

表面增强拉曼的机制研究进展及其在生物医学中的应用

王东方^{1,2} 宋世平¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 嘉定园区 上海 201800)

² (中国科学院大学 北京 100049)

摘要 对表面增强拉曼(Surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)的增强机制研究进展, 包括电磁增强机制和化学增强机制, 以及具有高 SERS 活性的 SERS 探针进行综述。这种高活性的 SERS 探针可以用于单分子检测和单细胞成像。为了更好的应用于生物医学领域, SERS 探针需要很好的生物兼容性。SERS 探针能够提供详细的光谱信息, 为多元分子诊断和体内拉曼成像提供了新的研究工具。

关键词 综述, 表面增强拉曼(SERS), 生物应用, SERS 成像, 表面等离子体共振

中图分类号 O657.37, TL65

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.050101

拉曼光谱是一种分子振动光谱, 可以反映分子的结构特征。表面增强拉曼(Surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)是人们在将激光拉曼光谱应用于表面化学研究探索中发现的一种新的表面光学现象。由于 SERS 比普通拉曼的信号要高几个数量级, 近年来得到了快速发展。且与其他分析工具相比, SERS 具有自己独特的优越性: (1) SERS 可以用于研究多种界面分析, 如固-固、固-气和固-液等; (2) SERS 给出的是具有分子水平上的信息, 从而可以实时、原位地探测待测物质, 这使其成为生物分析领域的有力工具。

近十几年来, SERS 的研究取得了一些较大的进展: 一方面, 对 SERS 机制的深入研究让人们更深刻地认识到其增强机制, 对发展新的 SERS 探针具有指导意义; 另一方面, 新技术的发展提高了 SERS 的检测灵敏度, 将其提升为新兴的单分子科学检测手段之一。本文将从 SERS 的机制研究进展以及在生物医学中的应用两方面分别进行综述。

1 表面增强拉曼的原理

根据之前宏观样品的 SERS 研究, 人们认为远距的电磁增强和短距的化学增强是同时起作用的。Kelly 等^[1]讨论了电磁场(Electromagnetic, EM)机制和其远距作用的特点(10-100 nm)。Otto^[2]分析了化

学增强以及对原子表面粗糙程度的依赖性。Tsai 等提出了一种共振分散理论来解释聚集胶体中的表面增强拉曼效应^[3]。EM 来自于小金属颗粒表面等离子体共振的光学激发效应, 这导致了颗粒表面电磁场强度的显著增强。对于化学增强机制, 吸附在颗粒表面特定位置(如原子簇)的分子可以与表面产生电子耦合, 这会产生与共振拉曼散射相似的增强效应。

在单颗粒水平上, Xu 等^[4-6]提出电磁增强的最大的增强因子可以达到 10^{11} 。这种增强来自于两个颗粒之间的间隙或者在尖锐的表面突起以外的地方获得的。Michaels 等^[7]从实验结果说明了单分子 SERS 与表面等离子体共振并不完全相关, 并且 SERS 活性位点很可能位于两个纳米银之间的缝隙。这种非直接的证据表明, 除了 EM 机制, 还有一种化学或者其他非依赖于电磁场效应的机制存在。换句话说, 表面等离子体激发是必须的但还不足够观察到单分子 SERS。EM 机制另一个无法解释的现象是“SERS 闪烁”。这种现象跟荧光发射不连续性非常相似。但是, 一个显著的不同是在许多分子吸附在单颗粒或聚集体上时 SERS 光谱的强度和频率都发生了很大的波动。一种解释的假说认为多分子 SERS 光谱仍然是由吸附在颗粒表面或者两个颗粒之间的单一分子的 SERS 光谱主导。

基金资助: 国家自然科学基金项目(2012CB932600, 2013CB933800)资助

第一作者: 王东方, 男, 1987年3月出生, 2009年7月毕业于大连医科大学, 上海应用物理研究所物理生物学实验室在读博士研究生, E-mail: wangdongfang@sinap.ac.cn

通讯作者: 宋世平, 博士, 研究员, E-mail: songshiping@sinap.ac.cn

收稿日期: 初稿 2014-04-18; 修回 2014-05-12

1.1 SERS 闪烁和摆动

有文献报道在单颗粒和纳米聚集体上发现了不连续表面增强拉曼散射现象(图 1)^[8]。典型的闪烁时间间隔从毫秒到秒不等。最近的研究发现 SERS 闪烁包括了热激活和光诱导两个部分^[8]。许多证据显示这种 SERS 信号的波动是由于热激活分子在颗粒表面的扩散而产生的。利用波长分辨光谱进而发现信号波动来自增强拉曼散射,而不是光致发光或者瑞利散射(图 2)。测量的信号强度包含了拉曼和背景信号在 557–663 nm 的波段的总和。另一个重要的特征是 SERS 光谱包含了很强的背景信

号。这种背景信号并不是 R6G 的荧光而是 SERS 的连续发射信号。在 SERS 闪烁的“Off”阶段,光数量很少,这说明 SERS 信号和背景信号是成正相关的,而且是同时波动的。Michaels 等发现 SERS 强度和背景信号随时间成高度相关^[7, 9-10]。大量的数据统计发现在 0.1 mW 激光激发下, SERS 闪烁的 On-time 大约是 80 ms。另一个有趣的发现是 SERS 光谱摆动现象,就是 SERS 信号会突然改变他们的频率。这种现象首先由 Nie 和 Emory 报道^[11]。他们发现拉曼信号的频率变化可以有 10 cm^{-1} 的改变。

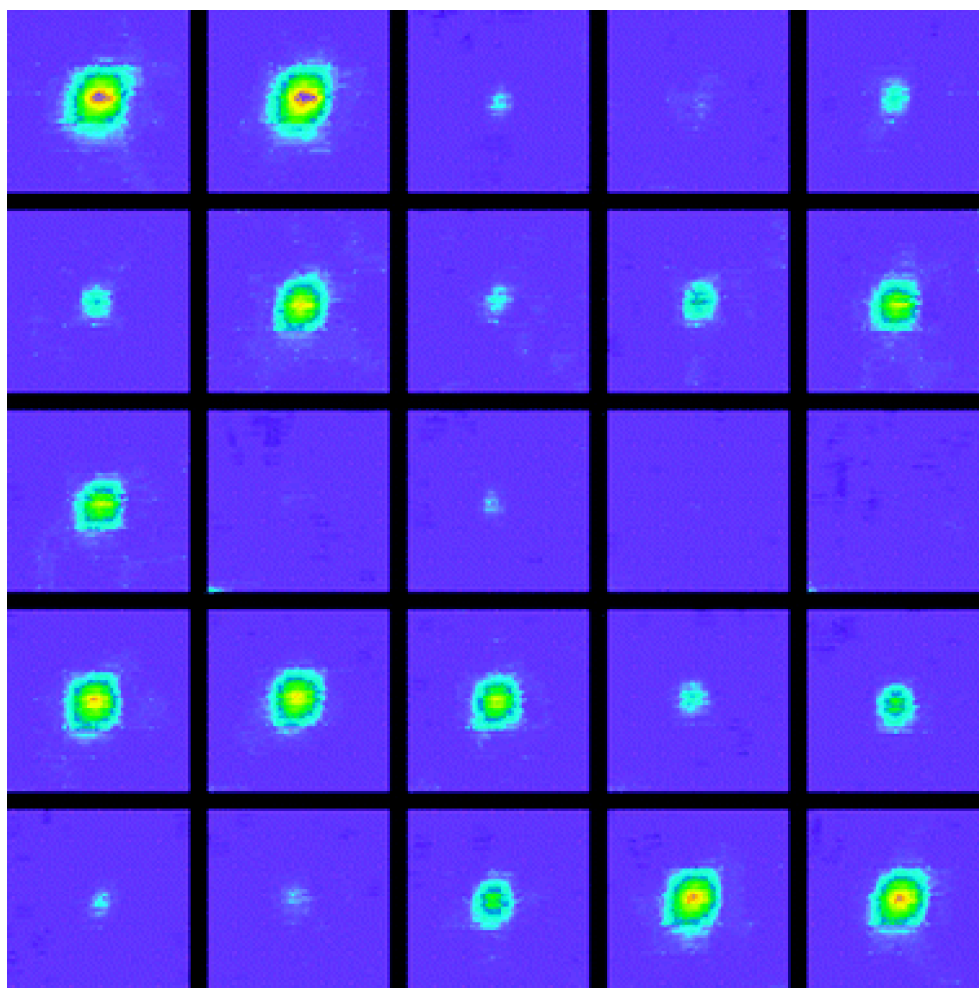


图 1 单个纳米银颗粒的不连续光散射的时间分辨成像: 图像从左到右每隔 100 ms 记录一次; 信号强度由颜色深浅表示; SERS 成像显微镜使用倒置光学显微镜和 100×油浸物镜(N.A. 1.3), CCD 照相机和高速图像采集卡集合而成; 激发波长是 514.5 nm, 光强 10 mW^[8]

Fig.1 Time-lapsed video images of intermittent light emission recorded from a single silver nanoparticle. The images are ordered from left-to-right with an elapsed time of 100 ms between images. The signal intensities are indicated by false colors. SERS video microscopy was accomplished using an inverted optical microscope, coupled with a 100× oil-immersion objective (N.A.1.3), a video-rate intensified CCD camera, and a high-speed frame grabber. Continuous-wave laser excitation at 514.5 nm was provided by an Ar⁺ laser with a total excitation intensity (wide-field) of 10 mW ($130\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)^[8]

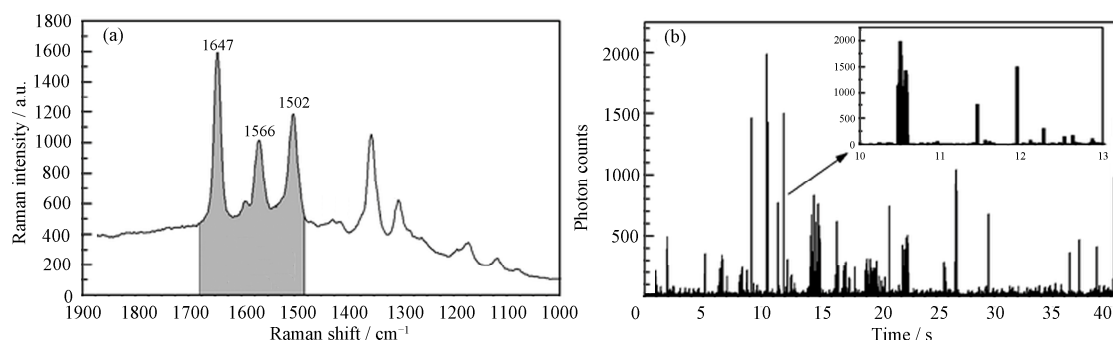


图2 单个银颗粒光散射的时间分辨研究: (a) 514.5 nm 激发光的 R6G SERS 光谱图; (b) 使用 0.1 mW 激光强度, 每秒采集 200 个数据的时间分辨 SERS 信号。灰色部分是使用窄带滤光片选取 1647、1566 和 1502 cm^{-1} 用于分析^[11]

Fig.2 Time-resolved studies of light emission from single Ag nanostructures: (a) SERS spectrum of R6G obtained with 514.5 nm excitation, and (b) time-resolved SERS signals recorded with 0.1 mW laser power at 200 data points s^{-1} . A narrow bandpass filter was used to select the Raman lines at 1647, 1566, and 1502 cm^{-1} respectively for measurement (shaded area)^[11]

SERS 光谱波动的另一个来源是含碳基团和其他光解化合物^[8]。实验过程中需要把单分子 SERS 信号与污染分子的信号区分开来^[12]。有研究发现环境中的氧气在 SERS 闪烁中扮演了重要的角色^[13]。在含氧环境中 SERS 闪烁的频率很快, 波动的幅度更大。其它的理论和实验则认为 SERS 闪烁来自于颗粒本身而不是吸附分子的扩散^[14], 因为在无吸附物的条件下如银粉和气相沉积银膜, 同样观察到了闪烁现象。

1.2 SERS 活性位点

一个关键问题是关于颗粒表面的活性位点的结构和性质。之前的研究发现 SERS 活性位点很可能是吸附原子、原子簇和颗粒尖端^[15-16]。这些位置可以通过共振电荷转移和类似共振拉曼增强方式进行化学增强^[17]。换句话说, 吸附分子和活性位点之间的耦合可以产生新的金属-配体或者配体-金属之间的电荷转移, 这种状态可以用可见光激发。Hildebrandt 等^[18]认为 SERS 活性位点是高亲和性结合位点。为了进一步研究这些 SERS 活性位点, Doering 等^[19]使用了一种整合流动注射和光谱装置来研究吸附分子被其他分子置换现象。在加入卤化物之前, SERS 光谱经常包含很宽的背景和柠檬酸根的微弱信号, 但是没有 R6G 的信号。在加入卤化物之后, 他们发现 R6G 的 SERS 光谱很快替换了柠檬酸根的光谱, R6G 的信号在 10–30 min 中不断增加。这种置换行为是连续的, 最终 SERS 光谱被一种或吸附在活性位点的少量分子信号主导。这些结果也进一步说明, 这些 SERS 活性位点最开始是没有活性的或者被柠檬酸根离子所占据。卤离子在颗

粒表面的吸附可以帮助 R6G 在颗粒表面的吸附, 并且阻碍柠檬酸根离子在活性位点的吸附。

1.3 化学激活和失活

研究 SERS 机制时面临的一个重要困难是将化学增强因素从电磁效应中分离出来。为了解决这一问题, Doering 等^[19]使用了整合流动注射和超灵敏光学成像系统直接研究化学增强。他们的实验系统中胶体银颗粒被固定在微流动装置的玻璃表面, 在固定颗粒表面加入化学试剂就可以实时观察到单颗粒 SERS 信号。这种单颗粒原位表面等离子体散射研究发现在经过化学处理后, 单颗粒的电磁性质并未改变。因此观察到的 SERS 光谱变化应该主要来自于化学增强。他们的实验数据表明 3 种卤离子 (Cl^- 、 Br^- 和 I^-) 有显著的 SERS 激活效应, 而其他离子, 如柠檬酸根、硫酸根和氟化物则对单颗粒 SERS 信号几乎无影响。然而, 他们发现硫代硫酸根离子则会使 SERS 信号完全消失。在对颗粒处理卤离子和硫代硫酸根处理 25 min 后 (图 3), 未产生任何表面等离子体散射的变化。因为表面等离子体散射可以用于测量单个和多个颗粒的电磁场性质, 因而他们认为这种观察到的激活/失活效应主要来自于颗粒表面的原子尺度的改变, 而不是大尺度的颗粒电磁场性质改变。进一步的波长分辨实验表明, 单颗粒等离子体散射可以引起散射光谱小的改变 (5–10 nm), 但是这种小的位移不太可能引起电磁增强发生大的变化。事实上, 之前的研究显示表面等离子体光谱通常很宽, 而单分子 SERS 与表面等离子体散射并不直接相关。

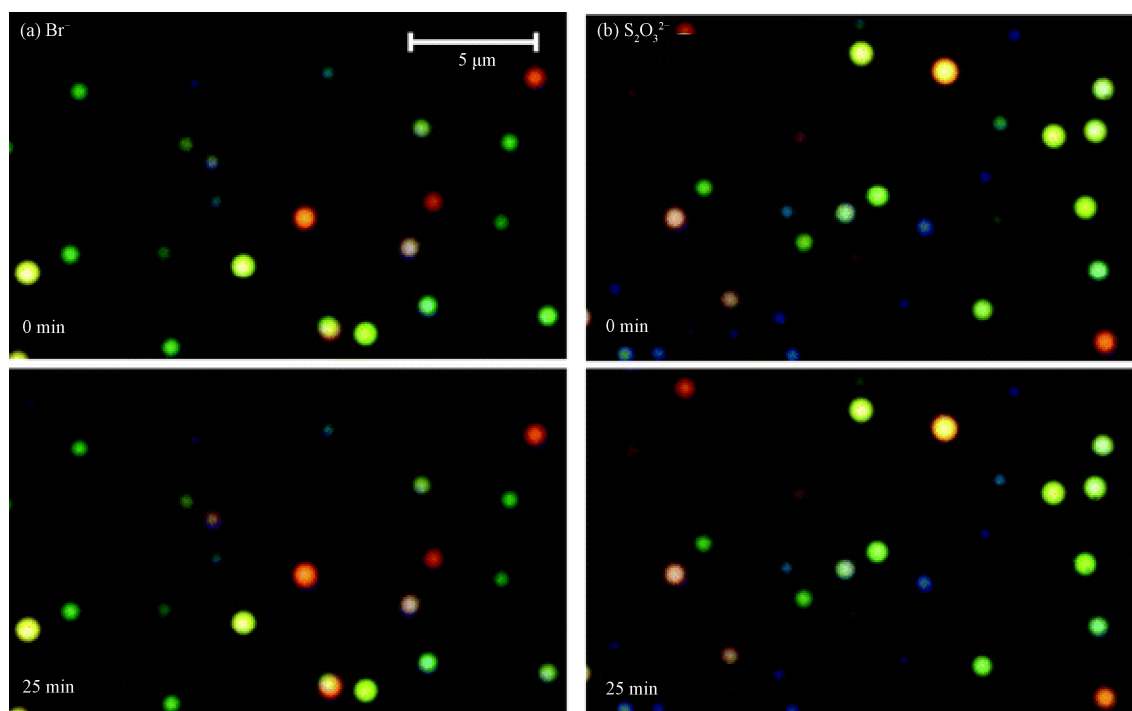


图3 固定单颗粒在化学处理前后的表面等离子体散射结果: (a) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化物处理前后的颗粒散射图; (b) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫代硫酸盐处理前后的颗粒散射图^[19]

Fig.3 Surface plasmon resonance scattering images of single immobilized nanoparticles: (a) particle scattering images before and after treatment with $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bromide; (b) particle scattering images before and after treatment with $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ thiosulfate^[19]

1.4 单颗粒和多颗粒的 SERS 比较

为了比较单个颗粒和小聚集体之间的 SERS 活性, Khan 等^[20]核对了 SERS 活性位点是否跟表面缺陷或者颗粒间隙有相关性。不过结果显示, 高 SERS 活性跟表面性质没有显著相关性。另外, 他们也发现有些固定的单颗粒与 Dimers 和 Trimers 的平均 SERS 强度相似, 但这些信号强度比那些大聚集体的信号低 3~4 倍。但是单颗粒的 SERS 信号重复性更好, 而且具有更窄的光闪烁时间间隔。尽管理论预测单个纳米颗粒周围的电磁场强度没有两个颗粒之间的 Nano-gap 的强, 但每个颗粒可以吸附大量的分子。当单个颗粒表面吸附了单层拉曼分子时, 其 SERS 信号就达到最大值。

当分子定位在两个靠近的纳米金纳米缝隙中时, 可以使 SERS 信号得到极大增强^[21-23]。然而, 事实上, 很难制造出这种 Dimer 或 Trimer, 可以让分析物非常精确地定位在 Nano-gap 里。并且, 金属纳米颗粒是被周围的电子云包围, 他们可以通过静电排斥阻止其他颗粒靠近。这种静电排斥可以被强电解质减弱, 但这样经常会引起不可控的颗粒聚集和沉淀。一个可行的办法是加入高分子或表面活性

剂提供空间位阻, 因而阻止纳米金的直接接触。Chen 等^[21]制备了 Au@Ag 的 Dimer 和 Trimer 结构, 他们发现 dimer 的 SERS 效果是单颗粒的 16 倍, 而 trimer 是单颗粒的 87 倍。Lee^[24]进一步研究了 Dimer 之间的距离跟 SERS 效应的关系, 发现当 Dimer 之间的 gap 达到 1 nm 以下时, 增强因子可以达到 10^{13} 。

2 表面增强拉曼探针的制备

纳米技术的发展给 SERS 技术的发展带来了新的活力。第一代 SERS 探针是由 Porter 等^[25]制备, 他们使用拉曼分子和定位配体在金属纳米颗粒上共吸附的方式。然而, 这种方式的一个很大局限性就是这些纳米探针由于没有跟外界的环境隔绝, 容易发生光谱变化和胶体聚集。为了解决这个问题, 许多实验室使用了各种各样的包裹策略^[26-30]。聚二乙烯基包裹的 SERS 探针可以很好的保护探针^[26], 但对于生物偶联需要二次修饰, 并且这种微米级的尺寸不太适合做细胞内的分子检测。二氧化硅修饰的探针是在纳米级的, 也适合生物分子共组装。图 4 显示了制备二氧化硅包裹的 SERS 探针步骤和 TEM 结果图。这种核-壳结构的 SERS 探针包含了 3 种关

键组分：金属核心用于光学增强，报告分子用于光谱分析，二氧化硅壳用于保护和生物偶联^[27]。这种设计成为 SERS 探针生物分析应用的基础模式，并可免受外界环境的干扰。完整的二氧化硅包裹可以

增强 SERS 探针在高电解质下的稳定性。但是一个缺点就是这种二氧化硅包裹的颗粒容易非特异吸附蛋白和细胞表面^[25]。二氧化硅包裹技术需要拉曼分子带有巯基或者异硫氰酸酯用于表面吸附^[27]。

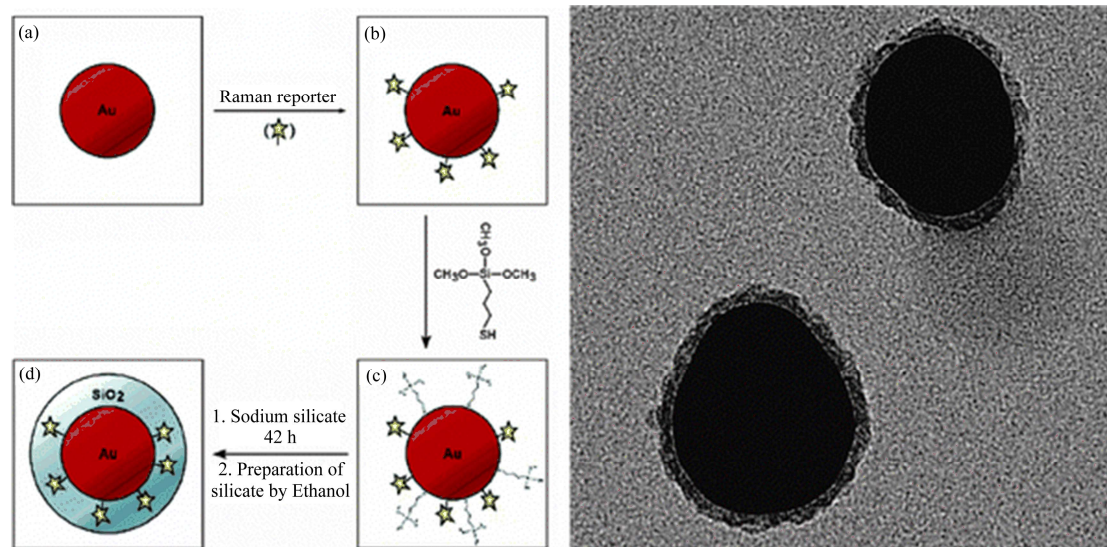


图 4 核-壳结构的纳米颗粒示意图和制备二氧化硅包被的 SERS 活性探针：(a)55–65 nm 的纳米颗粒；(b)吸附拉曼分子的纳米金颗粒；(c)吸附了拉曼分子和巯基化合物修饰的纳米金颗粒；(d)二氧化硅包被的 SERS 探针^[27]

Fig.4 Schematic illustration of the core-shell nanoparticle structure and the procedure for preparing silica-coated SERS-active gold colloids: (a) colloidal gold particles in the size range of 55–65 nm; (b) gold particles with an adsorbed Raman reporter; (c) gold particles with both the reporter and mercaptopropyltrimethoxysilane (a common coupling agent); and (d) silica-coated gold particles with a Raman spectroscopic reporter embedded at the core-shell boundary^[27]

Qian 等^[31]设计了一种新的 SERS 探针可以解决以上面临的问题。PEG 修饰的 SERS 探针由 3 个部分组成：60 nm 的柠檬酸保护的纳米金，拉曼分子和 PEG-SH(5000 MW) (图 5)。UV-Vis 吸收，TEM，DSL 测量显示在纳米金溶液中加入 MGITC 后没有明显的聚集。加入少量的 MGITC 没有改变纳米金在 533 nm 的等离子体共振峰，但假如 SH-PEG 后有 1 nm 的红移。PEG-SH 保护的纳米金颗粒具有很小的非特异性吸附和可忽略的细胞毒性。另外，使用不同修饰的 PEG 可以偶联多种生物配体分子^[32]。PEG-SH 修饰纳米金颗粒可以使用非巯基拉曼分子结合在纳米金上，同时却可以阻止溶液里的其他分子接近纳米金表面。与二氧化硅包裹不同的是。PEG-SH 包裹并不会将吸附的非巯基拉曼分子置换掉。根据对多种拉曼分子如 Crystal Violet、Nile Blue、Basic Fuchsin 和 Crysyl Violet 关于 Perchlorate 的研究显示，这些非巯基的染料跟 PEG-SH 可以很好的兼容。事实上，使用 Crystal Violet 的 SERS 探针可以稳定超过 11 个月。研究中使用的染料都是带

正电荷的，并包含多个 π 键。这说明很多种类的有机分子可以作为拉曼分子用于 PEG-SH 包裹的 SERS 探针。为了将 SERS 探针用于多元检测和成像，需要筛选出不同的拉曼分子，由于拉曼分子拉曼峰有时会重叠，对多元检测造成困难。Wang 合成了一种有机物-纳米金-量子点的复合纳米 SERS 探针^[33]，这种探针可以进行 SERS 和荧光的双重生物标记，进而可以用于生物标记物的生物条形码分析，增强了多元检测能力。

3 表面增强拉曼在生物分析中的应用

在过去的十几年中，研究者在 SERS 用于超灵敏检测生物分子方面投入了极大的兴趣，如血红蛋白、葡萄糖、肿瘤基因、病原体、生物毒素和病毒检测。SERS 是一种近场探针，对周围的环境很敏感。几个研究小组的成果表明如果在金属纳米颗粒或者核壳结构的颗粒表面修饰上 pH 敏感的 SERS 探针分子，SERS 可以作为一种 pH 纳米探针用于细胞内或者细胞外检测^[34-35]。总体来说，在 SERS 应

用方面现在有两种类型的工作：第一种类型是使用单分子 SERS 用于单一分析物如 DNA 碱基对和单个血红蛋白的指纹图谱分析，这里，待分析分子被放置在单个颗粒的 Hot spot 位置或者是纳米颗粒的聚集处；第二种类型是从纳米颗粒表面覆盖的单层

分子上获得的 SERS 图谱，这种图谱可以得到明确频率和带宽的宏观数据。如果胶体纳米粒子和分析物不受外界环境的影响，那么得到的 SERS 图谱强度和重复性都是可控的。这种设计在复杂的细胞样品或者全血分析中有强大的优势。

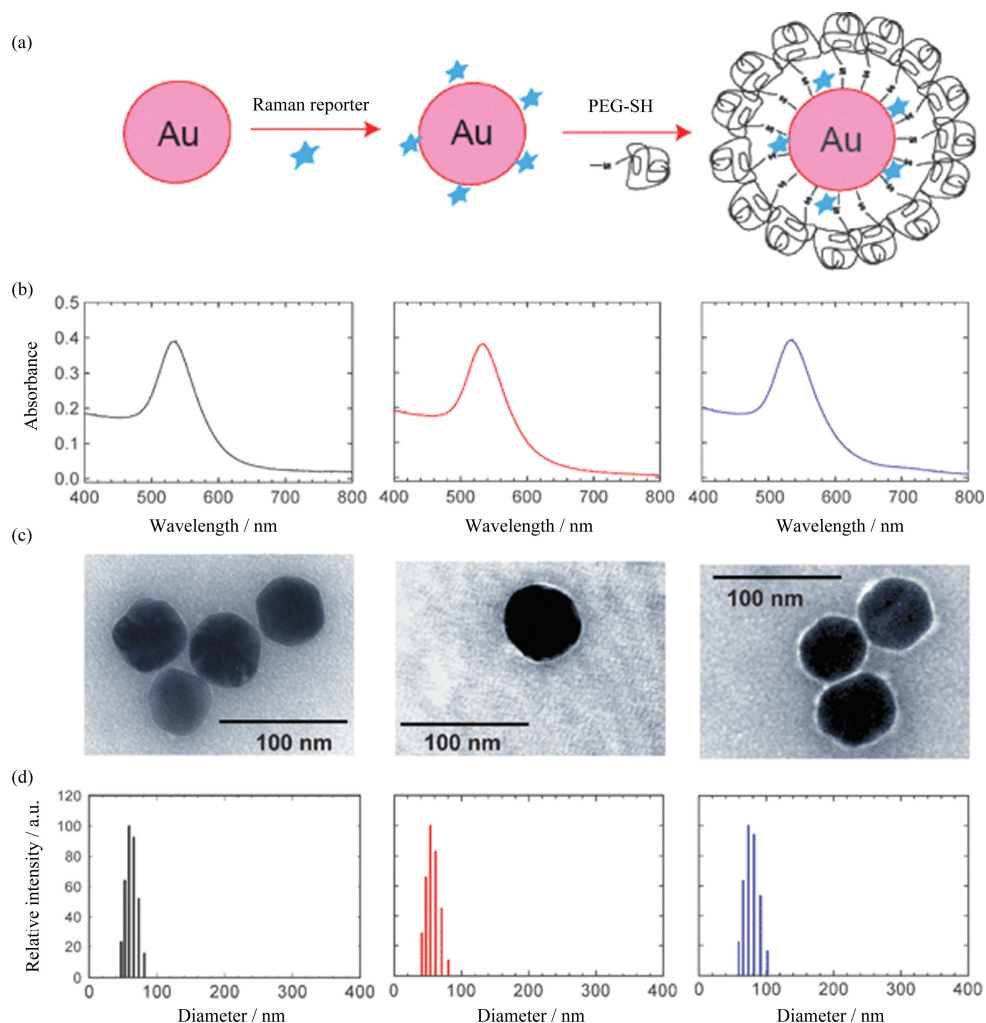


图5 PEG-SH 包裹的 SERS 探针的设计和表征：(a)SERS 探针组装示意图：Au 纳米颗粒（左），Au-MGITC 复合物（中），Au-MGITC-PEG-SH 探针（右）；(b) UV-Vis 吸收图谱；(c)TEM 图；(d) SERS 探针的 DLS 大小分布图^[31]

Fig.5 Design and characterization of PEG-SH coated SERS nanotags: (a) schematic illustration of tag assembly: Au nanoparticles (left), Au-MGITC complex (middle), Au-MGITC-PEG-SH tag (right); (b) UV-Vis absorption spectra; (c) TEM images, and (d) DLS size distributions of each assembly state^[31]

3.1 生物标记物检测

Jin 等^[36]以多种拉曼分子修饰的纳米金为 SERS 探针设计了一种多元 SERS 检测平台。每种 SERS 探针对应一种 DNA 检测分子，并使用银沉积增强 SERS 信号，实现了多种 DNA 分子的同时检测。Kang 等^[37]设计了一种 Particle-on-wire 的 SERS 传感器用于 DNA 的多元检测。在纳米线与纳米颗粒之

间形成的 Nano gaps 里 Hot spots 可以显著增强 SERS 活性，实现了多种病毒 DNA 分子的检测。Souza 等^[38]最近的工作使用了 SERS 探针实现了细胞内特定生物分子的定位检测。他们使用 Au-噬菌体-咪唑复合物用于标记溶液里的细胞。但是噬菌体本身有很高的 SERS 背景信号，降低了实验的信噪比，而且探针光谱容易发生变化。Huang 等^[39]证明

了抗体标记的金纳米棒作为癌细胞诊断探针，这种探针使用 CTAB 作为 SERS 的拉曼分子。他们将金纳米棒修饰上聚苯乙烯磺酸钠来稳定溶胶体系，将纳米棒的表面电荷从负电荷变成正电荷。Hu 等^[40]将氰基团偶联在拉曼分子上以此来区分其他分子的振动峰。Yu 等^[41]将纳米银结合上荧光染料，可实现细胞和组织的 SERS 和荧光的双重成像。

3.2 单细胞分子成像

偶联生物分子的 SERS 纳米探针已经用于识别肿瘤细胞上的蛋白标记物^[31]。对肿瘤细胞检测来说，可使用 SH-PEG (~85%) 和 SH-PEG-COOH (~15%) 的混合物来制备可定位纳米金颗粒。双修饰的 PEG 可以共价结合 ScFv 抗体上，ScFv 抗体可

以与表皮生长因子特异性结合^[42]。人头部和颈部肿瘤细胞(Tu686)都是 EGFR 阳性的（每个细胞有 10^4 – 10^5 个受体）^[43]，可以用 SERS 方法检测到。相反，人非小细胞肺癌则不表达 EGF 受体，不能显示出 SERS 信号。人们使用一种近红外染料(DTTC)用作光谱探针用于 785 nm 的表面增强共振拉曼。这种共振增强不会引起光漂白，因为这种吸附染料将有效能量转移到金属颗粒而免于光降解。这种共振效应可进一步将 SERS 效果提高 10–100 倍（图 6）。这种灵敏度足够用于单个癌细胞的拉曼分析。EGFR 是 EGF 抗体的特异靶标，也是蛋白激酶疗法的重要蛋白，因此单细胞 SERS 分析检测 EGFR 对临床诊断有重要意义^[44-45]。

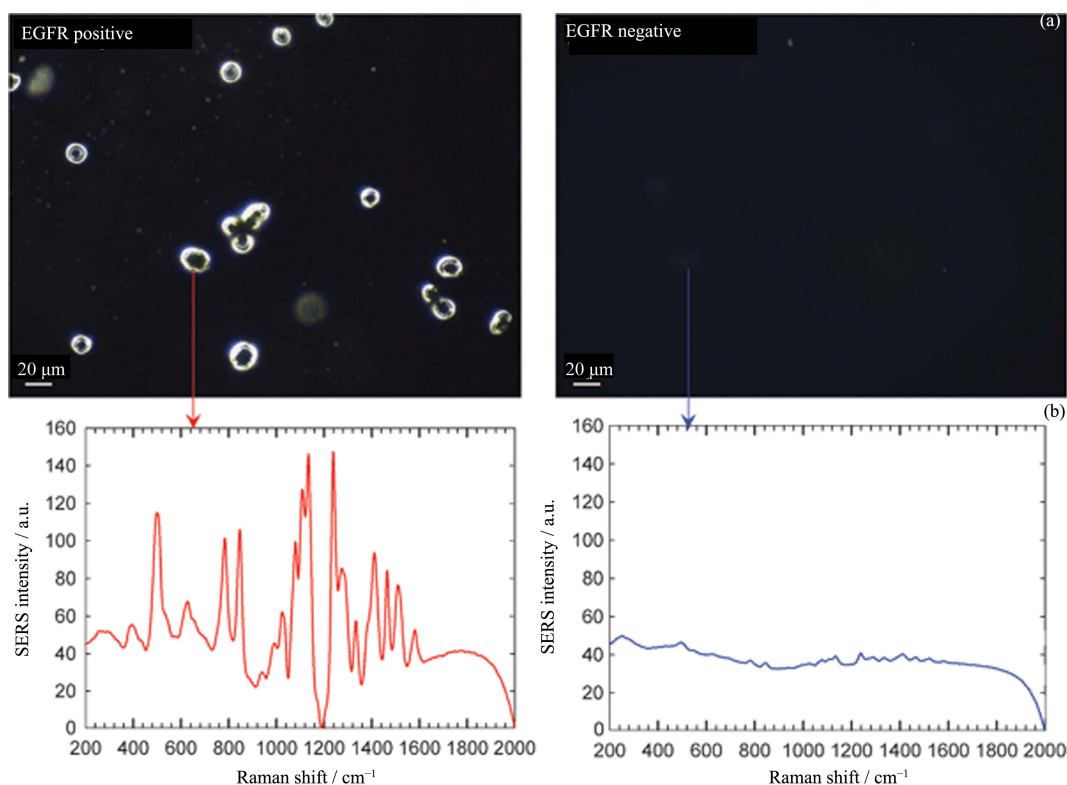


图 6 单个癌细胞的 SERS 光谱和相关表面等离子成像：(a)Tu686 细胞（EGFR 阳性）和 H520 细胞(EGFR 阴性)的反射模式的暗场图像；(b)单个细胞的 SERS 光谱。拉曼分子是 DTTC^[31]

Fig.6 SERS Spectra and correlated surface plasmon imaging of single cancer cells: (a) reflective mode dark-field images of live Tu686 cells (EGFR positive) and H520 cells (EGFR negative), and (b) SERS spectra obtained from single cells as indicated by arrows. The Raman reporter dye is diethylthiatricarbocyanine (DTTC)^[31]

3.3 体内肿瘤定位和检测

为了确定在动物组织中能否从 PEG 修饰的纳米金颗粒上得到 SERS 图谱，Qian 等^[31]在活体动物皮下组织和深层肌肉组织注入小量的 SERS 探针。

结果表明可以同时也在皮下组织和深层肌肉组织得到高度可辨 SERS 信号。尽管由体内得到的信号强度减少了 1–2 个数量级，但得到的 SERS 图谱与体外的图谱一致。由于实验的信噪比很高，可以估算对于体内 SERS 肿瘤检测可以探测的深度是 1–2 cm。

为了实现体内肿瘤定位和成像, 偶联了 ScFv 抗体的纳米金颗粒通过尾静脉注射进入肿瘤小鼠体内。图 7 中显示了注射 SERS 探针 5 h 后的 SERS 图谱。使用 785 nm 的激光照射了肿瘤和非肿瘤部位。可以看出在肿瘤部位可定位 SERS 探针与非可定位 SERS 探针的 SERS 图谱有明显的差距, 然而对于非肿瘤区的 SERS 信号则很相似。结果说明了 ScFv 抗体偶联的纳米金颗粒可以定位 EGFR 阳性的肿瘤组织中。时间分辨的 SERS 数据进一步表明了 SERS 探针在进入小鼠体内 4–6 h 是逐渐积累的, 并且大

多数的探针保留在肿瘤组织超过了 24 h。

在生物体系研究方面, SERS 可以直接用于分析水相生物分子的结构状态研究且所需样品用量少。将 SERS 技术用于生物研究的先驱是 Koglin^[46]、Nabiev^[47]和 Cotton^[48]等。此后, 大量的研究工作证实了这一技术能够解决生物化学, 生物物理和分子生物学中的很多问题, 如蛋白质, 核酸及其组分等的分析与鉴别, 生物分子的某些基团与界面的相互作用研究, 生物分子与金属表面的键合方式等。

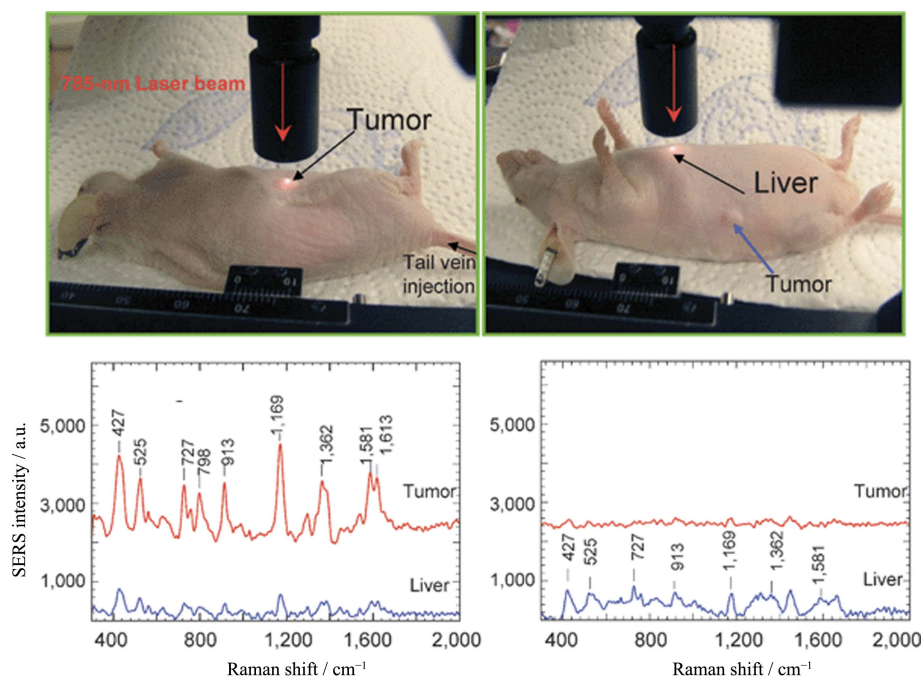


图 7 细胞内肿瘤定位和可以识别肿瘤标记物 EGFR 的 ScFv 抗体偶联的纳米金用于 SERS 检测。Top: 图像显示激光照射到肿瘤位置和非肿瘤位置。Lower: 使用可定位和非定位的纳米金颗粒从肿瘤组织和肝组织获得的 SERS 图谱^[31]

Fig.7 *In vivo* cancer targeting and surface-enhanced Raman detection by using ScFv-antibody conjugated gold nanoparticles that recognize the tumor biomarker EGFR: (a) photographs showing a laser beam focusing to the tumor site or to the anatomical location of liver and (b) SERS spectra obtained from the tumor and the liver locations by using targeted and nontargeted nanoparticles^[31]

4 结束语

本文讨论了 SERS 的基本原理和增强机制, 重点介绍了基于 SERS 的生物医学应用, 并探讨了 SERS 的细胞成像、活体成像等领域的研究进展。SERS 成像作为一种快捷、高效、无损、高灵敏度的检测手段, 在生物医学、药物、食品检测等领域展现了巨大的应用潜力, 特别是在生物医学领域的细胞成像、肿瘤识别等方面的研究更具有重要价值。同时, SERS 成像也面临一些问题, 如每个像元的积分时间过长、SERS 探针的制备困难等等。目前

开展的工作仍处于临床前研究阶段, 要实现 SERS 成像技术在肿瘤疾病临床诊断上的实际应用还需要各个不同学科领域的研究者加强沟通与合作。

参考文献

- 1 Kelly K L, Coronado E, Zhao L L, *et al.* The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**(3): 668-677.
- 2 Otto A. What is observed in single molecule SERS, and why? [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2002, **33**(8): 593-598.

- 3 Tsai D P, Kovacs J, Wang Z, *et al.* Photon scanning tunneling microscopy images of optical excitations of fractal metal colloid clusters [J]. *Physical Review Letters*, 1994, **72**(26): 4149-4152.
- 4 Xu H X, Bjerneld E J, Kall M, *et al.* Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering [J]. *Physical Review Letters*, 1999, **83**(21): 4357-4360.
- 5 Bjerneld E J, Johansson P, Käll M. Single Molecule Vibrational Fine-structure of Tyrosine Adsorbed on Ag Nano-Crystals [J]. *Single Molecules*, 2000, **1**(3): 239-248.
- 6 Xu H X, Aizpurua J, Kall M, *et al.* Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering [J]. *Physical Review E*, 2000, **62**(3): 4318-4324.
- 7 Michaels, A M, Nirmal M, Brus L E. Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**(43): 9932-9939.
- 8 Emory S R, Jensen R A, Wenda T, *et al.* Re-examining the origins of spectral blinking in single-molecule and single-nanoparticle SERS [J]. *Faraday Discussions*, 2006, **132**: 249-259.
- 9 Michaels A M, Jiang J, Brus L. Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single Rhodamine 6G molecules [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, **104**(50): 11965-11971.
- 10 Bosnick K A, Jiang J, Brus L E. Fluctuations and local symmetry in single-molecule rhodamine 6G Raman scattering on silver nanocrystal aggregates [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**(33): 8096-8099.
- 11 Nie S M, Emery S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, **275**(5303): 1102-1106.
- 12 Domke K F, Pettinger B. Comment on "Scanning-probe Raman spectroscopy with single-molecule sensitivity" [J]. *Physical Review B*, 2007, **75**(23).
- 13 Kudelski A. Role of O₂ in inducing intensive fluctuations of surface-enhanced Raman scattering spectra [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**(25): 12610-12615.
- 14 Andersen P C, Jacobson M L, Rowlen K L. Flashy silver nanoparticles [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, **108**(7): 2148-2153.
- 15 Lombardi J R, Birke R L, Lu T H, *et al.* Charge-transfer theory of surface enhanced Raman-spectroscopy-Herzberg-teller contributions [J]. *Journal of Chemical Physics*, 1986, **84**(8): 4174-4180.
- 16 Kambhampati P, Child C M, Campion A. On the role of charge-transfer resonances in the chemical mechanism of surface-enhanced Raman scattering [J]. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 1996, **92**(23): 4775-4780.
- 17 Otto A, Bruckbauer A, Chen Y X. On the chloride activation in SERS and single molecule SERS [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2003, **661**: 501-514.
- 18 Hildebrandt P, Stockburger M. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1984, **88**(24): 5935-5944.
- 19 Doering W E, Nie S M. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: Examining the roles of surface active sites and chemical enhancement [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**(2): 311-317.
- 20 Khan I, Cunningham D, Littleford R E, *et al.* From micro to nano: Analysis of surface-enhanced resonance Raman spectroscopy active sites *via* multiscale correlations [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**(1): 224-230.
- 21 Chen G, Wang Y, Yang M, *et al.* Measuring ensemble-averaged surface-enhanced Raman scattering in the hotspots of colloidal nanoparticle dimers and trimers [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**(11): 3644-3645.
- 22 Ye J, Wen F, Sobhani H, *et al.* Plasmonic nanoclusters: near field properties of the Fano resonance interrogated with SERS [J]. *Nano Letters*, 2012, **12**(3): 1660-1667.
- 23 Qian X, Zhou X, Nie S. Surface-enhanced Raman nanoparticle beacons based on bioconjugated gold nanocrystals and long range plasmonic coupling [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**(45): 14934-14935.
- 24 Lee J H, Nam J M, Jeon K S, *et al.* Tuning and maximizing the single-molecule surface-enhanced Raman scattering from DNA-tethered nanodumbbells [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(11): 9574-9584.
- 25 Ni J, Lipert R J, Dawson G B, *et al.* Immunoassay readout method using extrinsic Raman labels adsorbed on immunogold colloids [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, **71**(21): 4903-4908.
- 26 McCabe, A F, Eliasson C, Prasath R A, *et al.* SERRS labelled beads for multiplex detection [J]. *Faraday Discussions*, 2006, **132**: 303-308.
- 27 Doering W E, Nie S M. Spectroscopic tags using

- dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**(22): 6171-6176.
- 28 Mulvaney S P, Musick M D, Keating C D, *et al.* Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering [J]. *Langmuir*, 2003, **19**(11): 4784-4790.
- 29 Kaufmann S, Tanaka M. Cell adhesion onto highly curved surfaces: one-step immobilization of human erythrocyte membranes on silica beads [J]. *Chemphyschem*, 2003, **4**(7): 699-704.
- 30 Wuelfing W P, Gross S M, Miles D T, *et al.* Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**(48): 12696-12697.
- 31 Qian X, Peng X H, Ansari D O, *et al.* *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(1): 83-90.
- 32 Hirsch L R, Jackson J B, Lee A, *et al.* A whole blood immunoassay using gold nanoshells [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**(10): 2377-2381.
- 33 Wang Z, Zong S, Li W, *et al.* SERS-fluorescence joint spectral encoding using organic-metal-QD hybrid nanoparticles with a huge encoding capacity for high-throughput biodetection: putting theory into practice [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(6): 2993-3000.
- 34 Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, *et al.* One- and two-photon excited optical pH probing for cells using surface-enhanced Raman and hyper-Raman nanosensors [J]. *Nano Letters*, 2007, **7**(9): 2819-2823.
- 35 Bishnoi S W, Rozell C J, Levin C S, *et al.* All-optical nanoscale pH meter [J]. *Nano Letters*, 2006, **6**(8): 1687-1692.
- 36 Jin R, Cao Y C, Thaxton C S, *et al.* Glass-Bead-Based Parallel Detection of DNA Using Composite Raman Labels [J]. *Small*, 2006, **2**(3): 375-380.
- 37 Kang T, Yoo S M, Yoon I, *et al.* Patterned multiplex pathogen DNA detection by Au particle-on-wire SERS sensor [J]. *Nano Letters*, 2010, **10**(4): 1189-1193.
- 38 Souza G R, Christianson D R, Staquicini F I, *et al.* Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(5): 1215-1220.
- 39 Huang X, El-Sayed, I H, Qian W, *et al.* Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: A potential cancer diagnostic marker [J]. *Nano Letters*, 2007, **7**(6): 1591-1597.
- 40 Hu Q, Tay L L, Noestheden M, *et al.* Mammalian cell surface imaging with nitrile-functionalized nanoprobe: Biophysical characterization of aggregation and polarization anisotropy in SERS imaging [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**(1): 14-15.
- 41 Yu K N, Lee S-M, Han J Y, *et al.* Multiplex targeting, tracking, and imaging of apoptosis by fluorescent surface enhanced raman spectroscopic dots [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, **18**(4): 1155-1162.
- 42 Herbst R S, Shin, D M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors - A new paradigm for cancer therapy [J]. *Cancer*, 2002, **94**(5): 1593-1611.
- 43 Reuter C W M, Morgan M A, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signaling in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. *British Journal of Cancer*, 2007, **96**(3): 408-416.
- 44 Paez J G, Janne P A, Lee J C, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, **304**(5676): 1497-1500.
- 45 Lynch T J, Bell D W, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, **350**(21): 2129-2139.
- 46 Koglin E, Sequaris J M. Surface enhanced Raman scattering of biomolecules [J]. *Topics in Current Chemistry*, 1986, **134**: 1-57.
- 47 Nabiev I R, Efremov R G, Chumanov G D. Surface-enhanced Raman scattering and its application to the study of biological molecules [J]. *Soviet Physics Uspekhi*, 1988, **31**(3): 241-262.
- 48 Cotton T M, Kim J H, Chumanov G D. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to biological-systems [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1991, **22**(12): 729-742.

Review on the mechanism of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and its biomedical application

WANG Dongfang^{1,2} SONG Shiping¹

¹(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Jiading Campus,
Shanghai 201800, China)

(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT The fundamental mechanism of SERS (Surface enhanced Raman spectroscopy), such as electromagnetic and chemical effect, as well as the synthesis of SERS tags with high enhancement, which will be applied in single molecule detection and single cell imaging, were discussed. For applications, SERS nanoparticle tags have been developed based on the use of embedded reporter molecules and a silica or polymer encapsulation layer. The SERS nanoparticle tags are capable of providing detailed spectroscopic information. These properties have raised new opportunities for multiplexed molecular diagnosis and *in vivo* Raman spectroscopy and imaging.

KEYWORDS Review, Surface enhanced Raman spectroscopy(SERS), Biomedical application, SERS imaging, Surface plasmon resonance

CLC O657.37, TL65