

LSPR 生物传感器在临床医学检测应用中的研究进展

段瑞岐, 于秀章, 兰竹, 李林, 郑明蓉*

四川大学华西第二医院妇产科; 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 成都 610041

摘要: 肿瘤标志物在人类医学及恶性肿瘤的早期诊断、治疗监测及预后评估方面具有重要作用。目前血清肿瘤标志物的检测方法主要有放射免疫法(RIA), 酶联免疫吸附法(ELISA)及化学发光免疫法(CLEIA)等, 这些方法各自存在放射性污染、操作繁琐、检测时间长、价格昂贵等缺点, 限制了血清肿瘤标志物在临床医学及肿瘤检测中的应用。新近出现的基于局域表面等离子体共振效应(LSPR)的传感器因在生物医学检测领域极具优势而成为研究热点。基于局域表面等离子体共振效应的生物传感器, 利用贵金属纳米结构对周围介质环境变化敏感的基本原理, 可将生物分子吸附引发的金属纳米颗粒外界介质折射率的改变转化为可测量的 LSPR 峰值吸收波长有规律的移动以实现对传感器表面样品的检测, 具备检测灵敏度高、特异性好、免标记、设备便携、成本低的优点, 具备临床检测潜力。但到目前为止, 利用此传感器检测与疾病及肿瘤相关的肿瘤标志物的类似研究报道较少。在本文中, 我们针对 LSPR 生物传感器的传感原理、国内外的研究进展以及我们在此方面的主要研究成果进行了综述。

关键词: 局域表面等离子体共振效应; 生物传感器; 临床医学; 肿瘤标志物

中图分类号: O539; R508

文献标志码: A

Research progress in applications of LSPR biosensor for clinical medicine detection

Ruiqi Duan, Xiuzhang Yu, Zhu Lan, Lin Li and Mingrong Xi*

Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education; Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Tumor biomarker plays an important role in early diagnosis, treatment evaluation, and prognosis prediction for human medicine and cancers. At present, the human serum tumor biomarker detection methods mainly include radioimmunoassay (RIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and chemiluminescence immunoassay (CLEIA), which have disadvantages of radioactive contamination, complicated operation, and long detection time and high cost. Various issues exist in these methods which limit its widespread applications in clinic screening. Recently, biosensors based on localized surface plasmon resonance (LSPR) have attracted much research attention for their remarkable superiority in the domain of biomedicine detection. The LSPR biosensor, a novel type of optical fiber-based biosensor, uses an optical fiber or optical fiber bundle to transform biological recognition information into analytically useful signals in the LSPR spectrum, which is suitable for clinical detection because of the advantages of high sensitivity, high specificity, label free, portable equipment and lower cost. However, up to now, there was little progress on the report of the detection of tumor biomarkers associated diseases and tumors by using this LSPR biosensor. In this paper, the principle and research progress of local surface plasmon resonance biosensor, as well as the main findings of our study in the detection of tumor markers are reviewed.

Keywords: localized surface plasmon resonance; biosensor; clinical medicine; tumor biomarker

DOI: 10.3969/j.issn.1003-501X.2017.02.003

Citation: Opto-Elec Eng, 2017, 44(2): 152-160

收稿日期: 2016-10-24; 收到修改稿日期: 2016-12-28

*E-mail: qmrjzz@126.com

1 引言

近来,纳米材料和纳米技术发展迅猛,纳米材料因其有独特电磁学、光学以及力学特性而受到广泛关注^[1-3]。随着纳米科技的兴起,基于贵金属纳米粒子所产生的局部表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)效应构建的生物传感器因在检测领域极具潜力,现已成为探测传感领域研究和应用的热点。与表面等离子体类似,局域表面等离子体也具有表面局域和近场增强等独特性质,同时局域表面等离子体的高空间局域性使其在局域空间内具有更为显著的能量增强效应,因此LSPR生物传感器在保留SPR传感器高灵敏度、高选择性、实时、免标记等特点的同时,还具有设备体积小、成本低等优势^[4]。

肿瘤是严重威胁人类生存和社会发展的重大疾病,是21世纪我国和世界面临的最严重的公共卫生问题之一。大多数肿瘤患者在确诊时已有不同程度的局部或远处转移,患者预后差。早期诊断对提高肿瘤治愈率以及提高患者的生存质量,减轻社会经济负担具有重要意义。肿瘤标志物是肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成、分泌,或是由机体反应而产生反映肿瘤存在和生长的一类化学物质,在肿瘤筛查、诊断、疗效评价及随访等方面具有重要作用。目前临幊上肿瘤标记物的血清检验通常采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射性免疫试验(RIA)等方法。而这些方法在灵敏度、检测效率、实时性、免标记探测和生物安全性等方面存在着较大缺陷;而灵敏度较高的速率散射比浊法也因仪器试剂昂贵、检测成本高的原因难以得到普及应用。

作为新型的生物传感器,LSPR具有小分子检测灵

敏性好、分辨率高、非特异结合性小等优点,可将其特有灵敏性与生物反应的特异性结合在一起,且检测成本相对较低,仪器简单、便携,使其在临床检测中具有广阔的应用前景。尽管LSPR生物传感器在肿瘤标志物检测及肿瘤早期诊断方面具有诸多优点和广阔发展空间,但目前国内关于将其应用于临床医学检测尤其是肿瘤标志物检测方面的研究仍较少。我们在此方面做了大量的研究工作,并得到了一些有意义的结果,值得进一步深入研究。现将LSPR生物传感原理及其临床应用,尤其在肿瘤标志物检测方面的研究进展进行综述,从LSPR生物传感器传感原理、国内外相关研究进展以及本课题组在此方面的主要研究成果三方面展开。

2 局域表面等离子体共振生物传感原理

局域表面等离子体共振是一种由入射光(电磁场)与金属纳米粒子表面自由电子间相互作用产生的物理光学现象:入射光激发金属粒子表面自由电子发生集体振荡,当入射光频率与自由电子集体振荡频率相等时达到共振,展现出强烈的表面等离子体共振吸收,在紫外可见消光光谱中表现出特征消光峰。金、银等贵金属纳米粒子因具有很强的局域表面等离子体共振效应,它们在紫外可见光波段可展现出很强的光谱吸收。LSPR吸收光谱峰值 λ_{max} 对金属纳米粒子大小、形状及其周围电介质环境变化非常敏感,利用这一特点可以制备LSPR生物传感器,将生物分子吸附引发的局域表面折射率微小变化转换成可测量的波长移动,从而实现对其表面分子的有效探测^[5-6]。其传感检测原理如图1所示。

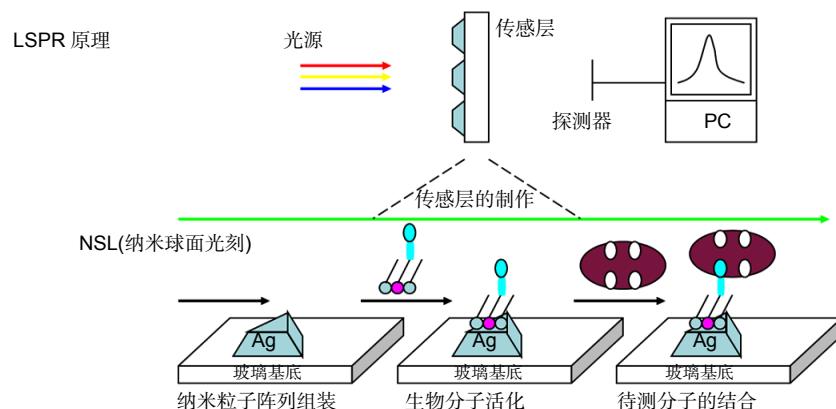


图1 LSPR传感检测示意图^[7].

Fig. 1 Schematic principle of LSPR sensor^[7].

3 LSPR 生物传感器的应用研究进展

1998 年, Englebienne 将胶体金纳米粒子的 LSPR 原理第一次真正应用于免疫传感^[8], 带有抗体的金纳米粒子与目标抗原结合引起纳米粒子周围介质折射率的变化, 从而导致消光光谱的变化, 实验中通过检测消光峰强的变化实现免疫识别。Kreuzer 等^[9]利用 LSPR 传感器研究生物素/抗生蛋白链菌素及抗体/抗原的结合, 可快速定量检测分析物, 无创伤检测血糖。Natan 等制备 LSPR 原理的传感膜^[10], 将纳米粒子移至玻璃基底表面, 实验中利用羟基化基片与带有巯基或氨基的硅烷剂共价结合, 再将纳米粒子与巯基或氨基作用制备贵金属纳米单层膜。Nath 和 Chilkoti 首次将此法制备的材料成功应用于生物传感^[11], 实验中将单层金纳米膜用巯基丙酸(MPA)修饰, 利用金与 MPA 巍基共价结合并通过 MPA 另一端羧基与生物分子氨基共价成酯, 间接将抗体固定于基片上, 最终实现免疫检测。

Van Duyne 小组^[12-14]利用纳米球平版印刷术(NSL)制备了形状、大小、粒子间隔可控的周期性排列的金

属纳米结构, 实验中他们发现制备的三角形银纳米粒子具有显著的光学特性, 其表面等离子体共振光谱 λ_{\max} 对金属纳米粒子形状、大小及 10~30 nm 局域外部电介环境非常敏感。该研究小组利用三角形银纳米粒子 λ_{\max} 的移动, 不仅实现了抗生蛋白链菌素、抗生物素、四聚体蛋白、伴刀豆球蛋白及免疫球蛋白的定量检测, 并对它们的结合常数进行了热力学评价^[7, 15-16], 实验中还实时监测生物素-抗生物素体系的免疫识别过程, 提示此类传感器在生物、医药及环境科学等方面具有广阔应用前景^[17]。2005 年, Van Duyne 将制备的 LSPR 传感器首次用于临床诊断^[16], 利用三明治方法, 将 β 淀粉体可溶性小低聚物(ADDL)的抗体共价结合于传感膜上, 通过检测 ADDL 及二抗, 确定 ADDL 浓度, 如图 2 所示。实验中发现, 随 ADDL 浓度变化, ADDLs 和 anti-ADDL 抗体 LSPR 峰位发生不同程度位移, 并得到 anti-ADDL 抗体与 ADDL 两个抗原决定簇的结合常数。该实验成功检测了临床阿尔茨海默型老年痴呆患者的脑脊液, 证实了此 LSPR 生物传感器可成功应用于临床。

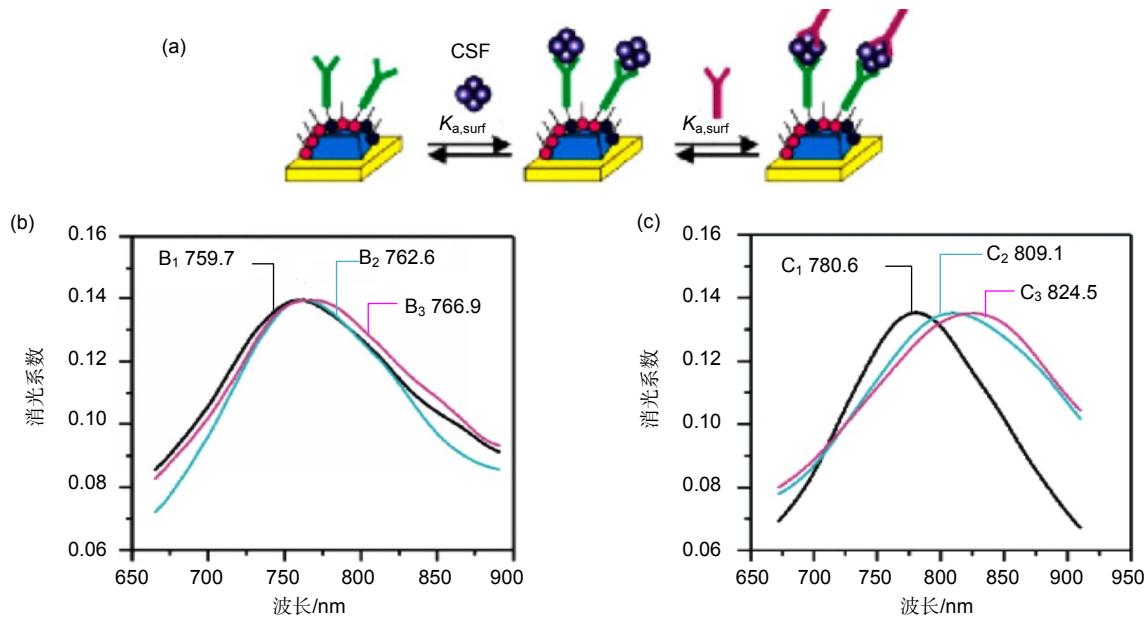


图 2 LSPR 纳米传感器检测人脑脊液样本^[16]。(a) 利用抗体三明治方法检测人脑脊液样本的芯片表面化学反应过程。(b) 传感器检测老年人脑脊液样本的波谱图。B₁~B₃: 功能化银纳米加入 100 nM anti-ADDL(100 mM EDC 活化)(B₁), 加入老年人脑脊液样本(B₂)以及再次加入 100 nM anti-ADDL(B₃)的波谱图。(c) 传感器检测老年患者脑脊液样本的波谱图。C₁~C₃: 功能化银纳米加入 100 nM anti-ADDL(100 mM EDC 活化)(C₁), 加入老年人脑脊液样本(C₂)以及再次加入 100 nM anti-ADDL(C₃)的波谱图。

Fig. 2 Analysis of human CSF samples using a sandwich assay and the LSPR nanosensor^[16]. (a) Surface chemistry for the possible ADDL detection in human CSF samples using the antibody "sandwich" assay. (b) Aging patient: LSPR spectra for each step of the assay. Ag nanoparticles after functionalization with 100 nM anti-ADDL (100 mM EDC) (B₁), CSF (B₂), 100 nM anti-ADDL (B₃). (c) AD patient: LSPR spectra for each step of the assay. Ag nanoparticles after functionalization with 100 nM anti-ADDL (100 mM EDC) (C₁), CSF (C₂), 100 nM anti-ADDL (C₃). All measurements were collected in a N₂ environment.

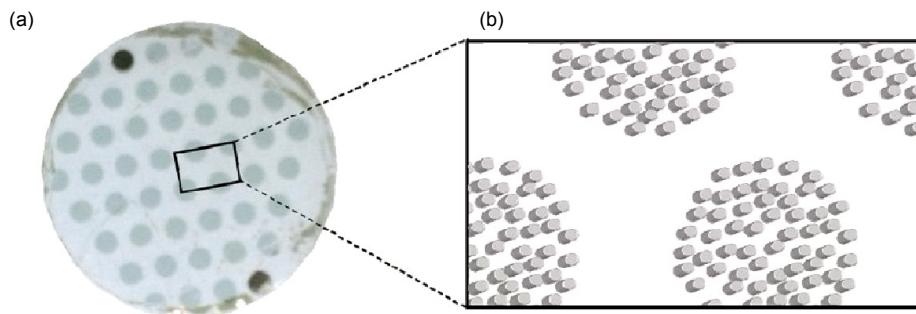


图 3 (a) 随机有序圆柱形纳米粒子阵列的离散圆形区域 25 mm 玻片相机图像。

(b) 每个圆形区域随机有序纳米圆柱阵列玻片示意图^[18]。

Fig. 3 (a) Camera imaging of a 25 mm glass slide patterned with discrete circular regions of randomly ordered cylindrical nanoparticle arrays using a shadow mask. (b) Schematic showing randomly ordered nano-cylinder arrays within each circular region on the glass slide^[18].

此后 LSPR 生物传感器被证实可成功检测多种重要临床指标,如前列腺癌特异性抗原 PSA^[19]、血型^[20]、艾滋病病毒^[21]、基因突变^[22]等,并证实该传感器具有快速、操作方便、免标记、高灵敏等优势,具有较大临床应用潜力。Yoo 等首次报道了利用基于 LSPR 原理的表面纳米结构阵列芯片检测人类 BIGH3 基因突变的研究,发现此传感器可为特异、灵敏检测人类疾病相关的基因突变提供一种新型的分析工具^[22]。而在多通道检测探索方面,美国西北大学对 SPRI 进行修饰,可制备出含多个纳米圆盘的芯片,采用液晶可调谐过滤器采集信号,能实现 15 个生物素-抗生物素的同时检测,如图 3 所示^[18]。另外, Antonio 大学学者通过不同长宽比的金纳米棒分别功能化特异性抗体,从而明确区分不同的生物标志物的量^[23]。台湾学者则在 2012 年第三届 APOS(Asia Pacific Optical Sensors Conference)会议上汇报了其利用银纳米颗粒(AgNPs)和金纳米棒(AuNRs)制备的光纤复用生物传感器^[24]。此外,微流量技术与 LSPR 传感器相结合也是非常有前景的多通道复用传感器制备方式^[25]。

4 本研究组关于 LSPR 生物传感器应用研究成果

本研究小组经过物理方法计算及设计模拟,利用 NSL 与反应离子刻蚀技术(RIE)结合,通过 RIE 的定向刻蚀及聚苯乙烯纳米球膜层作为掩蔽层,实现了纳米粒子大小、尖角间距可控,制作出了金属厚度为 40 nm、周期为 400 nm 的具有 LSPR 传感效应的三角形银纳米粒子阵列。在 LSPR 纳米阵列结构上成功制备生物敏感层,是实现和提高传感器性能的关键因素。

研究中我们选用 11-巯基十一烷酸(11-mercaptoundecanoic acid, MUA)氨基偶联成膜方法制备生物敏感层。通过 MUA 分子末端的巯基与贵金属(金、银)纳米粒子形成离子键,在纳米表面形成 MUA 的巯基自组装单分子层(self-assembled monolayer, SAM),并通过 MUA 分子另一末端的羧基与抗体分子末端的氨基形成酰胺键(在 EDC 等催化剂作用下),使抗体间接固定在金属纳米表面,当单克隆抗体与目标标准品或患者血清中的目标标志物结合时,传感芯片局部表面折射率变化,从而将生物信号转化为光学信号,即消光谱峰值移动进行探测。研究中发现基于氨基偶联法的生物敏感膜的制备方法具有可靠、有效、简单,操作方便等优势,具体示意图见图 4 所示^[26]。

我们搭建了简易紫外-可见光光谱测试平台。具体宏观紫外-可见消光谱的测量是利用带有 CCD 探测器的 Ocean Optics USB4000 光纤光谱仪。光源为 DH-2000 UV-VIS-NIR 光源,为非偏振光,所有的光谱测量都是在标准的几何传输路径进行的。探测光纤的通光孔径为 0.6 mm。整个测试系统的示意图及搭建的简易测试平台如图 5 所示。

首先利用该方法构建的 LSPR 生物传感器完成了对人血清白蛋白标准品的定量测定,并进行了临床病例方面的检测工作^[26]。该 LSPR 传感器检测白蛋白标准品的浓度范围为 1 ng/ml~1 μg/ml,检测限达 1 ng/ml;利用该传感器检测白蛋白标准品及临床患者标本的检测波谱图见图 6 和图 7 所示。研究中成功检测出妇产科临床轻度子痫前期患者尿液中微量尿蛋白,与临床生化检测比较,具有较高的吻合率,这对临床医学产科轻度子痫前期患者的临床普查及管理具有重要的临床意义和应用前景。

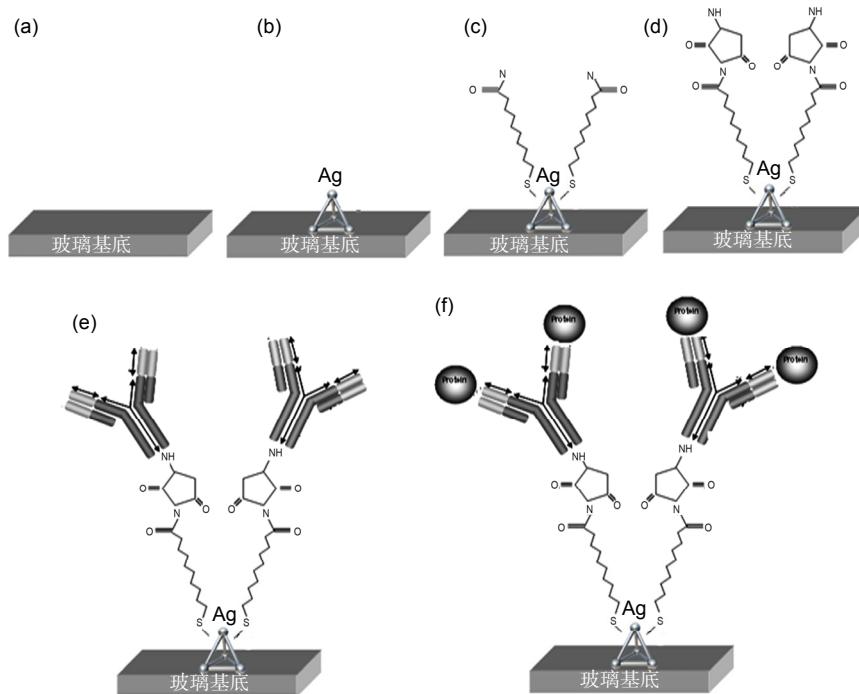


图 4 LSPR 纳米传感芯片检测白蛋白过程^[26]. (a) 芯片玻璃基底. (b) 采用 NSL 技术在芯片表面合成立点阵排列的纳米颗粒. (c) 纳米表面自主装 11-MUA 层. (d) 孵育 EDC 和 NHS, 活化表面疏基. (e) 固定白蛋白抗体. (f) 不同浓度的标准品和样品与芯片进行免疫分析检测.

Fig. 4 Design of LSPR nanobiosensor for albumin detection^[26]. (a) Glass substrate. (b) Surface-confined silver nanoparticles were synthesized using NSL. (c) The nanoparticles were incubated in MUA solution to form a SAM. (d) The substrates were incubated in EDC/NHS. (e) Anti-albumin antibody (10 mg/ml) immobilized the substrate. (f) Varying the concentrations of the albumin or the samples on the substrates completed the albumin immunoassay.

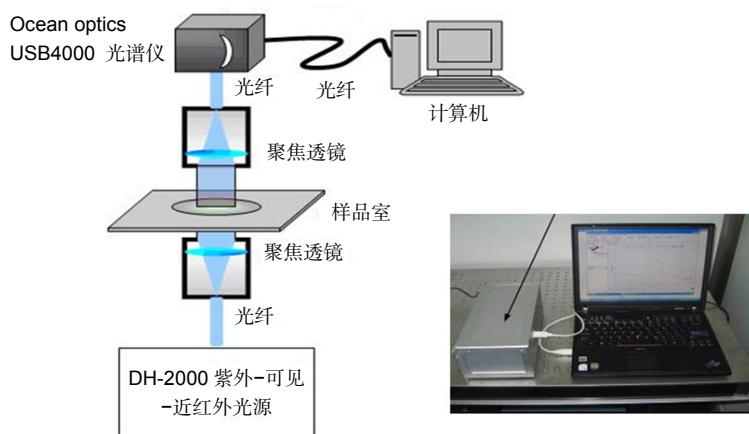


图 5 研究中搭建的消光谱实验测试平台.
Fig.5 Test platform for extinction spectrum experiment.

宫颈癌是全球妇女中仅次于乳腺癌的第二个最常见的恶性肿瘤^[27], 每年宫颈癌新发病例约 50 万, 导致每年约 23.9 万人死亡, 其中 80% 在发展中国家^[28]。我国宫颈癌发病率在世界各国中处于较高水平, 早期筛查、早期诊断及治疗后的严密随访对宫颈癌患者有着

非常重要的意义。鳞状上皮细胞癌抗原(SCC-Ag)是从宫颈鳞状上皮细胞癌的肝脏转移灶中提取并再分离得到的一种关联抗原。目前国内外采用检测 SCC-Ag 水平作为宫颈癌的诊断、病情监测的一个重要指标^[29-30]。研究中我们在 LSPR 纳米阵列上成功固定抗 SCCA 单

克隆抗体并实现了对 SCCA 的有效检测,其检测 SCCA 标准品的有效浓度范围为 0.1 pM ~1000 pM, 检测波谱如图 8 所示。实验中利用该传感器对临床患者的血液标本进行了有效检测^[31], 检测结果与传统检验方法高度一致。同时利用不同浓度的标准品的检测绘制出标准曲线, 研究还发现使用适当的再生溶液, 例如 50 mM 甘氨酸-HCl(pH2.0), 可实现该传感器 4~5 次重复使用。此传感器对宫颈癌的早期临床普查、早期诊断及防治具有重要临床意义。

卵巢癌是死亡率最高的女性生殖系统肿瘤, 严重威胁着广大女性的健康和生命。卵巢癌早期诊断极为困难, 70% ~ 80% 患者临床发现已为晚期, 早期诊断对改善卵巢癌患者预后, 提高患者生存率至关重要。目前早期诊断卵巢癌仍是医学界的难题。肿瘤标志物在卵巢癌早期诊断中具有非常重要的地位。人附睾蛋白 4(human epididymis gene protein 4, HE4)、p53 为临幊上重要的卵巢癌标志物^[32-35], 在卵巢癌早期诊断及临幊监测中具有重要临幊价值。研究中我们利用 MUA

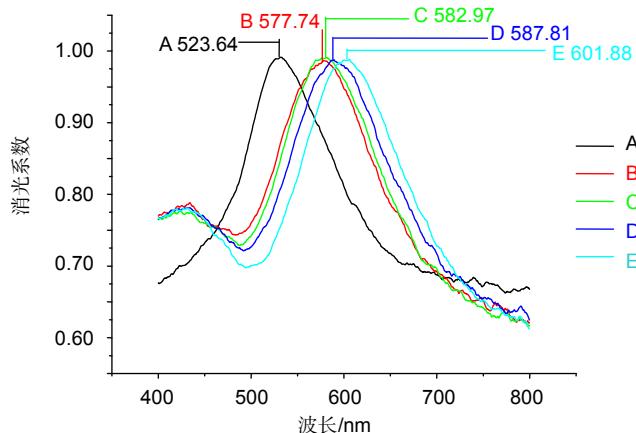


图 6 LSPR 传感芯片测定 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的白蛋白的波谱图^[26]. A: 原始基线值. B: 疏基化合物在芯片表面形成自组装单分子层(SAM)后的波峰值. C: 交联剂作用后的波峰值. D: 固定抗白蛋白抗体的波峰值. E: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 白蛋白反应上样波谱图.

Fig. 6 Specific LSPR extinction spectrum for 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ albumin detection^[26]. A: Ag nanoparticles before chemical modification. B: MUA (1 mM). C: EDC/NHS solution. D: antibody (10 mg/ml). E: albumin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). All spectra were collected in air.

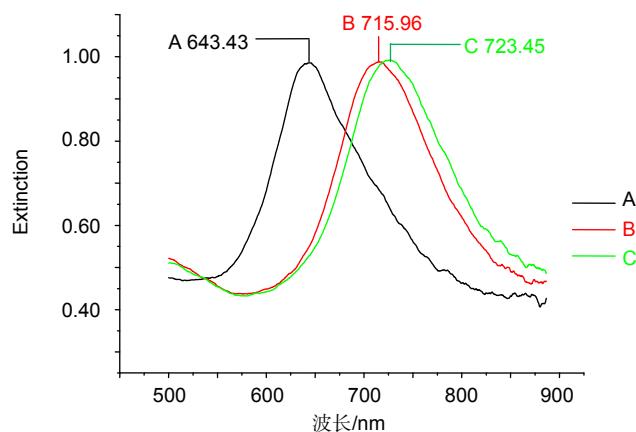


图 7 LSPR 传感器测定临床患者标本的波谱图^[26]. A: 原始基线值. B: 固定抗白蛋白抗体的波峰值. C: 轻度子痫前期患者尿液稀释后检测出来的微量蛋白尿的波峰值.

Fig. 7 Specific LSPR extinction spectrum for patient albumin detection^[26]. A: Ag nanoparticles before chemical modification. B: antibody. C: clinical sample. All spectra were collected in air environment.

氨基偶联成膜方法在 LSPR 纳米阵列上制备生物敏感层，固定抗 HE4 单克隆抗体，成功制备出可检测卵巢癌特异标志物 HE4 的生物传感器。该传感器可检测 HE4 标准品的有效浓度范围为 10 pM ~10000 pM，检测波谱如图 9 所示^[36]。该传感器与传统 ELISA 方法相比，具有较高的吻合率，同时克服了传统检测方法检测效率低、操作复杂等缺点，具有重要的临床价值，在临床检测中更突显出其方便快捷的优越性。

p53 是迄今为止认为与人类恶性肿瘤相关性最高的抑癌基因，其突变与大多数恶性肿瘤发生发展密切相关^[37-42]。研究中首次探索利用 LSPR 传感器检测与肿瘤相关的 p53 基因突变。在 LSPR 纳米芯片上采用 MUA

氨基偶联法制备生物敏感层，有效固定特异 DNA 探针，构建出可检测 p53 基因突变的新型 LSPR 传感器，传感器制备及检测示意图如图 10 所示^[43]。利用制备的传感器对人工合成 DNA 序列及临床患者 PCR 扩增产物进行了有效检测，检测目的序列的最低浓度可达 10 nM，检测范围为 10 nM~10 μM；其检测结果与 DNA 直接测序高度一致；结果显示通过对比 LSPR 响应信号可有效区分辨别发生在 p53 基因上的单碱基突变，此传感器在检测基因突变方面具有较高准确性、高灵敏、免标记、操作简单等优势，有望为临床肿瘤高危人群进行 p53 基因突变普查提供一种具有临床前景的新方法^[43]。

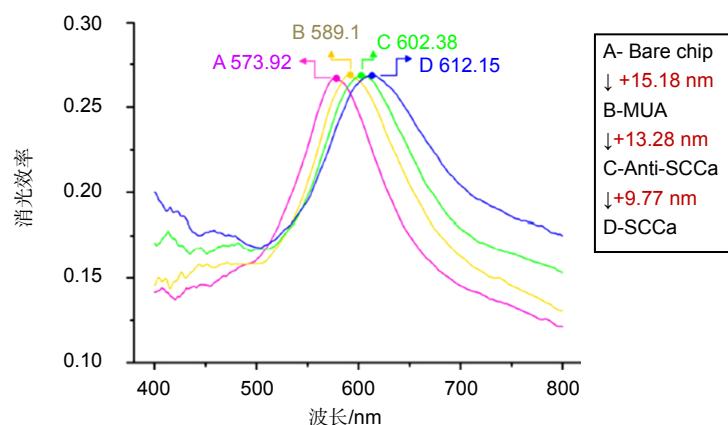


图 8 LSPR 传感器检测 100 pM SCCA 的波谱图^[31]. A: 原始基线值. B: MUA 在芯片表面形成 SAM 后的波峰值. C: 固定单克隆抗体的波峰值. D: 100 pM SCCA 反应点样后的波谱图.

Fig. 8 Specific LSPR extinction spectrum for 100 pM SCCA detection^[31]. A: Bare silver nanochip. B: Modification of 1 mM MUA. C: Incubation with 10 μg/mL monoclonal anti-SCCa. D: Detection of 100 pM SCCA.

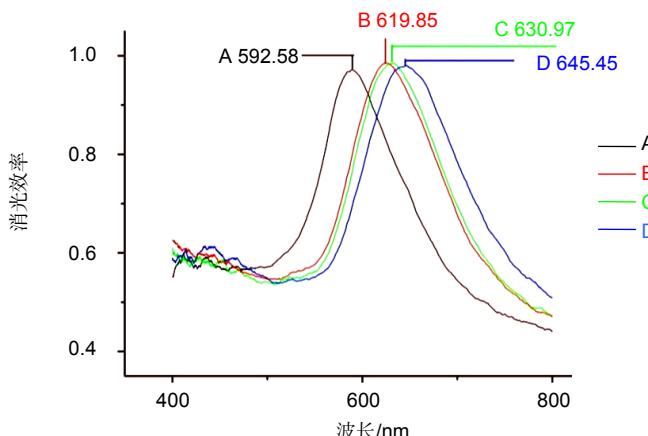


图 9 LSPR 传感芯片测定 HE4 的波谱图^[36]. A: 原始基线值. B: 11-MUA 自组装单分子层. C: 固定 10 μg/ml 抗 HE4 单克隆抗体. D: 与 500 pM 的 HE4 标准品进行抗原抗体反应($\Delta\lambda_{max}+14.48$ nm).

Fig. 9 Specific LSPR extinction spectrum for HE4 detection^[36]. A: Bare silver nanochip. B: 1 mM 11-mercaptopoundecanoic acid. C: functionalized biosensor with 10 μg/mL antibody. D: 500 pM HE4.

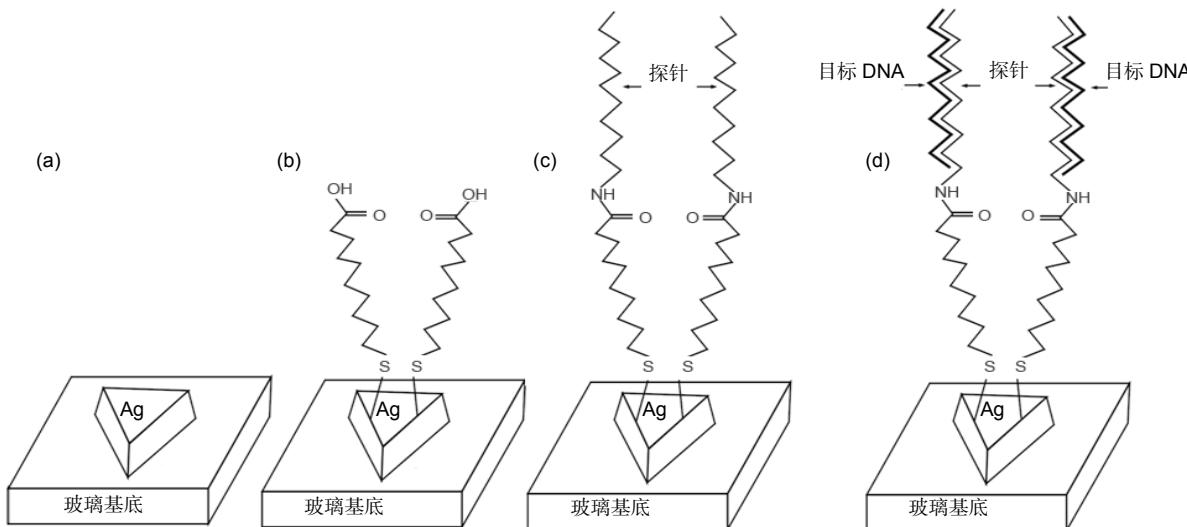


图 10 构建检测 p53 基因突变的 LSPR 纳米生物传感器^[43]. (a) 利用 NSL 方法在玻璃基底上制备三角柱银纳米. (b) 在银纳米表面修饰 MUA 形成自组装层. (c) EDC/NHS 催化下将末端修饰氨基的 DNA 探针固定在纳米表面. (d) 固定探针与目标序列杂交.

Fig. 10 (a) Triangular Ag nanoparticles were fabricated on a glass substrate using NSL. (b) The nanoparticles were modified with MUA to form a SAM. (c) Amine-terminated DNA probes were immobilized on the MUA-coated nanoparticles with EDC/NHS activation. (d) Target DNA was hybridized with the immobilized probe.

5 展望

贵金属纳米粒子由于具有独特的 LSPR 光学特性，在生物传感器方面的应用研究备受关注。相比大尺度传感器或其它不能使分析物复原的检测技术，LSPR 生物传感器显示出明显优势。在临床工作中如能将 LSPR 生物传感器成功用于医学及肿瘤相关标志物的检测中，必将会弥补目前检测方法的不足，为临床医学的发展及恶性肿瘤早期诊治起到重要作用。虽然作为实际检测工具应用之前仍有许多问题需要解决，但随着制备技术的提高及越来越多互补技术的发展集成，相信 LSPR 生物传感器在未来将会拥有美好的应用前景。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(61505126)。

参考文献

- Endo T, Kerman K, Nagatani N, et al. Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance-based core shell structured nanoparticle layer nanochip[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**(18): 6465–6475.
- Cantale V, Simeone F C, Gambari R, et al. Gold nano-islands on FTO as plasmonic nanostructures for biosensors[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, **152**(2): 206–213.
- Haynes C L, Van Duyne R P. Nanosphere lithography: a versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, **105**(24): 5599–5611.
- Haes A J, Van Duyne R P. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, **379**(7–8): 920–930.
- Willets K A, Van Duyne R P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, **58**(1): 267–297.
- Hutter E, Fendler J H. Exploitation of localized surface plasmon resonance[J]. *Advanced Materials*, 2004, **16**(19): 1685–1706.
- Haes A J, Van Duyne R P. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface Plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**(35): 10596–10604.
- Englebienne P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes[J]. *The Analyst*, 1998, **123**(7): 1599–1603.
- Kreuzer M P, Quidant R, Salvador J P, et al. Colloidal-based localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for the quantitative determination of stanozolol[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **391**(5): 1813–1820.
- Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B, et al. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers[J]. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**(4): 735–743.
- Nath N, Chilkoti A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, **74**(3): 504–509.
- Sherry Leif J, Jin Rongchao, Mirkin Chad A, et al. Localized surface Plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms[J]. *Nano Letters*, 2006, **6**(9): 2060–2065.

- 13 Chan George H, Zhao Jing, Hicks Erin M, et al. Plasmonic properties of copper nanoparticles fabricated by nanosphere lithography[J]. *Nano Letters*, 2007, **7**(7): 1947–1952.
- 14 Chan George H, Zhao Jing, Schatz George C, et al. Localized surface Plasmon resonance spectroscopy of triangular aluminum nanoparticles[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**(36): 13958–13963.
- 15 Haes A J, Van Duyne R P. Nanoscale optical biosensors based on localized surface plasmon resonance spectroscopy[J]. *Proceedings of SPIE*, 2003, **5221**: 47–58.
- 16 Haes Amanda, Chang Lei, Klein William L, et al. Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**(7): 2264–2271.
- 17 Riboh J C, Haes A J, McFarland A D, et al. A nanoscale optical biosensor: real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**(8): 1772–1780.
- 18 Ruemmele J A, Hall W P, Ruvuna L K, et al. A localized surface Plasmon resonance imaging instrument for multiplexed biosensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(9): 4560–4566.
- 19 Truong Phuoc Long, Cao Cuong, Park Sungho, et al. A new method for non-labeling attomolar detection of diseases based on an individual gold nanorod immunosensor[J]. *Lab on a Chip*, 2011, **11**(15): 2591–2597.
- 20 Yamamichi J, Ojima T, Yurugi K, et al. Single-step, label-free quantification of antibody in human serum for clinical applications based on localized surface plasmon resonance[J]. *Nanomedicine*, 2011, **7**(6): 889–895.
- 21 Lee Jin Ho, Kim Byung chan, Oh Byung Keum, et al. Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1[J]. *Nanomedicine*, 2013, **9**(7): 1018–1026.
- 22 Yoo S Y, Kim D K, Park T J, et al. Detection of the most common corneal dystrophies caused by BIGH3 gene point mutations using a multispot gold-capped nanoparticle array chip[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, **82**(4): 1349–1357.
- 23 Tang Liang, Casas Justin. Quantification of cardiac biomarkers using label-free and multiplexed gold nanorod bioprobes for myocardial infarction diagnosis[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, **61**: 70–75.
- 24 Lin Hsing Ying, Huang C S, Liu Yu Chia, et al. Multiplex fiber-optic biosensor using multiple particle Plasmon resonances[J]. *Proceedings of SPIE*, 2012, **8351**: 83512S.
- 25 Acimović S S, Ortega M A, Sanz V, et al. LSPR chip for parallel, rapid and sensitive detection of cancer markers in serum[J]. *Nano Letters*, 2014, **14**(5): 2636–2641.
- 26 Lai Ting, Hou Qiannan, Yang Huan, et al. Clinical application of a novel silver nanoparticles biosensor based on localized surface Plasmon resonance for detecting the microalbuminuria[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010, **42**(11): 787–792.
- 27 Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia[J]. *The Lancet Oncology*, 2002, **3**(1): 11–16.
- 28 Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2005, **55**(2): 74–108.
- 29 Gadducci A, Tana R, Cosio S, et al. The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: a review of the literature[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008, **66**(1): 10–20.
- 30 Esajas M D, Duk J M, de Brujin H W A, et al. Clinical value of routine serum squamous cell carcinoma antigen in follow-up of patients with early-stage cervical cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2001, **19**(19): 3960–3966.
- 31 Zhao Qianying, Duan Ruiqi, Yuan Jialing, et al. A reusable localized surface plasmon resonance biosensor for quantitative detection of serum squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer patients based on silver nanoparticles array[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, **9**: 1097–1104.
- 32 Shah C A, Lowe K A, Paley P, et al. Influence of ovarian cancer risk status on the diagnostic performance of the serum biomarkers mesothelin, HE4, and CA125[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2009, **18**(5): 1365–1372.
- 33 Hellstrom I, Heagerty P J, Swisher E M, et al. Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms[J]. *Cancer Letters*, 2010, **296**(1): 43–48.
- 34 Anastasi E, Giovanna M G, Viggiani V, et al. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer[J]. *Tumor Biology*, 2010, **31**(2): 113–119.
- 35 Yurkovebtsky Z, Skates S, Lomakin A, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, **28**(13): 2159–2166.
- 36 Yuan Jialing, Duan Ruiqi, Yang Huan, et al. Detection of serum human epididymis secretory protein 4 in patients with ovarian cancer using a label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**: 2921–2928.
- 37 Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis[J]. *Cancer*, 1992, **70**(12): 2778–2784.
- 38 Flamini G, Curigliano G, Ratto C, et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 overexpression in colorectal cancer. An immunohistochemical analysis[J]. *European Journal of Cancer*, 1996, **32**(5): 802–806.
- 39 Gu Jian, Zhang Lidong, Swisher Stephen G, et al. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis[J]. *Oncogene*, 2004, **23**(6): 1300–1307.
- 40 Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, et al. P53 mutations in ovarian cancer: a late event[J]. *Oncogene*, 1991, **6**(9): 1685–1690.
- 41 Shahin M S, Hughes J H, Sood A K, et al. The Prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, **89**(9): 2006–2017.
- 42 Sagarra R A M, Andrade L A L A, Martinez E Z, et al. P53 and Bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2002, **12**(6): 720–727.
- 43 Duan Ruiqi, Yuan Jialing, Yang Huan, et al. Detection of p53 gene mutation by using a novel biosensor based on localized surface Plasmon resonance[J]. *Neoplasma*, 2012, **59**(3): 348–353.