

SERS 技术在疾病诊断和生物分析中的应用*

邵 锋 陈 坤 罗志辉 王艳君 陆冬莲 韩鹤友**

(农业微生物学国家重点实验室 华中农业大学理学院 武汉 430070)

摘 要 表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)技术以其独特的谱带窄、灵敏度高、抗光漂白、原位和无损等优势,在疾病诊断和生物分析领域得到了越来越广泛的应用。本文介绍了近几年来应用于生物大分子、病原微生物、细胞和活体检测分析中的最新 SERS 技术,并分别从标记与非标记的角度对其进行了阐述,总结了 SERS 标记检测生物大分子的基本识别模式,简述了检测低浓度病原微生物的 SERS 技术,着重评述了 SERS 检测技术在细胞和活体研究中的应用,并对基于 SERS 的疾病诊断和生物分析技术的发展趋势进行了初步展望。

关键词 表面增强拉曼散射(SERS) 生物大分子 病原微生物 细胞 活体

中图分类号:O657.37; TP212.3 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2012)12-2391-12

Application of SERS Techniques in Diagnosis and Bioassay

Shao Feng Chen Kun Luo Zhihui Wang Yanjun Lu Donglian Han Heyou**

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Science,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Surface-enhanced Raman scattering (SERS) technique has experienced unprecedented growth in recent years, driven in large part by its numerous merits including sharp bandwidth, high sensitivity, anti-photobleaching as well as the ability of in-situ and noninvasive analysis for diagnosis and bioassay. Recent advances in SERS-based detection and analysis techniques toward the targets of biomacromolecules, pathogenic microorganisms, cells and living organisms, with an emphasis on labeled or label-free techniques are discussed in the review. General methods are summarized in basic recognition modes for different objects in SERS detection. Details are listed to highlight the strategies to increase sensitivity in the detection of pathogenic microorganisms. We also provide insights into the latest applications of SERS techniques in vivo and present the prospects of SERS techniques in the last part of the article.

Key words surface-enhanced Raman scattering (SERS); biomacromolecule; pathogenic microorganism; cell; in vivo

Contents

- | | |
|---|---|
| 1 Introduction | 2.2 Detection of biomacromolecules based on label-free SERS techniques |
| 2 Detection of biomacromolecules based on SERS | 3 Detection of pathogenic microorganisms based on SERS |
| 2.1 Detection of biomacromolecules based on labeled SERS techniques | 3.1 Detection of pathogenic microorganisms based on labeled SERS techniques |

收稿:2012年4月,收修改稿:2012年9月

* 国家自然科学基金项目(No. 20975042, 21175051)和湖北省创新团队自然科学基金项目(No. 2011CDA115)资助

** Corresponding author e-mail:hyhan@mail.hzau.edu.cn

- 3.2 Detection of pathogenic microorganisms based on label-free SERS techniques
- 4 SERS techniques in cell study
 - 4.1 SERS techniques in direct cell study
 - 4.2 SERS techniques in indirect cell study
- 5 In vivo detection based on SERS
- 6 Conclusions and prospects

1 引言

疾病是危害人类生命和健康的最大威胁之一。2008 年癌症使全球大约 760 万人丧生^[1], 心脏病已经成为美国第一大杀手^[2], 艾滋病毒变异频繁, 出现了传染性更强的亚型^[3]。早发现、早诊断以及早治疗是提高患者生存率最有效的方式。随着人类对生命体系研究的进步, 对疾病致病机理探索的深入, 使得许多工作已经趋向于从单分子、单基因的水平上来研究疾病, 这也就对疾病诊断和生物分析技术提出了越来越高的要求。

拉曼光谱能够提供分子结构振动的指纹图谱信息, 已经被应用于生物医学、表面科学、分子识别和痕量检测等众多领域。虽然 Raman 和 Krishnan 在 1928 年发现了拉曼散射 (Raman scattering) 现象^[4], 但其散射截面分别只有红外和荧光过程的 10^{-6} 和 10^{-14} 倍^[5], 这种内在的低灵敏度限制了拉曼光谱的广泛应用。直至 20 世纪 70 年代中期, Fleischmann^[6]、Van Duyne^[7] 和 Creighton^[8] 等分别发现和确认了 SERS 效应, 才打开了拉曼光谱广泛应用之门。目前, 伴随着纳米科技的飞速发展, 研究人员制备出了许多新型高活性的纳米增强基底, 吸附于增强基底上的分子拉曼信号比普通分子拉曼信号增强约 10^4 — 10^7 倍, 甚至通过耦合贵金属纳米基底所产生的表面等离子共振效应, 可使一些荧光染料分子的 SERS 信号增强 10^{10} — 10^{14} 倍^[9,10]。SERS 技术已经发展成为能够在特定条件下实现单分子水平检测的分析手段^[11,12]。

相比其他光谱而言, SERS 光谱具有谱带窄、选择性好、灵敏度高、抗光漂白、不受生物样品自发荧光和水的干扰、快速、原位、实时和无损等众多优点^[13-16], 在生物医学研究方面有很大的应用前景。目前, 基于 SERS 的分析技术已经在 DNA、氨基酸、蛋白质、适配子、病毒、细菌和细胞等基础研究中, 以及癌症的检测和诊断、血糖的体外传感、环境污染物分析等实际应用方面都得到了长足发展^[17-27]。本文就近几年来国内外 SERS 技术在疾病诊断和生物

分析应用领域中的现状和问题, 从方法学的角度对这些成果进行分析和总结, 并对其前景进行了初步展望。

2 基于 SERS 的生物大分子检测

2.1 SERS 标记检测生物大分子

生物大分子作为生物体内主要的活性成分, 在生命活动和疾病的发生与发展过程中扮演着重要角色, 对其进行深入研究具有十分重大的意义。许多生物大分子, 如抗体蛋白和核酸等, 由于自身散射横截面比较小, 难以直接用 SERS 技术进行定量分析或检测。为此, 通过引入外源的 SERS 活性标记分子, 可利用标记分子较强的 SERS 信号来对微量的生物活性物质进行定量分析或动态监测。SERS 标记检测技术具有灵敏度高、选择性好、快速和无损等特性, 已经被研究者广泛应用于疾病诊断和生物分析。在这些应用之中, SERS 标记检测技术主要基于以下几种基本识别模式来对生物大分子进行特异性识别与检测。

2.1.1 抗原抗体识别模式

抗原抗体识别是基于生物特异性免疫应答反应原理而形成和发展的, 它是一类主要采用类似于“三明治”的结构而构建出来的识别模式。对于某一种待测抗原, 通过与 SERS 活性分子标记的抗体, 以及在固相基底上偶联了特异性抗体而形成的固相抗体之间发生免疫反应, 形成了“固相抗体-抗原-标记抗体”夹心复合物, 从而引起标记分子 SERS 信号的变化来进行识别和检测^[28]。相比荧光免疫标记检测技术, SERS 标记检测可达到与荧光免疫分析相媲美甚至更高的灵敏度, 同时还具有抗光漂白、无光猝灭、生物自发荧光干扰小等优势, 并且拉曼光谱的谱带要比荧光窄 10—100 倍, 这些优点使其特别适用于生物样品的分析^[13]。

Rohr 等^[29] 最早运用表面增强共振拉曼光谱 (SERS) 对促甲状腺激素的检测进行了尝试, Dou 等^[30] 也将 SERS 标记检测技术用于酶联免疫分析, 而颇具代表性的研究应属 Porter 小组的工作^[31-35]。他们采用“三明治”结构的 SERS 标记免疫检测技术, 首次实现了对两种抗原的同时检测, 并且所得到的拉曼光谱重叠很小, 其检测限也达到了 10^{-9} M 的水平^[31]。此后, 他们继续发展了这种 SERS 标记免疫分析技术, 实现了对前列腺特异性抗原 (PSA) 飞摩尔 (fM) 水平的检测^[32]。他们还引入了新型旋转捕获基底^[33] 同时设计了两种混合的单层拉曼标记

方法^[34],进一步探究更加快速、灵敏和多通路的 SERS 标记免疫分析技术。近来,他们构建了一类 SERS 免疫分析芯片,尝试运用这种芯片对胰腺癌的癌症标志物——粘蛋白 MUC4 进行了检测(图 1)。通过对实际胰腺癌病人血清样品的分析,这种 SERS 免疫芯片展现出了快速、灵敏、样品用量小的优点以及可多通路、自动化进行实际临床应用的潜力^[35]。

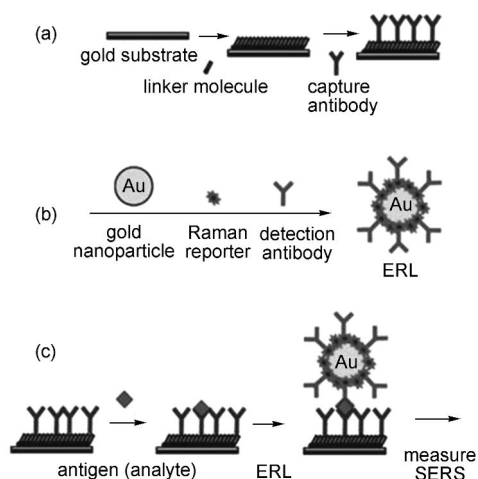


图 1 基于 SERS 的免疫分析芯片设计和分析原理图^[35]

Fig. 1 General SERS-based immunoassay chip design and assay scheme^[35]

最近,Chon 等^[36]巧妙地把磁分离技术引入 SERS 标记检测,并且通过中空金纳米球表面针孔所形成的具有 SERS 活性的“热点”,对肺癌标志物——癌胚抗原(CEA)进行了定量分析。他们不但获得了较低检测限(1 pg/ml),并且在较低的浓度范围内(1—100 pg/ml)得到了较好检测线性关系($R^2 = 0.93$)以及可重复性,这将有助于科研工作者开发出更加快速准确的 SERS 临床疾病检测和诊断技术。另外,实现更多抗原组分的同时检测以及对各组分进行定量分析,将是研究者努力的方向之一^[37,38],因而开发多功能 SERS 标记探针并应用于多通路疾病检测也越来越受到全世界多个课题组的密切关注^[39—42]。此外,在这种抗原抗体识别模式的基础上,各国的研究者已经尝试开发对胃癌^[25]、鼻咽癌^[43]、前列腺癌^[44]以及老年痴呆症^[45]等多种疾病标志物的检测和诊断技术。

2.1.2 碱基配对识别模式

基因作为遗传信息的载体,有助于人们从分子水平上了解生命的本质,找到预防和治疗疾病的新方法。基于碱基配对识别的基因检测技术通常将拉曼标记分子与寡核苷酸链相连形成拉曼探针序列,

然后利用碱基互补配对原则使探针序列与固定在基底上的目标序列杂交,可将标记分子转移到金属基底表面,从而产生较强的 SERS 信号来达到检测和分析的目的^[46]。相比传统的放射性标记基因检测技术,SERS 标记的基因检测技术更加快捷、经济以及具有更高的灵敏度和选择性^[47]。

Vo-Dinh 的小组^[48,49]和 Graham 的小组^[50,51]在 SERS 标记检测基因片段方面作了不少有意义的工作,建立了一系列 SERS 标记检测癌症基因的方法。Mirkin 等^[17]首次创造性地模仿了抗原抗体识别的“三明治”结构,借助银染色增强技术,实现了同时对 6 种 RNA 和 DNA 序列多组分、高灵敏度和高选择性的检测,并且使其检测限达到 20 fM 的水平。Monaghan 等^[52]结合 SERS 标记检测技术与微流控技术,经 PCR 扩增后可检测出 20.6 nM 的沙眼衣原体致病基因。Wabuyele 等^[53]为 HIV-1 基因设计了一段发卡结构的分子信标,采用 SERS 信号减弱的方式来对不同目标基因片段进行灵敏的检测。Mahajan 等^[54]把探针 DNA 序列用荧光染料标记并与目标序列杂交后,利用探针序列与目标序列在变性和再结合的过程中 SERS 信号的变化,在 0.02 aM(10^{-18} M)水平上区分了 CFTR 基因(cystic fibrosis transmembrane regulator)野生型、单点突变型和三碱基缺失型序列,这有可能为检测和诊断由基因变异引起的各种致死或致畸形的遗传病提供一种新的工具。Kang 等^[55]利用 DNA 碱基配对将金纳

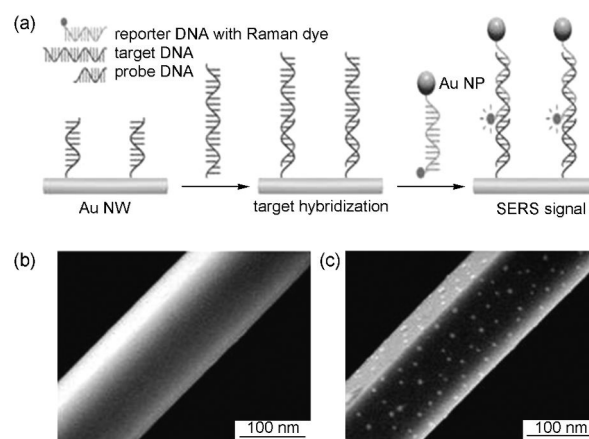


图 2 (a)“Particle-on-wire”传感器检测目标 DNAs 原理图; (b)未加和(c)加入互补目标 DNAs 后的金纳米线 SEM 图^[55]

Fig. 2 (a) Schematic representation for the detection of target DNAs by Au particle-on-wire system; (b) SEM image of nanowire before and (c) after adding complementary target DNAs^[55]

米粒子连接到金纳米线上,构建了一种“particle-on-wire”SERS 传感器(图 2)。他们通过金纳米粒子与金纳米线之间的间隙所产生的“热点”,实现了对实际临床病原菌 DNA 样品进行特异性好、灵敏度高和多通路的分析,其检测限可达到 10 pM。最近,本课题组开发了一种基于 SERS 条码技术的纳米传感器,对转入大米中的 Bt 基因 *cry1A(b)* 和 *cry1A(c)* 的融合基因片段进行分析,其检测限可达 0.1 pg/ml,为 SERS 技术在基因水平检测转基因产品及其安全性方面的应用打开了新的局面^[56]。

2.1.3 生物素-亲和素识别模式

生物素-亲和素(又称抗生物素)系统(biotin-avidin system, BAS)标记技术是 20 世纪 70 年代后期发展起来的一种新型生物反应放大系统^[57]。由于亲和素与生物素间的亲合力极强,结合迅速而稳定,生物素标记抗体和酶的效率高,且不影响蛋白的活性,使得 BAS 标记技术比常规酶联免疫、放射免疫及荧光免疫分析技术有着更高的灵敏度。Ahern 等^[58]利用 SERS 技术分析了亲和素与吸附在银溶胶上的生物素之间的反应,发现最初的时候蛋白质并非通过共价键直接结合在金属溶胶上,而是保持着自身外部水化层的完整且吸附在其表面。Garrett 等^[59]也以生物素与亲和素为识别对象,发现了一种天然的 SERS 基底。他们在青凤蝶(*Graphium butterfly*)天然呈圆锥体微阵列状的翅膀上包裹上一层纳米金,制成了新型仿生 SERS 基底。这种基底修饰亲和素后,能够识别和检测出 0.5—1 000 nM 浓度范围内的生物素。Galarreta 等^[60]通过硫醇修饰将生物素层固定在二维金纳米阵列上。他们在 SERS 光谱中发现,当与生物素结合时,链霉亲和素(streptavidin)的二级结构发生了改变。相比特异性抗原与抗体,生物素与亲和素制备简便、成本低廉且亲合力强,已经被越来越多的研究者用作基础识别方式用来检验其新技术新基底的效果^[61]。

2.1.4 适配子识别模式

适配子(aptamer)是一类人工合成的单链寡核苷酸(DNA 或 RNA),能够与相应的靶物质进行高特异性地结合,有着类似抗体识别的功能。但相比抗体,适配子具有分子量小、成本低、易重复和无免疫源性等优点,因此颇受关注^[62]。如今,适配子的靶物质已经从核酸蛋白,扩展到有机小分子,甚至完整的病毒和细胞^[63]。Wang 等^[64]首次应用适配子结合 SERS 标记检测技术实现了对蛋白质凝血酶(thrombin)的传感检测。他们将巯基修饰的凝血酶

适配子连接到金属基底上,然后依次加入 α -凝血酶和修饰有罗丹明 6G(R6G)及适配子的金纳米溶胶,形成了“三明治”复合体。接着在周围沉积适量的银溶胶粒子后检测到了 R6G 的 SERS 信号,其检测限为 0.5 nM。但由于银溶胶染色不均匀,未能得到凝血酶检测的定量曲线。Cho 等^[65]则通过加入目标分子凝血酶,使由拉曼活性分子标记的凝血酶适配子发生构型转变,适配子上连接的标记分子离开热点区,进而通过标记分子 SERS 信号的降低来对凝血酶进行高灵敏度的检测。这种方法简便、选择性强以及灵敏度高,对凝血酶的检测限可达 100 pM。Chen 等^[66]利用可卡因(cocaine)与其适配子结合前后,目标分子可卡因会令其适配子发生结构上的变化,形成特定的封闭结构,从而使标记分子四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine)靠近银基底而产生较强的 SERS 信号。此法建立起来的适配子 SERS 标记检测可卡因的技术具有快速和选择性强的优点,灵敏度优于可卡因的荧光和电化学检测技术。此外,Huh 等^[67]用多层金纳米管阵列为 SERS 基底并结合微流控技术,通过相应的适配子检测出 5.2 μ U/ml 的抗利尿激素(vasopressin)。Sassolas 等^[68]更是对近些年多种靶物质与其适配子的光学检测方法作了一个比较详细的总结,为此后适配子识别模式的加速发展打下了基础。

2.2 SERS 非标记检测生物大分子

由于光照而引起分子极化率的变化所产生的拉曼光谱能够提供有关分子结构振动的丰富信息,具有指纹图谱的特性^[69]。SERS 非标记技术充分利用拉曼光谱指纹图谱的特点,能够简便、快速、原位、无损地对样品进行检测。同时,拉曼光谱抗光漂白性强、水干扰小,并且借助金属纳米基底的增强效应,使得 SERS 非标记检测技术在多种生物大分子的检测与分析应用中有着广阔前景。目前,在 SERS 非标记检测研究的生物大分子中,比较受关注的主要有以下两类。

2.2.1 SERS 非标记检测蛋白质

SERS 非标记检测蛋白质主要获得的是关于外部基团(如氨基、羧基等)与金属基底之间的吸附作用以及蛋白质二级结构的信息^[70, 71],通过氨基酸残基的振动信息可以对蛋白质进行识别,这种技术在临床上能够对病变组织进行非常快速的分析。但一般的基底重复性差,基底上样品吸附非均匀,因此对同一种蛋白质的检测可能会有不同的结果^[72]。

Xu 等^[73]最早对血红蛋白(hemoglobin)进行了

单分子水平的探索,他们的理论计算和实验数据还指出电磁场效应对拉曼散射产生了主要的增强效果。Etchegoin 等^[74]则利用 SERS 光谱分析了血红蛋白中氧气释放的动态过程。Feng 等^[75]巧妙地设计了一种流动体系,能够用表面增强共振拉曼获得肌红蛋白(myoglobin)的本征结构信息,这种技术可以用来分析蛋白质与纳米粒子之间的相互作用。

Zhao 的小组^[20, 76, 77]在 SERS 非标记检测蛋白质的方面作了许多有意义的工作。他们用聚集态的银纳米溶胶,得到了水溶液中溶菌酶(lysozyme)和过氧化氢酶(catalase)的浓度与 SERS 强度之间的线性关系,所得检测限分别为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 50 ng/ml ,这在快速高通量的蛋白质检测中将可能有较大应用价值。他们结合蛋白质印迹技术(Western blot),实现了非标记的多蛋白质检测,其方法如下(图 3):(1)提取并处理混合蛋白质样品;(2)进行蛋白质电泳,将混合物分离成蛋白质条带;(3)进行蛋白质印迹,将已分离的蛋白质条带转移并固定到硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane)上;(4)进行银染色,将硝酸纤维素膜浸泡在银溶胶中 20 min 显示出蛋白质条带;(5)进行拉曼检测,借助 SERRS 获得蛋白质的指纹图谱。实验中,他们选择了肌红蛋白(myoglobin, Mb)和血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为模型蛋白分析物,区分了 Mb 和 BSA 的不同振动信息,并且在每条带中 Mb 的灵敏度达到 4 ng。这种方法不仅灵敏,也在很大程度上提高了蛋白质检测的效率,并且可以用来鉴定蛋白质组中特定的蛋白质或蛋白质复合物,为蛋白质组学的研究提供了新手段,也将会推动相关生物医学的进一步发展。

2.2.2 SERS 非标记检测 DNA/RNA

早期 SERS 非标记检测 DNA/RNA 主要是分析吸附在银电极上的寡核苷酸片段,但获得的 SERS 信号非常弱且耗时,未能得到推广^[78]。1988 年 Benevides 等^[79]通过对拉曼光谱的对比分析,证实了在 RNA 中 A 型结构和 B 型结构共同存在。Bell 等^[80]直接将 DNA 和 RNA 的 5 种主要的碱基单核苷酸与银纳米溶胶混合,通过加入一定量的电解质 MgSO_4 使银溶胶发生一定程度的聚集,在水溶液中能够直接同时对这 5 种单核苷酸进行亚微摩尔(sub-micromolar)浓度的区分。

最近,Lo 等^[81]设计了一种三维金纳米尖(Au nanotip)阵列,提高了基底的增强效应。他们将非标记的 DNA 直接吸附在金纳米尖阵列上,然后进行银

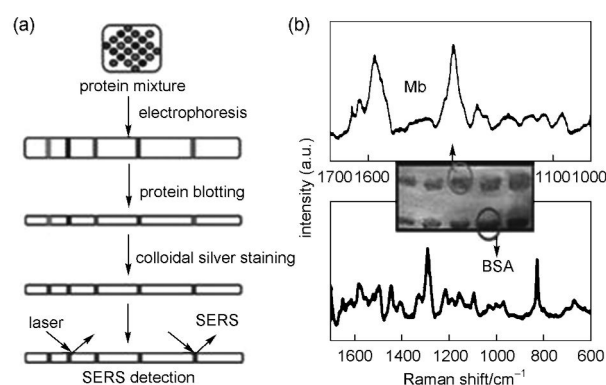


图 3 (a)基于蛋白质印迹的 SERS 检测蛋白质的流程图^[76]; (b)处理后硝酸纤维素膜上肌红蛋白和血清白蛋白的 SERRS 图谱^[20]

Fig. 3 (a) Procedure for protein detection based on Western Blot and SERS^[76]; (b) SERRS of myoglobin and BSA by the “Western-SERS” procedure^[20]

溶胶染色,能够非常稳定快速地对 DNA 亚皮摩尔(sub-picomole)的检测。Barhoumi 等^[82]更是将探针 DNA 序列中腺嘌呤(adenine)用 2-氨基嘌呤(2-aminopurine)替换,并且以 2-氨基嘌呤在 663 cm^{-1} 处的拉曼峰作为基准,在金纳米壳(Au nanoshells)上实现了对 DNA 互补链杂交过程简单、快速且低成本的分析。对于在细胞分化凋亡、生物发育和疾病发生等方面均起重要调控作用的微小 RNA(microRNA),Driskell 等^[83]利用 SERS 非标记技术对其进行了分析研究。他们直接用未修饰的银纳米棒阵列(silver nanorod array)来吸附很短的(21—22 个核苷酸)单链 RNA(ssRNA)、巯基修饰的单链 DNA(thiolated ssDNA)以及 RNA 与 DNA 的复合物(RNA:DNA duplex),通过所得到的指纹图谱,能够快速简便地对三者进行区分,这种方法在对 RNA 非标记多通路的检测方面有潜在的应用。

3 基于 SERS 的病原微生物检测

3.1 SERS 标记检测病原微生物

病原微生物能够入侵宿主并产生有害物质,从而引起感染,严重者可引起大规模爆发的传染病。病原微生物入侵宿主后能够引起免疫应答反应,刺激宿主产生相应的抗体来对付这些入侵者。SERS 标记检测病原微生物也是一类主要基于抗原抗体识别模式发展而成的免疫分析技术。而 SERS 技术所具有的灵敏度高、快速和无损等优势,使其有可能在病原微生物的检测中发挥重要作用。

Driskell 等^[84]首次利用 SERS 标记免疫分析技

术对低浓度下的病毒病原体进行了检测。他们通过形成免疫“三明治”复合体,实现了对猫杯状病毒(FCV)快速和灵敏的检测,其检测限可达 1×10^6 viruses/ml,检测结果与原子力显微镜(AFM)成像所分析得到的结果相符合。最近,Guven 等^[85]结合免疫磁分离与 SERS 技术,实现了对大肠杆菌高灵敏的检测和计数。他们将金包裹的磁性纳米粒子修饰上亲和素,然后通过结合生物素化的抗大肠杆菌抗体来识别溶液中的大肠杆菌并对其进行分离和浓缩。同时,他们在棒状纳米金上连接二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)作为 SERS 标记分子,并用相同的方法修饰上抗体后对大肠杆菌进行检测。这种技术能够实现 10^1 — 10^7 cfu·ml⁻¹ 浓度范围内大肠杆菌的检测,检测限可达 8 cfu·ml⁻¹,并且在低浓度(10^1 — 10^4 cfu·ml⁻¹) 范围内获得了较好的检测线性关系($R^2 = 0.992$),可能发展成为一种快速、灵敏的用于检测水中大肠杆菌的新技术。Tay 等^[86]以硅包裹的纳米金聚集体为基底,利用特异性的 P22 噬菌体尾突起蛋白(TSP)来对沙门氏菌(*Salmonella*)进行识别,实现了对单个沙门氏菌的检测。他们分别尝试了3种不同的偶联方式来实现基底与 TSP 的连接,并且都得到了较好的效果,非常有潜力应用于对病原菌进行快速、高灵敏度、高特异性以及高通量的检测。此外,本课题组利用 SERS 免疫分析技术对能够引起人畜共患疾病的重要病原体,如猪圆环病毒2型(PCV2)^[87]、猪链球菌2型(SS2)^[88, 89]等进行了研究,有望在检测和诊断人畜共患传染病以及减少养猪业巨大的经济损失方面发挥积极作用。

3.2 SERS 非标记检测病原微生物

微生物表面含有多糖、脂类和蛋白质等多种复杂的生物大分子,一般的检测技术很难对其进行原位、实时及无损地检测和分析。拉曼光谱所能提供的指纹图谱信息,能够快速、准确地对微生物进行辨别,为非标记直接检测微生物带来新的希望。

早在 20 世纪 90 年代就有人提出了“全生物体指纹图谱”(whole-organism fingerprinting)的概念,并且能够利用拉曼光谱检测出复杂培养基中的病原体^[90]。Schuster 等^[91]利用拉曼光谱使直接分析单个微生物细胞成为可能,即使形态学上无法区分但单个微生物的多维光谱信息能够揭示它们化学组成的差异,进而可以分辨出不同的微生物。Fan 等^[92]在硅晶片上包覆金纳米作为基底,通过对拉曼光谱的数学统计分析,快速、准确和无损地区分了 7 种食物和水中的病毒。Knauer 等^[93]也以较少的时间和

样品量原位在银溶胶中辨别了两种细菌。最近, Liu 等^[94]在 SERS 非标记检测微生物方面取得了最新进展(图 4)。他们在阳极氧化铝(AAO)上组装了间隙小于 10 nm 的银纳米颗粒,然后在其上包被一层万古霉素(vancomycin),它可以与人血液中的细菌细胞壁上的肽聚糖形成氢键,以至于能够捕获比传统方法多 1 000 倍以上的细菌,获得的拉曼光谱信号也有 4—5 倍的增强,并且未造成明显干扰。同时,他们还从 SERS 光谱中发现了万古霉素敏感菌与抗性菌有明显区别,这在细菌抗药性的测试中有着非常高的实用价值。新兴的 SERS 非标记检测微生物技术相比传统的微生物血清学和物种学而言,在微生物的辨别和分析方面的可靠性还有待加强,但其快速、原位和受水干扰小的优点将会在传染病的及早发现与检测方面得到越来越多的重视。

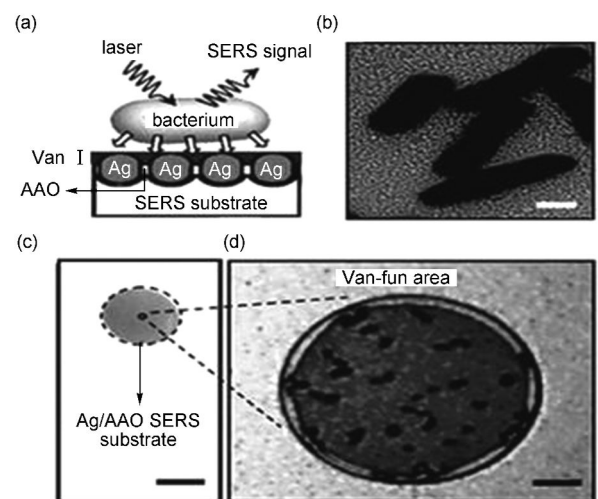


图 4 (a) 细菌吸附在万古霉素包被的基底上的示意图; (b) 基底上细菌的扫描电镜图; (c) 包被了万古霉素的基底光学显微镜图; (d) 被捕获的大肠杆菌光学显微镜图^[94]

Fig. 4 (a) Schematic diagram of Van-coated substrate; (b) SEM image of bacteria on the substrate (scale bar, 500 nm); (c) optical image of a substrate with Van coating (scale bar, 1 cm); (d) optical image of the captured *E. coli* (scale bar, 5 μ m)^[94]

4 基于 SERS 的细胞研究

细胞是生物体生命活动的基本结构和功能单位,对细胞的深入研究是揭开生命奥秘、改造生命和征服疾病的关键。现代生命科学研究已经进入单细胞单分子阶段,借助 SERS 超高灵敏度和水干扰小等特性,科学家有望在分子和细胞水平上研究生命活动的规律、疾病的发生与发展以及药物与机体的

相互作用等。利用 SERS 技术,通过原位、实时、无损探测活细胞的功能和变化,获取病变初期细胞结构和功能的微小变化信息,进而实现对疾病的早期检测和诊断。总的来说,SERS 技术在细胞研究中的应用主要归结为直接检测和间接检测两大类^[95]。

4.1 SERS 直接检测细胞

SERS 直接检测细胞充分利用了 SERS 能够提供指纹图谱的特性,是一种非标记检测方法。将待测细胞吸附在 SERS 基底上或者与金属纳米溶胶混合,可以获得细胞样品自身脂质、核酸、蛋白质等分子结构的振动信息。早在 1985 年,Efrima 等^[96]将银纳米溶胶直接吸附在大肠杆菌细胞壁上,获得了细胞壁不同成分如蛋白质、肽聚糖和氨基酸等分子的 SERS 光谱。Kneipp 等^[97]利用金纳米溶胶较好的生物相容性,将直径约为 60 nm 的金纳米溶胶与细胞共培养,金纳米溶胶进入细胞内以后,会产生部分簇状聚集来增强拉曼信号。他们通过分析所得拉曼图谱,对活细胞内天然化学组分如 DNA、苯基丙氨酸(phenylalanine)和酪氨酸(tyrosine)进行了拉曼峰的归属,提供了一种对细胞内组分进行灵敏、结构性的检测方法。此后,他们课题组将金纳米溶胶引入细胞,通过其与细胞共培养不同时间段所获得的 SERS 光谱,可揭示出细胞内分子动力学的变化过程^[98]。最近,为了突破细胞溶酶体对纳米溶胶的限制,Vitol 等^[99]研制了一种 SERS 纳米吸管(nanopipette),可以对细胞核以及细胞质中各种细胞器进行定位研究,并且能够检测到细胞对外界刺激而引起的变化。Xie 等^[100]则在金纳米溶胶上连接一段缩氨酸 SV-40 的 T-抗体(T-antigen)作为核定位标志(nuclear localization signal),引导金纳米溶胶成功进入了 HeLa 细胞的细胞核,首次获得了活细胞中细胞核的原始拉曼信号(图 5)。Sujith 等^[101]将银溶胶与活的酵母细胞(yeast cells)混合,借助酵母细胞壁使银纳米溶胶发生一定程度的聚集来提高 SERS 活性,得到了酵母细胞壁的指纹图谱。

虽然 SERS 直接检测细胞操作简便,利用了分子结构振动信息,检测细胞时简便快速,但其依然面临着两大挑战。首先,对于生物蛋白分子而言,其主要由拉曼散射横截面较小的氨基酸序列构成,拉曼活性低。生物分子与纳米基底的表面相互作用也较弱,直接检测得到的 SERS 信号往往很弱。发展高灵敏度的 SERS 基底,进一步通过表面修饰使基底具有较高的选择性,这将是我们应该继续探索的一个方向。与此同时,研制高灵敏度、芯片化、可再生

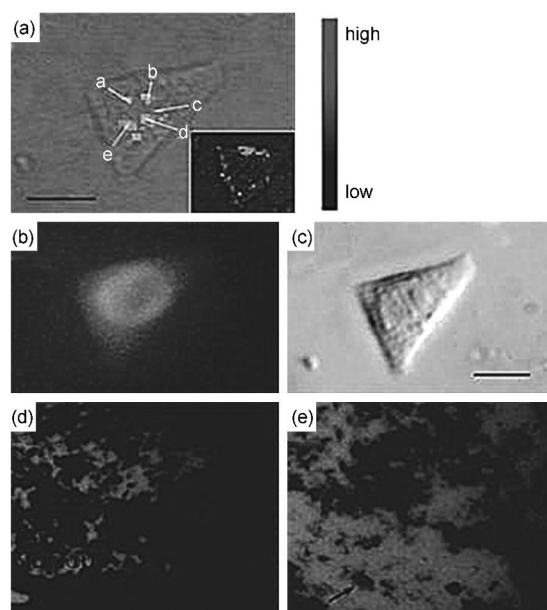


图 5 (a) SERS 成像与光学投射成像合并图;(b)核染色之后的细胞荧光成像;(c)细胞微分干涉显微图;(d)纳米探针进入细胞核内方式的 TEM 图;(e)细胞核内的纳米探针 TEM 图^[100]

Fig. 5 (a) Merged image of SERS map and an optical transmission image (scale bar, 10 μm); (b) fluorescent image of the cell after nuclear staining (scale bar, 10 μm); (c) differential interference contrast micrograph of the cell (scale bar, 10 μm); (d) TEM image of the nanoprobe entry to cell nucleus (scale bar, 400 nm); (e) TEM image of the nanoprobe in cell nucleus (scale bar, 100 nm)^[100]

的 SERS 基底可以明显降低分析成本,这在 SERS 直接检测中将有着较强的实用性以及光明的应用前景。最近有报道将类胡萝卜素(carotenoid)作为内源性生物标记物^[102],用来观测细胞动态过程中拉曼光谱的变化,然而这种方法适用面并不大。其次,细胞作为一种复杂的生命动态体系,其结构和成分非常复杂,通常所得到的光谱信息也十分庞杂。SERS 基底在检测过程中也会不可避免地吸附一些干扰物质,更是加大了其分析难度。如何从 SERS 光谱提取到和生命过程相关的特征信息,将是一项艰巨的任务。Li 等^[103]尝试用碘离子吸附及电化学氧化法获得了比较洁净的 SERS 基底,并且应用于活细胞膜蛋白的研究,但这种方法同时也导致了金基底 1/3—1/2 的 SERS 活性降低。如今已报道有多种数学方法对大量复杂 SERS 光谱进行解析^[104],但活细胞的细微变化能否灵敏地反映在 SERS 光谱上,还有待进一步的研究。总而言之,SERS 直接检测细胞的核心问题应当包括发展优良的 SERS 基底

和准确解析动态 SERS 光谱,这种技术要应用于临床疾病的检测和诊断,显然还有许多工作需要继续开展。

4.2 SERS 间接检测细胞

SERS 间接检测细胞技术通常是在 SERS 基底上标记拉曼活性分子(如 CV、R6G、pMBA),然后将 SERS 标记的纳米粒子连接上对细胞某种成分具有特异性识别功能的生物分子(如抗体、亲和素、DNA、适配子),从而使 SERS 标记的纳米粒子结合到细胞特定部位进行检测。虽然间接法丧失了 SERS 能够提供指纹图谱的特性,但其具有很高的灵敏度,且相比荧光检测背景干扰小、谱峰窄,在多组分标记检测中具有突出优势。Wabuyele 等^[105]将银纳米溶胶修饰上结晶紫(CV),并以其在 596 cm^{-1} 处的拉曼峰作为 SERS 信号标记,获得了经多聚甲醛(paraformaldehyde)固定的中国仓鼠卵巢细胞(CHO cell) SERS 成像图谱,揭示了 CV 标记的银纳米溶胶在细胞中的分布状况。Sha 等^[106]利用抗体修饰的磁性纳米粒子对进入人体血液循环的肿瘤细胞进行富集和浓缩,并结合 SERS 标记免疫纳米粒子进行特异性识别,在人全血分析中达到了 50 个肿瘤细胞每毫升的检测限,而且获得了 99.7% 的高准确率。Lu 等^[107]则对金纳米爆米花粒子进行了抗体和 RNA 适配子的双修饰,使其对前列腺癌细胞的识别与结合能力大大提高。此外,对细胞内微环境的 pH 传感在细胞病理和生理的研究中具有重要意义,也引起许多课题组的关注^[108-111]。Kneipp 等^[109]利用 pH 敏感分子 4-巯基苯甲酸(pMBA)修饰在金纳米溶胶上,通过内吞作用进入细胞后,pMBA 在不同 pH 值下发生质子化和去质子化的转变,引起 SERS 光谱变化从而反映分子结构的微小改变。他们用 830 nm 激光进行激发,以 1076 和 1423 cm^{-1} 处的 SERS 峰为功能标志,获得了高分辨率的单细胞 pH 值图谱(图 6)。发展这种能够对细胞内各个部位快速、动态、准确地进行 pH 值检测和分析技术,在实际的疾病检测与诊断应用方面有着重大意义。

借助 SERS 技术高灵敏度、原位、无损和实时等特性,运用 SERS 标记检测病变细胞有着较好的应用前景。若要使 SERS 标记检测细胞技术真正能够成为一种可靠且先进的癌症诊断手段,还有一些问题需要继续改进。SERS 基底方面,如何更好地对新型高灵敏度的基底进行表面修饰,保持其高活性的同时也能提高生物相容性,降低其细胞毒性,还值得我们继续探究。成像技术方面,科学家已经能够把

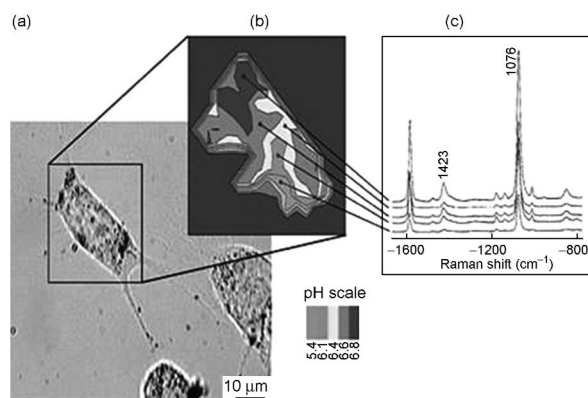


图 6 (a) 单细胞的光学显微图; (b) 细胞 pH 成像; (c) 不同 pH 值下胞内体区域的 SERS 谱图^[109]

Fig. 6 (a) Photomicrograph of single cell; (b) pH map of the cell; (c) typical SERS spectra at different pH^[109]

SERS 技术与多种技术集成^[112-115],实现多模态细胞成像和癌症诊断。而在集成过程中保持和发挥各个成像技术的优势,并应用于生物医学中复杂的多组分体系,也还需不断完善。识别特异性方面,细胞组成非常复杂,识别过程中往往容易发生非特异性吸附。如何降低甚至消除非特异性吸附对实验的干扰,提高细胞识别特异性和选择性,也是必须要认真考虑的问题。近来报道了同时利用多种识别模式来加强 SERS 标记基底特异性识别能力的技术^[107],可以在同一个细胞中整合靶向定位、实时监控和光热治疗^[114, 116, 117]等。而如何进一步使纳米粒子突破溶酶体的限制靶向到各个细胞器,真正实现疾病诊断与治疗紧密结合,将这种技术带出实验室走向临床应用,将是一个极具挑战性的课题。

5 基于 SERS 的活体检测

生命体的活体检测是 SERS 技术最终能够真正应用于临床疾病检测和诊断必不可少的过程。相比传统的组织病理学染色诊断方法,基于 SERS 的检测和诊断技术具有灵敏度高、快速、对样品限制少和不破坏样品等优点,在一些重大疾病(如癌症、糖尿病等)的早期诊断和基础研究中有着很好的应用潜力。

Schut 等^[118]率先用拉曼光谱对发育异常组织和癌症早期的组织进行了检测。他们利用光纤探头在大鼠上原位、快速、高灵敏度和高特异性地区分了正常上皮组织、轻度非典型增生组织(low-grade dysplasia)和重度非典型增生组织(high-grade dysplasia)。为避免生物样品背景荧光和光纤探头

的干扰, Mo 等^[119]采用高波段(2 400—3 800 cm^{-1})作为拉曼光谱指纹区域来分析子宫颈非典型增生(cervical dysplasia), 并运用 PCA、LDA 等数学统计分析方法实现了对正常组织和非正常组织高灵敏度和高特异性诊断。Qian 等^[120]以 DTTC (diethylthiatricarbocyanine) 为 SERS 标记分子连接在金纳米粒子上, 并将 SERS 标记纳米粒子用几近无毒的聚乙二醇(PEG)来修饰, 通过表皮生长因子受体抗体(EGFR-antibody)进行特异性识别。他们成功地在异种移植了癌细胞(Tu686)的裸鼠皮下 1—2 cm 处检测到了明显不同的 SERS 信号(图 7), 并且获得了比量子点(QDs)检测技术约高 200 倍的灵敏度。2010 年, Stone 等^[121]率先发展了一种表面增强空间补偿拉曼散射(surface enhanced spatially offset Raman spectroscopy, SESORS)技术, 得到了注射在猪组织 25 mm 深处中的银纳米粒子所产生的拉曼信号。这种对哺乳动物组织进行无损、低浓度的深层拉曼检测技术, 其检测的深度比常规拉曼检测方法提高了上百倍, 将有可能为临床中高灵敏、高通量、深层的活体肿瘤检测开辟新的道路。Yigit 等^[122]制备了金纳米和超顺磁的氧化铁杂交粒子, 且利用这种双功能造影剂成功在活的小鼠体内同时完成了 SERS 成像和核磁共振成像(MRI), 这种活体成像技术可以进一步应用于临床疾病检测和诊断的研究中, 并为人类造福。

糖尿病已经成为一种高发的现代病, 实施血糖监测对患者饮食、生活规律以及合理用药都具有重要的指导意义, 并可以帮助患者随时发现问题, 及时就医。早在 2003 年, Grant 等^[123]就报道了利用 SERS 技术对血糖进行高灵敏度和选择性地检测。随后, Van Duyne 课题组在这个方向做了许多重要和积极的工作^[126, 124—129]。他们构建了一类银纳米膜作为 SERS 基底, 并在其上修饰对血糖具有预浓缩作用的长链硫醇(EG3), 通过运用偏最小二乘法(PLS)以及克拉克误差表格分析(Clarke error grid), 定量检测出了 0—25 mM 范围内的血糖并获得了 94% 的准确度, 而且在活体中所得到的拉曼光谱能够稳定 3 天以上^[127]。在此基础上, 他们将具有多种优点的自组装银纳米膜 SERS 基底经皮移植到大鼠体内, 第一次实现了 SERS 技术在活体中连续稳定的血糖检测^[26]。最近, 他们继续发展和优化了活体血糖检测技术, 引入了表面增强空间补偿拉曼散射(SESORS), 不但降低了激发光的能量以保护生物体本身, 而且提高了在低浓度条件下检测的

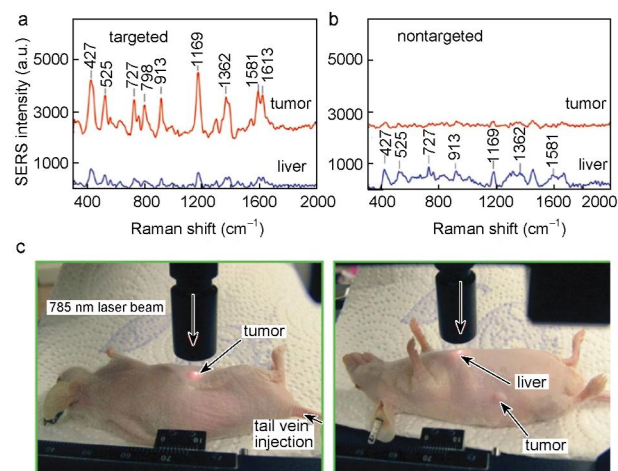


图 7 利用标记(a)和未标记(b)的纳米粒子分别在肿瘤和肝脏所获得的 SERS 图谱;(c)激光束聚焦于肿瘤和肝脏处^[120]

Fig. 7 SERS spectra obtained from the tumor and the liver locations by using targeted (a) and nontargeted (b) nanoparticles; (c) a laser beam focusing on the tumor site or liver^[120]

准确性, 在多只大鼠中实现了稳定、连续、准确的活体血糖实时监测超过 17 天^[129], 此项技术将来很有潜力用于人类低血糖和糖尿病的基础研究以及辅助治疗。

6 结论与展望

目前, 从与病理相关的生物大分子, 如抗体蛋白、核酸、粘蛋白等, 到病原微生物、癌细胞, 直至动物活体, SERS 技术在疾病诊断与生物分析方面已经获得了广泛应用。然而, SERS 技术要进一步成为灵敏可靠的疾病诊断和生物分析手段, 还有许多工作需要继续完善。一方面, 制备高灵敏度、高特异性、生物相容性好、芯片化、可再生以及干扰小的 SERS 基底仍是关键。优良的基底不但具有灵敏度高可重复利用的特点, 而且还能够有助于获得详细、精确的拉曼光谱, 甚至实现活体深层组织 SERS 成像, 直接应用于疾病的临床诊断。另一方面, 探索出可将基础识别模式进行优势互补的方法, 发掘出具有更高特异性和灵敏度的分子识别模式, 并将其应用于 SERS 检测技术, 可以提高 SERS 检测的选择性、特异性、可靠性和灵敏度, 也将促进疾病诊断和生物分析技术的继续发展。此外, 开发多功能金属纳米粒子, 集成靶向定位、实时监控和光热治疗等功能于一体, 将极大提高疾病诊断与治疗的效率。而且, 通过整合多种成像技术, 同时实现 SERS、磁性、荧光、

MRI、瑞利散射等多模态成像,可以获得有关疾病的多维信息,这在更全面更准确地进行疾病检测和诊断方面有着十分重大的意义。可以预见,SERS技术以其独特的优势,必将在疾病诊断和生物分析领域的研究和应用中发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. *CA: Cancer J. Clin.*, 2011, 61(2): 69—90
- [2] Borkin M, Gajos K, Peters A, Mitsouras D, Melchionna S, Rybicki F, Feldman C, Pfister H. *IEEE T. Vis. Comput. Gr.*, 2011, 17(12): 2479—2488
- [3] Huang W, Eshleman S H, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos E E, Whitcomb J M, Young A M, Donnell D, Mmiro F. *J. Virol.*, 2007, 81(15): 7885—7893
- [4] Raman C V, Krishnan K. *Nature*, 1928, 121(3048): 501—502
- [5] Jacek L, Philip N R. *Adsorption of Molecules at Metal Electrodes*. 1st ed. NY: Wiley-VCH, 1992. 285
- [6] Fleischmann M, Hendra P, McQuillan A. *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26(2): 163—166
- [7] Jeanmaire D L, van Duyne R P. *J. Electroanal. Chem. Interfa. Electrochem.*, 1977, 84(1): 1—20
- [8] Albrecht M G, Creighton J A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99(15): 5215—5217
- [9] Dieringer J A, Robert B, Lettan I, Scheidt K A, van Duyne R P. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(51): 16249—16256
- [10] Michaels A M, Nirmal M, Brus L. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121(43): 9932—9939
- [11] Nie S, Emory S R. *Science*, 1997, 275(5303): 1102—1106
- [12] Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman L T, Itzkan I, Dasari R R, Feld M S. *Phys. Rev. Lett.*, 1997, 78(9): 1667—1670
- [13] Porter M D, Lipert R J, Siperko L M, Wang G, Narayanan R. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37(5): 1001—1011
- [14] Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, Kneipp K. *Nanomed. Nanotechnol.*, 2010, 6(2): 214—226
- [15] Kho K W, Fu C Y, Dinis U S, Olivo M. *J. Biophotonics*, 2011, 4(10): 667—684
- [16] Alvarez-Puebla R A, Liz-Marzán L M. *Small*, 2010, 6(5): 604—610
- [17] Cao Y C, Jin R, Mirkin C A. *Science*, 2002, 297(5586): 1536—1540
- [18] Allain L R, Vo-Dinh T. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 469(1): 149—154
- [19] Podstawka E, Ozaki Y, Proniewicz L M. *Applied Spectroscopy*, 2004, 58(5): 570—580
- [20] Han X X, Zhao B, Ozaki Y. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394(7): 1719—1727
- [21] Bizzarri A R, Cannistraro S. *Nanomed. Nanotechnol.*, 2007, 3(4): 306—310
- [22] Wang Y, Wei H, Li B, Ren W, Guo S, Dong S, Wang E. *Chem. Commun.*, 2007, (48): 5220—5222
- [23] Chen J W, Liu X P, Feng K J, Liang Y, Jiang J H, Shen G L, Yu R Q. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24(1): 66—71
- [24] Zhang L, Xu J J, Mi L, Gong H, Jiang S Y, Yu Q M. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 31(1): 130—136
- [25] Feng S, Chen R, Lin J, Pan J, Wu Y, Li Y, Chen J, Zeng H. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26(7): 3167—3174
- [26] Stuart D A, Yuen J M, Shah N, Lyandres O, Yonzon C R, Glucksberg M R, Walsh J T, van Duyne R P. *Anal. Chem.*, 2006, 78(20): 7211—7215
- [27] Schmidt H, Ha N B, Pfannkuche J, Amann H, Kronfeldt H D, Kowalewska G. *Mar. Pollut. Bull.*, 2004, 49(3): 229—234
- [28] 葛明(Ge M), 崔颜(Cui Y), 顾仁敖(Gu R A). *光谱学与光谱分析(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, 2008, 28(1): 110—116
- [29] Rohr T E, Cotton T, Fan N, Tarcha P J. *Anal. Biochem.*, 1989, 182(2): 388—398
- [30] Dou X, Takama T, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Ozaki Y. *Anal. Chem.*, 1997, 69(8): 1492—1495
- [31] Ni J, Lipert R J, Dawson G B, Porter M D. *Anal. Chem.*, 1999, 71(21): 4903—4908
- [32] Grubisha D S, Lipert R J, Park H Y, Driskell J, Porter M D. *Anal. Chem.*, 2003, 75(21): 5936—5943
- [33] Driskell J D, Uhlenkamp J M, Lipert R J, Porter M D. *Anal. Chem.*, 2007, 79(11): 4141—4148
- [34] Wang G, Park H Y, Lipert R J, Porter M D. *Anal. Chem.*, 2009, 81(23): 9643—9650
- [35] Wang G, Lipert R J, Jain M, Kaur S, Chakraborty S, Torres M P, Batra S K, Brand R E, Porter M D. *Anal. Chem.*, 2011, 83(7): 2554—2561
- [36] Chon H, Lee S, Son S W, Oh C H, Choo J. *Anal. Chem.*, 2009, 81(8): 3029—3034
- [37] 葛明(Ge M), 鲍芳(Bao F), 姚建林(Yao J L), 孙如(Sun R), 顾仁敖(Gu R A). *化学学报(Acta Chimica Sinica)*, 2009, 67(20): 2285—2289
- [38] Bell S E J, Sirimuthu N M S. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37(5): 1012—1024
- [39] Kim J H, Lee S M, Jun B H, Choi H J, Kim J S, Cho M H, Kim Y K, Jeong D H, Lee Y S. *Nanomed-Nanotechnol.*, 2007, 3(4): 341—341
- [40] Wang Z Y, Zong S F, Yang J, Li J, Cui Y P. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26(6): 2883—2889
- [41] Lee S, Chon H, Yoon S Y, Lee E K, Chang S I, Lim D W, Choo J. *Nanoscale*, 2012, 4(1): 124—129
- [42] Cui Y, Ren B, Yao J L, Gu R A, Tian Z Q. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, 38(7): 896—902
- [43] Chen Y, Zheng X, Chen G, He C, Zhu W, Feng S, Xi G, Chen R, Lan F, Zeng H. *Int. J. Nanomed.*, 2012, 7: 73—82
- [44] Stevenson R, Ingram A, Leung H, McMillan D C, Graham D. *Analyst*, 2009, 134(5): 842—844
- [45] El-Said W A, Kim T H, Yea C H, Kim H, Choi J W. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, 11(1): 768—772

- [46] 胡娟 (Hu J), 张春阳 (Zhang C Y). 化学进展 (Progress in Chemistry), 2010, 22(8): 1641—1647
- [47] Vo-Dinh T, Houck K, Stokes D L. Anal. Chem., 1994, 66(20): 3379—3383
- [48] Vo-Dinh T, Allain L R, Stokes D L. J. Raman Spectrosc., 2002, 33(7): 511—516
- [49] Culha M, Stokes D L, Allain L R, Vo-Dinh T. Anal. Chem., 2003, 75(22): 6196—6201
- [50] Graham D, Smith W E, Linacre A M T, Munro C H, Watson N D, White P C. Anal. Chem., 1997, 69(22): 4703—4707
- [51] Faulds K, Barbagallo R P, Keer J T, Smith W E, Graham D. Analyst, 2004, 129(7): 567—568
- [52] Monaghan P B, McCarney K M, Ricketts A, Littleford R E, Docherty F, Smith W E, Graham D, Cooper J M. Anal. Chem., 2007, 79(7): 2844—2849
- [53] Wabuye M B, Vo-Dinh T. Anal. Chem., 2005, 77(23): 7810—7815
- [54] Mahajan S, Richardson J, Brown T, Bartlett P N. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(46): 15589—15601
- [55] Kang T, Yoo S M, Yoon I, Lee S Y, Kim B. Nano Lett., 2010, 10(4): 1189—1193
- [56] Chen K, Han H, Luo Z, Wang Y, Wang X. Biosens. Bioelectron., 2012, 34(1): 118—124
- [57] Guesdon J L, Ternynck T, Avrameas S. J. Histochem. Cytochem., 1979, 27(8): 1131—1139
- [58] Ahern A M, Garrell R L. Langmuir, 1991, 7(2): 254—261
- [59] Garrett N L, Vukusic P, Ogrin F, Sirotkin E, Winlove C P, Moger J. J. Biophotonics, 2009, 2(3): 157—166
- [60] Galarreta B C, Norton P R, Lagugne-Labarthe F. Langmuir, 2011, 27(4): 1494—1498
- [61] Li T, Liu D, Wang Z. Biosens. Bioelectron., 2009, 24(11): 3335—3339
- [62] Baldrich E, Restrepo A, O'Sullivan C K. Anal. Chem., 2004, 76(23): 7053—7063
- [63] Mairal T, Gengiz Özalp V, Lozano Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan C K. Anal. Bioanal. Chem., 2008, 390(4): 989—1007
- [64] Wang Y, Wei H, Li B, Ren W, Guo S, Dong S, Wang E. Chem. Commun., 2007, 5220—5222
- [65] Cho H, Baker B R, Wachsmann-Hogiu S, Pagba C V, Laurence T A, Lane S M, Lee L P, Tok J B H. Nano Lett., 2008, 8(12): 4386—4390
- [66] Chen J, Jiang J, Gao X, Liu G, Shen G, Yu R. Chem. A Eur. J., 2008, 14(27): 8374—8382
- [67] Huh Y S, Erickson D. Biosens. Bioelectron., 2010, 25(5): 1240—1243
- [68] Sassolas A, Blum L J, Leca-Bouvier B D. Biosens. Bioelectron., 2011, 26(9): 3725—3736
- [69] Tong L M, Zhu T, Liu Z F. Chem. Soc. Rev., 2010, 40(3): 1296—1304
- [70] Stewart S, Fredericks P. Spectrochim. Acta Part A, 1999, 55(7/8): 1641—1660
- [71] Kumar G V P, Reddy B A A, Arif M, Kundu T K, Narayana C. J. Phys. Chem. B, 2006, 110(33): 16787—16792
- [72] Grabbe E S, Buck R P. J. Am. Chem. Soc., 1989, 111(22): 8362—8366
- [73] Xu H, Bjerneld E J, Käll K, Börjesson L. Phys. Rev. Lett., 1999, 83(21): 4357—4360
- [74] Etchegoin P, Liem H, Maher R, Cohen L, Brown R, Milton M, Gallop J. Chem. Phys. Lett., 2003, 367(1/2): 223—229
- [75] Feng M, Tachikawa H. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(23): 7443—7448
- [76] Han X X, Jia H Y, Wang Y F, Lu Z C, Wang C X, Xu W Q, Zhao B, Ozaki Y. Anal. Chem., 2008, 80(8): 2799—2804
- [77] Han X X, Huang G G, Zhao B, Ozaki Y. Anal. Chem., 2009, 81(9): 3329—3333
- [78] Kneipp K, Kneipp H, Itzkan I, Dasari R R, Feld M S. J. Phys. Condens. Matt., 2002, 14(18): R597—R624
- [79] Benevides J, Thomas G Jr. Biochemistry, 1988, 27(10): 3868—3873
- [80] Bell S E J, Sirimuthu N M S. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(49): 15580—15581
- [81] Lo H C, Hsiung H I, Chattopadhyay S, Han H C, Chen C F, Leu J P, Chen K H, Chen L C. Biosens. Bioelectron., 2011, 26: 2413—2418
- [82] Barhoumi A, Halas N J. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132(37): 12792—12793
- [83] Driskell J D, Tripp R A. Chem. Commun., 2010, 3298—3300
- [84] Driskell J D, Kwarta K M, Lipert R J, Porter M D, Neill J D, Ridpath J F. Anal. Chem., 2005, 77(19): 6147—6154
- [85] Guven B, Basaran-Akgul N, Temur E, Tamer U, Boyaci I H. Analyst, 2011, 136(4): 740—748
- [86] Tay L L, Huang P J, Tanha J, Ryan S, Wu X, Hulse J, Chau L K. Chem. Commun., 2012, 1024—1026
- [87] Luo Z, Fu T, Chen K, Han H, Zou M. Microchimica Acta, 2011, 175(1): 55—61
- [88] Luo Z, Chen K, Lu D, Han H, Zou M. Microchimica Acta, 2011, 173(1): 149—156
- [89] Chen K, Han H, Luo Z. Analyst, 2012, 137(5): 1259—1264
- [90] Grow A E, Wood L L, Claycomb J L, Thompson P A. J. Microbiol. Meth., 2003, 53(2): 221—233
- [91] Schuster K, Urlaub E, Gapes J. J. Microbiol. Meth., 2000, 42(1): 29—38
- [92] Fan C, Hu Z, Riley L K, Purdy G A, Mustapha A, Lin M. J. Food Sci., 2010, 75(5): M302—M307
- [93] Knauer M, Ivleva N P, Liu X, Niessner R, Haisch C. Anal. Chem., 2010, 82(7): 2766—2772
- [94] Liu T Y, Tsai K T, Wang H H, Chen Y, Chen Y H, Chao Y C, Chang H H, Lin C H, Wang J K, Wang Y L. Nat. Commun., 2011, 2: 538
- [95] 崔颜 (Cui Y), 任斌 (Ren B), 田中群 (Tian Z Q). 东南大学学报 (医学版) (Journal of Southeast University (Medical Science Edition)), 2011, 30(1): 254—262
- [96] Efrima S, Bronk B V, Czege J. Proc. SPIE, 1999, 3602:

- 164—171
- [97] Kneipp K, Haka A S, Kneipp H, Badizadegan K, Yoshizawa N, Boone C, Shafer-Peltier K E, Motz J T, Dasari R R, Feld M S. *Appl. Spectrosc.*, 2002, 56(2): 150—154
- [98] Kneipp J, Kneipp H, McLaughlin M, Brown D, Kneipp K. *Nano Lett.*, 2006, 6(10): 2225—2231
- [99] Vitol E A, Orynbayeva Z, Bouchard M J, Azizkhan-Clifford J, Friedman G, Gogotsi Y. *ACS Nano*, 2009, 3(11): 3529—3536
- [100] Xie W, Wang L, Zhang Y, Su L, Shen A, Tan J, Hu J. *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20(4): 768—773
- [101] Sujith A, Itoh T, Abe H, Yoshida K, Kiran M S, Biju V, Ishikawa M. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394(7): 1803—1809
- [102] Li M, Canniffe D P, Jackson P J, Davison P A, FitzGerald S, Dickman M J, Burgess J G, Hunter C N, Huang W E. *ISME J.*, 2012, 6(4): 875—885
- [103] Li M D, Cui Y, Gao M X, Luo J, Ren B, Tian Z Q. *Anal. Chem.*, 2008, 80(13): 5118—5125
- [104] Alvarez-Puebla R A, Liz-Marzan L M. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41(1): 43—51
- [105] Wabuyele M B, Yan F, Griffin G D, Vo-Dinh T. *Rev. Sci. Instrum.*, 2005, 76(6): 063710—063717
- [106] Sha M Y, Xu H, Natan M J, Cromer R. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130(51): 17214—17215
- [107] Lu W, Singh A K, Khan S A, Senapati D, Yu H, Ray P C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(51): 18103—18114
- [108] Talley C E, Jusinski L, Hollars C W, Lane S M, Huser T. *Anal. Chem.*, 2004, 76(23): 7064—7068
- [109] Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, Kneipp K. *Nano Lett.*, 2007, 7(9): 2819—2823
- [110] Pallaoro A, Braun G B, Reich N O, Moskovits M. *Small*, 2010, 6(5): 618—622
- [111] Balint S, Rao S, Marro M, Miskovsky P, Petrov D. *J. Raman Spectrosc.*, 2011, 42(6): 1215—1221
- [112] Gole A, Agarwal N, Nagaria P, Wyatt M D, Murphy C J. *Chem. Commun.*, 2008, 6140—6142
- [113] Jun B H, Noh M S, Kim J, Kim G, Kang H, Kim M S, Seo Y T, Baek J, Kim J H, Park J, Kim S, Kim Y K, Hyeon T, Cho M H, Jeong D H, Lee Y S. *Small*, 2010, 6(1): 119—125
- [114] Olivo M, Lucky S S, Bhuvaneshwari R, Dendukuri N. *Proc. SPIE*, 2011, 8087: 80870T
- [115] Cui Y, Zheng X S, Ren B, Wang R, Zhang J, Xia N X, Tian Z Q. *Chem. Sci.*, 2011, 2(8): 1463—1469
- [116] Huang H C, Barua S, Sharma G, Dey S K, Rege K. *J. Control. Rel.*, 2011, 155(3): 344—357
- [117] Beqa L, Fan Z, Singh A K, Senapati D, Ray P C. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, 3(9): 3316—3324
- [118] Schut T C B, Witjes M, Sterenborg H, Speelman O, Roodenburg J, Marple E, Bruining H, Puppels G. *Anal. Chem.*, 2000, 72(24): 6010—6018
- [119] Mo J, Zheng W, Low J J H, Ng J, Ilancheran A, Huang Z. *Anal. Chem.*, 2009, 81(21): 8908—8915
- [120] Qian X, Peng X H, Ansari D O, Yin G Q, Chen G Z, Shin D M, Yang L, Young A N, Wang M D, Nie S. *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26(1): 83—90
- [121] Stone N, Faulds K, Graham K, Matousek P. *Anal. Chem.*, 2010, 82(10): 3969—3973
- [122] Yigit M V, Zhu L, Ifediba M A, Zhang Y, Carr K, Moore A, Medarova Z. *ACS Nano*, 2011, 5(2): 1056—1066
- [123] Grant C D, Schwartzberg A, Bogomolni R, Zhang J Z, Talley C E, Huser T R, Lane S M. *Abstr. P. Am. Chem. Soc.*, 2003, 226: U732—U732
- [124] Lyandres O, Yuen J M, Shah N C, van Duyne R P, Walsh J T Jr, Glucksberg M R. *Diabetes Technol. The.*, 2008, 10(4): 257—265
- [125] Zhang X, Shah N C, van Duyne R P. *Vib. Spectrosc.*, 2006, 42: 2—8
- [126] Lyandres O, Shah N C, Yonzon C R, Walsh J T, Glucksberg M R, van Duyne R P. *Anal. Chem.*, 2005, 77(19): 6134—6139
- [127] Yonzon C R, Haynes C L, Zhang X, Walsh J T Jr, van Duyne R P. *Anal. Chem.*, 2004, 76(1): 78—85
- [128] Shafer-Peltier K E, Haynes C L, Glucksberg M R, Van Duyne R P. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(2): 588—593
- [129] Ma K, Yuen J M, Shah N C, Walsh J T Jr, Glucksberg M R, van Duyne R P. *Anal. Chem.*, 2011, 83(23): 9146—9152