

• 研究论文 •

空间稳定的 SERS 标记金纳米棒探针用于免疫检测

卢军军^a 郭红燕^b 王维钰^a 潘建高^a 胡家文^{*,a}

(^a 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室和化学化工学院 长沙 410082)

(^b 中国科学院合肥智能机械研究所 合肥 230031)

摘要 报道了空间稳定的表面增强拉曼散射(SERS)标记的金纳米棒探针在免疫检测方面的应用. 该探针是将拉曼活性分子 4-巯基苯甲酸和生物亲和性高分子 α -巯基- ω -羧基聚乙二醇共吸附于金纳米棒表面而制得. 其中, 聚乙二醇高分子链为探针提供保护作用 and 空间稳定, 使之可以耐受较苛性的条件; 其端位的羧基与抗体等靶向实体结合, 从而赋予探针检测识别功能. 当探针检测待测抗原时(通过固体基底上的捕获抗体、待测抗原和探针上的抗体之间的特异性结合, 形成经典“三明治”夹心结构), 探针上 4-巯基苯甲酸的 SERS 信号就能示踪出这种识别. 该探针对于单组分抗原的检出浓度能低至 $1 \times 10^{-9} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

关键词 4-巯基苯甲酸; 金纳米棒; α -巯基- ω -羧基聚乙二醇; 免疫检测; 表面增强拉曼散射

Sterically Stabilized, Surface-Enhanced Raman Scattering-Tagged Gold Nanorod Probes for Immunoassay

Lu, Junjun^a Guo, Hongyan^b Wang, Weiyu^a Pan, Jiango^a Hu, Jiawen^{*,a}

(^a State Key Laboratory for Chemo/Biosensing and Chemometrics and College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

(^b Institute of Intelligent Machines, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract The immunoassay application of sterically stabilized, surface-enhanced Raman scattering (SERS)-tagged Au nanorod (NR) probes was reported. The probes were prepared by coadsorbing Raman-active molecule 4-mercaptobenzoic acid and biocompatible α -mercapto- ω -carboxyl polyethylene glycol onto the surfaces of Au NRs. The long PEG chain provides both protection and steric stabilization to the probes so that they are able to survive in adverse condition; meanwhile, its terminal carboxyl group binds target entity such as antibody, which imparts detection/recognition functionality to the probes. When the probe recognizes antigen (through the classical “sandwich” structure that was formed due to the highly binding specificity among capture antibody on a solid substrate, detected antigen, and antibody on the probe), the recognition is signaled by the SERS signals of the 4-mercaptobenzoic acid. The detection limit of the Au NR probes, for a single component antigen, was as low as $1 \times 10^{-9} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Keywords 4-mercaptobenzoic acid; gold nanorod; α -mercapto- ω -carboxyl polyethylene glycol; immunoassay; surface-enhanced Raman scattering

标记免疫分析是将标记示踪技术的高灵敏性和抗体与抗原反应的特异性相结合的分析方法. 已有的免疫

分析方法包括酶免疫分析、化学发光免疫分析、放射免疫分析、荧光免疫分析、电化学免疫分析等^[1~5]. 其中,

* E-mail: jwhu@hnu.edu.cn

Received May 31, 2011; revised August 16, 2011; accepted September 26, 2011.

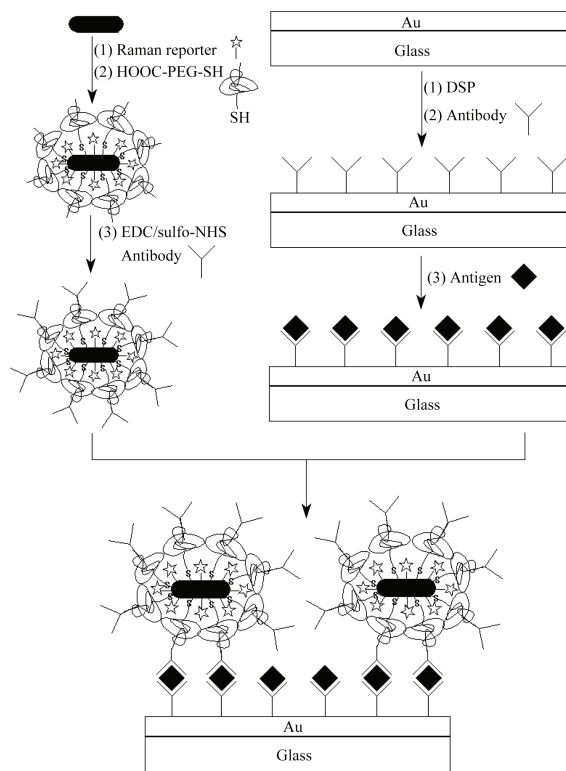
Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20603008, 20873037, and J0830415) and Open Project of State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials (Jilin University) (No. SKLSSM200902).

国家自然科学基金(Nos. 20603008, 20873037 和 J0830415)和吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室开放课题(No. SKLSSM200902)资助项目.

荧光免疫分析具有无污染性和灵敏度高等特点, 是最为成熟和普及的标记免疫分析技术^[6]. 但是, 荧光谱峰较宽, 易淬灭; 这些缺陷在一定程度上限制了荧光免疫分析的应用^[7].

表面增强拉曼散射(SERS)可将拉曼活性分子的拉曼信号放大 10^6 到 10^{14} 倍, 具有极高的灵敏度. 同时, SERS 谱峰比荧光谱峰窄 10 到 100 倍, 而且 SERS 不存在光漂白和淬灭现象^[7]. 因而, 基于 SERS 的免疫检测已引起了人们越来越多的关注^[8~13]. 最初发展的是无修饰层保护的 SERS 标记纳米探针, 即将拉曼标记分子和功能识别分子共吸附在金等纳米粒子上^[14,15]. 用于生物分析的纳米探针往往要在较复杂的环境下使用, 因而应具备水溶性、生物亲和性和高稳定性等特点^[16,17]. 为此, 纳米探针逐渐向有修饰层保护方向发展. 常见的修饰层为 SiO_2 ^[7,18] 和高分子^[19,20]. 和无修饰层保护的纳米探针相比, SiO_2 和高分子自身的水溶性和生物亲和性可赋予纳米探针所需的水溶性和生物亲和性. 其次, 修饰层可保护探针信号免受外界干扰. 如防止拉曼标记分子自探针表面脱落、阻挡杂质分子向探针表面吸附, 从而提高 SERS 信号的稳定性和光谱纯度. 第三, 对高分子修饰而言, 其化学成分和功能的多样性可赋予探针表面成分和功能丰富的可调控性. 而且, 高分子修饰能为纳米探针提供空间稳定性, 使之能耐受复杂环境^[21]. 所谓空间稳定是指由粒子上的高分子链重叠产生的“空间斥力”来抵抗粒子间的范德华吸引力, 使粒子保持稳定. 它在本质上来源于高分子链之间的相互作用, 而不是粒子之间的电荷斥力. 因而空间稳定的纳米探针不易受溶液中酸、碱和盐等的干扰, 可以耐受较苛性的条件^[21].

我们曾报道过无修饰层保护的 SERS 标记金纳米棒探针用于免疫检测^[11]. 这里, 我们进一步制备了空间稳定的 SERS 标记金纳米棒探针, 并用其进行 SERS 免疫检测. 图式 1 给出了该探针制备的方法和 SERS 免疫检测的原理示意图. 该探针和无修饰层保护的金纳米棒探针的区别是: 功能识别抗体不再直接和金纳米棒相连, 而是通过 α -巯基- ω -羧基聚乙二醇(HS-PEG-COOH, $M_w=5000$)连接到金纳米棒上. 如前所述, 引入 PEG 长链可为探针提供水溶性和生物亲和性^[22], 并能提供保护作用 and 空间稳定性. 这一方面提高了纳米探针对复杂条件(如生理环境)的耐受性; 另一方面, 能避免探针团聚产生的“假阳性”信号. 探针团聚后, 粒子之间的耦合会产生强 SERS 信号^[23]. 由图式 1 可知, SERS 检测的基本原理是利用 SERS 信号强度来示踪和指示待测物质. 待测物质浓度越高, 通过其组装到基底上的探针数目就越多, SERS 信号就越强. 如果探针不稳定, 在制备、纯化和使用中出现聚集, 那么检测到的 SERS 信号



图式 1 空间稳定的 SERS 标记金纳米棒探针用于免疫检测示意图

Scheme 1 Schematic illustration of the immunoassay of sterically stabilized, SERS-tagged gold nanorod probes

强度一部分来自探针数目的多寡, 另一部分来自探针的聚集. 而后者与待测物浓度无关, 是“假阳性”信号, 导致检测到的浓度偏高. 因而, 空间稳定的纳米探针能更真实地检测待测物质浓度高低. 以同一免疫检测体系做比较, 空间稳定的 SERS 标记金纳米棒探针的检测限能达到 1 pg/mL , 优于或至少相当于我们曾报道的无修饰层保护的金纳米棒探针的检测能力(10 pg/mL)^[11]. 以往报道的 SERS 免疫检测限为 $0.1 \sim 10 \text{ ng/mL}$ ^[9,13,24], 少数能达到 $1 \sim 10 \text{ pg/mL}$ ^[25].

1 实验部分

1.1 实验试剂

4-巯基苯甲酸(MBA)、3,3'-二硫代二丙酸(99%)和 *N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)购自 Aldrich 公司. *N,N'*-二环己基碳酰亚胺(DCC)、*N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 HS-PEG-COOH ($M_w=5000$)均为分析纯, 分别购自上海共价化学科技有限公司、阿拉丁试剂有限公司、Alfa Aesar 和 Laysan Bio 公司. 羊抗鼠 IgG、小鼠 IgG、牛血清蛋白(BSA)和 PBS 缓冲液(pH=7.4)购自北京鼎国生物试剂有限责任公司. 玻璃镀金基底由中国科学院安徽光

学精密机械研究所提供. 为防止镀金层在水溶液中脱落, 玻璃基底上预先真空镀上一薄层铬, 再镀金层. 实验用超纯水先经禹之神公司 YZS-RO-S50 超纯水机纯化, 再经二次蒸馏所得.

1.2 SERS 标记金纳米棒免疫探针的制备

纵向表面等离子体共振(SPR)在 630 nm 的金纳米棒按我们以前报道的方法合成^[11,26]. 该合成方案由 Murphy 课题组发展的种子生长法改进而来^[27]. 将制备好的金纳米棒离心(10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 12 min)洗涤两次, 再重新分散于超纯水中备用. 取 1 mL 上述金纳米棒, 向其中加入 5 μL $1.0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MBA, 反应 4 h, 让 MBA 充分吸附到金纳米棒上. 再向其中加入 5 μL $5\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HS-PEG-COOH 溶液, 室温反应 2 h, 让其充分吸附到金纳米棒剩余的空位上. 将其离心洗涤两次(13000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 以除掉溶液中未吸附的 HS-PEG-COOH, 再将沉于离心管底部的金纳米棒稀释到 0.5 mL. 向上述溶液中依次加入 10 μL $1\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC 和 10 μL $2\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sulfo-NHS, 在室温下搅拌反应 15 min, 以活化 PEG 链端位的羧基. 然后加入 10 μL $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 羊抗鼠 IgG, 先在室温下反应 2 h, 接着在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h, 从而将抗体连接到 PEG 链端位的羧基上. 由此制得空间稳定的 SERS 标记金纳米棒免疫探针, 也即完成了用 SERS 信号标记抗体. 最后, 将所制得的免疫探针离心清洗两次(13000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分散于超纯水中备用.

1.3 捕获抗体在金基底上的组装

3,3'-二硫代二丙酸丁二酰亚胺酯(DSP)按我们以前报道的方法合成^[11], 配制成 $1\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丙酮溶液. 玻璃镀金基底依次在超纯水、乙醇、丙酮、氯仿、丙酮、乙醇和超纯水中分别超声洗涤 5 min, 氮气吹干后放入 DSP 的丙酮溶液中, 室温下浸泡 12 h. 取出基底后, 用丙酮洗去表面未吸附的 DSP. 将 DSP 修饰的基底放入 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的羊抗鼠 IgG 的 PBS 缓冲液中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h, 将捕获抗体固定在金基底上. 用 PBS 充分洗去基底表面未吸附的羊抗鼠 IgG, 再将基底浸入 2% 的 BSA 溶液中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h, 以封闭基底表面的剩余空位, 减少基底对探针的非特异性吸附. 最后, 用大量的 PBS 缓冲液冲洗基底, 将基底保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 缓冲液中备用.

1.4 捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构的组装

将固定上捕获抗体的金基底从 PBS 缓冲液中取出, 氮气吹干. 再将其浸入 400 μL 待测抗原小鼠 IgG 的 PBS(pH=7.4)缓冲液中. 室温下静置 4 h, 让捕获抗体和

待测抗原充分反应结合. 反应完毕, 用大量 PBS 缓冲液洗去基底上未结合的抗原, 再用超纯水冲洗, 最后氮气吹干. 然后将基底浸入到金纳米棒免疫探针溶液中, 室温反应 4 h, 将免疫探针组装到固体基底上. 用超纯水充分洗去未结合的探针, 将基底用氮气吹干备用. 改变溶液中抗原的浓度, 制备出一系列的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构.

1.5 实验仪器

紫外-可见光谱在 UV-1800 型(岛津)紫外-可见光谱仪上测试. 金纳米棒的形貌表征在 JEM-1230 型(JEOL 公司)透射电镜(TEM)上进行. 玻璃镀金基底及“三明治”结构表面形貌表征在 JSM-6700 型扫描电子显微镜(SEM)上进行. SERS 光谱在 LabRam HR 型(法国 Jobin Yvon 公司)共聚焦显微拉曼光谱仪上采集. 激发波长为 632.8 nm, 所有光谱均为一次 10 s 积分时间采集.

2 结果与讨论

2.1 金纳米棒免疫探针的表征和稳定性研究

各向异性的金纳米棒有两个 SPR 吸收峰: 位于 520 nm 处的横向 SPR 和位于长波长处的纵向 SPR. 其中横向 SPR 的位置相对固定, 纵向 SPR 的位置随纳米棒的长径比不同可在可见至近红外区间调控^[26,27]. 金纳米棒的这个光学特点使得人们可以调控其 SPR 位置, 使之和激发光耦合, 以优化 SERS 增强. 我们的计算表明: 长径比为 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 和 5.0 的金纳米棒(直径 12 nm)的电磁场增强分别为 2.0×10^3 , 1.4×10^4 , 9.6×10^5 , 1.5×10^4 , 1.5×10^2 和 3.9×10^{12} ^[26]. 长径比为 2.5 的金纳米棒增强能力最好, 因为其纵向 SPR 位于 630 nm (见图 2), 和 632.8 nm 的激发光耦合. 因而, 我们选择该长径比的金纳米棒来制备探针, 以提高探针的检测灵敏度. 图 1a 是按种子生长法制备的金纳米棒的 TEM 图. 从 TEM 图可以看到, 其中只有少数粒子是球形, 大多数粒子为棒状. 通过电感耦合等离子体测出金纳米棒溶胶中金元素的含量, 按 TEM 结果把金纳米棒近似成两端覆盖为半球形的圆柱体, 计算出棒的浓度约为 1.013×10^{12} 个/mL. 单个拉曼标记分子 MBA 的面积约为 20 \AA^2 ^[28], 并假设加入的 MBA 全部吸附在金纳米棒上. 据此计算出占据金纳米棒表面积约 60% 所需的 MBA 量, 以留出 40% 的空位来吸附 PEG. 加入的 PEG 的量为空位可吸附量的 20 倍, 让 PEG 充分占据金纳米棒表面的空位. 这既减少了基底对探针的非特异性吸附, 也为后续的抗体修饰提供了足够的官能团. 图 1b 是同时修饰了 MBA 和 HS-PEG-COOH 的金纳米棒的负染色 TEM 图. 经 PEG 修饰后, TEM 图中金纳米棒间距增大、分散得更均匀.

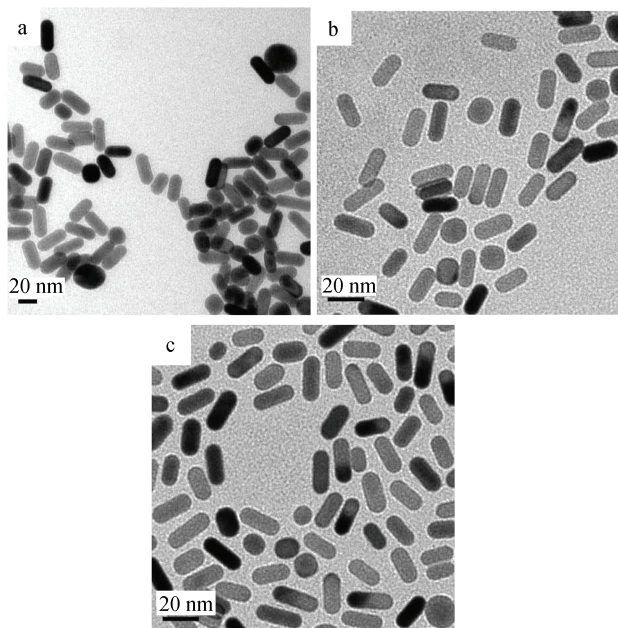


图 1 (a) 纯态金纳米棒的 TEM 图、(b) MBA & HS-PEG-COOH 修饰和 (c) MBA & HS-PEG-goat anti-mouse IgG 修饰的金纳米棒的负染色 TEM 图

Figure 1 TEM image of (a) pure Au nanorods and negative staining TEM images of (b) MBA & HS-PEG-COOH functionalized and (c) MBA & HS-PEG-goat anti-mouse IgG functionalized Au nanorods

同时, 在金纳米棒周围有一层较浅颜色的修饰层, 说明 PEG 已成功连接到金纳米棒上. PEG 上的羧基经水溶性的 EDC 和 sulfo-NHS 活化后^[29], 和羊抗鼠 IgG 抗体上的氨基反应, 从而将抗体连接到 PEG 上, 制得最终的金纳米棒免疫探针. 在此过程中, MBA 分子上的羧基也有可能被活化而连接上抗体蛋白. 但 PEG 链相对 MBA 要长得多, 抗体和 MBA 的羧基反应存在较大的空间位阻, 所以不会连接到 MBA 上. 图 1c 是金纳米棒免疫探针的负染色 TEM 图. 同样, 在探针周围可看到较浅颜色的修饰层.

图 2 是经 MBA 和 HS-PEG-COOH 修饰的金纳米棒在盐、酸性和碱性溶液中的紫外-可见光谱图. 向溶胶中加入盐、调节其 pH 值会部分稀释溶胶, 这会导致光谱的吸收强度有不同程度降低. 除此以外, 光谱的形状和位置与其在纯水中相比没有明显的变化. 因而, PEG 修饰后的金纳米棒在较苛性的条件下仍很稳定, 没有团聚. 如前言所述, 这是由于 PEG 链为探针提供了空间稳定性, 使之能耐受较苛性的环境条件. 为了尽量避免探针团聚产生的“假阳性”信号, 我们用紫外-可见吸收光谱来监测纳米探针的制备过程. 图 3 中光谱 a 为纯态金纳米棒的紫外-可见吸收光谱, 光谱 b 和 c 分别是 MBA 修饰和 MBA 及 HS-PEG-COOH 共吸附修饰的金纳米棒

的紫外-可见吸收光谱. 可以看到, 随着修饰物不同, 金纳米棒周围的介电环境改变导致其纵向 SPR 逐渐红移. 在长波长方向没有出现新的吸收峰, 说明金纳米棒探针在制备过程中没有团聚. 当探针连接上抗体后, 其紫外-可见光谱和纯态金纳米棒的光谱特征仍然类似(光谱 d). 因而, 最终制得的金纳米棒免疫探针具有很好的分散性, 可以用于后面的免疫检测.

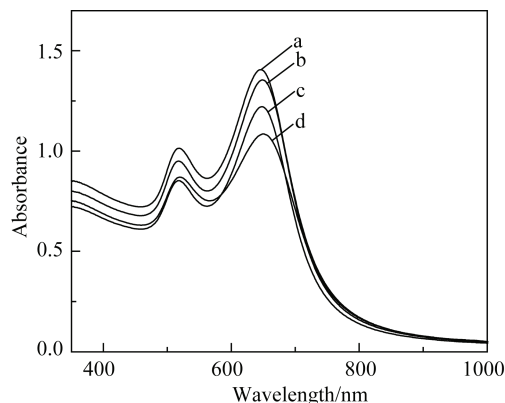


图 2 MBA & HS-PEG-COOH 修饰的金纳米棒在(a) 中性, (b) 1.5 mol/L KNO₃, (c) pH=1.0 (H₂SO₄ 调节)和(d) pH=13.2 (NaOH 调节)水溶液中的紫外-可见吸收光谱

Figure 2 UV-Vis spectra of MBA & HS-PEG-COOH functionalized Au nanorods in (a) neutral, (b) 1.5 mol/L KNO₃, (c) pH=1.0 (adjusted by H₂SO₄) and (d) pH=13.2 (adjusted by NaOH) aqueous solutions

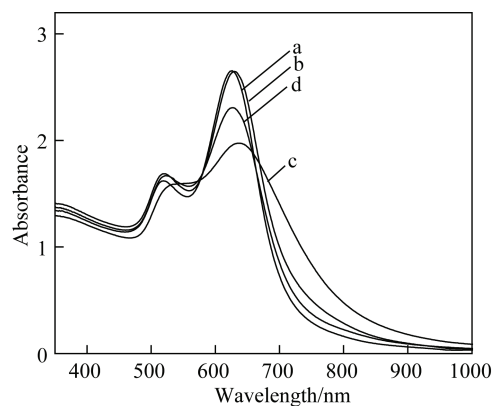


图 3 (a) 纯态金纳米棒, (b) MBA, (c) MBA & HS-PEG-COOH 和(d) MBA & HS-PEG-goat anti-mouse IgG 修饰的金纳米棒的紫外-可见吸收光谱

Figure 3 UV-Vis spectrum of (a) pure Au nanorods and UV-Vis spectra of (b) MBA, (c) MBA & HS-PEG-COOH and (d) MBA & HS-PEG-goat anti-mouse IgG functionalized Au nanorods

2.2 捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构的表征

图 4a 和 4b 分别是空白的基底和先修饰上 DSP 再连接抗体后的基底的 SEM 图. DSP 的二硫键和金反应断

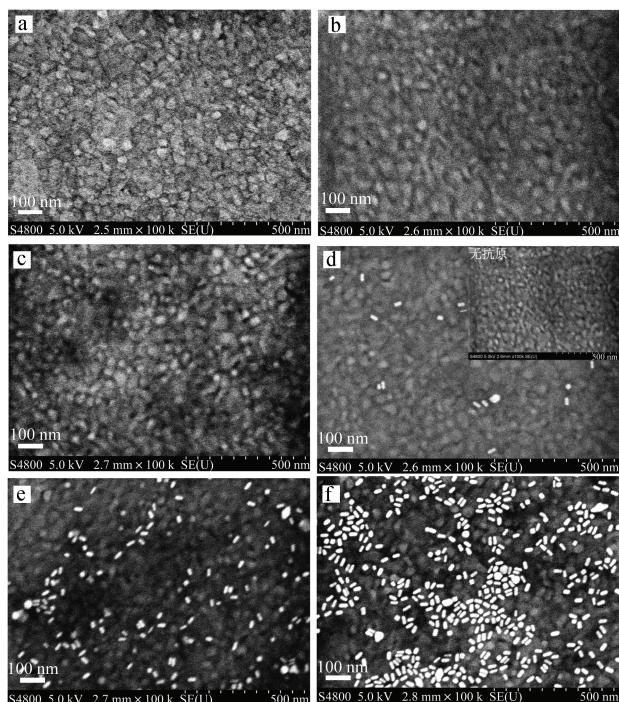


图 4 (a)空白金基底, (b) DSP-抗体修饰和(c) DSP-抗体-抗原修饰的金基底的 SEM 图和待测抗原浓度为(d) 1×10^{-8} (d 中插图抗原浓度为 0), (e) 1×10^{-4} 和(f) $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时金基底上组装的“三明治”结构的 SEM 图

Figure 4 SEM images of (a) bare Au substrate, (b) DSP-goat anti-mouse IgG functionalized, and (c) DSP-goat anti-mouse IgG-mouse IgG functionalized Au substrates, and SEM images of the “sandwich” structures assembled on Au substrates at mouse IgG concentrations of (d) 1×10^{-8} (0 for the inset in image d), (e) 1×10^{-4} , and (f) $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

裂, 通过形成强的 Au—S 键将硫代丙酸-N-羟基丁二酰亚胺酯连接到金基底上. 其端位的活性酯和捕获抗体上的一 NH_2 基团反应形成酰胺键, 从而将捕获抗体固定在基底上. 为减缓酰胺键水解造成抗体脱落, 通常将基底保存在 4°C 的 PBS 中备用. 通过这种固定方式, 捕获抗体在基底上直立排列, 能更好地结合待测抗原. 图 4c 是捕获抗体结合待测抗原后的 SEM 图. 由于 DSP、抗体和抗原都是有机物质, 电子密度低, 故它们在 SEM 图中无法分辨. 图 4d, 4e 和 4f 分别是用低、中、高浓度的待测抗原组装的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构的 SEM 图. 当抗原浓度为 0 时(d 中插图), 金基底上基本上看不到金纳米棒免疫探针, 这说明所制备的探针有效地抑制了基底对探针的非特异性吸附. 当抗原浓度从低到高时, 金基底上捕获抗体特异性结合的抗原增多; 因而, 抗原结合的探针也增多, 形成更多的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构. 可见, 探针表面密度反映了溶液中待测抗原浓度. 仔细检测图 4, 金纳米棒免疫探针在高表面密度下仍较为分散,

较少出现粒子聚集的情况, 这就有效抑制了 SERS 免疫检测中出现的“假阳性”现象.

2.3 SERS 免疫检测

图 5 是用不同浓度的待测抗原组装的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构的 SERS 光谱图. 由于探针数目在基底上不均匀分布, 我们对每一个样品随机采集 10 个点的 SERS 光谱, 取其信号的平均值与样品浓度作图. 图 6 是 1073 cm^{-1} 处的 SERS 谱峰积分面积与抗原浓度的关系图. 从图中可以看到, 当待测抗原浓度从高到低时, SERS 信号逐渐减弱, 这是由于基底上免疫探针的数目逐渐减少所致(图 4). 当抗原浓度为 0 时, SERS 强度与基线的背景噪音基本相当, 说明非特异性吸附的探针数目很少. 这与 SEM 观察到的结果一致(图 4d 中插图), 进一步表明 PEG 修饰的探针能有效抑制

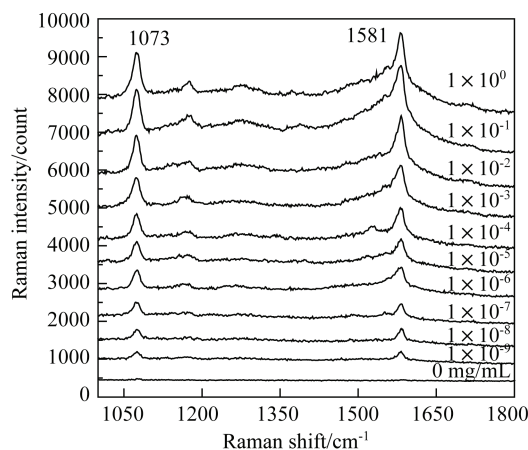


图 5 不同浓度的小鼠 IgG 抗原组装的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构的 SERS 光谱

Figure 5 SERS spectra obtained from capture antibody-detected antigen-SERS-tagged antibody “sandwich” structures assembled at varying mouse IgG concentrations

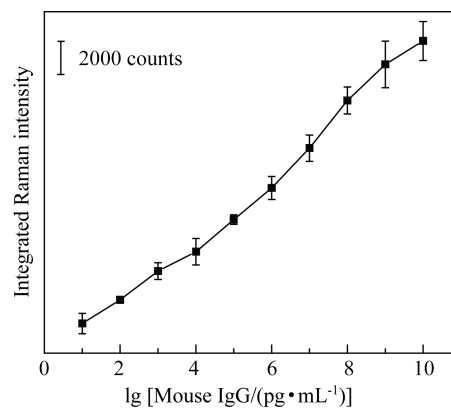


图 6 1073 cm^{-1} 谱峰的 SERS 信号积分强度与待测抗原浓度的关系图

Figure 6 Integrated SERS intensity of the peak at 1073 cm^{-1} as a function of mouse IgG concentration

非特异性吸附. 以信噪比为 3 倍(1073 cm^{-1} 处谱峰强度与基线噪音之比)作为检测限的判断标准, 空间稳定的金纳米棒探针对于单组分抗原的检出浓度可低至 $1\times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3 结论

我们成功制备了空间稳定的 SERS 标记金纳米棒探针, 能在酸性、碱性和高浓度盐的条件下保持稳定. 利用抗体和抗原之间特异性反应组装的捕获抗体-待测抗原-SERS 标记抗体“三明治”结构, 该探针对单组分抗原检出浓度可低至 $1\times 10^{-9}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 该探针具有水溶性好、稳定性和灵敏度高的特点, 有望用于复杂环境下的检测.

References

- 1 Gutcho, S.; Mansbach, L. *Clin. Chem.* **1977**, *23*, 1609.
- 2 Vuori, J.; Rasi, S.; Takala, T.; Vaananen, K. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 2087.
- 3 Brown, C. R.; Higgins, K. W.; Frazer, K.; Schoelz, L. K.; Dyminski, J. W.; Marinkovich, V. A.; Miller, S. P.; Burd, J. F. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1500.
- 4 Hayes, F. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1860.
- 5 Butler, J. E. *J. Immunoassay* **2000**, *21*, 165.
- 6 Sokolow, K.; Byramova, N. E.; Mochalova, L. V. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 535.
- 7 Mulvaney, S. P.; Musick, M. D.; Keating, C. D.; Natan, M. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 4784.
- 8 Han, X.-X.; Chen, L.; Guo, J.; Zhao, B.; Ozaki, Y. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4102.
- 9 Wang, G.; Park, H.-Y.; Lipert, R. J. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9643.
- 10 Bao, F.; Yao, J.-L.; Gu, R.-A. *Langmuir* **2009**, *25*, 10782.
- 11 Guo, H.-Y.; Lu, L.-H.; Wu, C.; Pan, J.-G.; Hu, J.-W. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*(14), 1603 (in Chinese). (郭红燕, 芦玲慧, 吴超, 潘建高, 胡家文, 化学学报, **2009**, *67*(14), 1603.)
- 12 Hwang, H.; Chon, H.; Choo, J.; Park, J.-K. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7603.
- 13 Chon, H.; Lim, C.; Ha, S.-M.; Ahn, Y.; Lee, E. K.; Chang, S.-I.; Seong, G. H.; Choo, J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5290.
- 14 Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4903.
- 15 Charles, C. Y.; Jin, R.; Mirkin, C. A. *Science* **2002**, *297*, 1536.
- 16 Basiruddin, S. K.; Saha, A.; Pradhan, N.; Jana, N. R. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 11009.
- 17 Selvan, S. T.; Tan, T. T. Y.; Yi, D. K.; Jana, N. R. *Langmuir* **2010**, *26*, 11631.
- 18 Doering, W. E.; Nie, S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6171.
- 19 Qian, X.; Peng, X.-H.; Ansari, D. O.; Yin-Goen, Q.; Chen, G. Z.; Shin, D. M.; Yang, L.; Yong, A. N.; Wang, M. D.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83.
- 20 Huang, Y.; Swarup, V. P.; Bishnoi, S. W. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2914.
- 21 Wu, C.; Guo, H.-Y.; Hu, J.-W. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*(14), 1621 (in Chinese). (吴超, 郭红燕, 胡家文, 化学学报, **2009**, *67*(14), 1621.)
- 22 Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283.
- 23 Xu, H.; Käll, M. *Top. Appl. Phys.* **2006**, *103*, 87.
- 24 Kim, K.; Lee, M. Y.; Lee, H. B.; Shin, K. S. *Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*(10), 2174.
- 25 Chon, H.; Lee, S.; Son, S. K.; Oh, C. W.; Choo, J. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3029.
- 26 Guo, H.; Ruan, F.; Lu, L.; Hu, J.; Pan, J.; Yang, Z.; Ren, B. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 10459.
- 27 Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957.
- 28 Chang, S.-C.; Chao, I.; Tao, Y.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6792.
- 29 Hermanson, G. T. In *Bioconjugate Techniques*, Ed.: Hermanson, G. T., Academic Press, San Diego, **1996**, p. 169.

(A1105311 Cheng, B.)