

文章编号: 1000-7032(2019)03-0317-09

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

沈 颢¹, 佟丽莹¹, 梁照恒¹, 彭 乐¹, 王福艳², 周 骏^{1*}

(1. 宁波大学理学院 微电子科学与工程系, 浙江 宁波 315211;

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

摘要: 以聚苯乙烯(PS)小球为模板,采用金属辅助刻蚀和湿法化学刻蚀技术,制备大面积冠状硅柱阵列,再原位生长银纳米粒子后得到银覆盖冠状硅柱阵列(Ag/Si CPA)基底。实验表明,制备的基底具有优良的表面增强拉曼散射(SERS)特性,电磁增强因子达到 1.81×10^6 。同时,将制备的罗丹明分子(R6G)标记的DNA发卡探针与基底链接,在与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。结果表明,基于(Ag/Si CPA)基底的SERS特性,开展miRNA-106a的检测,具有特异性好和灵敏度高的优势,检测范围为 $1 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测极限为 $0.917 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,与实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(RT-qPCR)方法相比,不仅检测结果一致,而且基于SERS光谱技术的检测方法具有更高的灵敏度。

关键词: 表面增强拉曼散射; 硅柱阵列; 发卡探针; 肿瘤标志物; miRNA

中图分类号: O433.1

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fjxb20194003.0317

Silver-covered Si Corona-pillar Array Substrate: Fabrication, SERS Characteristic Analysis and Detection of Tumor Marker miRNA-106a

FU Hao¹, TONG Li-ying¹, LIANG Zhao-heng¹, PENG Le¹, WANG Fu-yan², ZHOU Jun^{1*}

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

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

* Corresponding Author, E-mail: zhoujun@nbu.edu.cn

Abstract: Polystyrene(PS) spheres were used as a template, and the metal-assisted etching and wet chemical etching techniques were applied to prepare large-area Si corona-pillar arrays, silver nanoparticles were then grown *in-situ* to obtain silver-covered Si corona-pillar array (Ag/Si CPA) substrate. The experimental results show that the prepared substrate has excellent surface enhanced Raman scattering(SERS) characteristics, and its electromagnetic enhancement factor is up to 1.81×10^6 . Meanwhile, the rhodamine molecule(R6G)-labeled DNA hairpin probe was immobilized on the surface of Ag/Si CPA substrate, and SERS signal detection was performed for getting the corresponding dose-response curve after complementary hybridization with various concentration of microRNA-106a. The results demonstrate that the detection of miRNA-106a, based on the SERS characteristic of Ag/Si CPA substrate, exhibits the advantages of specificity and high sensitivity with the limit of detection of $0.917 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in the detection range of $1 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1} - 100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, compared with the real-time fluorescence quantitative polynucleotide chain reaction (RT-qPCR)

收稿日期: 2018-05-01; 修订日期: 2018-08-05

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

Supported by National Natural Science Foundation of China(61320106014,61675104,81501421); K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University

method, not only the detection results are consistent, but the detection method based on SERS spectroscopy has a higher sensitivity.

Key words: surface-enhanced Raman scattering; si pillar array; hairpin probe; tumor marker; miRNA

1 引 言

当前,癌症已严重威胁人类的健康和生命^[1]。大量医学研究表明,癌症的有效预防和及时治疗的关键是能够对癌症进行早期诊断^[2-3]。特别是,肿瘤标志物的发现为开展高通量、高灵敏度的癌症早期筛查和诊断提供了重要手段。例如,前列腺特异抗原(PSA)、甲胎蛋白(AFP)、糖抗原(CEA19-9)分别与前列腺癌、肝癌和胰腺癌有强关联性^[4];促肾上腺皮质激素(ACTH)和绒毛膜促性腺激素(HCG)分别与小细胞肺癌和乳腺癌有强关联性^[5-6];癌基因产物中的微小核糖核酸 miRNA-21 与 miRNA-106a 分别在胃癌与胰腺癌中有过度表达^[7-8]。目前,人们成功发展了多种有效的肿瘤标记物检测技术,如酶联免疫法(ELISA)、化学发光免疫法(CLIA)等已成为常规的临床检测技术^[9]。然而,微小核糖核酸(miRNA)类肿瘤标志物的检测方法,如印迹法^[10]、荧光成像法^[11]和实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(RT-qPCR)^[12]等,由于操作复杂、耗费时间以及检测灵敏度也难以满足肿瘤的早期快速精准检测的需要,目前仅适用于实验室操作。因此,开展新的高灵敏度、高通量的 miRNA 类肿瘤标志物的定性和定量检测技术研究,具有重要意义。

1974年,Fleischmann等在粗糙的银电极表面发现表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)效应,使金属表面吸附分子的拉曼信号产生极大增强^[13]。特别是基于贵金属纳米结构局域表面等离子体共振(LSPR)特性的 SERS 光谱技术,由于其高灵敏、快速和独特的指纹谱特征,可以应用于生物和医学检测,引起了人们极大的关注^[14-15]。例如,Morla-Folch等^[16]利用正电性的精胺包裹银纳米粒子(Ag NPs)吸附负电性的 RNA,进行无标记 SERS 检测和分析 RNA 的分子结构;Güven等^[17]利用金基底与金纳米杆探针,设计了基于 SERS 的直接检测与三明治检测方案,并对肿瘤标志物 miRNA-21 进行检测,其

检测极限分别达到 $0.36 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $0.85 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$;祝一峰等^[18]利用合成的金包裹四氧化三铁磁性纳米粒子基底和二氧化硅包裹金纳米粒子探针,对肿瘤标志物 miRNA-141 进行检测,检测限达到 $1.8 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。然而,尽管 miRNA 是一种特异性好的高表达肿瘤标志物,但由于早期癌症患者血清中的 miRNA 浓度较低以及血清采样后 miRNA 容易降解等因素的影响^[19],应用 SERS 光谱技术开展 miRNA 的精确定量检测仍面临很多挑战。

在我们的工作中,首先应用 Langmuir-Blodgett(L-B)膜法^[20]和金属辅助湿法化学刻蚀法^[21]制备冠状硅柱阵列(Si corona-pillar array, Si CPA),并原位生长 Ag NPs,得到具有优良 SERS 特性的银覆盖冠状硅柱阵列(Ag/Si CPA)基底。然后,制备罗丹明(R6G)标记的 DNA 发卡探针,并将探针固定到 Ag/Si CPA 基底上,进行肿瘤标志物 miRNA-106a 检测。实验结果表明,对 miRNA-106a 的检测不仅具有高灵敏度而且具有高特异性。因此,基于 Ag/Si CPA 基底 SERS 特性开展基因类肿瘤标志物的检测具有良好应用前景。

2 实 验

2.1 试剂与仪器

实验所用试剂均为分析纯:4-巯基苯甲酸(4-MBA)和硝酸银(AgNO_3)购于 Sigma Aldrich 公司;氢氟酸(HF)、硝酸(HNO_3)购于阿拉丁试剂有限公司;聚苯乙烯(PS)小球购于上海辉质生物科技有限公司;RNA 杂交缓冲液(无乙酰胆碱,浓度 $\geq 40\%$)购于北京雷根生物试剂有限公司;TE 缓冲溶液购自苏州泽科生物科技有限公司;R6G 修饰的与 miRNA-106a 完全互补配对的寡核苷酸(R6G-DNA-106a)、miRNA-106a、与 miR-106a 单碱基错配的核酸(U/C-miRNA-106a)以及 miRNA-21 均购自上海杰瑞生物工程有限公司。实验用水是电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 的超纯水。

主要的实验仪器:场发射扫描电子显微镜(SU-70,日本 Hitachi 公司);便携式拉曼光谱仪

(BWS415,美国 B&W Tek 公司);实时荧光定量 PCR 仪(Step One Plus, 美国 ABI 生物系统公司)。

2.2 Ag/Si CPA 基底制备

Ag/Si CPA 基底的制备流程如图 1 所示。制备步骤如下:(1)应用 L-B 膜法在面积为 5 cm × 5 cm 的硅片上平铺一层密堆积 PS 小球作为模板,再分别沉积 1.5 nm 厚的 Ti 膜和 20 nm 厚的 Au 膜,然后将硅片浸入 HF/H₂O₂ (25:2) 溶液,遮光环境下反应 2 min,则在 Ti/Au 金属层催化作用下, HF/H₂O₂ 溶液腐蚀硅片形成硅柱阵列;(2)将硅柱阵列浸入 AgNO₃ (2 mmol · L⁻¹)、HF (2 mol · L⁻¹) 和 HNO₃ (5 mmol · L⁻¹) 组成的混合溶液中,反应 15 min 后取出硅片,用 HNO₃ (10 mmol · L⁻¹) 清洗 2 min,由于硅柱的顶端边缘具有低结晶性,因而顶端边缘最先被刻蚀,如此循环 5 次,最后在硅柱顶端形成 5 层台阶的冠状硅柱阵列;(3)先用 HF (10%) 处理冠状硅柱阵列 10 min,再将其浸入 AgNO₃ (5 mmol · L⁻¹) 溶液中反应 3 min,则在冠状硅柱表面还原生长银纳米粒子层形成 Ag/Si CPA 基底,取出后用超纯水清洗两遍,并

用氮气吹干密封保存备用。

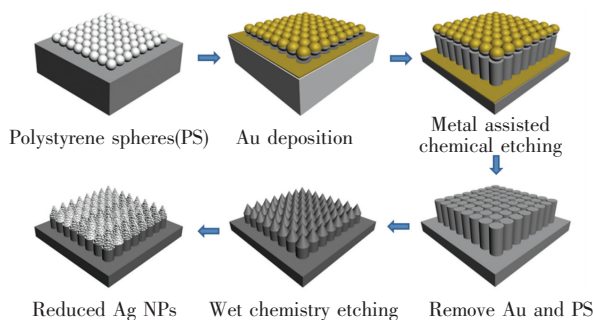


图 1 Ag/Si CPA 基底的制备流程图

Fig. 1 Preparation of Ag NPs/Si CPA substrate

2.3 miRNA-106a 探针制备与链接

采购的 R6G-DNA-106a、miRNA-106a、U/C-miR-106a 和 miRNA-21 的碱基序列如表 1 所示。在 R6G-DNA-106a 中, DNA 的 5' 端修饰 R6G 分子,两个带下划线的碱基序列片段能够互补配对形成发卡状,黑体部分的碱基序列能与 miR-106a 互补配对, DNA 的 3' 端修饰-SH; 在 U/C-miRNA-106a 中,单碱基错配核苷酸中的 C 为胞嘧啶,它与 miR-106a 中的尿嘧啶 U 错配。

表 1 R6G-DNA-106a 与 miRNA 的碱基序列

Tab. 1 Sequences of R6G-DNA-106a and miRNA

名称	序列
R6G-DNA-106a	5'-R6G-GGCGAGGCTACCTGCACTGTAAG CAGTTTTCTCTCGCCAAAAAA-SH-3'
miRNA-106a	5'-AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3'
U/C-miRNA-106a	5'-AAAAGUGCUUACAGCGCAGGUAG-3'
miRNA-21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'

我们首先将 R6G-DNA-106a 溶解在浓度为 10 μmol · L⁻¹ 的 TE 缓冲溶液中,然后取 80 μL 溶液放入水浴锅中加热到 95 °C 并保持 5 min,接着降温到 65 °C 后保持 5 min,再将其放入冰水浴中冷却并保持 20 min,则 R6G-DNA-106a 中的碱基序列片段互补配对形成发卡状结构,即为 miRNA-106a 探针;然后,用 TE 缓冲液将制备的 miRNA-106a 探针溶液的浓度稀释到 1 μmol · L⁻¹,再吸取 200 μL 探针溶液滴入到细胞培养盒的单孔中,每个孔中放入 1 片 1 cm × 1 cm 大小的 Ag/Si CPA 基底,在室温下静置 24 h,使探针与基底链接,再加入 20 μL (1 mol · L⁻¹, pH = 7.4) 的 NaCl 溶液老化处理 3 h,取出基底后用 TE 缓冲液清洗,并

保存在 TE 缓冲液中备用。

2.4 miRNA-106a 的检测

首先,用 RNA 杂交缓冲液按照 10 倍稀释比稀释购置的 miRNA-106a,分别制备浓度为 100 pmol · L⁻¹、10 pmol · L⁻¹、1 pmol · L⁻¹、100 fmol · L⁻¹、10 fmol · L⁻¹、1 fmol · L⁻¹ 的 6 个样品溶液,并从每个样品溶液中取 500 μL 滴入经灭菌处理的细胞培养盒的单孔,接着将链接有探针的基底放入每个单孔中,置于 37 °C 恒温箱中 3 h 后,取出基底依次用 TE 缓冲液和超纯水清洗,随后用氮气吹干进行后续实验。探针的 SERS 光谱测量和 miRNA-106a 的检测过程如图 2 所示。由于基底上链接的 miRNA-106a 探针的碱基序列与待检测的

miRNA-106a 互补杂交, 探针中形成发卡结构的碱基双链会刚性打开, 使 R6G 分子远离基底上的 Ag NPs 层, 导致 R6G 分子的 SERS 信号减弱。待测 miRNA-

106a 样品的浓度越高, 远离基底的 R6G 分子越多, 则检测到的 SERS 信号越弱, 从而 SERS 信号强度与待测样品的浓度呈现负相关表达。

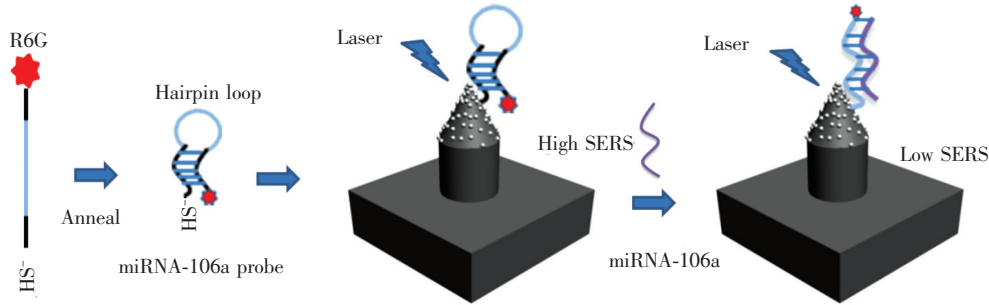


图 2 miRNA-106a 探针的制备与 miRNA-106a 检测示意图

Fig. 2 Preparation of miRNA-106a probe and schematic of detecting miRNA-106a

3 结果与讨论

3.1 硅柱基底的形貌表征与特性分析

实验制备的圆形硅柱阵列与冠状硅柱阵列基底的扫描电镜照片如图 3 所示。由图 3(a) 可见, 圆形硅柱阵列呈有序周期性排列, 硅柱直径为 900 nm, 硅柱高度为 1.2 μm , 硅柱之间的间隙为 350 nm, 硅柱顶端边缘比较粗糙; 在图 3(b)

中, 圆形硅柱阵列经湿法化学刻蚀后即成为冠状硅柱阵列, 硅柱顶端形成光滑的冠状结构, 冠高为 500 nm; 再从图 3(c) 可以发现, 原位生长的 Ag NPs 的平均粒径约 120 nm, 绝大部分覆盖在冠状硅柱的顶端, 硅柱侧面附着的 Ag NPs 较少, 因此制备的 Ag/Si CPA 基底的 SERS 特性主要取决于覆盖在冠状硅柱顶端的银纳米粒子层的性质。

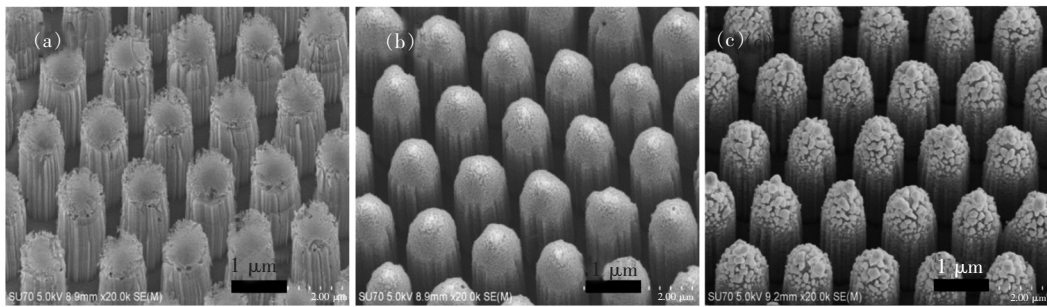


图 3 硅柱阵列(a)、Si CPA(b)与 Ag/Si CPA 基底(c)的扫描电镜图。

Fig. 3 SEM images of Si circular pillar array(a), Si corona-pillar array(b) and Ag/Si CPA substrates(c).

为研究硅柱基底的电磁增强特性, 我们在 785 nm 激光波长、20 mW 激光功率和 10 s 积分时间的实验条件下, 对硅片以及基底位于 520.7 cm^{-1} 处的 Si—Si 键振动的拉曼特征峰进行检测, 结果如图 4 所示。从图 4 看出, 平面硅片的特征峰强度很弱, 而圆形硅柱阵列基底的特征峰强度增大, 冠状硅柱阵列基底的特征峰再度增大, Ag/Si CPA 基底的特征峰强度又进一步增大。分析表明, 硅柱基底的硅特征峰强度增大主要有两个原因^[22]: 一是硅片经刻蚀后形成的硅柱阵列的面积占比减小, 使入射材料的透射光增强, 由漫散射导致的光损失减少; 二是硅柱间隙的陷光特性也

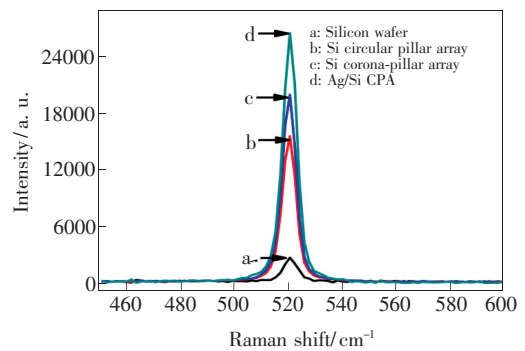


图 4 各种硅基底的 520.7 cm^{-1} 拉曼特征峰

Fig. 4 Raman characteristic peaks of silicon wafer and the substrates at 520.7 cm^{-1}

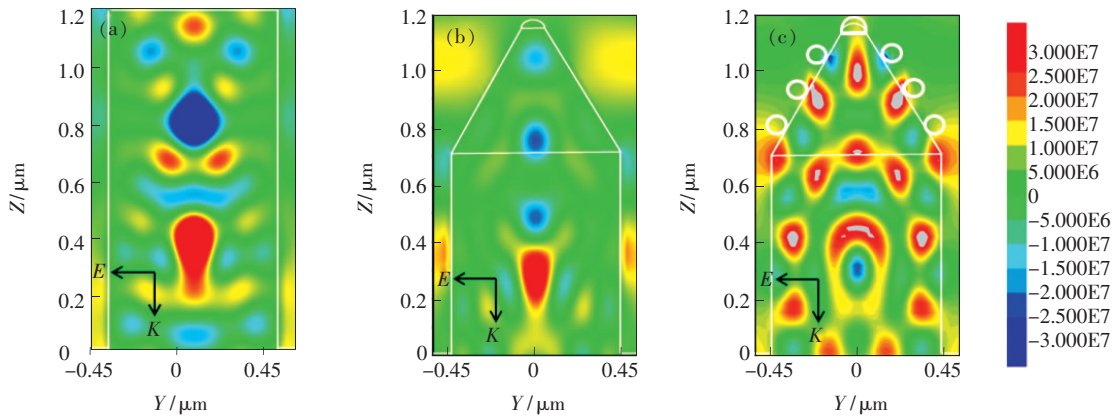


图5 圆形硅柱阵列(a)、冠状硅柱阵列(b)和 Ag/Si CPA 基底(c)的电场分布。

Fig.5 Electric field distribution of the substrates. (a) Si circular pillar array. (b) Si corona-pillar array. (c) Ag/Si CPA.

进一步导致拉曼散射增强。此外,由于 Ag NPs 层的 SERS 效应,从而 Ag/Si CPA 基底的硅特征峰的强度最大。

为阐释上述现象,我们用时域有限差分法(FDTD)进行电场分布计算,结果如图5所示。计算中,入射光波长 $\lambda = 785 \text{ nm}$, 偏振方向沿 x 轴,硅的相对介电常数 $\epsilon_{\text{Si}} = 11.9$,银的复介电常数^[23] $\epsilon_{\text{Ag}} = -28.466857 - 0.36461197i$ 。由图5可见,尽管圆形硅柱阵列与冠状硅柱阵列的最大电场强度几乎相同,但是冠状硅柱的顶端和柱之间的电场强度均大于圆形硅柱相应处的电场强度,特别是 Ag/Si CPA 的硅柱表面电场强度更大。一般而言,拉曼强度与激发电场强度的4次方成正比^[24],所以 Ag/Si CPA 基底具有更好的拉曼增强特性。

3.2 Ag NPs/Si CPA 基底的 SERS 特性分析

为研究 AgNO_3 浓度对 Ag NPs 原位生长的影响,选用结构简单的 4-MBA 分子作为拉曼标记分子表征基底的 SERS 特性。我们在制备的 Ag/Si CPA 基底上滴加 $20 \mu\text{L}$ ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 4-MBA 溶液,对不同 AgNO_3 浓度下制备的 5 种基底进行 SERS 光谱测量,实验条件与前述一致,结果如图6所示。由图6(a)可见,当 AgNO_3 浓度较低时,在基底 1 和 2 的冠状硅柱表面的 Ag NPs 的尺寸较小,相邻间隙较大,产生的 LSPR 热点较少;当 AgNO_3 浓度较高时,基底 4 和 5 的冠状硅柱表面的 Ag NPs 团聚成较大颗粒,间隙减少,LSPR 热点也少;而在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 浓度下制备的基底 3 的冠状硅柱表面,Ag NPs 的尺寸适中、分布均匀、间隙较多,因而 LSPR 热点多,对应的 SERS 效应强。由图6(b)可以直观地看出,与基

底 1~5 相对应的位于 1078 cm^{-1} 与 1590 cm^{-1} 的 4-MBA 的拉曼特征峰强度先增大后减小,而在基底 3 上的 4-MBA 的拉曼特征峰强度最大,具有优良的 SERS 增强特性,因此选定其应用于 miRNA-106a 的检测。

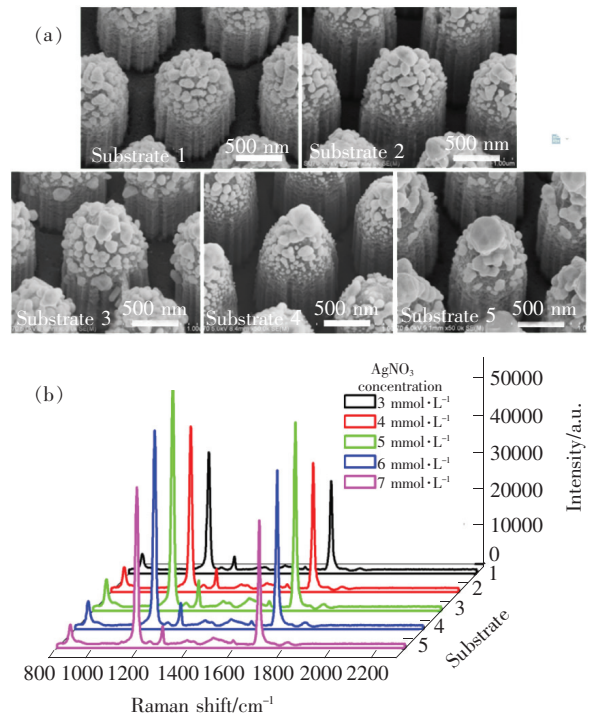


图6 (a) Ag/Si CPA 基底的扫描电镜图,其中基底 1~5 分别对应于 $3, 4, 5, 6, 7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 浓度制备条件;(b) 在 5 种基底上测量的 4-MBA 的 SERS 光谱。

Fig.6 (a) SEM images of Ag/Si CPA substrates 1-5, which correspond to the prepared conditions at $3, 4, 5, 6, 7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of AgNO_3 concentrations, respectively. (b) SERS spectra of 4-MBA on the above 5 substrates.

为表征 Ag/Si CPA 基底的 SERS 增强性能,按照如下公式计算其 SERS 增强因子:

$$F = \frac{\left(\frac{I_{\text{SERS}}}{N_{\text{SERS}}}\right)}{\left(\frac{I_{\text{bulk}}}{N_{\text{bulk}}}\right)}, \quad (1)$$

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_{SERS} 与 N_{bulk} 分别表示在激光照射光斑内吸附在基底和平面硅片上

的 4-MBA 分子数。这里, 计算图 7(a) 中 4-MBA 位于 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 处拉曼峰的积分强度, 得到 $I_{\text{SERS}} = 1.139 \times 10^6$, $I_{\text{bulk}} = 8.491 \times 10^3$; 然后, 根据实验参数(激光光斑直径 $d = 1.473\ \mu\text{m}$ 、激光光斑的有效面积 $A = 0.945\ \mu\text{m}^2$ 、激光穿透深度 $h = 1.86\ \mu\text{m}$ 和 4-MBA 分子所占的面积^[25] $\sigma = 2.0 \times 10^9\ \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$), 计算得到 $N_{\text{bulk}} = 3.817 \times 10^{10}$, $N_{\text{SERS}} = 2.836 \times 10^6$ 。则由公式(1)可得基底 3 的增强因子 $F = 1.81 \times 10^6$ 。此外, 在基底上随机取 25 个测试点, 测量得到 4-MBA 位于 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉曼峰强度如图 7(b) 所示, 各点峰强的相对标准差为 3.17%, 表明基底的均匀性良好。同时, 图 7(c) 给出了链接 4-MBA 的样品基底在间隔一周和一个月后测量的 SERS 光谱, 可见基底具有很好的时间稳定性。

3.3 miRNA-106a 的检测分析

实验中, 将链接 miRNA-106a 探针的 Ag/Si CPA 基底作为初始基底分别浸入不同浓度的 miRNA-106a 样品溶液进行互补杂交处理后, 进行 SERS 光谱测量, 如图 8(a) 所示。由图可见, 在初始基底的 SERS 光谱中, 位于 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 处的 R6G 特征峰强度最大, 而随着样品溶液浓度的增加, 该特征峰强度逐渐减弱, 直到 miRNA-106a 的浓度为 $100\ \text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, R6G 的特征峰仍清晰可辨, 表现出强度与浓度的负相关性。需要指出的是, 对应 DNA 碱基双键伸缩振动模型的拉曼特征峰位于 $1\ 550 \sim 1\ 750\ \text{cm}^{-1}$ 区域, 而实验中 miRNA-106a 探针和待检测的 miRNA-106a 互补杂交形成的 DNA-RNA 双链却没有位于 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征峰, 所以 R6G 的特征峰选择是特异性的^[16,26]。为直观反映 SERS 信号与 miRNA-106a 浓度的关系, 以 miRNA-106a 的浓度 C 为横坐标, 初始基底的背景信号强度 I_0 与样品溶液的检测信号强度 I 的差值为纵坐标, 得到对数坐标下的剂量-响应曲线如图 8(b) 所示。在图中, ΔI_{1650} 与 miRNA-106a 的浓度 C 成正比关系, 其拟合直线方程 $\Delta I = 3914.49556 \times C + 67816.64603$, 相关系数 $R^2 = 0.998\ 04$ 。这表明, 基于 Ag/Si CPA 基底 SERS 特性的 miRNA-106a 的检测具有宽的动态检测范围($1\ \text{fmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 100\ \text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并定义初始基底背景信号强度的 3 倍标准偏差所对应的浓度为检测限, 则得到 miRNA-106a 的检测限低至 $0.917\ \text{fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

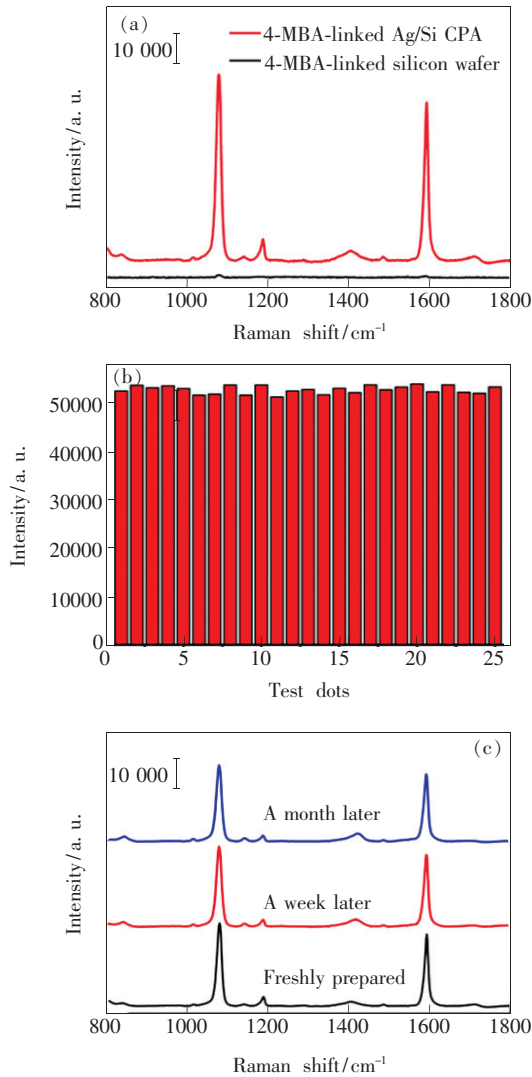


图 7 (a) 由基底 3 测量的 4-MBA 的 SERS 光谱和拉曼光谱; (b) 基底上 25 个点位于 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 的 SERS 峰强度; (c) 基底放置不同时间后测量的 4-MBA 的 SERS 光谱。

Fig. 7 (a) SERS and Raman spectra of 4-MBA on substrate. (b) Intensities of SERS peaks at $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ for 25 spots on the substrate. (c) SERS spectra of 4-MBA-linked Ag/Si CPA substrate at different time intervals.

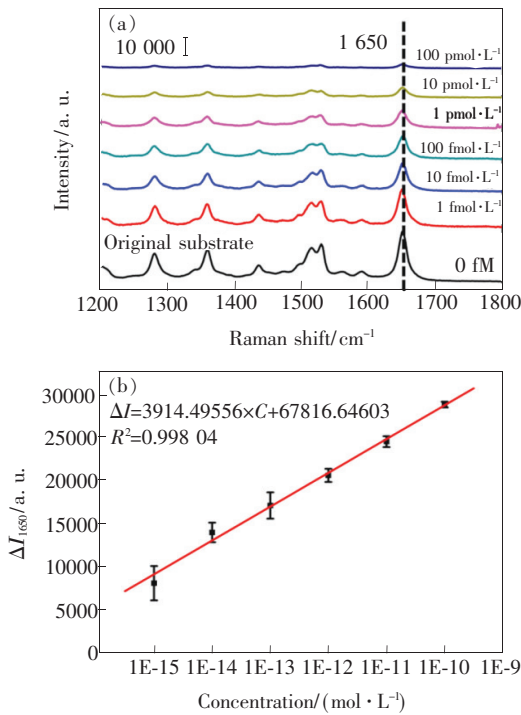


图8 (a) 初始基底与对应不同浓度 miRNA-106a 的 SERS 光谱; (b) 对数坐标下的剂量-强度曲线。

Fig. 8 (a) SERS spectra of original substrate and corresponding to different concentrations of miRNA-106a. (b) Dose intensity curve in logarithmic coordinates.

为验证检测结果的特异性,图9给出了初始基底分别与 miRNA-21、miRNA-106a 单碱基失配核苷酸以及 miRNA-106a 杂交后检测的 SERS 光谱。从图中可见,初始基底经过完全不互补的 miRNA-21 杂交处理后,位于 1650 cm^{-1} 处的 R6G 特征峰强度 I_{1650} 比初始基底的 SERS 信号有较小的减弱 ($\leq 11\%$), 与 miRNA-106a 单碱基错配核苷酸杂交后, I_{1650} 减少了 28%, 而与互补的 miRNA-106a 杂交后, I_{1650} 减少了约 92%。因此,我们的检测结果具有良好的特异性,甚至能在 miRNA 只有一个单碱基突变的情况下也可保证对靶基因的检测。

最后,采用 RT-qPCR 方法对我们提出的 miRNA-106a 检测方法进行可靠性验证。对不同浓度的 miRNA-106a 样本溶液,分别进行 SERS 光谱检测和 RT-qPCR 检测,结果列于表 2 中。从表 2 可以看出,利用链接 miRNA-106a 探针的 Ag/Si CPA 基底对 miRNA-106a 进行检测与由 RT-qPCR 方法

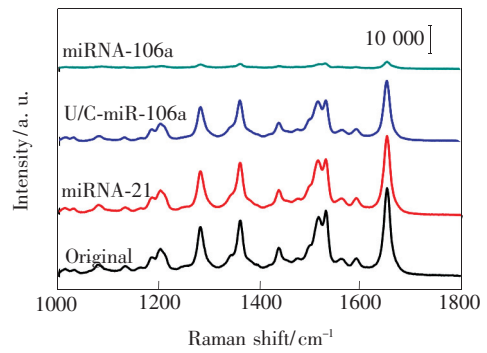


图9 初始基底和分别经 $100\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 miRNA-21、U/C-miR-106a 及 miRNA-106a 杂交处理后测量的 SERS 光谱。

Fig. 9 SERS spectrum of original substrate and SERS spectra of the substrates hybridized with miRNA-21, U/C-miR-106a and miRNA-106a of $100\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

检测的结果基本一致,并且具有更高的检测灵敏度。因此,基于 Ag/Si CPA 基底开展基因型肿瘤标志物 miRNA 的检测具有很好的实用性。

表 2 样品的检测结果

Tab. 2 Detection results of samples

样品	RT-qPCR/ ($\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SERS/ ($\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	相对偏差
1	10 800	9 930	-8.06%
2	776.00	828.09	6.71%
3	266.37	245.23	-7.93%
4	131.37	124.29	-5.39%
5	-	16.99	-
6	-	1.27	-

4 结 论

通过制备 Ag/Si CPA 的基底,研究了不同 AgNO_3 浓度对冠状硅柱阵列 SERS 特性的影响,并采用 miRNA-106a 探针链接的 Ag/Si CPA 基底对 miRNA-106a 进行检测,检测极限达到 $0.917\text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$,呈现出极高的灵敏度和良好的特异性。因此,基于 Ag/Si CPA 基底优良的 SERS 特性,开展基因类肿瘤标志物 miRNA 的检测,对于癌症的早期诊断具有极大的应用潜力。

参 考 文 献:

- [1] KANE M A. Preventing cancer with vaccines: progress in the global control of cancer [J]. *Cancer Prev. Res.*, 2012, 5(1):24-29.
- [2] ROBISON L L, HUDSON M M. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, 14(1):61-70.
- [3] STEWART B W, WILD C P. *World Cancer Report 2014* [M]. Lyon: IARC Nonserial Publication, 2014.
- [4] 李争, 李强, 肖强. 甲胎蛋白、癌胚抗原和糖链抗原 19-9 联合检测诊断消化系统恶性肿瘤的价值分析 [J]. *癌症进展*, 2017, 15(4):432-434.
LI Z, LI Q, XIAO Q. Value of the combination detection of alpha fetal protein, carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 for the diagnosis of malignant tumors of digestive system [J]. *Oncol. Prog.*, 2017, 15(4):432-434. (in Chinese)
- [5] SATOH H, SAITO R, HISATA S, *et al.*. An ectopic ACTH-producing small cell lung carcinoma associated with enhanced corticosteroid biosynthesis in the peritumoral areas of adrenal metastasis [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3):486-490.
- [6] KÖLBL A C, SCHLENK K, BEHRENDT N, *et al.*. The importance of hCG in human endometrial adenocarcinoma and breast cancer [J]. *Int. J. Biol. Markers*, 2018, 33(1):33-39.
- [7] SIMONIAN M, MOSALLAYI M, MIRZAEI H. Circulating miR-21 as novel biomarker in gastric cancer: diagnostic and prognostic biomarker [J]. *J. Cancer Res. Therapeut.*, 2018, 14(2):475.
- [8] LI P, XU Q H, ZHANG D, *et al.*. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer [J]. *FEBS Lett.*, 2014, 588(5):705-712.
- [9] LI L X, CAI B, TAO C M, *et al.*. Performance evaluation of CLIA for *Treponema pallidum* specific antibodies detection in comparison with ELISA [J]. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2016, 30(3):216-222.
- [10] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, *et al.*. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543):853-858.
- [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] 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.
- [13] FLEISCHMANN M, HENDRA P J, MCQUILLAN A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26(2):163-166.
- [14] 陈雷, 刘毛毛, 张永军, 等. SERS 传感器间接检测蛋白质的研究进展 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(10):3094-3098.
CHEN L, LIU M M, ZHANG Y J, *et al.*. Indirect protein detection by versatile SERS sensors [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 2017, 37(10):3094-3098. (in Chinese)
- [15] LI J X, ZHU Z, ZHU B Q, *et al.*. Surface-enhanced Raman scattering active plasmonic nanoparticles with ultrasmall interior nanogap for multiplex quantitative detection and cancer cell imaging [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(15):7828-7836.
- [16] MORLA-FOLCH J, XIE H N, ALVAREZ-PUEBLA R A, *et al.*. Fast optical chemical and structural classification of RNA [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2):2834-2842.
- [17] GUVEN B, DUDAK F C, BOYACI I H, *et al.*. SERS-based direct and sandwich assay methods for mir-21 detection [J]. *Analyst*, 2014, 139(5):1141-1147.
- [18] ZHANG H, FU C P, YI Y, *et al.*. A magnetic-based SERS approach for highly sensitive and reproducible detection of cancer-related serum microRNAs [J]. *Anal. Methods*, 2018, 10(6):624-633.
- [19] 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]. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, 3(1):23743-1-14.
- [20] LIN H, CHEUNG H Y, XIU F, *et al.*. Developing controllable anisotropic wet etching to achieve silicon nanorods, nanopencils and nanocones for efficient photon trapping [J]. *J. Mater. Chem. A*, 2013, 1(34):9942-9946.
- [21] PENG K Q, ZHANG M L, LU A J, *et al.*. Ordered silicon nanowire arrays *via* nanosphere lithography and metal-induced

- etching [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2007,90(16):163123-1-3.
- [22] KUMAR D,SRIVASTAVA S K,SINGH P K,*et al.*. Room temperature growth of wafer-scale silicon nanowire arrays and their Raman characteristics [J]. *J. Nanopart. Res.*, 2010,12(6):2267-2276.
- [23] TANG S W,CHO D J,XU H,*et al.*. Nonlinear responses in optical metamaterials;theory and experiment [J]. *Opt. Express*, 2011,19(19):18283-18293.
- [24] ZHANG L,ZHOU J,JIANG T. Gain-assisted U-shaped au nanostructure for ultrahigh sensitivity single molecule detection by surface-enhanced Raman scattering [J]. *J. Opt.*, 2015,17(12):125003.
- [25] CHEN D,ZHOU J,RIPPA M,*et al.*. Structure-dependent localized surface plasmon resonance characteristics and surface enhanced Raman scattering performances of quasi-periodic nanoarrays;measurements and analysis [J]. *J. Appl. Phys.*, 2015,118(16):163101-1-12.
- [26] BARHOUMI A,ZHANG D M,TAM F,*et al.*. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008,130(16):5523-5529.



湫颢(1992 -),男,安徽芜湖人,硕士研究生,2015年于淮南师范学院获得学士学位,主要从事表面增强拉曼散射及其应用的研究。
E-mail: 15058449909@163.com



周骏(1958 -),男,安徽当涂人,博士,教授,1996年于上海交通大学获得博士学位,主要从事纳米功能材料、光电电子技术和生物光子学等方面的研究。
E-mail: zhoujun@nbu.edu.cn