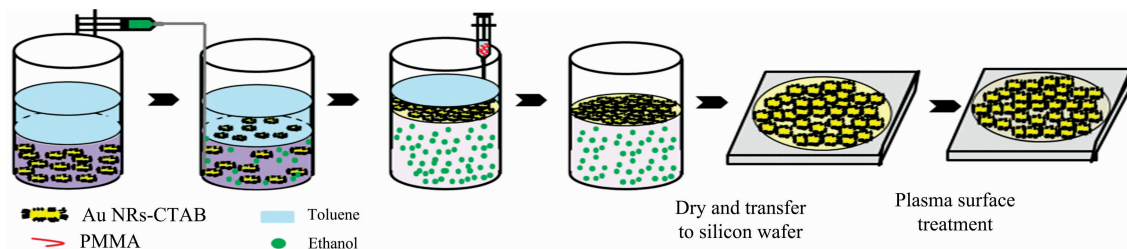


图 1 AuNRs/PMMA 基底的制备流程图

Fig. 1 Preparation schematic of AuNRs/PMMA substrate

Au NRs/PMMA 基底的 SERS 光谱测量: 首先用无水乙醇配制浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-MBA 拉曼分子溶液, 然后将制备的 Au NRs/PMMA 基底浸泡在 4-MBA 溶液中, 10 min 后取出基底, 再用乙醇及去离子水分别冲洗 3 次, 以去除过量的 4-MBA 分子。待基底自然干燥后, 进行拉曼光谱检测。同时, 作为对照, 称取质量为 7.3 mg 的 4-MBA 粉末置于洁净的硅片表面, 同时利用洁净石英片将其按压压实, 随后进行 4-MBA 的拉曼光谱检测。以上测量均在 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进行。

1.4 PSA 的 SERS 光谱检测

考虑到临床血清样本的基质环境, 为避免盐类缓冲液中的离子对无标记检测造成的影响, 因此标准溶液均采用新生牛血清进行稀释。具体操作为: 用新生牛血清将 PSA 标准溶液以十倍比例稀释, 分别得到浓度从 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 至 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 7 个标准样本溶液。再将切割制备的 AuNRs/PMMA 基底分别浸泡在配制的 PSA 标准样本溶液中, 20 min 后取出基底并用去离子水清洗 3 次, 待室温下自然干燥后, 进行 SERS 光谱检测。SERS 光谱检测的实验条件与前述一致。

2 结果与讨论

2.1 Au NRs 和 Au NRs/PMMA 基底表征

Au NRs 和制备的 Au NRs/PMMA 薄膜的扫描电子显

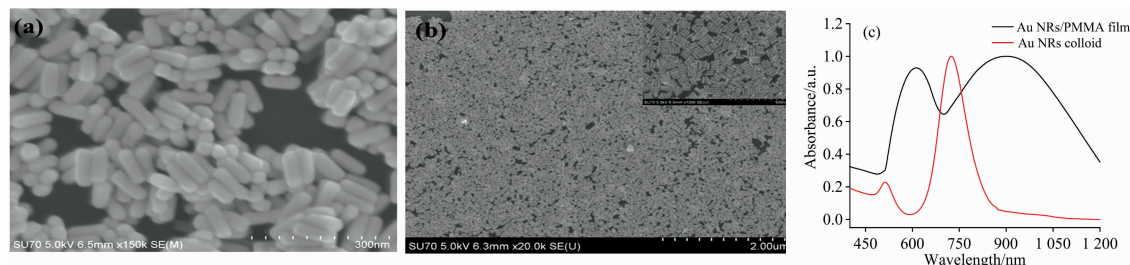


图 2 (a) AuNRs 和 (b) AuNRs/PMMA 基底的扫描电镜图; (c) AuNRs 溶液和 AuNRs/PMMA 薄膜的紫外-可见吸收光谱
Fig. 2 SEM images of (a) AuNRs (b) AuNRs/PMMA substrate; (c) UV-Vis spectra of AuNRs colloid and AuNRs/PMMA film

表征 Au NRs/PMMA 基底的 SERS 增强特性的 SERS 增强因子, 按照式(1)计算

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

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基底上的 4-MBA 分子数。计算图 3(a) 中 4-MBA 位于 1078 cm^{-1} 处拉曼峰的积分强度, 得到 $I_{\text{bulk}} = 2.756 \times 10^3$, $I_{\text{SERS}} = 1.391 \times 10^6$; 然后, 根据实验参数(光斑直径

显微镜(SEM)照片如图 2 所示。由图 2(a)可见, Au NRs 的形貌一致、尺寸均一, 其长径比为 $3:1$ [长 $(75 \pm 5) \text{ nm}$, 直径 $(25 \pm 2) \text{ nm}$]; 图 2(b)中, Au NRs/PMMA 薄膜均匀完整, 其由 Au NRs 并肩排列形成致密的二维畴结构(见插图)。分析表明, 由于以 CTAB 为表面活性剂合成的 Au NRs 的表面带有正电荷, 注入乙醇后, 乙醇电离的羟基中和 Au NRs 表面的部分正电荷, 使粒子表面的自由能降低, 粒子与界面的接触角近似为 90° , 从而 Au NRs 汇聚于两相溶液的交界面处; 此时, 伴随着交界面处粒子数目的增加, 粒子间范德瓦尔斯力增大, 系统处于非平衡态; 最后, 范德瓦尔斯力与粒子间的静电斥力达到平衡, 则纳米粒子之间的距离相应减小并形成稳定的二维畴结构。实际上, Au NRs 溶液和 Au NRs/PMMA 薄膜的紫外-可见吸收光谱也反映了上述过程。在图 2(c)中, Au NRs 溶液的吸收峰位于 511 和 725 nm 处, Au NRs/PMMA 薄膜的吸收峰位于 612 和 900 nm 处。对比两者的吸收光谱, 可以发现 Au NRs/PMMA 薄膜的吸收峰有明显的红移和展宽, 这是 Au NRs 粒子间强烈的表面等离子耦合导致的, 也表明大部分 AuNRs 是以肩并肩方式排列的^[17]。

对所制备的 AuNRs/PMMA 基底的 SERS 特性进行表征, 测量得到在硅片上的 4-MBA 以及与基底链接的 4-MBA 的 SERS 光谱如图 3(a)所示。由图可见, 与 Au NRs/PMMA 基底链接的 4-MBA 分子的 SERS 特征峰强度远高于硅片上的 4-MBA 分子的拉曼特征峰强度, 这是由基底中密集排列的 Au NRs 产生的电磁增强引起的。

对所制备的 AuNRs/PMMA 基底的 SERS 特性进行表征, 测量得到在硅片上的 4-MBA 以及与基底链接的 4-MBA 的 SERS 光谱如图 3(a)所示。由图可见, 与 Au NRs/PMMA 基底链接的 4-MBA 分子的 SERS 特征峰强度远高于硅片上的 4-MBA 分子的拉曼特征峰强度, 这是由基底中密集排列的 Au NRs 产生的电磁增强引起的。

1.473 μm 、激光穿透深度 1.86 μm 和单个 4-MBA 分子所占的面积为 3.32×10^{-15} [18], 计算得到 $N_{\text{bulk}} = 6.18 \times 10^9$, $N_{\text{SERS}} = 5.13 \times 10^6$ 。则由式(1)即得, AuNRs/PMMA 基底的增强因子 $EF = 5.49 \times 10^6$ 。此外, 在 AuNRs/PMMA 基底上随机取 25 个测试点, 测量得到 4-MBA 位于 1078 cm^{-1} 处的

拉曼峰强度如图 3(b) 所示, 各点峰强的相对标准差为 4.02%, 表明基底的均匀性良好。同时, 由图 3(c) 给出的链接 4-MBA 的样品基底在间隔一周和一个月后测量的 SERS 光谱, 可以看出基底具有很好的时间稳定性。

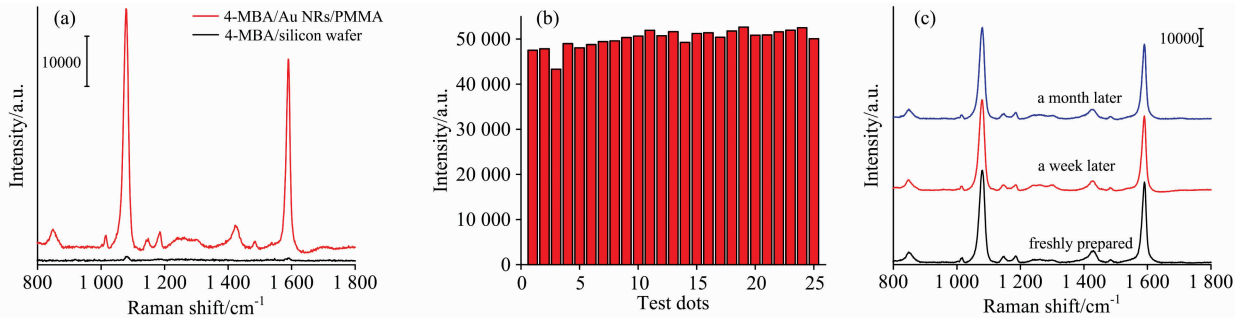


图 3 (a) 4-MBA 的 SERS 光谱和拉曼光谱; (b) 基底上 25 个点的位于 1078 cm^{-1} 的 SERS 峰强度; (c) 基底放置不同时间后测量的 4-MBA 的 SERS 光谱

Fig. 3 (a) SERS and Raman spectra of 4-MBA; (b) the intensities of SERS peaks at 1078 cm^{-1} for 25 spots on the substrate; (c) SERS spectra of 4-MBA-linked AuNRs/PMMA substrate after different time intervals

2.2 基于 SERS 的肿瘤标志物无标记检测方案

2.2.1 Au NRs/PMMA 基底的功能分析

为了进行 AuNRs/PMMA 基底检测肿瘤标志物的功能分析, 对基底、新生牛血清缓冲液以及浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PSA 标准溶液的 SERS 光谱和拉曼光谱进行检测, 结果如图 4 所示。在图 4 中, AuNRs/PMMA 基底的 SERS 光谱仅为背景信号, 新生牛血清缓冲液 SERS 光谱的拉曼特征峰分别位于 $713, 964, 1122, 1284$ 和 1488 cm^{-1} ; PSA 标准溶液的拉曼光谱中仅出现几个分别位于 $713, 755, 848, 1122$ 和 1284 cm^{-1} 的强度较弱的拉曼特征峰, 而 PSA 标准溶液的 SERS 光谱中除了可以观察到上述拉曼特征峰以外, 还出现位于 $649, 680, 823, 964, 1180, 1226, 1336, 1448, 1586$ 以及 1640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰。对比图 4 中新生牛血清缓冲液和 PSA 标准溶液的 SERS 光谱可见, 新生牛血清缓冲液的 SERS 光谱的拉曼特征峰数目少、强度低, 对 PSA 标准溶液的 SERS 光谱影响较小; 对比 PSA 标准溶液的 SERS 光谱和拉曼光谱可以看出, 在 PSA 标准溶液的 SERS 光谱中出现的拉曼特征峰, 不仅强度大而且数目多, 说明 AuNRs/PMMA 基底对 PSA 的拉曼信号有极大的增强特性, 可以利用 AuNRs/PMMA 基底进行 PSA 的无标记检测。另一方面, 考虑到 PSA 标准溶液的 SERS 光谱与新生牛血清缓冲液的 SERS 光谱中有部分特征拉曼峰重合, 因此去除这些重合的拉曼特征峰以及光谱中强度低的拉曼特征峰后, 采用其他较强的拉曼特征峰更加适合用于进行后续的 PSA 检测。

2.2.2 肿瘤标志物无标记检测方案的设计

将肿瘤标志物 PSA 的无标记检测应用于临床定量分析, 除了要求检测高灵敏以外, 还必须保证检测结果的特异性。为此, 对 PSA 标准溶液、临床男性血清样本及女性血清样本的 SERS 光谱进行测量和分析, 以筛选 PSA 标准溶液的 SERS 光谱中与血清中 PSA 含量相关的拉曼特征峰。如图 5

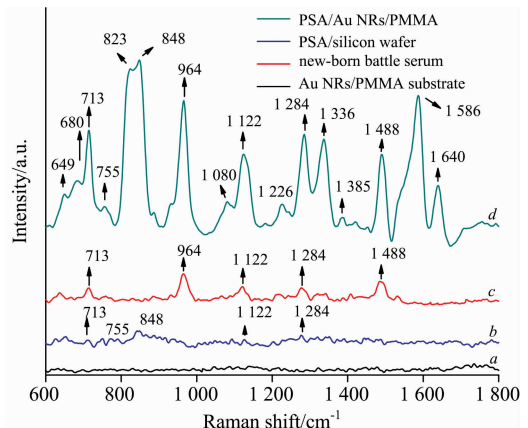


图 4 拉曼光谱和 SERS 光谱

a: AuNRs/PMMA 基底; b: PSA 标准溶液; c: 新生牛血清; d: PSA 标准溶液

Fig. 4 Raman spectra and SERS spectra

a: Au NRs/PMMA substrate; b: PSA standard solution; c: New-born battle serum buffer; d: PSA standard solution

所示, 由于 PSA 一般主要存在于男性血清中, 则对比男性血清样本与 PSA 标准溶液的 SERS 光谱, 发现它们在 $649, 680, 755, 1080, 1226, 1336, 1385, 1586$ 和 1640 cm^{-1} 处有一致的拉曼特征峰, 而血清样本的光谱中位于 $755, 1080$ 和 1336 cm^{-1} 处的拉曼特征峰的强度比 PSA 标准溶液的高。考虑到医院提供的男性血清样本的 PSA 浓度已知为 $38.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 远低于 PSA 标准溶液中 PSA 的浓度 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 这些位于 $755, 1080$ 和 1336 cm^{-1} 处的拉曼峰并非单纯来自男性血清样本的 PSA。另一方面, 与对照实验中女性血清样本的 SERS 光谱相比, 发现 PSA 标准溶液的 SERS 光谱中位于 $1080, 1226, 1336, 1385$ 和 1586 cm^{-1} 处的拉曼特征峰与女性血清的 SERS 光谱一致, 也可能来自

于其他成分, 缺乏特异性。因此, 上述缺乏特异性的拉曼特征峰不能用于临床血清样本的定量检测。最后确定, 在 PSA 标准溶液的 SERS 光谱中, 位于 649, 680 以及 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰可以用于临床血清样本的定量检测。

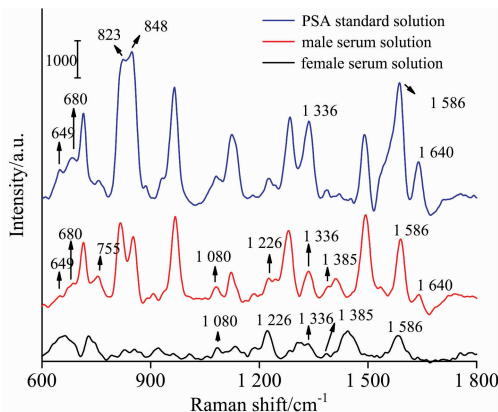


图 5 PSA 标准溶液与临床血清样本的 SERS 光谱
Fig. 5 SERS spectra of PSA standard solution and the clinic serum samples

进一步对上述拟用于临床血清样本中 PSA 检测的拉曼特征峰进行特异性检验。选择与 PSA 同属糖蛋白的肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)以及与 PSA 同源的人腺体激素释放酶 2 (hK2)进行 SERS 光谱检测, 结果如图 6 所示。图 6 可见, AFP 标准溶液 SERS 光谱中位于 649 和 680 cm^{-1} 处的拉曼特征峰与 PSA 标准溶液的拉曼特征峰重合, hK2 标准溶液的 SERS 光谱中位于 1 080, 1 284 和 1 336 cm^{-1} 处的拉曼特征峰与 PSA 标准溶液的拉曼特征峰重合。因此, 排除上述实验中重合的拉曼特征峰, 则位于 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰对于 PSA 具有高特异性, 将作为临床血清样本中 PSA 无标记定量检测的依据。

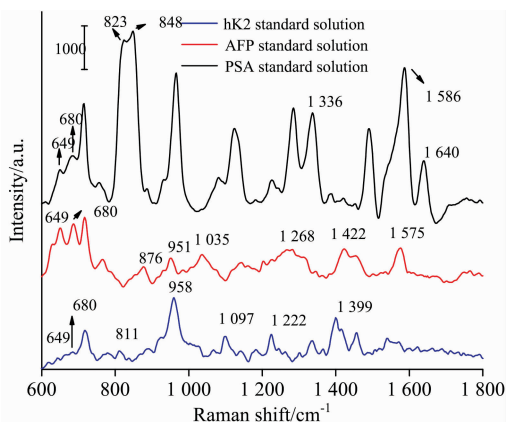


图 6 PSA 和 AFP 以及 hK2 标准溶液的 SERS 光谱
Fig. 6 SERS spectra of PSA, AFP and hK2 standard solution

2.2.3 标准剂量响应曲线

首先, 根据 2.2.2 节设计的基于 Au NRs/PMMA 基底的 PSA 无标记检测方案, 对不同浓度的 PSA 标准样本溶液进行 SERS 光谱检测, 结果如图 7(a)所示。我们发现, 随着

PSA 标准样本溶液浓度的降低, SERS 光谱中位于 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰的强度下降。然后, 将位于 1 640 cm^{-1} 处的拉曼特征峰强度与 PSA 标准样本溶液的浓度相对应, 并进行数据拟合得到标准剂量响应曲线如图 7(b)所示。由

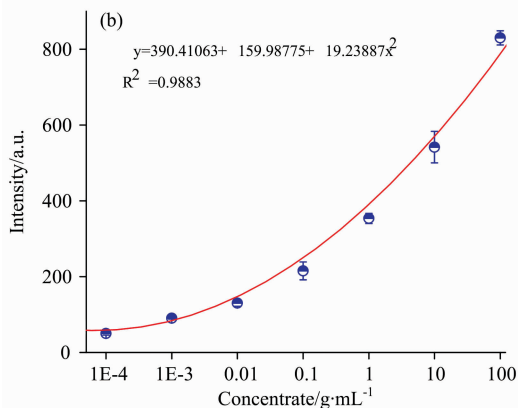
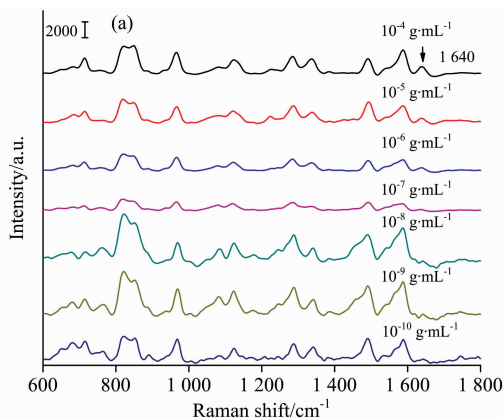


图 7 (a)不同浓度的 PSA 标准样本溶液的 SERS 光谱;
(b)PSA 的标准剂量响应曲线

Fig. 7 (a) SERS spectra of PSA standard solution with different concentrations; (b) the standard dose-response curve of PSA

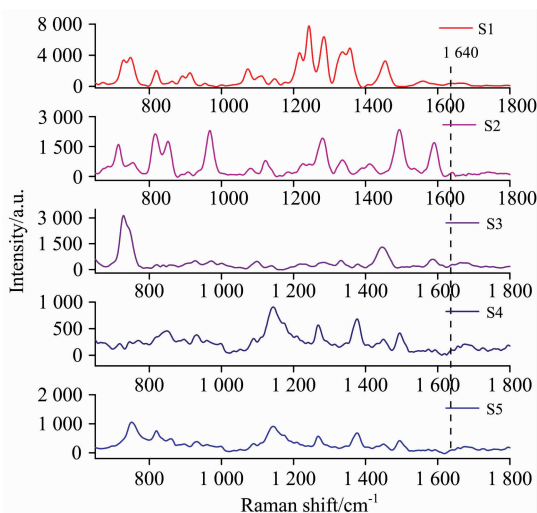


图 8 临床男性血清样本的 SERS 光谱
Fig. 8 SERS spectra of clinical male serum samples

图 7(b)可得^[19], PSA 浓度的检测范围为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低检测极限为 $60 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 血清样本的检测结果

Table 1 Detection results of the serum samples

样本	SERS/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CLIA/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相对偏差 /%
S1	996.42	1 040	4.19
S2	35.29	38.28	7.81
S3	14.58	16.02	8.98
S4	6.42	6.81	5.72
S5	2.74	2.93	6.48

2.3 临床血清样本的检测

将肿瘤标志物无标记检测方案应用于临床男性血清样本中 PSA 的检测。首先, 对临床采集的 5 份男性血清样本进行 SERS 光谱检测, 如图 8 所示。然后, 根据标准剂量响应曲线图 7(b), 由测量的位于 $1\,640 \text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼特征峰强度, 得到相应的 PSA 浓度并列于表 1 中。同时, 表 1 也列出了采用

化学发光法 (CLIA) 检测的对应血清样本中 PSA 的含量。从表 1 可见, 应用 Au NRs/PMMA 基底进行的 PSA 无标记检测与 CLIA 检测的结果基本一致, 相对偏差较小。

3 结 论

应用制备的具有均匀、稳定和高灵敏 SERS 特性的 AuNRs/PMMA 基底, 实现了肿瘤标志物 PSA 的无标记检测。实验中, 通过对 PSA 标准溶液及其抗原稀释剂的 SERS 光谱测量和分析, 得到表征 PSA 的拉曼特征峰; 通过对比男性血清、女性血清、AFP 和 hK2 的标准溶液的 SERS 光谱, 确定出高特异性的 PSA 的拉曼特征峰并应用于临床血清样本的定量检测。实验结果表明, 与 CLIA 方法相比, 以 AuNRs/PMMA 基底进行 PSA 的无标记检测, 具有更高的灵敏度, 最低检测限可以低至 $60 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 基于 AuNRs/PMMA 基底的 SERS 特性开展肿瘤标志物的高灵敏度无标记检测, 对于癌症的早期诊断具有极大的应用潜力。

References

- [1] HE Jie, CHEN Wan-qing (赫捷, 陈万青). Annual Report on Status of Cancer in China (中国肿瘤登记年报). Beijing: Tsinghua University Press (北京: 清华大学出版社), 2017.
- [2] Chen W Q, Zheng R S, Baada P D, et al. CA-Cancer J. Clin., 2016, 66: 115.
- [3] Setiawan D, Luttjeboer J, Pouwels K B, et al. JPN. J. Clin. Oncol., 2017, 47(3): 265.
- [4] Skenandore C S, Pineda A, Bahr J M, et al. Domest. Anim. Endoc., 2017, 60: 61.
- [5] Li X G, Meng M, Zheng L, et al. Anal. Chem., 2016, 88(17): 8556.
- [6] Ding S Y, Yi J, Li J F, et al. Nature Reviews Materials, 2016, 1: 1.
- [7] Li J F, Zhang Y J, Ding S Y, et al. Chem. Rev., 2017, 117(7): 5002.
- [8] Wang Z Y, Zong S F, Wu L, et al. Chem. Rev., 2017, 117(12): 7910.
- [9] Wang Y, Kang S, Khan A, et al. Sci. Rep., 2016, 6: 21242.
- [10] Wang Y W, Doerksen J D, Kang S, et al. Small, 2016, 12(40): 5612.
- [11] Liu Y, Zhou H B, Hu Z W, et al. Biosens. Bioelectro., 2017, 94: 131.
- [12] Lane L A, Qian X M, Nie S M. Chem. Rev., 2015, 115(19): 10489.
- [13] Li S X, Zhang Y J, Xu J F, et al. Appl. Phys. Lett., 2014, 105(9): 091104.
- [14] Chaloupková Z, Balzerová A, Bařinková J, et al. Anal. Chim. Acta, 2018, 997: 44.
- [15] Falk Y Z, Schmitt J, Alfredsson V. Micropor. Mesopor. Mat., 2018, 256: 32.
- [16] Allen J M, Xu J P, Blahove M, et al. J. Colloid Interf. Sci., 2017, 505: 1172.
- [17] Erik C Dreaden, Alaaldin M Alkilany, Huang Xiaohua, et al. Chem. Soc. Rev., 2012, 41(7): 2740.
- [18] Álvarez-Puebla R A. J. Phys. Chem. Lett., 2012, 3(7): 857.
- [19] Shrivastava A, Gupta V B. Chronicles of Young Scientists, 2011, 2(1): 21.

A Highly Sensitive Label-Free Quantitative Detection Method for Tumor Marker Based on Au NRs/PMMA Substrate

TONG Li-ying¹, FU Hao¹, PENG Le¹, LI Qing-ning², SHI Qing-hua³, ZHOU Jun^{1*}

1. Department of Microelectronics Science & Engineering, Faculty of Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China

3. Affiliated Hospital, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315020, China

Abstract Preparation of high-quality noble nanostructure substrate is vital for the application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) technology in ultrasensitive bioassay. In our work, based on the improved Langmuir-Blodgett method, the gold nanorods were extracted from colloid to the interface between the colloid and toluene with the help of ethanol, and fixed by polymethyl methacrylate (PMMA), then a uniform and dense array of two-dimensional domain-like nanostructure was formed in a large area. Next, the plasma clean technology was used to treat the fabricated substrate for enhancing its SERS performance due to the exposed surface of the Au NRs. The experimental results showed that the Au NRs/PMMA substrate exhibited the excellent SERS characteristic and its enhancement factor (EF) achieved 5.49×10^6 under irradiating of 785 nm laser. In addition, the highly sensitive label-free quantitative detection of tumor marker, prostate specific antigen (PSA), was developed by using Au NRs/PMMA substrate. In the experiments of label-free detection, the Raman characteristic peaks of the PSA were first acquired by comparing the SERS spectra of the PSA standard solution and new-born battle serum solution, and they were mainly located at 823, 1 080, 1 385, 1 586 and 1 640 cm^{-1} . Following, the SERS spectra of PSA standard solution, clinical male serum samples and female serum samples were measured and analyzed to screen the Raman characteristic peaks of PSA associated only with serum PSA levels, and they were located at 649, 680 and 1 640 cm^{-1} . Furthermore, the SERS spectra of α -fetoprotein (AFP) belonging to the glycoprotein same with PSA and human kallikrein 2 (hK2) homologous with PSA were separately measured as two controls, and the extremely specific Raman characteristic peaks of PSA located at 1640 cm^{-1} were determined and applied in the detection of clinic serum samples. Subsequently, the dose-response curve was obtained by the relationship of the intensities of the Raman peaks at 1640 cm^{-1} and the PSA concentrations in the standard solutions. Lastly, the PSA concentrations in the clinical serum samples were detected based on the SERS-based label-free detect proposal. It demonstrated that SERS-based label-free detection not only exhibits a well consistency of test data when compared with that of the chemiluminescent immunoassay (CLIA), but also higher sensitivity, and its limit of detection as low as 0.06 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the range of 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Therefore, it reveals that the proposed protocol has a significant application potential for the quantitative detection of tumor marker.

Keywords Surface-enhanced Raman scattering (SERS); Gold Nanorods (Au NRs); Prostate specific antigen (PSA); Label-free detection

(Received Mar. 19, 2018; accepted Jul. 14, 2018)

* Corresponding author