

表面增强拉曼散射技术在核酸检测中的研究进展及应用

田晖艳¹, 刘羽¹, 黄姣祺¹, 谢凤欣¹, 黄国荣¹, 廖璞¹, 府伟灵¹, 张阳^{2*}

1. 陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038

2. 重庆大学附属肿瘤医院检验科, 重庆 400030

摘要 核酸是生命最基本的遗传物质, 开展核酸分子诊断对促进人类健康医疗的发展具有重要意义。表面增强拉曼光谱(SERS)是一种快速无损检测技术, 具有制样简单、水的干扰小、非侵入、实时检测等优点, 在核酸检测、病原微生物检测、肿瘤精准分子诊断等领域展现出良好的应用潜力。该研究立足于临床检验应用的角度, 简要阐述了 SERS 技术原理及 SERS 增强理论, 重点介绍了 SERS 在核酸检测方面的最新研究方法及其研究成果。传统的非标记型检测方法是直接检测靶核酸的拉曼信号, 但其灵敏度和特异性并不能满足检测要求。在标记型 SERS 核酸检测技术中, 充分利用 SERS 的“指纹图谱”分析优势, 以 DNA 探针的方式将拉曼活性分子与靶核酸连接, 通过对 DNA 探针上拉曼活性分子信号变化的检测和分析, 可实现对靶核酸的定性及定量分析, 达到可控制度及稳定性好的高通量检测目的, 提高检测灵敏度及特异性。按照不同的拉曼信号放大方式, SERS 标记型核酸检测方法主要包括: “夹心法”、“信号开关法”及链式杂交反应信号放大法, 特别以夹心法检测策略的灵敏度最高。已有研究表明 SERS 在 DNA/RNA 检测应用中可克服传统方法对样本要求高、耗时等缺点, 实现灵敏快速的检测分析, 为核酸分子的实时快速检测及临床疾病的实时精准诊断提供有效的分析工具。同时, 指出了 SERS 技术在临床应用方面依然面临诸多挑战: (1) 拉曼活性分子与纳米颗粒的结合稳定性差, 较难实现大规模生产重现性能好、可长期稳定储存的高灵敏度 SERS 探针; (2) 临床生物样本成分复杂, 对 SERS 检测信号的干扰因素较多, 因此选择有效的数据分析方法非常重要; (3) 研究高灵敏、易操作、低成本的拉曼光谱仪是将 SERS 技术转化为临床实际应用的关键。随着 SERS 研究的深入及多学科领域的交叉发展, SERS 技术有望广泛应用于核酸检测以及整个生物医学检测领域, 为生命科学提供一种强大的分析技术。

关键词 拉曼光谱; 表面增强拉曼散射(SERS); 核酸检测; SERS 探针

中图分类号: O657.37 **文献标识码**: R **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)10-3021-08

1 拉曼光谱技术及其生物医学应用

1928年印度科学家 Raman 首次发现拉曼散射效应, 该效应产生的拉曼光谱是一种散射光谱, 当单色光束的光子与生物分子相互作用时, 可发生弹性碰撞及非弹性碰撞; 其中, 弹性碰撞所产生的光散射被称为瑞利散射, 该碰撞过程仅改变了光子的运动方向而不改变频率; 而在非弹性碰撞过程中, 光子与分子之间发生能量交换, 光子的运动方向及频率均发生改变, 这种非弹性散射称为拉曼散射。拉曼散射光谱反应了特征峰的数量、强度、峰宽和位移等信息, 这些丰

富的谱峰信息均与待测物质的分子振动和转动能级密切相关, 因此, 每种物质都有其特征拉曼光谱, 通过检测得到的拉曼光谱与数据库中的拉曼光谱进行比对, 便可得到待测物质的组成信息, 从而达到定性分析的目的。此外, 利用拉曼特征峰强度与待测物质浓度成正比的关系, 可以达到半定量分析的目的。

核酸是以核苷酸为合成单位形成的生物大分子化合物, 是生命最基本的遗传物质, 在生命体生长、遗传、进化等一系列重大生命现象中占据着决定性作用。开展核酸分子诊断对促进人类健康医疗的发展具有重要意义。拉曼光谱技术在核酸等生物样本的检测与分析方面具有独特的技术优势:

收稿日期: 2019-07-17, 修订日期: 2019-11-22

基金项目: 国际(地区)合作与交流项目(81920108024), 国家重点研发计划(973)项目(2015CB755400), 后勤科研项目(BWS13C013, 2016XY08)资助

作者简介: 田晖艳, 女, 1986年生, 陆军军医大学第一附属医院检验科实验师 e-mail: 393602704@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: millen001@163.com

(1)对待测样本的形状、大小要求低,可以省去复杂的样本预处理环节;(2)样本需求量少,适用于微量及痕量样本的检测;(3)可实现快速检测,一般在 30 s 内即可完成对一个样本的检测;(4)通过拉曼标签技术的引入可以达到强特异性检测的目的;(5)由于水的拉曼散射很微弱,使得拉曼光谱技术非常适用于水环境中样本的检测。因此,SERS 光谱非常适合于多元生物样本的检测。

2 表面增强拉曼散射技术(SERS)

2.1 表面增强拉曼散射光谱的发现

拉曼光谱作为一种无损、非接触式且可重复的快速检测技术,能够提供分子结构振动的指纹图谱信息且谱峰窄不易发生重叠,在生化物质检测中具有显著优势。但拉曼光谱因其散射截面只有 $10 \sim 30 \text{ cm}^2/\text{分子}$ (约为红外的 10^{-6} , 荧光光谱的 10^{-14})且容易受到荧光干扰^[1],限制了拉曼光谱的广泛应用。20 世纪 70 年代,Fleischmann 小组研究发现,将吡啶吸附在粗糙的银表面时,可获得高强度的拉曼光谱信号^[2]。在随后的研究中, Van Duyne 及 Creighton 等证实了粗糙银表面对吡啶分子的拉曼信号放大程度可达 $10^5 \sim 10^6$ 倍,并将这一粗糙金属表面的增强效应命名为表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)^[3]。20 世纪末,Nie 小组及 Kneipp 等先后研究报道了 SERS 在单分子及单纳米粒子中的检测,其拉曼信号增强因子可达 10^{14} ^[4-5]。

2.2 SERS 增强原理

在众多的 SERS 增强机理研究中,物理增强机理和化学增强机理是目前被普遍接受的两种解释机理(如图 1 所示)。其中,物理增强又称为电磁场增强(electromagnetic enhancement, EM),即电磁波与比波长小得多的等离子体(如 Au、Ag)纳米结构的相互作用会引起金属表面自由电子的集体振荡;当入射光的频率与金属中自由电子固有的振荡频率相匹配时,局域表面等离子体共振(LSPR)就会发生,从而导致入射光场的增强,研究表明电磁场增强的增强因子可达 10^{11} 左右^[6]。化学增强(chemical enhancement)是一种电荷转移增强^[7],需要分析物直接吸附或通过化学键结合在粗糙金属表面,并与金属表面存在电荷转移,当入射光子的能量与电子在金属基底及吸附物之间的转移能量差相等时将产生共振,从而使体系的有效极化率增加并使拉曼信号增强,研究表明化学增强因子为 $10^1 \sim 10^3$ 左右^[8]。通常认为 SERS 效应的产生是由上述两种增强机理共同作用的结果。此外,Michaels 小组研究发现在金属纳米结构的连接点及空隙处,SERS 增强因子最大,这是因为当金属纳米颗粒相互靠近形成聚集时跃迁偶极分子相互耦合,在颗粒的结合处能获得显著增强的 SERS 效应^[9],这些特殊的增强位点被称为 SERS“热点”。目前,大量对 SERS 金属基底的选择研究显示,Au、Ag 纳米结构因具备较好的稳定性、重复性且极易制取,成为研究者们对 SERS 基底的首选,并且,具备各向异性及尖锐形态的纳米颗粒(如锥形、纳米棒、纳米星等)较对称形(如球形)纳米颗粒的 SERS 增强效果更好^[10]。

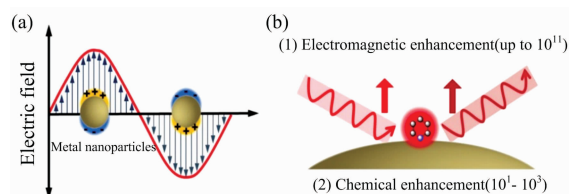


图 1 SERS 原理示意图

(a)电磁增强:电磁波激发下金属纳米粒子中自由电子集体振荡示意图;(b)化学增强产生于信号分子和金属纳米结构之间的电荷转移共振,通常较电磁增强弱

Fig. 1 Principle of SERS

(a) Illustration of the collective oscillation of free electrons in metal nanoparticles upon excitation by an electromagnetic wave; (b) Chemical enhancement results from charge transfer resonance between signal molecules and metal nanostructures, which is usually weaker than electromagnetic enhancement

3 基于 SERS 的核酸检测技术类型及应用

核酸的特异性检测是临床检验医学的重要研究内容,在疾病的诊断及治疗方面具有非常重要的应用价值。常见的基于 SERS 的核酸检测技术,根据是否使用探针标记物,可分为无标记检测(Label-free SERS)及标记型检测(SERS tags)两种类型(如图 2 所示)。

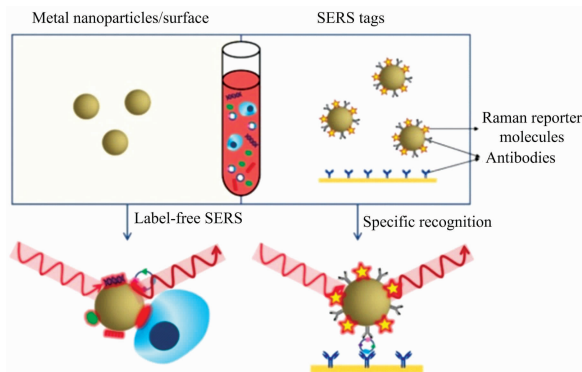


图 2 SERS 无标记检测(左)及标记型检测(右)技术原理示意图

无标记检测方法直接获取生物样本(吸附于 SERS 基底上)自身的拉曼指纹图谱;标记型 SERS 检测获取的是 SERS 标签上拉曼活性分子的拉曼信号

Fig. 2 SERS-based nucleic acid analysis using a label-free SERS approach (left) or SERS tags (right)

In label-free SERS, the spectroscopic signal results from analyte adsorption onto the SERS substrate, whereas in SERS tags-based specific recognition assays, the spectroscopic signal results from the reporter molecules on the SERS tags

3.1 无标记检测

在无标记检测方法中,待测样本直接吸附于金属纳米结构表面,利用 SERS 技术直接获取生物样本自身的拉曼指纹图谱,该方法需要结合特殊的纳米基底结构及光谱分析技术,用于区分不同状态下的生物分子或不同物种的细胞、微生物的光谱信息^[11];ElSayed 等利用高浓度的球形纳米银胶

表 1 SERS 无标记检测及标记型检测方法分析

Table 1 Analysis of the label-free SERS approach and SERS tags-based nucleic acid assays

检测方法	优点	缺点
无标记检测	(1) 步骤简单, 无需对样品进行处理, 可以避免对生物体的破坏, 最大限度地保持生物体的活性; (2) 可以充分发挥 SERS 作为振动光谱具有指纹识别的优势, 得到 DNA 自身的结构信息。	(1) 在实际 SERS 检测中, 由于碱基的拉曼散射截面很小, 导致 DNA/RNA 的 SERS 信号很弱, 检测灵敏度较低; (2) 不同的 DNA/RNA 序列具有相同的碱基种类只是碱基排列顺序不同, 因而具有相似的 SERS 光谱, 很难直接通过 SERS 信号来确定特定的 DNA 序列, 需要借助一些数据分析手段。
标记型检测	特异性好, 灵敏度高, 可直接进行定量检测	在检测结构及探针的设计上有一定的难度。

体颗粒聚集后形成的 SERS“热点”效应, 研究了癌细胞 DNA 发生构象变化而形成的拉曼特征峰, 实现了对癌细胞 DNA 和健康细胞 DNA 高重现性的分辨^[12]。Abell 等设计了一种以 Ag 纳米棒为结构单元的微阵列芯片, 以此来研究 miRNA 序列中嘌呤及嘧啶的相对比率, 并通过最小二乘法分析成功实现了 miRNA 捕获杂交前后拉曼光谱的特征差异探究^[13]。无标记 SERS 核酸检测技术的优点在于步骤简单, 无需对样本进行特殊处理, 但总体而言, 该方法尚未能满足临床实际检测对灵敏度及特异性的要求。

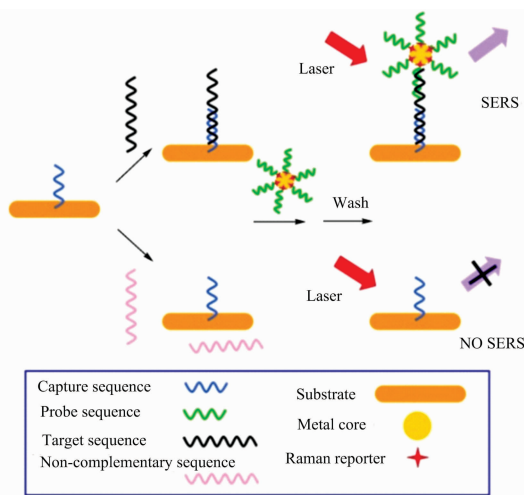
3.2 标记型检测

标记型检测方法通常依赖拉曼报告分子修饰的金属纳米颗粒, 通过检测拉曼报告分子强烈而独特的拉曼信号达到检测目的^[14-15]。当前, 基于 SERS 标记型检测技术的核酸检测方法, 主要包括: “夹心法”、“信号开关法”及链式杂交反应 (hybridization chain reaction, HCR) 引起的信号放大。其中, “夹心法”检测策略灵敏度高, 具有良好的定量检测能力, 可应用于多元检测, 是开展 SERS 标记型检测 DNA/RNA 最常用的方法。

3.2.1 “夹心法”检测

“夹心法”SERS 探针检测结构一般由纳米金属核、拉曼活性分子、DNA 探针链及封闭液构成 (如图 3 所示)。其中, 金属核在 SERS 探针中用作增强基底, 是保证 SERS 探针实现高性能检测的关键之一。金、银胶体溶液因制备简单、易于保存、表面增强效果好等优势在 SERS 探针金属核的应用最为广泛; 经研究发现, 相同实验条件下, 纳米金颗粒的表面增强能力较纳米银弱 10~100 倍^[16]。在金属核的结构及形貌方面, 伴随着纳米材料制备技术的迅猛发展, 不拘于早期的单一球形金属纳米颗粒, 现已成熟应用的还有纳米棒、多面体形、星形、树枝形和花形等; 此外, 新型的合金或核壳双金属复合纳米粒子也越来越多地应用于 SERS 探针金属核, 如金核银壳、银核金壳等。拉曼活性分子可通过绑定在金属核表面来实现拉曼信号的输出功能; 常用的拉曼活性分子可大致分为三类: 含氮阳离子染料 (如结晶紫、罗丹明 6G 等)、含硫染料 (如孔雀石绿) 以及硫代小分子 (如 4-氨基苯硫酚、4-甲基苯硫酚等)^[17]。DNA 探针链是保证实现 SERS 探针特异性靶向识别检测目标序列的关键, 将 DNA 探针链在金属核表面的固定方法主要有两种: 一是通过巯基形成 S-金属共价键, 以及通过氨基和羧基缩合形成酰胺键, 从而将 DNA 探针有序组装到金属核表面。

此外, 为了保证上述 SERS 探针的结构稳定性及特异性

图 3 “夹心法”SERS 核酸检测结构示意图^[18]Fig. 3 Scheme of SERS-based nucleic acid detection based on sandwich structure^[18]

检测, 通常需要对 SERS 探针结构外表面进行封闭, 常用的封闭液有 BSA 和 MCH 等。Zhou 等^[19]在构建“夹心”SERS 标签的基础上, 研制了一种以细菌为模板的 Ag 微球作为信号放大基底, 如图 4 所示, 该方法设计了 3 种分别结合了不同拉曼信号分子 (44DP, 4-ATP, DTNB) 的“夹心”SERS 标签, 通过捕获探针将 SERS 标签结合在 Ag 微球表面, 通过对 SERS 标签的检测可达到同时检测 3 种肝癌肿瘤标志物 miRNA-21, miRNA-122, miRNA-223 的目的。从 SERS 光谱检测结果图中显示: 该方法在具有较高灵敏度与特异性的同时, 成功实现了多个肿瘤标志物的高通量检测。

Li 等^[20]以银纳米粒为核标记探针拉曼分子并包裹二氧化硅壳 (Ag nanorice @ MGITC @ SiO₂) 作为 SERS 探针, 利用光刻技术在硅圆片上形成三角状金纳米膜作为 SERS 活性检测基底, 实现了乙型肝炎病毒 DNA 的检测, 检测限达到 50 amol · L⁻¹。Kang 等^[21]在直径约为 150 nm 的金纳米棒上构建检测基底, 与球形金纳米颗粒探针一起实现了对复合病原体 DNA 的检测, 检测限达到 10 pmol · L⁻¹。Liu 等^[22]通过合成寡核苷酸修饰的 Ag 纳米结构为增强基底, 并采用 DTNB、4-MBA 标记、并用寡核苷酸修饰的 Au 纳米粒子作为 SERS 标签, 直接在水溶液中进行 DNA 检测, 实验结果显示目标 DNA 浓度在 10⁻¹¹ ~ 10⁻⁸ mol · L⁻¹ 范围时, 目标 DNA 的浓度对数与 SERS 信号强度呈现良好的线性关系,

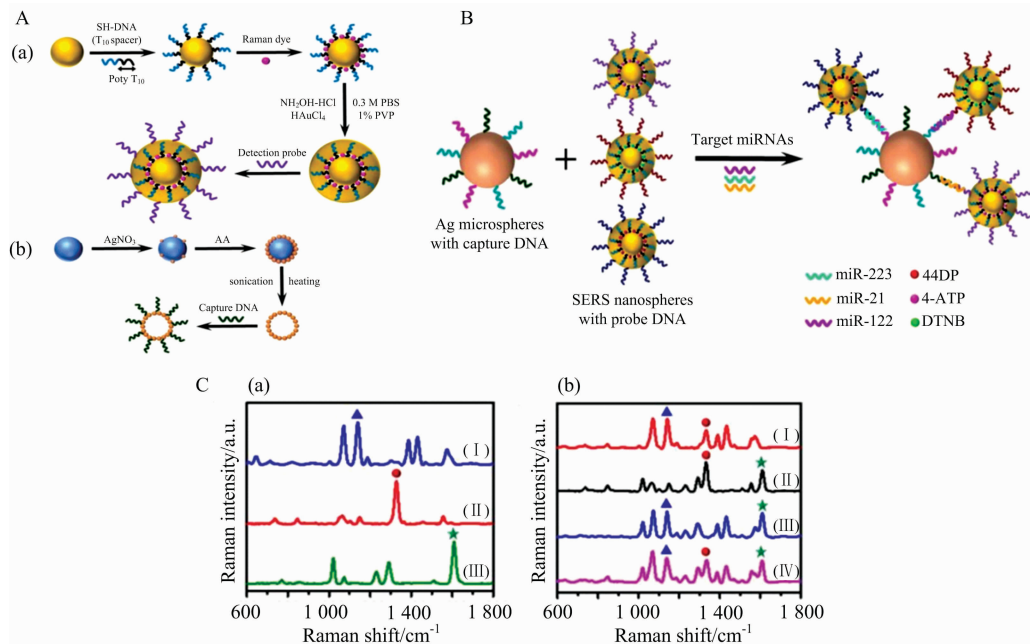


图 4 (A)核酸修饰纳米 Au 为基底及拉曼活性分子包被的 Au 核 Au 壳 SERS 标签(a)及 Ag 微球 SERS 基底(b)结构示意图; (B)“夹心法”SERS 探针高通量检测 miRNAs 示例图; (C)单一 miRNA 的 SERS 光谱检测结果图(a)及多个 miRNA 的 SERS 光谱检测结果图(b)^[19]

Fig. 4 (A) Schematic illustration of the synthetic procedures of Raman dye-coded Au-RNNPs using DNA-modified AuNPs as templates (a) and Ag-HMSs using bacteria as template; (B) Schematic illustration of the multiplex SERS assay for triple-target miRNA detection; (C) SERS spectra of the nanoprobe obtained in the presence of (a) single and (b) multiple miRNA^[19]

此实验方法可与固相检测方法的灵敏度相媲美。

3.2.2 信号开关法

“信号开关法”一般是通过分子探针与目标序列的结合实现。如图 5 所示,根据目标 DNA/RNA 序列针对性地设计与目标序列结合过程中可发生可逆性解离、聚合的发夹型 DNA 探针链,在探针链的两端分别标记上固定基团(如巯基)和拉曼活性分子,探针链通过固定基团组装到 SERS 活性基底表面,从而成功构建发夹型 SERS 检测探针。该发夹型探针要求探针链含有与目标 DNA/RNA 序列完全互补的环状序列,通过与目标 DNA/RNA 序列的结合实现环链的打开,拉曼活性分子远离基底表面,从而使 SERS 信号强度发生变化^[23]。

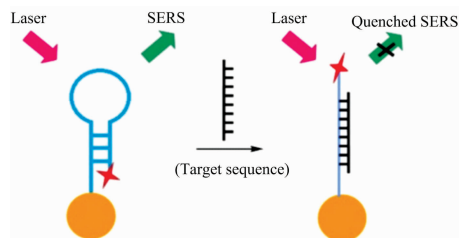


图 5 “发夹型”结构形成的 SERS 信号开关法检测核酸示意图^[18]

Fig. 5 Scheme of SERS-based nucleic acid detection based on hairpin structure^[18]

Song 等^[24]采用发夹型 SERS 检测探针同时检测 3 种肺癌 miRNA 标志物(miRNA 21, miRNA 486, miRNA 375),如图 6(a),通过设计与目标 miRNA 完全互补的 3 种发夹型 SERS 检测探针,并将探针吸附结合于银纳米棒微阵列基板上。当目标 miRNAs 存在时,发夹探针环序列打开,拉曼活性分子远离银基底表面,SERS 信号由“ON”到“OFF”,信号强度显著降低。通过监测 SERS 信号值的变化达到定量检测血清中目标 miRNAs 的目的。实验结果显示:利用该方法检测人血清中 miRNAs 的 LOD 值为:miRNA 21/393 amol · L⁻¹, miRNA 486/176amol · L⁻¹, miRNA 375/144 amol · L⁻¹。

在另一项分析中,Wang 等^[25]开发了一个 SERS 信号由“OFF”到“ON”的信号开关,他们称之为“反向分子哨兵(inverse molecular sentinel, iMS)”纳米探针,以区别于之前的“ON”到“OFF”开关。如图 6(b),在此项研究中,以一条单链 DNA 作为“占位”链与纳米探针的茎环序列杂交,发夹探针的环序列打开,从而使拉曼报告分子远离金属纳米颗粒表面;当目标序列出现时,占位 DNA 链与纳米探针序列解离,探针序列重新形成发夹型结构,拉曼报告分子移动到金属纳米颗粒表面,从而产生强烈的 SERS 信号,从图 6(b)中的 SERS 光谱图可以看出,谱线 b(样本组)呈现出的 SERS 信号远高于谱线 a(空白对照组),从而佐证了该方法的可行性。

3.2.3 HCR 信号放大法

链式杂交反应(hybridization chain reaction, HCR)是一

种在室温条件下进行的无酶、线性扩增方法。在 HCR 反应的溶液中存在着稳定的 DNA 发夹探针，触发链的进入可引发一系列的杂交反应，最终形成双螺旋 DNA 聚合物。HCR 信号放大联合 SERS 检测的方法是在 DNA 聚合物上连接由拉曼活性分子包被的金属纳米颗粒，由金属纳米颗粒形成的“热点”效应可显著实现拉曼信号放大并最终达到定量检测靶序列的目的。

与酶促扩增检测法相比，HCR 反应操作简单且成本更低，仅靠单链 DNA 即可实现双链 DNA 聚合物大小的原位调节。Li 等^[26]设计了一种以靶序列为触发链的 HCR 信号放

大联合 SERS 检测 miRNA-141 的方法，如图 7(a)所示，该方案中的捕获探针由捕获链、Au 纳米颗粒及拉曼信号分子构成，由靶序列 miRNA-141 触发形成的双链 DNA 聚合物通过纳米磁珠产生聚集后，捕获探针通过捕获链特异性结合 DNA 聚合物上的粘性末端，使得 Au 纳米颗粒在聚合物上形成“热点”效应，通过检测放大后的拉曼信号达到定量检测复杂生物样本中 miRNA-141 的目的。实验结果显示，利用该方法检测乳腺癌细胞中 miRNA-141，其线性有效检测范围为 $10^{-15} \sim 10^{-7}$ mol，LOD 值可达 $0.17 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

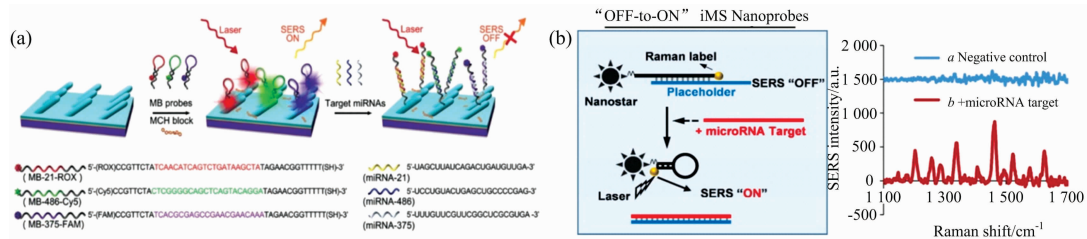


图 6 (a)一种用于高通量检测 miRNAs 的功能化发夹探针 SERS 传感器原理图^[24]；
(b)SERS“反向分子哨兵”(iMS)纳米探针检测原理图^[25]

Fig. 6 (a) Schematic illustration of the molecular beacons functionalized-SERS sensor for simultaneously measuring multiple miRNAs^[24] ; (b) Detection scheme of the SERS “inverse Molecular Sentinel” nanoprobes^[25]

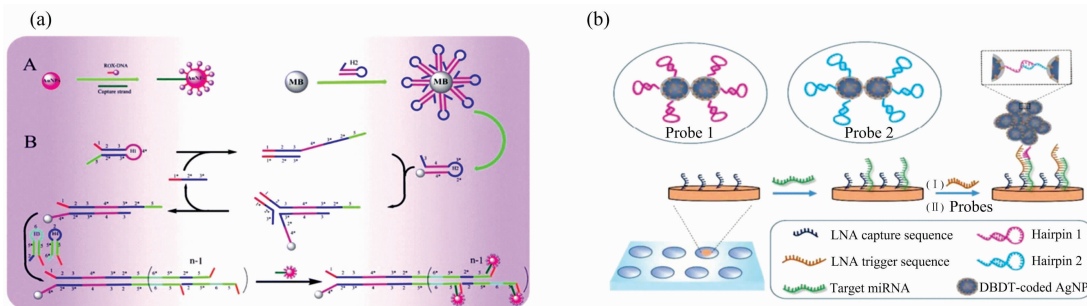


图 7 HCR 信号放大 SERS 核酸检测示例图^[26-27]

Fig. 7 Scheme of SERS-based nucleic acid detection based on the signal amplification of hybridization chain reaction^[26-27]

在后续的研究中，Liu 等^[27]采用 HCR 联合银纳米颗粒形成的“热点”效应，如图 7(b)，在微阵列硅基片上成功实现了单细胞的 miRNA-21 检测，如图 7 所示，该方案采用 DB-DT(4,4'-biphenyldithiol)作为拉曼信号分子并连接形成间隔距离为 1 nm 的 AgNP 二聚体，从而产生典型的 SERS “热点”；当修饰有捕获链的硅基片上引入靶序列 miRNA-21 后，发生的一系列 HCR 反应将大量 AgNP 富集，从而产生超强拉曼信号；实验结果显示，该方法特异性好，对单碱基突变及双碱基突变序列的检测信号点分别为 12.4% 和 4.6% (定义对靶序列 miRNA-21 的检测信号点 100%)。

4 与 SERS 技术联用的核酸检测方法

4.1 SERS 联合 PCR 核酸检测方法

基于聚合酶链式反应(PCR)的 SERS 技术主要是目标 DNA 片段的 PCR 扩增产物与 SERS 探针结合，在激光照射

下产生 SERS 信号，根据 SERS 光谱实现 DNA 检测。He 等^[28]利用 RCA 扩增技术及 SERS 信号开关技术建立了一种 miRNA 超灵敏检测方法，在磁性纳米颗粒上连接功能性发夹探针，发夹探针一端连接纳米金颗粒；原始状态下，磁性纳米颗粒上的发夹探针通过与占位 DNA 链的结合一链环打开，Cy5 远离磁性纳米颗粒，拉曼信号弱，信号开关处于闭合状态；通过引入 RCA 扩增产生的 DNA 触发链后，该触发链竞争性结合占位 DNA 链，发夹探针的形成环序列，拉曼活性分子靠近磁性纳米颗粒并在 SERS 效应的影响下产生强烈的拉曼信号，从而达到超灵敏检测 miRNA-150 的目的。实验结果显示：此检测方法的 LOD 值为 $70.2 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，有效线性检测范围为 $100 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SERS 联合 PCR 核酸检测方法在微量检测及样本处理方面具有诸多优势，通过 PCR 技术可以成功实现对靶序列的重组及浓度放大，从而达到超灵敏检测的目的。

4.2 SERS 联合酶切技术的核酸检测方法

基于酶切技术的核酸 SERS 检测主要是借助金属纳米颗粒之间“热点”的优异 SERS 增强性能,利用 ss-DNA 的自组装增加热点形成的概率,利用酶切反应进行热点消除,来实现 SERS 信号从弱到强再从强到弱的变化。Crew 等^[29]在包被了拉曼活性分子的金纳米颗粒之间设计并连接了一条 30 bp 的 DNA 双链,通过 DNA 双链连接形成的金纳米颗粒多聚体形成了大量 SERS“热点”,可产生较强的 SERS 信号;当限制性内切酶作用于 DNA 双链时,“热点”消失,SERS 信号显著减弱,由此根据 SERS 信号的变化可以实现对 DNA 杂交及限制性酶切过程的检测。SERS 联合酶切技术的核酸检

测方法可成功实现在液相环境中的 DNA 组装及核酸有效检测,充分发挥了金属纳米颗粒之间 SERS“热点”的优势,达到高灵敏检测的目的。该研究清楚地验证了 DNA 自组装及酶切反应在 SERS“热点效应”形成过程中的能力,这对于制定新的生物分析策略具有重要意义。

关于 SERS 技术在核酸检测中的应用研究主要集中在不同 SERS 增强基底、不同靶标捕获方式、不同信号放大方式等方面,基底功能化、多种拉曼报告分子形成多元检测、“热点效应”的产生及减弱已成为 SERS 核酸检测的主要趋势,表 2 为 SERS 技术在核酸检测中的应用。

表 2 SERS 在核酸检测中的应用

Table 2 Typical research about SERS used for detection on nucleic acids

目标核酸	SERS 检测方法	LOD/判别正确率	参考文献
肝癌 miRNA 标志物 (miRNA-21, miRNA-122, miRNA-223)	“夹心法”检测: Ag 微球偶联 DNA 捕获链, Au RNNP-44DP/4ATP/DTNB DNA 探针	10 fmol · L ⁻¹	[15]
乙型肝炎病毒 DNA	“夹心法”检测: Ag nanorice @ MGITC @ SiO ₂	50 amol · L ⁻¹	[16]
复合病原体 DNA	“夹心法”检测: Au NPS DNA 探针, 150 nm 的金纳米棒上构建检测基底	10 pmol · L ⁻¹	[17]
肺癌 miRNA 标志物 (miRNA 21, miRNA 486, miRNA 375)	“信号开—关法”: 发夹探针-ROX/Cy5/FAM, Ag NRs 微阵列增强基底	miRNA 21/393 amol · L ⁻¹ , miRNA 486/176 amol · L ⁻¹ , miRNA 375/144 amol · L ⁻¹	[20]
肺癌 miRNA 标志物 (miRNA 21, miRNA 34a)	“信号关—开法”: 发夹探针-Cy5/Cy5.5, Ag-coated Au nanostars 增强基底	成功实现对生物样本中混合 miRNA 标志物的检测	[21]
miRNA 141	“HCR 信号放大法”: Au NPS 在 DNA 聚合物上形成“热点”效应	0.17 fmol · L ⁻¹	[22]
miRNA 21	“HCR 信号放大法”: Ag NPS 在 DNA 聚合物上形成“热点”效应	对单碱基突变及双碱基突变序列的检测信号点分别为 12.4% 和 4.6% (定义对靶序列 miRNA-21 的检测信号点 100%)	[23]
miRNA-150	“信号开—关法”: 发夹探针-Cy5-Au NPS	70.2 amol · L ⁻¹	[24]
DNA	“热点效应”: 通过 ss-DNA 的自组装在 Au NPS 间形成“热点”, 再利用酶切技术进行“热点”消除	通过检测拉曼报告分子拉曼信号的变化, 证明该方法可行	[25]

5 SERS 技术走向临床应用的技术发展方向

SERS 技术作为一种新兴的快速检测方法,因其特有的指纹图谱、无损性、高灵敏度、操作简单且不受水干扰等技术优势,已成为核酸检测领域近年来的研究热点。然而,SERS 技术在临床应用方面仍然存在着诸多挑战:(1)大规模生产重现性能好、可长期稳定储存的高灵敏度 SERS 探针较难实现,目前常用的 Au 和 Ag 纳米颗粒在溶液中极易产生聚集,并且拉曼活性分子与纳米颗粒的结合稳定性差,因此,对 SERS 探针表面结构的涂层保护非常重要;(2)为了准确实现对生物样本中各种循环标志物浓度检测,必须首先获得可信的定量检测标准曲线,但由于生物样本自身的成分复杂,对 SERS 检测信号的干扰因素较多,使得对临床样本的准确定量检测较难成功实现;(3)研制高灵敏度、易操作、低成本的拉曼光谱仪是将 SERS 技术转化为实际应用的关键。

我们相信,在多学科研究人员和临床工作者的不断共同努力下,基于 SERS 的生物样本检测技术将得到进一步改进,并将稳步向临床应用方向发展。

6 展 望

拉曼光谱作为一种无损、非接触式且可重复的快速检测技术,能够提供分子结构振动的指纹图谱信息且谱峰窄不易发生重叠,在生化物质检测中具有显著优势。SERS 有望实现高灵敏分析检测核酸的技术,在临床分子诊断、食品安全、病原微生物检测领域展现了潜在的应用价值。相信随着纳米技术、生物芯片、微流体技术的进步以及便携式拉曼光谱仪、生物样本拉曼光谱数据库的完善,SERS 技术会在不久的将来广泛应用于生物样本检测,尤其是核酸分子诊断领域,为临床实验室诊断提供一种强大的分析技术。

References

- [1] Lipkowski J. Adsorption of Molecules at Metal Electrodes, 1994.
- [2] Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A J. Chemical Physics Letters, 1974, 26(2): 163.
- [3] Albrecht M G, Creighton J A. Journal of the American Chemical Society, 1977, 99(15): 5215.
- [4] Nie Shuming, Steven R Emory. Science, 1997, 275(5303): 1102.
- [5] Katrin Kneipp Yang Wang, Harald Kneipp. Physical Review Letters, 1997, 78(9): 1667.
- [6] Xu Hongxing, Javier Aizpurua, Mikael Käll, et al. Physical Review E, 2000, 62(3): 4318.
- [7] WANG Xiao-hui, XU Tao-tao, HUANG Yi-qun, et al(王晓辉, 徐涛涛, 黄轶群, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2019, 39(1): 123.
- [8] William E Doering, Nie Shuming. J. Phys. Chem. B, 2002, 106(2): 311.
- [9] Amy M Michaels, Jiang Jiang, Louis Brus. J. Phys. Chem. B, 2000, 104: 11965.
- [10] Eduardo Garcia-Rico, Ramon A Alvarez-Puebla, Luca Guerrini. Chemical Society Reviews, 2018, 47(13): 4909.
- [11] Zheng Xiaoshan, Izabella Jolan Jahn, Karina Weber, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 197: 56.
- [12] Sajanlal R Panikkanvalappil, Megan A Mackey, Mostafa A El-Sayed. J. Am. Chem. Soc., 2013, 135(12): 4815.
- [13] Justin L Abell, Jeonifer M Garren, Jeremy D Driskell, et al. J. Am. Chem. Soc., 2012, 134(31): 12889.
- [14] Qian Ximei, Peng Xianghong, Dominic O Ansari, et al. Nature Biotechnology, 2008, 26(1): 83.
- [15] Kaustabh Kumar Maiti U. S. Dinish, Animesh Samanta. Nano Today, 2012, 7: 85.
- [16] Melek Erol, Yun Han, Scott K Stanley, et al. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(22): 7480.
- [17] Wang Yunqing, Yan Bing, Chen Lingxin. Chemical Reviews, 2013, 113(3): 1391.
- [18] SONG Chun-yuan, YANG Yan-jun, WANG Lian-hui(宋春元, 杨琰君, 汪联辉). Progress in Chemistry(化学进展), 2014, 26(9): 1516.
- [19] Zhou Wen, Tian Yafei, Yin Bincheng. Anal. Chem., 2017, 89: 6120.
- [20] Li Ming, Scott K Cushing, Liang Hongyan, et al. Analytical Chemistry, 2013, 85(4): 2072.
- [21] Taejoon Kang, Seung Min Yoo, Ilsun Yoon, et al. Nano Letters, 2010, 10(4): 1189.
- [22] Liu Min, Wang Zhuyuan, Zong Shenfei. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(18): 6131.
- [23] Tuan Vo-Dinh, Fei Yan, Musundi B Wabuyele. Journal of Raman Spectroscopy, 2005, 36(6-7): 640.
- [24] Song Chunyuan, Yang Yanjun, Yang Boyue, et al. Nanoscale, 2016, 8(39): 17365.
- [25] Hsin-Neng Wang, Bridget M Crawford, Andrew M Fales, et al. The Journal of Physical Chemistry, C., 2016, 120(37): 21047.
- [26] Li Xiaoxiao, Ye Sujuan, Luo Xiliang. Chem. Commun., 2016, 52: 10269.
- [27] Liu Huiqiao, Li Qiang, Li Mingmin. Analytical Chemistry, 2017, 89(9): 4776.
- [28] He Yi, Yang Xia, Yuan Ruo. Analytical Chemistry, 2017, 89(5): 2866.
- [29] Elizabeth Crew, Yan Hong, Lin Liqin. Analyst, 2013, 138(17): 4941.

Research Progress and Application of Surface-Enhanced Raman Scattering Technique in Nucleic Acid Detection

TIAN Hui-yan¹, LIU Yu¹, HUANG Jiao-qi¹, XIE Feng-xin¹, HUANG Guo-rong¹, LIAO Pu¹, FU Wei-ling¹, ZHANG Yang^{2*}

1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of the Army Military Medical University, Chongqing 400038, China
2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China

Abstract Nucleic acid is the most basic genetic material in life. It is of great significance to carry out a nucleic acid molecular diagnosis to promote the development of human health and medical treatment. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), as a rapid, nondestructive testing technique, has the advantages of simple sample preparation, low interference of water, non-invasion, and real-time detection. It has shown great application potential in the fields of nucleic acid detection, pathogenic microorganism detection and tumor accurate molecular diagnosis. Based on the application of clinical examination, a brief tutorial on SERS technical principle and SERS enhancement theory are given first of all. Then the review mainly summarizes the recent trends and developments of SERS in the detection of nucleic acid. The traditional label-free SERS detection is to detect the Raman signal of nucleic acid itself directly, but its sensitivity and specificity can not meet the detection requirements. In the labeled SERS detection, the Raman reporter molecule is connected with the target nucleic acid by DNA probe. The qualitative and quantitative detection of target DNA/RNA is realized by detection and analysis of the Raman reporter molecular signal, which demonstrates the advantage of SERS as “fingerprint” and achieves the purpose of high throughput detection with good control lability and stability. According to different Raman signal amplification methods, the labeled SERS analysis on nucleic acid detection mainly include “sandwich structure”, signal turn “on /off”, and hybridization chain reaction (HCR) signal amplification method, especially the “sandwich structure” detection strategy has the highest sensitivity. These researches have demonstrated that the application of SERS in DNA/RNA detection could overcome the shortcoming of traditional methods, and provide a rapid, effective and sensitive analytical tool for real-time monitoring of nucleic acid and accurate real-time diagnosis of clinical diseases. At the same time, there are still great challenges for the application of SERS technology in clinical application: (1) The poor binding stability of Raman reporter molecules to nanoparticles makes it difficult to realize the high sensitivity SERS probe which can be stored stably for a long time. (2) the composition of clinical, biological samples is complex, and there are many interference factors to SERS detection signal, so it is necessary to select effective data analysis methods. (3) The research of highly sensitive, easy to operate, low-cost Raman spectrometer is the key to transform SERS technology into practical application. In the future, with the deepening of SERS and the cross-development of multi-disciplinary, SER technology is expected to be widely used in nucleic acid detection and the whole biomedical detection field, and provide a powerful analytical technology for life science.

Keywords Raman spectroscopy; Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS); Nucleic acid detection; SERS tags

(Received Jul. 17, 2019; accepted Nov. 22, 2019)

* Corresponding author