

表面等离子体-拉曼散射双模式复合生物芯片*

李文雪 时元振 蒋之森 苏亚荣 庞霖**

(四川大学物理科学与技术学院, 成都 610064)

摘要 本文提出了复合表面等离子体(SPR)无标记检测及表面增强拉曼散射(SERS)的显微成像技术, 证明了双模式 SPR-SERS 生物芯片的可实施性, 即在同一芯片上实现了表面等离子共振和表面增强拉曼显微检测. 鉴于双模芯片的高保真性, 基于显微技术的高精准、多通道无标记检测技术有望在临床医学检测中得以广泛应用.

关键词 SPR, SERS, 拉曼散射, 双模 SPR-SERS, 纳米间隙

学科分类号 Q6, O43

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0387

无标记、无损伤检测技术在生物医学等领域(如实现干细胞演化过程的无标记检测等)一直为广大生物医学工作者所向往. 无标记检测是以生物体或有关反应引起的物理量(质量、电荷、电流或光谱等)的变化为检测量的直接、间接检测技术. 在众多无标记检测技术中, 表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)是光子入射到贵金属表面从而导致金属中的电子随着电场发生移动的一种量子光电现象^[1]. SPR 技术通过测量金属界面上发生生物物质相互作用后, 表面有效折射率的变化导致激发耦合条件的变化来检测生物分子. SPR 技术具有灵敏度高、测量速度快、不需要荧光标记、能实时快速监测分子间相互作用等优点, 而广泛应用在生物分子分析检测领域^[2].

如果说 SPR 生物检测是探测生物分子反应所引起的表面折射率变化, 是一种间接测量, 那么拉曼信号检测则是一种完全的直接测量. 拉曼散射是待测样品对入射光的非弹性散射, 其实质是当光子与分子发生非弹性碰撞时, 光子将能量传递给待测分子后, 分子能态发生跃迁及辐射, 揭示分子的振动或转动能级的光谱技术. 拉曼光谱提供了待测材料中分子固有的振动和旋转模式, 直接反应待测样品的分子结构, 这种技术已被广泛应用于各个领域, 包括生物化学、材料、环境监测等方面. 然而拉曼散射是一种弱散射过程, 其探测受限于背景噪

声和荧光背景^[3]. 拉曼散射截面约为 10^{-30} cm^2 , 而荧光过程的散射截面约为 10^{-15} cm^2 ; 相对于拉曼散射, 荧光信号远远高于拉曼散射, 这也是目前荧光技术更为普遍应用的原因. 拉曼信号电磁场增强是一种通过局域电场(如粗糙的金属表面能够产生增强的局域电场)所引发的拉曼增强效应^[4]; 这种所谓的表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)所产生的信号与分子所处光电场强度的四次方成正比^[5-6]. 显然, 拉曼信号的增强依赖于局域电场的增强, 而局域电场集中在纳米共振结构附近, 因此 SERS 适用于表面附着分子或者细胞表面的蛋白质分子的直接分辨及检测.

鉴于 SPR 技术对生物分子的间接检测与拉曼光谱对分子的直接分辨, 近年来不断有科研工作者探讨 SPR 拉曼增强, 或将结合两种模式的双模式结构. 而双模式结构有助于研究者在探测生物分子时获取更多的有用信息以减少研判生物分子时的误报. 例如 Lin 等^[7]通过表面等离子体共振和局部表面等离子体共振(local surface plasmon resonance, LSPR)之间的强相互作用, 获得多共振增强 SERS

* 国家自然科学基金(61377054, 61675140)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13981850996, E-mail: panglin_p@yahoo.com

收稿日期: 2016-12-17, 接受日期: 2017-03-24

等. Kim 等^[8]研究了银纳米粒嵌入光栅结构的表面等离子体增强 SERS. 然而, 使用的热退火方法随机形成银颗粒层的方法, 无法精确控制纳米粒子位置及间隙形成方式, 以致无法进行实用化应用. Liu 等^[9]制作了周期性金纳米蝴蝶结结构来形成 SPR 与 SERS 基底. 此种纳米结构蝴蝶结制作工艺繁琐, 需要用电子束光刻或离子束刻蚀的方法制作, 昂贵的制作成本使得其无法实现实用化推广^[10-11]. 虽然采用纳米压印^[10, 12]方法可以降低其制作成本, 但其纳米结构在转移过程中, 精度无法得以保证. Perney 等^[13]采用 111 晶向在硅基底上进行湿法刻蚀得到周期性的倒金字塔结构, 能达到 80% SERS 检测重复率, 基本达到实用化要求. 但其增强方式仅通过表面等离子共振增强拉曼信号, 而缺少纳米结构增强局域场强, 导致增强因子不高, 无法进行高精度的生物检测.

本文在表面等离子体生物探测及纳米等离子体拉曼增强的研究基础上, 提出了低成本、大面积复合表面等离子体无标记检测及表面增强拉曼散射的显微成像技术, 即在普通显微镜轮廓成像的基础上, 于同一芯片上实现表面等离子共振的高效激发和表面局域场的增强, 提供生物样本及反应综合特征的低成本、高精度实用化检测. 通过专利技术制作的 SPR-SERS 复合芯片(申请中)^[14], 利用金属光栅周期结构激发 SPR, 用以感知金属表面生物分子间的反应; 同时, 在表面传播的 SPR 诱发纳米间隙处的偶极振荡, 产生强局域电场引发表面生物分子增强拉曼信号; 实现生物分子表面等离子基元与拉曼散射信号的复合正交检测. 同一芯片给出待测样的两种独立信息, 生物分子间的相互作用信息及生物分子本身的本征谱; 这对于生物分子高保真检测及研判具有重要意义. 本文给出 SPR-SERS 双模检测的可行性研究证明.

1 原 理

SPR 是金属电介质界面上激发自由电子随入射光波振荡的表面波, 其激发条件对电介质物理特性(介电常数或折射率)极为敏感. 由于 SPR 与自由空间波存在动量不匹配, 即表面传播的 SPR 波矢大于自由空间光波沿表面的波矢, 光波无法直接激发 SPR. 只能通过波矢补偿方法激发 SPR, 如棱镜在全反射条件下激发表面瞬逝波、粗糙金属表面或光栅通过衍射补偿波矢. 对于金属光栅激发而言, 金属光栅的空间周期须满足动量匹配条件^[15]:

$$\vec{K}_{\text{SPR}} = \sqrt{\varepsilon_1} \vec{K}_{0//} + p\vec{G} \quad (1)$$

其中 $\vec{K}_{\text{SPR}}$ 为所激发的 SPR 波的波矢; $\vec{K}_{0//}$ 为入射光波平行于光栅方向的波矢; ε_1 为电介质的介电常数; G 为金属光栅波矢; p 为对应衍射级次. 当生物分子在感应面(SPR 金属面)发生特性结合反应(例如蛋白质分子间相互作用)时, 金属表面等效介电常数(等效折射率)发生变化, 导致 SPR 共振波长 $\lambda_{\text{SPR}} = 2\pi/K_{\text{SPR}}$ 移动, 通过检测激发条件(激发波长、角度、强度等)的偏移, 可以确知表面生物分子的量变信息.

为了实验通用平台应用, 减少仪器成本, 我们采用一般实验室都有的显微镜平台. 将 SPR-SERS 复合芯片置于显微镜平台上, 照明激光光波由显微镜物镜聚焦入射于光栅上. 设定光栅槽方向为 z 方向, 光栅波矢方向为 x 方向, 垂直于光栅表面方向为 y 方向, 对于径向角、方位角为 (θ, φ) 的入射波, 其入射面如图 1. 此时动量匹配条件成为

$$K_{\text{SPP}} = \sqrt{\varepsilon_1} K_0 \sin\theta \cos\varphi + pG \quad (2)$$

反射光由同一物镜收集. SPR 信号检测是测量反射光的角谱分布, 即反射光强度随入射角度的变化关系. 理论上, 拉曼散射检测可同时获得, 只需将反射信号通入拉曼光谱仪. 激光光波通过周期性光栅结构激发 SPR, 激发的 SPR 耦合入纳米间隙处产生偶极振荡而激发局域电场, 增强后的强局域场反过来增强 SPR 表面灵敏度^[16].

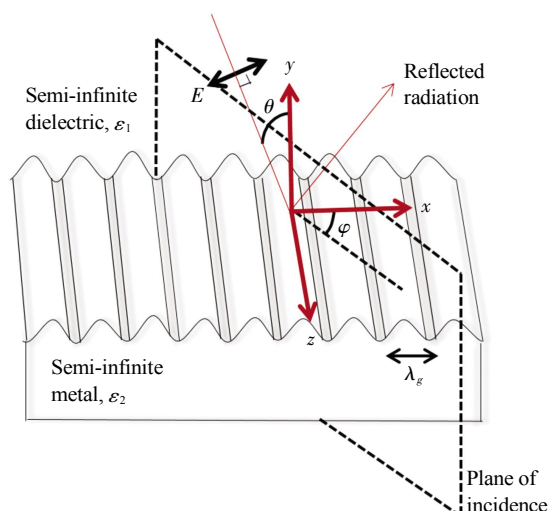


Fig. 1 The relationship between incident plane of and the grating orientation

The incident angle and the azimuth of the incident wave is (θ, φ) . The grating period is λ_g . The dielectric constant of the semi-infinite dielectric and the semi-infinite metal are $\varepsilon_1, \varepsilon_2$, respectively.

局域场增强同时产生高效益增强拉曼。一般而言, 表面增强拉曼检测信号可表示为^[17]:

$$I_{\text{SERS}} \propto |\vec{E}(\omega_0)|^2 |\vec{E}(\omega_s)|^2 \sum_{\rho\alpha} |\alpha_{\rho\alpha}^{>i \rightarrow f}|^2 \propto |\vec{E}(\omega_0)|^4 \quad (3)$$

其中, $|\vec{E}(\omega_0)|$ 和 $|\vec{E}(\omega_s)|$ 分别为频率为 ω_0 的入射光的表面局域电场强度和频率为 ω_s 的拉曼散射的表面局域电场强度; ρ 和 α 分别为分子所处位置的激发光及拉曼散射的电场方向; $\alpha_{\rho\alpha}^{>i \rightarrow f}$ 为从初始态 $|i\rangle$ 经中间态 $|r\rangle$ 到终止态 $|f\rangle$ 的极化率张量。

不考虑生物分子化学增强及局域散射场与入射场差异的情况下, SERS 信号正比于局域入射电场的四次方。显然, 提高拉曼信号最有效的方法是提高局域场, 提高局域电场的方法可通过纳米谐振结构产生电偶极子、耦合电偶极子及高极子, 如电四极子等。

本文将通过纳米狭缝阵列光栅结构实现 SPR 与 SERS 的同时高效激发。SPR 由光栅的周期结构激发, SERS 由一个周期内双峰间的纳米间隙所产生的偶极子局域场来实现。

2 实验装置及样品准备

2.1 试剂和仪器

实验中所用的苯硫酚(I1 872, 99%) 购自于西亚试剂公司; 乙醇(无水乙醇, 分析纯)购自于成都长聊化工试剂有限公司; 乙二醇购自于 Aldrich 公司。本文实验所涉及的化学试剂均没有进一步提纯。本文实验中所用去离子水由成都康捷科技有限公司生产的超纯水制备系统(QPHL-I-100L)所制备。

所用仪器有高频数控超声波清洗器(KQ-100TDB, 昆山市超声仪器有限公司); 二维

CCD 接收装置(ThorLabs, BC106-VIS), 像素大小为 $1\,360 \text{ pixel} \times 1\,024 \text{ pixel}$; 拉曼-原子力联用系统(HR EVOLUTION, HORIBA JOBIN YIN, FRANCE)。拉曼光谱测试在拉曼-原子力联用系统上进行, 光谱分辨率为 0.5 cm^{-1} 。以 633 nm 或 785 nm 波长激光作为激发光源, 出射激光功率分别为 17 mW 、 100 mW , 到达样品的激光功率分别为 0.1 mW 、 2.5 mW 。采用 $50\times/0.5$ 显微物镜收集散射光, 测量时波数扫描范围为 $300 \sim 2\,000 \text{ cm}^{-1}$ 。

2.2 SPR 测试检验平台

SPR 实验光路示意图如图 2 所示。 633 nm 或 785 nm 波长激光经显微物镜 $O_1(40\times/0.65)$ 及透镜 L_1 滤波、准直后成为平行光, 经分光棱镜 BS 导入显微物镜 $O_2(40\times/0.65$ 或 $100\times/0.85)$ 聚焦于复合芯片上。显微物镜 O_2 对应的入射孔径角为 40.5° (或 58.2°)。入射平面波经显微物镜 O_2 成为入射角为 (θ, φ) 的入射球面波。其中径向角 θ 从 -40.5° (或 -58.2°) $\sim 40.5^\circ$ (或 58.2°) 变化, 方位角 φ 从 $0^\circ \sim 360^\circ$ 变化。聚焦于复合芯片上的光线反射回来又经过物镜 O_2 , 再次经过分光棱镜 BS 改变方向后, 由焦距为 f_2 的透镜聚焦, 在其傅里叶变换平面上用 CCD 接收 SPR 信号。当某一角度 θ (方位角取 2π) 满足 SPR 激发条件时, 激发的表面等离子体波沿光栅表面传播, 带走此角度下的入射能量, 相应的反射波无此角度能量, 在 CCD 对应位置形成暗带。暗带随表面有效折射率的变化而移动, 通过 CCD 接收的信号可以计算暗带的移动量, 推算出表面折射率的变化, 进而表征生物分子的反应程度。

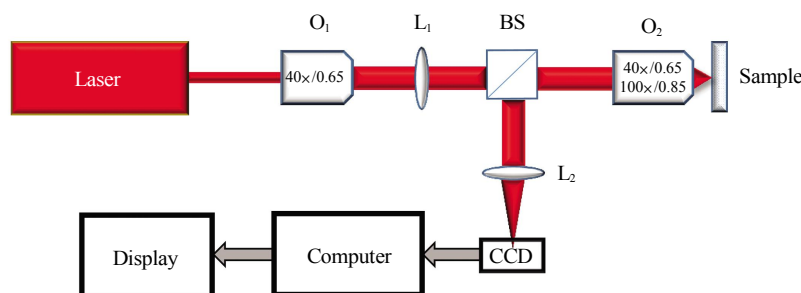


Fig. 2 Schematic diagram of SPR platform

The 633 nm (or 785 nm) laser beam was filtered by the microscope objective (O_1) and collimated to parallel light by the lens (L_1). Parallel optics is focused on the sample by the microscope objective (O_2), and a CCD camera images the reflected signal. The objective is overfilled and we use segments that fall inside the pupil. BS, 50% non-polarizing beam splitter; L_2 , lens.

对于显微照明系统, 平行光经显微物镜聚焦, 汇聚于芯片上, 到达芯片的入射光包括由零度到物镜所确定的孔径角, 方位角为零度到 360° 锥形内的所有光束. 显微镜将入射平面波聚焦成锥形分布, 入射角范围为 $0 \sim \text{Max}(\theta)$, 入射光波的最大孔径角由物镜的数值孔径 NA 决定, $\text{Max}(\theta) = \arcsin^{-1}(NA/n)$, 其中 n 为入射媒介折射率. 如图 3a 所示, 入射平行光转换为入射角为 $0 \rightarrow \text{Max}(\theta)$, 入射面(对

应方位角)为 $0^\circ \sim 360^\circ$ 的无数组光波.

入射方向在孔径角与方位角的变化, 提供了 SPR 检测所需要的变量扫描, 即孔径角与方位角角度分布中出现代表 SPR 激发的如图 3b 所示的暗带. 由显微镜示意图可知, 入射角分布是对称的, 若以一侧入射角激发 SPR 波, 必存在一相反入射角激发另一反向传播的 SPR 波.

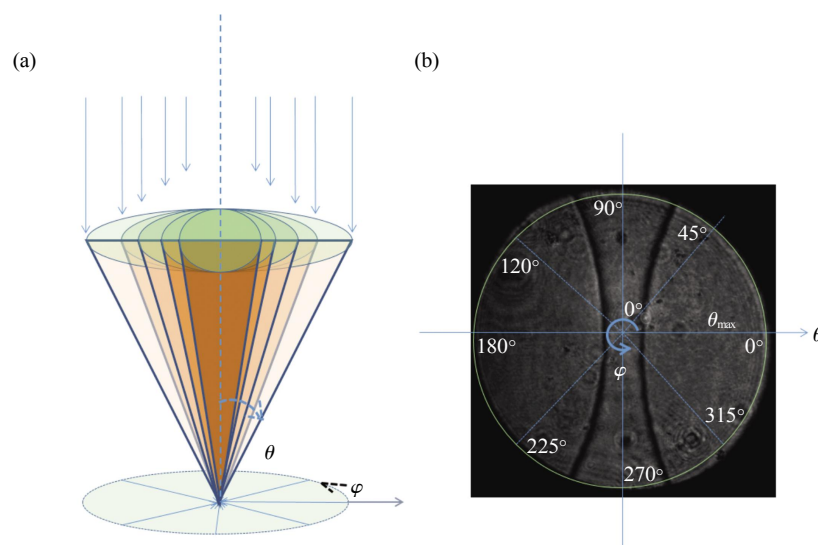


Fig. 3 The schematic microscope(a) and SPR microscopic image(b)

The microscope focuses the incident plane waves on a tapered distribution. θ means the incident angle; φ represents the azimuth angle. (b) Two dark bands show the SPR excitation. Yellow solid line (circle) represents the Fourier transform plane. Incident angle (θ) changes from the center of the circle (0°) to the edge($\text{Max}(\theta)$); the azimuth angle changes from $0^\circ \sim 360^\circ$.

2.3 芯片制作

复合芯片采用干涉光刻和参数耦合沉积实现大面积纳米缝隙阵列光栅结构(投稿中)^[18]. 图 4 为原子力显微镜测量的芯片面型, 蓝色线对应的面型轮廓显示在面型图下方; 普通光栅结构经参数耦合后形成新的光栅, 新旧光栅之间形成纳米间隙. 复合芯片为光栅周期大约 400 nm 或 600 nm 的缝隙阵列光栅结构, 对应 SPR 激发波长分别为 633 nm 或 785 nm. 一个周期内存在 2 个 10 纳米量级的纳米间隙以利用产生强局域场. 激发光波经光栅结构高效激发 SPR, SPR 在金属表面传播过程中与纳米间隙产生偶极振荡; SPR 产生的表面电场与纳米狭缝偶极共同作用增强表面局域电场获得增强的拉曼信号.

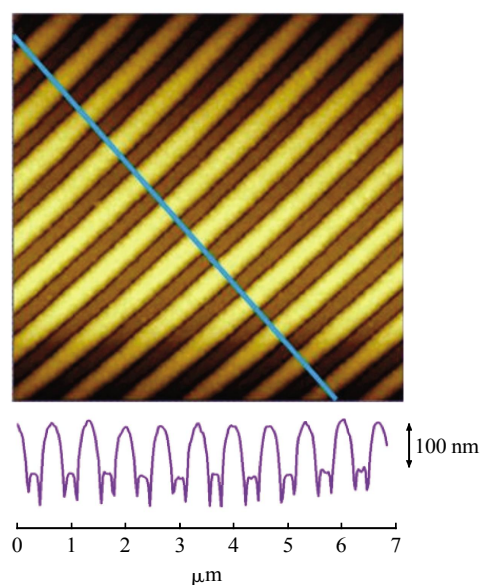


Fig. 4 A schematic diagram of the nano-slit array

The outline corresponding to the blue line is shown in the following figure. The original grating is about 100 nm higher than the current grating. The width of the nanogap is tens of nanometers between the newly grown grating and the original grating.

2.4 SPR 体折射率灵敏度测试

复合芯片体折射率变化通过改变乙二醇-去离子水混合溶液的比例而实现. 不同浓度百分比乙二醇溶液分别按照乙二醇与去离子水的容积比例为 0%、1%、10%、25%、50%、75%、100% 配置样品. 在进行每个浓度点测试时, 将溶液用移液管取出, 滴在芯片上, 周围放置垫片, 盖上一片盖玻片以保证液样厚度为 100 μm .

2.5 SPR 激发表面折射率检测与 SERS 检测

为了证明复合芯片是 SPR-SERS 双模芯片, 即可进行 SPR 及拉曼检测, 选用文献中普遍采用的拉曼标识材料苯硫酚来进行复合芯片的测试证明^[19]. SPR 生物检测是测量金属表面反应所引起的表面有效折射率的变化, 因此, 反映 SPR 检测性能的物理量是其表面折射率灵敏度, 即表面分子层吸附灵敏度. 苯硫酚中的硫原子与金属结合形成单分子层; 金属上结合单分子层的面密度与苯硫酚溶液的浓度成正比关系. 用移液器取苯硫酚溶液混于分析纯乙醇中得到溶度分别为 10^{-3} mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L、10 mol/L 的苯硫酚稀释液, 置于超声清洗机中用 60% 功率常温超声 2 min, 让苯硫酚分子均匀分布在溶液中.

在进行每个 SPR 浓度点测试前, 将芯片分别依次放入上述所配 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L、10 mol/L 苯硫酚溶液中, 浸泡 2 h 让其表面吸附苯硫酚分子. 浸泡后从苯硫酚溶液中取出样片, 放入乙醇溶液中漂洗 2~3 s 后取出. 将漂洗后的样片放入氮气干燥柜中, 在氮气流中干燥后测试备用. 在 SPR 测试平台上, 取测试样片于载物台, 用 100 $\times$ /0.85 显微物镜进行聚焦激发 SPR. 按照上述测试过程测定复合芯片在未沉积苯硫酚溶液时的 SPR 信号, 作为浓度为 0 mol/L 的参考点.

在进行每个 Raman 浓度点测试前, 将芯片放入 10^{-3} mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L、苯硫酚溶液中浸泡 2 h 后取出, 在乙醇溶液中漂洗 2~3 s 后取出. 将漂洗后的样片放入氮气干燥柜中, 在氮气流中干燥后测试备用. 用镊子将测试样片放到拉曼-原子力联用系统拉曼检测平台的载物台上, 以 633 nm 或 785 nm 波长激光作为激发光源, 到达样品的激光功率为 0.1 mW、2.5 mW. 用 50 $\times$ /0.5 物镜进行聚焦, 激发光斑大小为 2 μm , 积分时间 5 s, 扫描 3 次并取平均.

3 结果与讨论

3.1 SPR 体折射率灵敏度

SPR 表面波的电场穿透深度约为 100 nm, 因此, SPR 不仅感应金属表面上的生物分子反应, 同时也感应表面以上 100 nm 内溶液中的变化(体折射率变化). 利用乙二醇水溶液, 对 SPR 进行了成像检测(图 5). 考虑到水在近红外波段的强吸收及生物材料自发荧光, 选用 785 nm 激光作为激发光源, 通过 40 $\times$ /0.65 显微物镜收集反射光. 改变金属光栅上的媒介, 由空气、纯水、1% 乙二醇到 100% 乙二醇变化, 得到不同浓度下的显微 SPR 像(傅里叶面, 成像透镜的焦面). 如图 5 可见: 当金属光栅周围媒介发生变化时, 对应 SPR 产生条件暗条纹移动, 当金属光栅周围媒介为空气时, SPR 对应 2 条暗条纹靠近边缘, 对应较大的激发角度; 当周围媒介为水或溶液时 SPR 对应 2 条暗条纹靠近中心, 对应较小激发角度; 特别是当乙二醇容积百分比比较高时, 2 条暗纹重合甚至交叉, 激发角度为负值. 介质浓度由零改变为 100%, 方位角 0 $^{\circ}$ 时, 入射角由 4.6 $^{\circ}$ 移至 -2.2 $^{\circ}$.

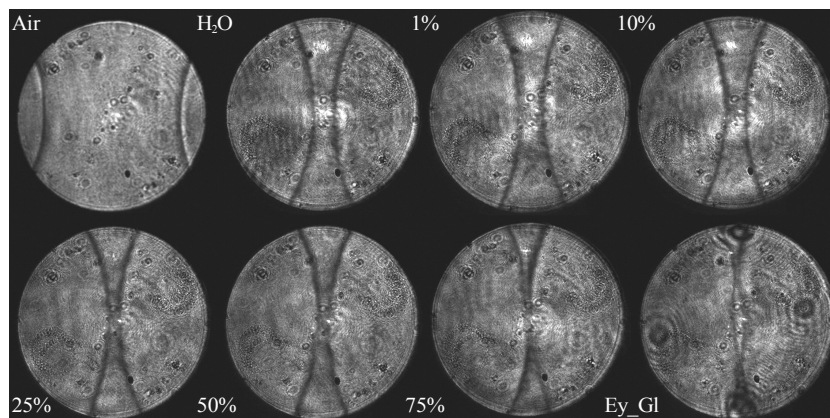


Fig. 5 The microscope SPR image with air, deionized water, 1% ethylene glycol to 100% ethylene glycol change

The dark stripes corresponding to the conditions to generating SPR move when the media around the metal grating change.

785 nm 波长下, 乙二醇、去离子水的折射分别为 1.4265、1.3296^[20], 通过容积比的关系, 根据 $n_{\text{复合折射率}} = \text{水容积百分比} \times n_{\text{水}} + \text{乙二醇容积百分比} \times$

$n_{\text{乙二醇}}$ 可计算出 785 nm 波长下混合溶液的折射率. 将 SPR 激发角度、溶液的容积比及对应折射率列入表 1.

Table 1 The volume ratio of the solution, SPR excitation angle, and the corresponding refractive index

Serial number	Water volume percentage/%	Ethylene glycol volume percentage/%	Composite refractive index	Excitation angle	Standard deviation
1	100	0	1.3296	4.6	0.2772
2	99	1	1.3306	4.4	0.22663
3	90	10	1.3393	3.9	0.2441
4	75	25	1.3538	2.4	0.5345
5	50	50	1.3781	1.5	0.40843
6	25	75	1.4023	-0.7	0.29158
7	0	100	1.4265	-2.2	0.21593

SPR 表面电介质从纯水、1%乙二醇~100%乙二醇变化时, 激发角度随复合折射率的变化如图 6 所示. 每个数据点代表测试样品区域上 5 个不同位置的平均值, 测量中的标准偏差值以误差棒给出; 红色斜线为各容积比乙二醇下的 SPR 激发角度平均值的线性拟合曲线. 当乙二醇容积比上升到 25%时, 激发角度与拟合曲线的误差较大. 激发角度随折射率变化呈线性关系, $y = -69.8x + 97.3$, $R^2 = 0.99744$. 线性拟合曲线斜率的绝对值即为, 每变化单位折射率(refractive index unit, RIU)时激发角度改变量. 每变化单位折射率时激发角度改变 69.8°, 复合芯片的 SPR 体折射率灵敏度 $S = 69.8^\circ/\text{RIU}$.

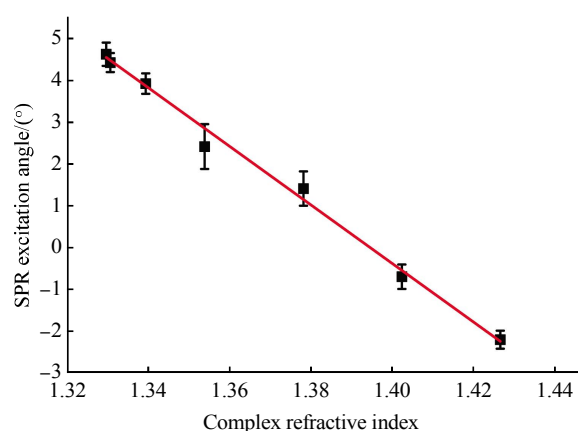


Fig. 6 Excitation angle with refractive index under different concentrations of ethylene glycol

Squares represent the average of five different locations on the test sample area; the standard deviation values are given as error bars; the red solid line is the linear fitting curve of each average point.

3.2 SPR-SERS 双模式生物芯片

取测试样片于图 2 所示 SPR 测试平台载物台上, 用 100×/0.85 显微物镜进行聚焦激发 SPR, 选用 633 nm 激光作为激发光源. 依据前述样品制备方法, 先将待测样片进行 0 mol/L(即无苯硫酚分子层)苯硫酚浓度的 SPR 复合芯片测试; 再依次进行 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L、10 mol/L 苯硫酚浓度溶液浸泡处理的 SPR 复合芯片测试. 将 SPR 激发角度与对应浸泡溶液的苯硫酚浓度列入表 2.

Table 2 SPR excitation angle and the corresponding solution thiophenol content

Serial number	$c(\text{Thiophenol})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Excitation angle	Standard deviation
1	0	38.6	0.48121
2	10^{-2}	36.5	1.11753
3	10^{-1}	35.8	1.08694
4	1	34.0	0.383
5	10	32.9	0.89872

当电介质溶液中苯硫酚溶液浓度从 0 mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L、10 mol/L 变化时, SPR 激发角度随苯硫酚溶液浓度的变化关系如图 7 所示, 每个数据点代表测试样品区域上 5 个不同位置的平均值, 测量中的标准偏差值以误差棒给出; 红色斜线为各浓度下 SPR 激发角度平均值的拟合线性曲线. 当苯硫酚浓度较低时, 如 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L; 当苯硫酚浓度为 10 mol/L 时, SPR 激

发角度偏差较大. 根据线性拟合方程, $y = -1.5x + 39.9$, $R^2 = 0.98971$, 每改变单位浓度, 激发角度改变 1.5° , 复合芯片的表面感应灵敏度 $S_{\text{面}} = 1.5^\circ/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$. 值得注意的是, 实验时采用的苯硫酚浓度呈 10 倍增长, 为非线性关系, 绘制 SPR 激发角度随苯硫酚溶液浓度的变化曲线时, 对每个浓度点取 $\lg 10$, 得到一致的线性关系, 其中 $\lg 0$ 在数学上是不存在的, 但其在物理学上是有实际意义的.

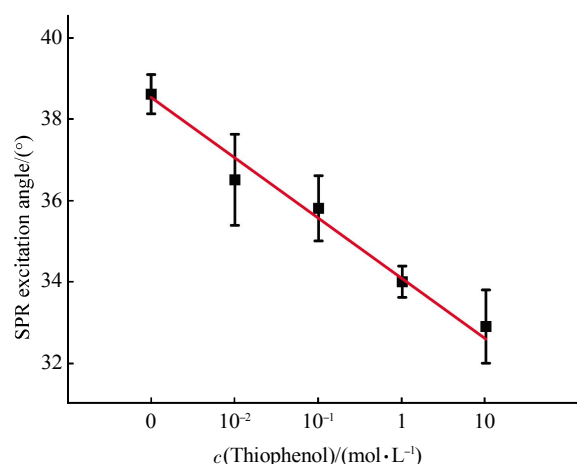


Fig. 7 The excitation angle of SPR at different concentration

Squares represent the average of five different locations on the test sample area; the standard deviation values are given as error bars; the red solid line is the linear fitting curve of each average point.

理论上, 应用复合芯片, 可同时获得 SPR 及拉曼散射检测, 只需将反射信号通入拉曼光谱仪, 而 SPR 信号导入 SPR 成像仪中. 考虑到复合芯片对高浓度苯硫酚分子非常敏感, 激发强度达到饱和, 采用较低浓度苯硫酚溶液进行拉曼检测. 将测试样品放到拉曼-原子力联用系统拉曼检测平台的载物台上. 如图 8 所示为 10^{-3} mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L 浓度苯硫酚溶液下的拉曼光谱图. 从下到上依次对应 10^{-3} mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-1} mol/L、1 mol/L 4 条拉曼光谱, 苯硫酚各特征峰明显; 随着苯硫酚浓度的降低, 拉曼光强随之降低. 当浓度降低到 10^{-15} mol/L 时, 仍可以检测到较强的拉曼信号. 拉曼谱中特征峰及高的信噪比, 显示高的拉曼增强效应, 计算得到的 SERS 增强因子为 $10^{[18]}$.

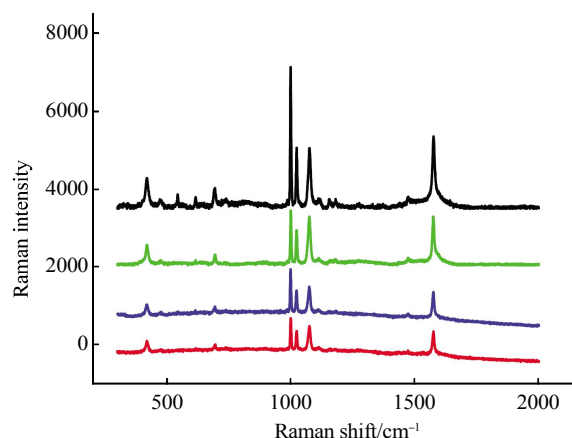


Fig. 8 Raman spectra of thiophenol solution at different concentrations

— : 1 mol/L; — : 10^{-1} mol/L; — : 10^{-2} mol/L; — : 10^{-3} mol/L.

取特征峰位的绝对强度平均值随苯硫酚溶液浓度的变化关系做图 9. 每个数据点代表测试样品区域拉曼光谱 1023 cm^{-1} 峰位的绝对强度平均值, 其中对每个浓度点扫描 3 次并取平均值; 红色斜线为各浓度下 1023 cm^{-1} 峰位绝对强度值的线性拟合曲线, $y = 238.2x + 597.3$, $R^2 = 0.97828$; 标准偏差以图中的误差线标出. 当苯硫酚浓度较高时, 如 1 mol/L, 绝对强度由于浓度饱和而偏差较大.

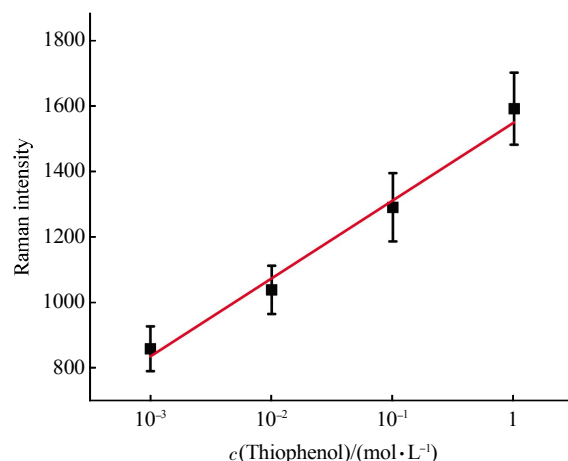


Fig. 9 Absolute intensity values with the thiophenol solution at the different concentration

Squares represent the average of five different locations on the test sample area; the standard deviation values are given as error bars; the red solid line is the linear fitting curve of each average point.

3.3 分析与讨论

我们将表面等离子共振检测以及表面增强拉曼检测集成在同一芯片上, 实现了无标记 SPR-SERS 双模式检测. 采用大面积纳米缝隙阵列结构, 激发光波经光栅结构高效激发 SPR, SPR 在金属表面传播过程中激发纳米间隙间的偶极振荡, SPR 产生的表面电场与纳米狭缝局域偶极共同作用增强了表面局域场, 因此可获得很强的拉曼信号. 实验中, 通过测量 SPR 峰位的移动判定激发角度的变化, 以确定芯片表面生物分子反应所引起的表面有效折射率的改变. 同时, 金属表面 SPR 与纳米缝隙的耦合所导致的强局域场, 可以用来同时测量拉曼光谱以直接分辨生物分子. SPR 信号间接测量与拉曼信号的直接判定, 为精确判定感应表面上的生物反应增加了确定性.

SPR 只给出活性表面有效折射率的变化, 无法确定 SPR 信号的来源. 实际信号可能源自于所要探测的固定于感应表面的捕获生物分子与溶液中待测生物分子对应反应的结果, 也可能来自于溶液中的非检测分子在感应表面的沉积(即所谓的非标识反应, non-specific reactions), 或只是溶液中的灰尘颗粒沉积于感应表面所引起的折射率变化的结果. 正因为如此, SPR 生物分子检测中(包括现有临床荧光检测试验)均需设置邻近的对比检测区域以区分可能的假阳性或假阴性反应. 复合 SPR-SERS 芯片的拉曼模式理论上可废除这些对比检测区域: 拉曼光谱提供待测材料中分子固有的振动和旋转模式, 不需要分子相互作用, 可直接反应待测样品的分子结构. 两种检测方式对同一区域生物分子反应的不同侧面的同时检测, 极大地提高了生物检测的精准性.

由于拉曼散射检测是测试样片的成像面, 而 SPR 检测是测试样片的焦面(傅里叶变化平面, 角度分布谱), 本文采用同一芯片不同测试平台证明了复合芯片的双模式功能. 为确保复合芯片双模优越性的体现, 下一步我们的工作便是将拉曼检测和 SPR 检测在同一显微镜成像系统中完成, 实现在一个显微系统下, 在同一生物芯片上实现两种不同信号的检测和分析. 需要指出的是: 本文旨在证明我们研制的双模式芯片可以获取 SPR 及 SERS 信号. 我们通过两个分立的平台证明了同一种芯片可实现 SPR 及 SERS, 同一平台实现 SPR 及 SERS 同时获取将是未来我们要继续的工作, 这主要是平台设备研发问题, 与本文的芯片研究无关.

本文实验中采用二维 CCD 接收一个完整的傅里叶变换平面(SPR 成像面), 该像面从中心起沿径向对应不同入射角, 中心对应 0° 入射角, 边缘则对应显微物镜的孔径角 $\text{Max}(\theta)$. 采用 $100\times/0.85$ 物镜激发 SPR 时, CCD 仅利用了部分区域, 实际接收图片大小为 $925\text{ pixel}\times 925\text{ pixel}$. 像面边缘对应的最大孔径角 $\text{Max}(\theta)=58.21^\circ$, 系统的角度分辨率为 $0.13^\circ/\text{pixel}$. 较大的标准偏差, 限制了 SPR 测量的检测极限(limit of detection, LoD). SPR 测量的检测极限取决于检测机制的灵敏度 S 及系统的测量标准偏差 σ , 即 $LoD=3\sigma/S$. 为进一步提高 SPR 检测极限, 下一步的工作将在 SPR-SERS 综合显微成像系统基础上, 设计放大光路, 在完整采样的条件下, 再进行区域性放大以进一步提升图像角度分辨率. 在 SPR 检测光路中, 采用二维 CCD 先接收一个完整的傅里叶变换平面, 包含 SPR 两条暗纹, 调节参数以完全利用 CCD 装置的像素($1360\text{ pixel}\times 1024\text{ pixel}$), 系统的角度分辨率为 $0.08^\circ/\text{pixel}$; 再经放大光路接收 SPR 其中一条暗纹, 并放大 10 倍, 此时系统的角度分辨率为 $0.008^\circ/\text{pixel}$; 将极大提高 SPR 的检测极限.

4 结 论

本文证明了双模式 SPR-SERS 生物芯片的可实施性. 对应 SPR 激发波长分别为 633 nm 或 785 nm 的 400 nm 或 600 nm 光栅周期缝隙阵列光栅结构, 成功实现了 SPR 的高效激发和低浓度 SERS 检测. 激发光波经光栅结构高效激发 SPR, SPR 在金属表面传播过程中在纳米间隙激发偶极振荡; SPR 产生的表面电场增强与纳米狭缝局域偶极共同作用, 增强表面局域场获得强拉曼信号. 实验证明复合芯片的 SPR 体折射率灵敏度 $S=68.8^\circ/\text{RIU}$, 表面感应灵敏度 $S_{\text{面}}=1.5^\circ/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$. 复合芯片的拉曼增强因子达到 10^6 , 最低检测浓度达到 10^{-15} mol/L . 下一步的工作是实现 SPR-SERS 双模生物检测的实际应用.

参 考 文 献

- [1] Mitchell J S, Wu Y, Cook C J, *et al.* Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules. *Analytical Biochemistry*, 2005, **343**(1): 125–135
- [2] McDonnell J M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, **5**(5): 572–577

- [3] Zou W, Cai Z, Wu J. Periodic nanostructures for SERS-active substrate//International Society for Optics and Photonics. International Conference on Optical Instruments and Technology 2015, 2015: 96230W-96230W-7
- [4] 伍子同, 刘翼振, 周晓东, 等. 表面增强拉曼光谱在 DNA 检测中的应用. 分析科学学报, 2014, **30**(6): 829-839
Wu Z T, Liu Y Z, Zhou X D, *et al.* Journal of Analytical Science, 2014, **30**(6): 829-839
- [5] Chang R. Surface enhanced Raman scattering. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media, 2013
- [6] Campion A, Kambhampati P. Surface-enhanced Raman scattering. Chemical Society Reviews, 1998, **27**(4): 241-250
- [7] Lin J, Zhang Y, Lee E H, *et al.* A triple-resonance Raman chip for simultaneous enhancement of Stokes and anti-Stokes lines utilizing both localized and non-localized plasmonic resonance. Journal of Optics, 2015, **17**(10): 105001
- [8] Kim K, Kim D J, Kim D. Effect of silver nanoisland-embedded grating for surface plasmon based total internal reflection fluorescence imaging//International Society for Optics and Photonics. SPIE OPTO: Integrated Optoelectronic Devices, 2009: 722417-722417-7
- [9] Liu L, Jin M, Shi Y, *et al.* Optical integrated chips with micro and nanostructures for refractive index and SERS-based optical label-free sensing. Nanophotonics, 2015, **4**(1): 419-436
- [10] Li W D, Ding F, Hu J, *et al.* Three-dimensional cavity nanoantenna coupled plasmonic nanodots for ultrahigh and uniform surface-enhanced Raman scattering over large area. Optics express, 2011, **19**(5): 3925-3936
- [11] Schuck P J, Fromm D P, Sundaramurthy A, *et al.* Improving the mismatch between light and nanoscale objects with gold bowtie nanoantennas. Physical Review Letters, 2005, **94**(1): 017402
- [12] Chou S Y, Krauss P R, Renstrom P J. Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. Applied Physics Letters, 1995, **67**(21): 3114-3116
- [13] Perney N M B, De Abajo F J G, Baumberg J J, *et al.* Tuning localized plasmon cavities for optimized surface-enhanced Raman scattering. Physical Review B, 2007, **76**(3): 035426
- [14] 时元振, 庞霖. 一种大面积纳米缝隙阵列及其制作方法: 中国, 201611072696.4.(申请中)
Shi Y Z, Pang L. A large area nano-gap arrays and its fabrication method: China, 201611072696.4. (in processing)
- [15] Raether H. Surface plasmons on smooth surfaces. Berlin Heidelberg: Springer, 1988
- [16] Pang L, Chen H M, Wang L, *et al.* Controlled detection in composite nanoresonant array for surface plasmon resonance sensing. Optics express, 2009, **17**(17): 14700-14709
- [17] Schatz G C, Young M A, Van Duyne R P. Surface-enhanced Raman scattering. Berlin Heidelberg: Springer, 2006: 19-45
- [18] Shi Y Z, Li W X, Su Y R, *et al.* Design and fabrication of metal nanogap arrays over large areas. (preparing)
- [19] 许小燕, 李淑瑾, 吴德印, 等. 苯硫酚各种形态在金上的拉曼光谱研究. 化学学报, 2007, **65**(12): 1095-1100
Xu X Y, Li S J, Wu D Y, *et al.* Acta Chimica Sinica, 2007, **65**(12): 1095-1100
- [20] Hale G M, Querry M R. Optical constants of water in the 200 nm to 200 μm wavelength region. Appl. Opt., 1973, **12**: 555-563. <http://refractiveindex.info>

Surface Plasmon-Raman Scattering Dual-mode Biochip*

LI Wen-Xue, SHI Yuan-Zhen, JIANG Zhi-Sen, SU Ya-Rong, PANG Lin**

(School of Physical Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract A microscopy based imaging technology was proposed to provide both surface plasmonic resonance (SPR) detection and surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral of attached molecules on a dual-mode biochip. Experimental studies were conducted to reveal that both SPR and SERS signals can be acquired from the same biochip. SPR excitation and low concentration SERS detection are successfully performed on metallic nanogap grating with periodicities of 400 or 600 nm ensuring the SPR excitation under the illumination of 633 or 785 nm irradiation, respectively. The excited SPR propagates on the metallic surface, efficiently excites dipole moment resonance at the nanogap in the grating trough, leading to extremely high local electric field built up at the nanogap and the metallic surface. Therefore, besides SPR detection, SERS evaluation can be conducted to identify the molecules attached on the biochip. The experimental results show that the SPR bulky sensitivity of the dual-mode biochip is $S = 68.8^\circ/\text{RIU}$, and the surface sensitivity is $S = 1.5^\circ/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$. The Raman enhancement factor of the dual-mode biochip reaches up to 10^6 and the minimum detection concentration of 10^{-15} mol/L could be achieved. Due to its high-fidelity measurement of the dual-mode chip and the high precision of microscopy imaging technology, multi-channel label-free detection is expected to be widely used in biological detections. Our future work is to achieve the practical application of SPR-SERS dual-mode biological detection.

Key words SPR, SERS, dual-mode, SPR-SERS, nanogaps

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0387

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61377054, 61675140).

**Corresponding author.

Tel: 13981850996, E-mail: panglin_p@yahoo.com

Received: December 17, 2016 Accepted: March 24, 2017