

基于催化发夹自组装的SERS微流控芯片用于结直肠癌患者血清中miRNA的快速和高灵敏检测

戴春¹, 谭明¹, 刘增源¹, 史君成¹, 汪峰⁴, 曹小卫³, 沈康³, 杨海帆³, 韦伟^{2*}

1. 扬中市人民医院普外科, 镇江 212200

2. 扬州大学附属江都人民医院胃肠外科, 扬州 225200

3. 扬州大学医学院, 扬州 225009

4. 扬州市人民医院检验科, 扬州 225001

* 联系人, E-mail: jd.k.kenny@163.com

2024-09-18 收稿, 2025-01-05 修回, 2025-01-07 接受, 2025-01-08 网络版发表

国家自然科学基金(81701825)、江苏省非编码RNA基础与临床转化重点实验室开放课题(202285)、扬州市卫生健康委员会医学科研项目(2023-1-04)和扬州市社会发展基金(YZ2023094和YZ2022089)资助

摘要 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球最常见的癌症之一, 死亡率极高. 本研究以催化发夹自组装(catalytic hairpin assembly, CHA)作为信号放大策略, 结合磁珠(magnetic beads, MBs)快速富集分离的特点, 构建表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)微流控芯片, 用于检测CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-5p. SERS微流控芯片检测miR-122-3p和miR-150-5p的线性范围为100 amol/L~1 nmol/L, 检测限(limit of detection, LOD)分别为19.74和16.35 amol/L. 该方法操作简便、快速、易于操作, 整个检测过程可在5 min内完成. 此外, SERS微流控芯片稳定性高、特异性强、可重复性好, 应用于临床血清检测表现出较高的准确性. SERS-微流控技术突破了现有方法的技术瓶颈, 不仅为生物标志物检测提供了新的思路, 也为CRC筛查提供了新的技术平台.

关键词 结直肠癌, 表面增强拉曼散射, 微流控芯片, 催化发夹自组装, 微小RNA

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球最常见的癌症之一, 死亡率高^[1,2]. 因此, 开发一种有效的CRC筛查方法具有重要的临床价值^[3]. 微小RNA (microRNA, miRNA)是一类由19~23个核苷酸组成的内源性非编码单链RNA, 在细胞的增殖、分化、凋亡及细胞间的信号传导等生理活动中具有重要的调控作用^[4,5]. 大量科学研究证明, 肿瘤组织与正常组织之间的miRNA表达水平明显不同, 当然这些肿瘤组织中包括CRC^[6,7]. 研究发现miR-122-3p和miR-150-5p在CRC患者体液中过表达^[8,9], 并且在晚期体液中表达水平更高. 此外, miR-122-3p和miR-150-5p的异常表达调控肿瘤相关过程(迁移、侵袭、血管生成和转移)的机制也被报道^[10,11]. 因

此, miRNA可作为CRC早期诊断、疗效评价和预后判断的生物标志物. 然而, miRNA的长度较短、浓度低, 且体液成分复杂, 因此体液中miRNA的定量分析具有挑战性^[12]. 传统的miRNA检测方法, 如微阵列、qRT-PCR和Northern印迹杂交在特异性、灵敏度和成本方面存在一定的缺陷^[13~16]. 因此, 迫切需要一种快速、可靠、高灵敏检测miRNA的方法.

表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)是一种基于振动光谱的高灵敏分析方法. 通过将分析物分子吸附到贵金属粗糙纳米材料表面, 使拉曼散射光信号强度放大 $10^7 \sim 10^{14}$ 倍^[17,18]. 虽然不同的纳米材料可以改善SERS信号, 但是将待测样本

引用格式: 戴春, 谭明, 刘增源, 等. 基于催化发夹自组装的SERS微流控芯片用于结直肠癌患者血清中miRNA的快速和高灵敏检测. 科学通报, 2025, 70: 600~611
Dai C, Tan M, Liu Z, et al. Rapid and highly sensitive detection of miRNAs in serum of colorectal cancer patients by surface-enhanced Raman spectroscopy microfluidic chip based on catalytic hairpin assembly (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 600~611, doi: [10.1360/TB-2024-0980](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0980)

滴涂在SERS基底表面进行测试, 样本损耗大, 存在重现性差等问题. 此外, 待测物暴露在空气中, 容易被污染或氧化, 导致SERS信号的信噪比较低. 因此, 研究人员将SERS与微流控芯片相结合, 开发了SERS微流控芯片. 微流控芯片可以作为一个集成平台, 它将所有实验室程序集成到芯片中, 消除了复杂的手动步骤, 并为反应提供了稳定的环境, 使SERS检测更加高效、安全和环保. 尤为值得一提的是, 免泵微流控芯片通过采用先进的微通道表面亲水性处理技术, 并巧妙设计梳状结构的微通道, 有效增强了微通道的毛细作用力, 使得液体能够在微通道内自由流动, 实现了无需依赖传统外部泵驱动的全自动一体化检测. 同时, SERS的高灵敏度完全适用于微流控芯片. 近年来, SERS微流控芯片已广泛应用于生物传感应用. Gao等人^[19]利用纳米条纹微锥阵列集成的SERS微流控芯片, 实现了对两种心脏标志物的同时检测, 其检测灵敏度高达0.01 ng/mL. Ma等人^[20]设计了一种新型的互逆信号放大探针, 并结合交流电动力学的微流控技术, 有效增强了SERS信号, 从而实现了miRNA的精准定量分析.

血清中某些miRNA表达水平非常低, 聚合酶链式反应、环介导等温扩增、滚环扩增等核酸信号放大策

略已被广泛使用, 用于提高miRNA检测的特异性和灵敏度^[21-23]. 然而, 这些策略强烈依赖于酶, 需要高成本和严格的反应条件. 催化发夹自组装(catalytic hairpin assembly, CHA)是一种新兴的miRNA信号放大手段, 无需酶催化, 在室温下无需扩增设备即可进行^[24]. 因此, 在CHA的辅助下, SERS微流控芯片可以实现miRNA的快速和高灵敏检测.

在本研究中, 我们构建了一种基于CHA的SERS微流控芯片, 用于检测两种CRC相关miR-122-3p和miR-150-5p. 如图1所示, 首先, 制备的金纳米笼(Au nanocage, AuNCs)与磁珠(magnetic beads, MBs)作为液态增强基底. 接着, 将两种具有可区分特征峰的拉曼信号分子4-氨基苯硫酚(4-aminothiophenol, 4-ATP)和5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)以及发夹DNA1(hairpin DNA, HP₁)分别修饰AuNCs表面, 制备两种SERS探针(AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁和AuNCs@DTNB@HP₁₋₂). 将发夹DNA2(hairpin DNA, HP₂)分别固定在MBs表面, 制备两种捕获探针(MBs@HP₂₋₁和MBs@HP₂₋₂). 随后, 将样本溶液、SERS探针、捕获探针滴加至3个加样口, 样本中目标miRNA触发CHA反应(第一次信号放大), 形成大量

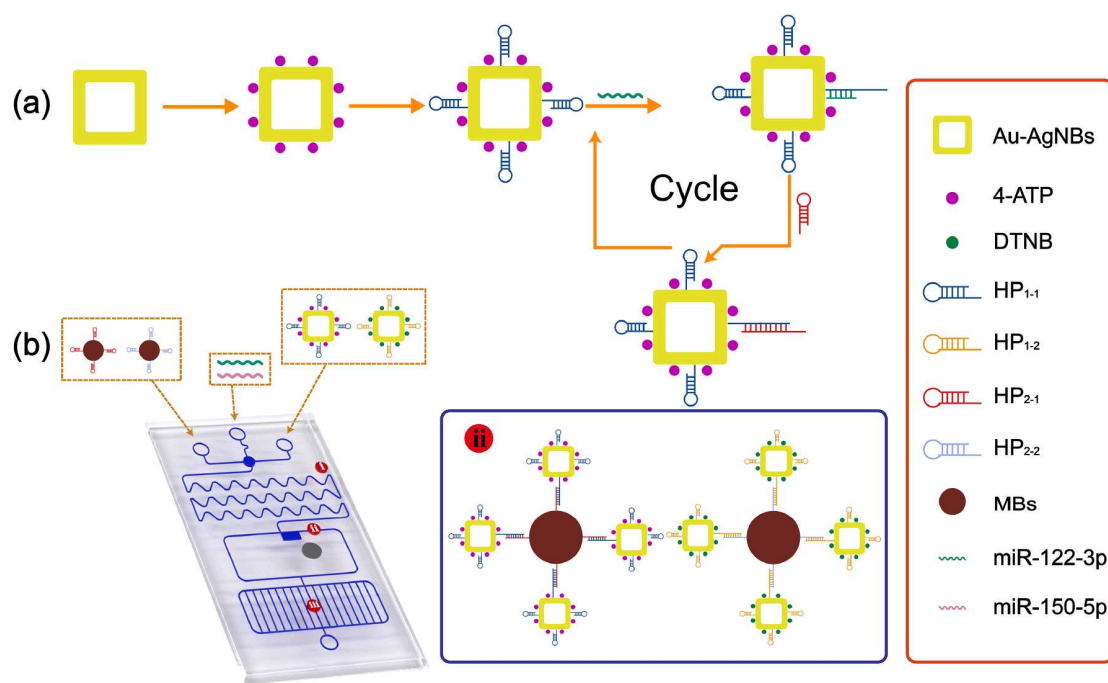


图1 (网络版彩色)SERS微流控芯片检测miR-122-3p和miR-150-5p的原理图. (a) SERS探针的合成过程; (b) SERS微流控芯片的检测原理
Figure 1 (Color online) Schematic diagram of the SERS microfluidic chip for detecting miR-122-3p and miR-150-5p. (a) Synthesis process of the SERS probe; (b) detection principle of the SERS microfluidic chip

HP₁-HP₂复合物(AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁-MBs@HP₂₋₁和AuNCs@DTNB@HP₁₋₂-MBs@HP₂₋₂). 在嵌微型磁铁的作用下, HP₁-HP₂复合物被富集到矩形收集室内, 显著增强SERS信号(第二次信号放大). 根据4-ATP和DTNB在1083和1330 cm⁻¹处特征峰位置和强度得到miR-122-3p和miR-150-5p的种类和浓度. 优化实验条件, 评估SERS微流控芯片的灵敏度、重复性、稳定性和特异性. 最后, 使用该SERS微流控芯片检测健康人和CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-5p表达水平的差异. 为了验证SERS结果的准确性, 使用qRT-PCR方法进行验证.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氯金酸(HAuCl₄)、六次甲基四胺(hexamethylenetetramine, HMT)、硝酸银(AgNO₃)、抗坏血酸(ascorbic acid, AA)、十六烷基三甲基氯化铵(hexadecyltrimethylammonium chloride, CTAC)、氢氧化钠(NaOH)、磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)、MBs、盐酸(HCl)和三乙酸酯(C₆H₅NO₅)购自国药控股化学试剂有限公司(中国). 5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB)购自西格玛奥立奇公司. 所有试剂均未进行任何纯化. qRT-PCR检测试剂盒购自基蛋生物科技股份有限公司. 使用的去离子水由电阻率为18.2 MΩ的Millipore系统制备. 表1中CHA反应使用的核苷酸序列, 包括HP₁₋₁、HP₁₋₂、HP₂₋₁和HP₂₋₂, 单碱基错配序列(MT1-1和MT1-2), 三碱基错配序列(MT3-1和MT3-2)和随机序列均购

自生工生物工程(上海)股份有限公司.

1.2 临床样本采集

采集来自扬中市人民医院的受试者的60份血清样本, 其中健康人平均年龄46.1岁, 男性20例, 女性10例; CRC患者平均年龄66.2岁, 男性18例, 女性12例. 所有受试者均签署知情同意书, 临床试验得到了扬中市人民医院医学伦理委员会的审查和批准(NO. LW2024008).

1.3 AuNCs的合成

利用离子置换法制备AuNCs. 具体步骤为: 首先, 在室温下将100 mL 1%的HAuCl₄与3 mL 30 mmol/L的HMT溶液以700 r/min搅拌混合. 2 min后, 溶液颜色变得透明. 随后, 将0.5 mL PVP和100 mL 10 mmol/L AgNO₃加入上述溶液中进一步反应. 最后, 将50 mL 0.1 mol/L的AA加入到反应体系中. 持续搅拌直到溶液变成紫色, 在室温下静置12 h. 反应完成后, 以700 r/min离心反应产物, 将沉淀物重新分散在5 mL去离子水中, 得到AuNCs.

1.4 SERS探针的制备

将4-ATP和DTNB作为拉曼信号分子通过金-硫共价键修饰到AuNCs表面, 巯基化的HP₁₋₁和HP₁₋₂同样以金-硫共价键的方式进行锚定, 制备两种SERS探针(AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁和AuNCs@DTNB@HP₁₋₂). 具体步骤如下: 在剧烈搅拌下将4-ATP/DTNB(200 mL, 2 mmol/L)与AuNCs溶液(8 mL)混合. 反应1 h后, 将新制备的TECP缓冲液(160 mL, 1 mmol/L)活化HP₁₋₁和

表 1 实验中CHA反应使用的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences used for CHA reactions in the experiments

名称	序列(5'-3')
miR-122-3p	AAC GCC AUU AUC ACA CUA AAU A
miR-150-5p	UCU CCC AAC CCU UGU ACC AGU G
MT1-1	AAC GCC AUU AUC ACA CCA AAU A
MT1-2	UCU CCG AAC CCU UGU ACC AGU G
MT3-1	AAC GCC AUCC GC ACA CUA AAU A
MT3-2	UCU GGG AAC CCU UGU ACC AGU G
Random	ACC AGC UCG AGU AAG GAA AUG
HP ₁₋₁	HS-TGT TGC ACT ACG TGA CAA TGG TGU TTG CCT CAG CAT CGA CTG CAA CAC AT
HP ₁₋₂	HS-AGC TCC CTT GTA CCA GTG AGA CTT CTA GAC GTA CTT GCT CAC TGG TAC AAG GGT TGG GAG A-NH ₂
HP ₂₋₁	TGA GGC AAC ACC ATT GTC ACG ATA AGT CGA TGG TCG TGA CAA TGG TGT TAC GT-NH ₂
HP ₂₋₂	ACT TCT AGA CGT ACT TGC TTG TAC CAG TGA GCA AGT ACG TCT AGA AGT CTC ACT GG-NH ₂

HP₁₋₂ (10 mmol/L) 分别加入4-ATP标记的AuNCs(DTNB标记的AuNCs)中, 反应12 h. 将混合物分散在80 μ L BSA溶液(1wt%)中, 孵育60 min, 然后纯化(9000 r/min, 25 min). SERS探针被成功制备.

1.5 捕获探针的制备

捕获探针是通过羧基和氨基之间的交联反应, 将氨基化的HP₂₋₁和HP₂₋₂修饰到MBs表面上来制备. 将HP₂₋₁和HP₂₋₂在95°C加热5 min, 冷却至室温后再进一步使用. 用去离子水纯化MBs (40 mL, 0.5%w/V)三次, 然后重新分散在180 mL缓冲溶液中. 将EDC (0.15 mol/L)和NHS (0.1 mol/L)与所得溶液在剧烈搅拌下混合50 min, 用于活化羧基官能团. 接下来, 将HP (1 mmol/L)加入混合物中并孵育过夜. 最后, 将所得溶液进行磁性分离, 以去除未连接的HP, 从而获得捕获探针(MBs@HP₂₋₁和MBs@HP₂₋₂).

1.6 微流控芯片的制作

制作一种由PDMS盖片和玻璃基板组成, 且植入微型磁铁的微流控芯片. 芯片长约49 mm, 宽22 mm, 厚度5 mm. 该芯片由以下三部分组成. (1) 3个加样口(3 mm)和蛇形通道(深度200 μ m, 宽度300 μ m): 在蛇形通道中, 流体具有折叠和拉伸的作用, 可引起混沌平流效应, 促进溶液的混合以及反应. (2) 磁性收集区(长1.8 mm, 宽0.75 mm): 矩形收集室用于储存和检测反应过程中产生的HP₁-HP₂复合物; 圆柱形小磁铁(4 mm)提供磁性吸引力, 溶液中的MBs可被吸引, 从而在矩形收集室中发生富集分离. (3) 梳状结构: 毛细管泵作用, 为实验过程中溶液的流动提供驱动力. 芯片制作方式如下: 首先, 在AutoCAD软件上设计实施方案, 得到PDMS微流控芯片的构造. 然后, 取彻底清洗后的硅晶圆, 放置在加热台上, 加热10~15 min, 干燥后取出. 接下来, 涂抹上SU-8胶, 甩胶1 min. 用紫外线照射, 曝光, 在95°C下操作2 min后, 用乳酸乙酯溶液浸泡, 以达到溶胶目的. 使用异丙醇清洗, 得到阳模板. 将PDMS预聚物与凝剂混合, 在真空中进行接下来的操作, 即静置抽真空30 min, 去除气泡. 接下来, 混合物倒在阳模板上, 并在72°C的热板上放置2 h固化. 冷却至室温后, 从模板上取下PDMS层, 切割并打孔. 泡入乙醇溶液和异丙醇溶液中清洗5 min. 将具有通道的一面浸泡于PEG溶液内, 加热150°C放置30 min. 将其取出, 用异丙醇洗净, 放置冷却. 用等离子处理30 s, 将其与玻璃基板粘

合, 得到微流控芯片.

1.7 SERS检测

在检测过程中, 将捕获探针、目标miRNA和SERS探针分别滴加至芯片的2个加样口. 液体在微通道内可以自动流动并连续混合, 在收集室中得到CHA反应形成的HP₁-HP₂复合物. 然后, 使用50 $\times$ 物镜测量HP₁-HP₂复合物的SERS光谱. 激光波长为785 nm, 曝光时间为10 s, 功率为5 mW.

1.8 仪器设备

所有拉曼光谱均通过雷尼绍inVia拉曼光谱仪进行检测. 使用UNICO 2100 PC紫外-可见分光光度计检测纳米材料的紫外-可见-近红外(UV-vis-NIR)吸收光谱. 使用S-4800 II场发射扫描显微镜(SEM)、Tecnai 12透射电子显微镜(TEM)、Tecnai G2F30 S-TWIN场发射高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)表征纳米材料形貌和结构.

2 结果与讨论

2.1 AuNCs的表征

由TEM可知, AuNCs形貌均匀, 为中空立方体结构, 平均壁厚为4.22 nm, 平均边长为35.92 nm (图2(a)). AuNCs的晶面间距为0.240 nm, 表明AuNCs优先在{111}面上生长(图2(b)). AuNCs在675 nm处具有很强的LSPR吸收峰(图2(c), 黑色曲线). 在波长785 nm、激光强度5 mW条件下, 4-MBA标记AuNCs的SERS光谱(图2(d)), 其在1075和1592 cm^{-1} 处的可见特征峰分别由苯环上C-H面内弯曲振动和苯环的骨架振动引起. 从显著放大的拉曼信号可以得出结论, AuNCs无疑具有优异的SERS增强效果. SERS增强热点主要是由AuNCs顶点的LSPR效应及内外壁之间的LSPR耦合引起的, 从而导致拉曼信号的增强. 结果表明AuNCs可以作为理想的纳米结构, 用于SERS探针的制备.

2.2 SERS探针和复合物的表征

由于SERS探针对信号放大非常重要, 因此对SERS探针(AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁)合成过程进行了表征. SERS探针由3种功能结构组成: AuNCs作为增强底物, 4-ATP作为报告分子, HP₁₋₁作为CHA反应物之一, 用于增强SERS信号. 如图2(c)所示, 在4-ATP和HP₁₋₁组装后,

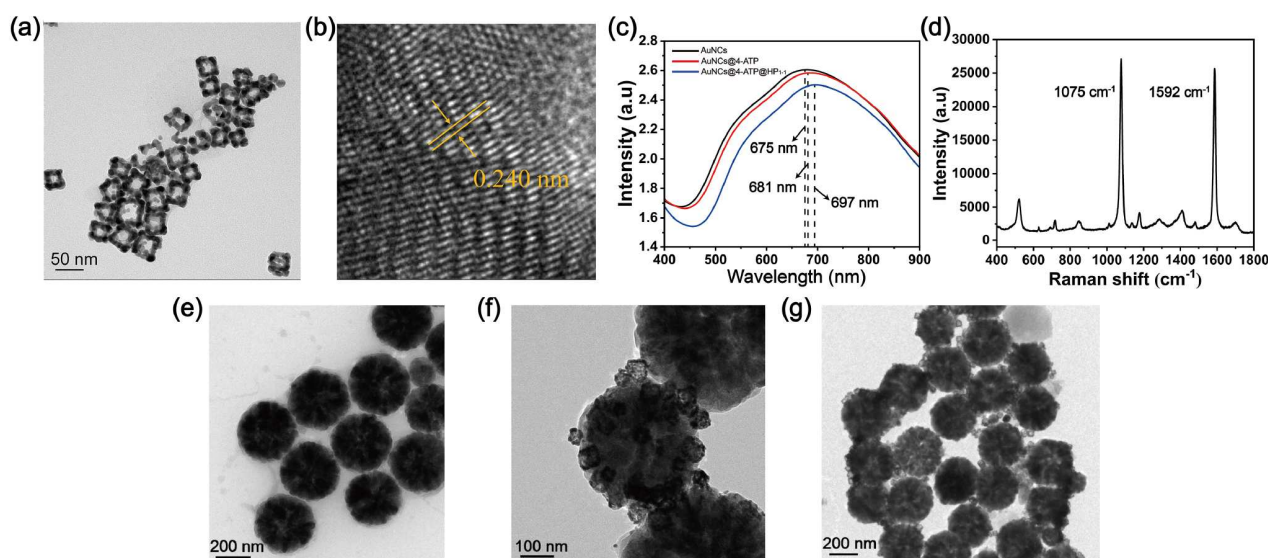


图2 (网络版彩色) AuNCs、MBs和复合物的结构表征图。AuNCs的TEM图像(a)和HRTEM图像(b); (c) AuNCs、AuNCs@4-ATP和AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁的UV-vis-NIR光谱; (d) 4-MBA (1×10^{-6} mol/L)标记AuNCs的SERS光谱; (e) MBs的TEM图像; (f) 单一HP₁-HP₂复合物的TEM图像; (g) HP₁-HP₂复合物的TEM图像

Figure 2 (Color online) Structural characterization diagram of AuNCs, MBs, and complexes. (a) TEM image and (b) HRTEM image of AuNCs; (c) UV-vis-NIR spectrum of AuNCs, AuNCs@4-ATP and AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁; (d) SERS spectrum of 4-MBA (1×10^{-6} mol/L) labeled AuNCs; (e) TEM image of MBs; (f) TEM image of a single HP₁-HP₂ complex; (g) TEM image of HP₁-HP₂ complex

导致AuNCs在675 nm处的强LSPR波段分别红移到681 nm(红色曲线)和697 nm(蓝色曲线), 这种减少和红移可能是由AuNCs的轻微聚集引起的。HP₁-HP₂复合物作为SERS探针与捕获探针之间CHA反应得到的产物, 承担着SERS信号放大的重要角色。如图2(e)所示, MBs平均直径约为350 nm, 显示出外观均匀、表面粗糙的球形结构。如图2(f)所示, 通过CHA反应形成的dsDNA成功地将SERS探针固定在MBs表面。图2(g)的TEM图像显示MBs和磁铁之间的吸引力会导致AuNCs进一步聚集。以上结果验证了CHA反应的可行性。SERS增强“热点”主要位于MBs表面AuNCs之间以及不同HP₁-HP₂复合物的连接处, 堆积的HP₁-HP₂复合物越多, 产生的SERS信号越强。

2.3 交叉反应性和CHA扩增的可行性评估

交叉反应性对于同时检测miR-122-3p和miR-150-5p至关重要。使用4-ATP和DTNB在1083和1330 cm^{-1} 处特征峰标记检测miR-122-3p和miR-150-5p。如图3(a)所示, 将浓度为100 pmol/L的miR-150-5p溶液与不同浓度的miR-122-3p溶液((I) 100 amol/L; (II) 1 fmol/L; (III) 10 fmol/L; (IV) 100 fmol/L; (V) 1 pmol/L; (VI) 10 pmol/L)混合后检测SERS光谱。1083 cm^{-1} 处特征峰的强度随着

miR-122-3p浓度的增加而增强, 而1330 cm^{-1} 处特征峰的强度保持不变。因此, miR-122-3p的存在对miR-150-5p的检测几乎无影响。当miR-122-3p溶液浓度一定时, 与不同浓度的miR-150-5p溶液混合后进行SERS检测, 可以得到相同的实验结果和结论(图3(b))。

为了验证CHA扩增的可行性, 以miR-122-3p为例进行了凝胶电泳验证。如图3(c)所示, 从泳道4可以看出, HP₁₋₁(泳道3)和HP₂₋₁在没有靶活化的情况下不会发生杂交反应。泳道5是HP₁₋₁和miR-122-3p在孵育一段时间后的混合物, 出现了一个可见的新条带, 表明miR-122-3p可以激活并打开HP₁₋₁的发夹结构。进一步将HP₂₋₁加入到HP₁₋₁-miR-122-3p中, 在泳道6出现了一个新的条带, 证明形成了一个分子量更大的配合物, 并且释放出miR-122-3p。这一结果验证了CHA信号放大策略的可行性。

2.4 实验参数的优化

为了获得最佳的检测结果, 我们优化了几个关键的实验参数, 包括孵育时间、SERS探针的体积、缓冲溶液的种类。如图3(d)所示, 1083和1330 cm^{-1} 特征峰处的SERS强度随时间增加而增加, 当时间达到5 min时, 增长趋势几乎消失。因此, 最佳孵育时间为5 min。除了

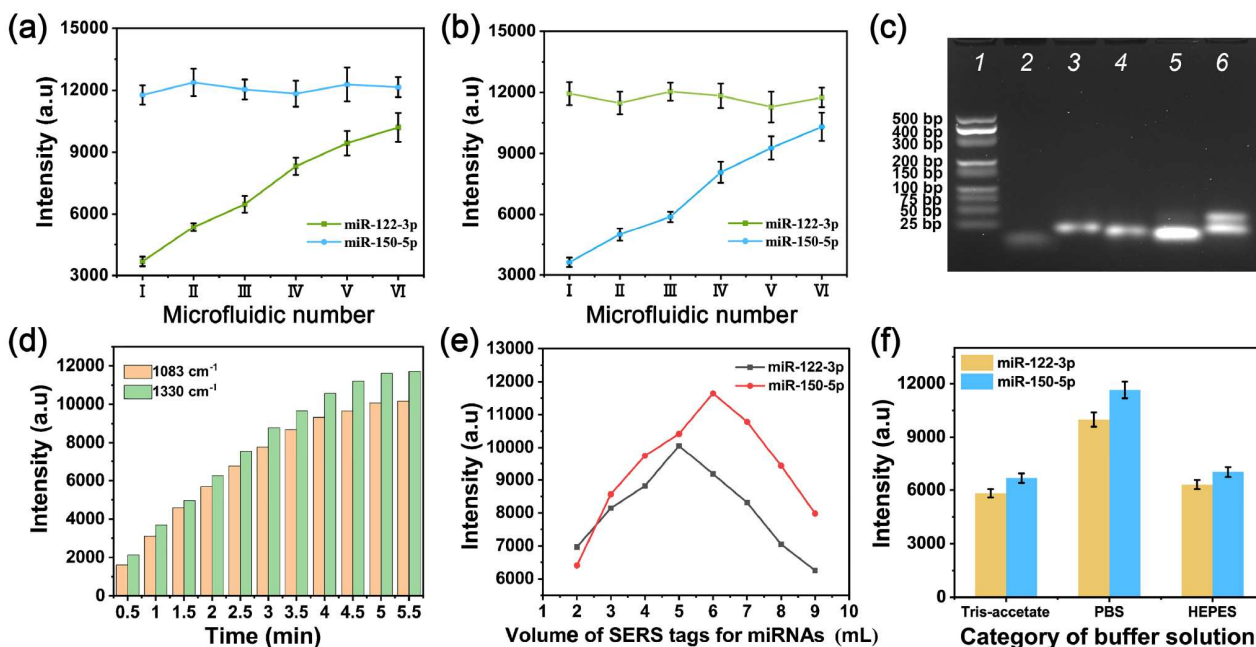


图 3 (网络版彩色)交叉反应性和CHA扩增可行性的评估及实验优化. (a) 不同浓度的miR-122-3p与miR-150-5p混合溶液在1083和1330 cm^{-1} 处特征峰的SERS强度的折线图. (b) 不同浓度的miR-150-5p与miR-122-3p混合溶液在1083和1330 cm^{-1} 处特征峰的SERS强度的折线图. (c) 用于检测miR-122-3p的CHA辅助无泵SERS微流控芯片的凝胶电泳图像. 泳道1: Marker; 泳道2: miR-122-3p; 泳道3: HP₁₋₁; 泳道4: HP₁₋₁+HP₂₋₁; 泳道5: HP₁₋₁+miR-122-3p; 泳道6: HP₁₋₁+HP₂₋₁+miR-122-3p. 实验参数的优化. (d) 孵育时间; (e) SERS探针的体积; (f) 缓冲液的种类

Figure 3 (Color online) Evaluation of cross-reactivity and feasibility of CHA amplification and experimental optimization. (a) Line chart of the SERS intensity of characteristic peaks at 1083 and 1330 cm^{-1} for different concentrations of miR-122-3p and miR-150-5p mixture solutions. (b) Line chart of the SERS intensity of characteristic peaks at 1083 and 1330 cm^{-1} for different concentrations of miR-150-5p and miR-122-3p mixture solutions. (c) Gel electrophoresis image of the CHA-assisted pump-free SERS microfluidic chip for detecting miR-122-3p. Lane 1: Marker; Lane 2: miR-122-3p; Lane 3: HP₁₋₁; Lane 4: HP₁₋₁+HP₂₋₁; Lane 5: HP₁₋₁+miR-122-3p; Lane 6: HP₁₋₁+HP₂₋₁+miR-122-3p. Optimization of experimental parameters. (d) Incubation time; (e) volume of the SERS probe; (f) type of the buffer solution

孵育外, SERS探针上修饰HP的体积也是影响CHA反应的另一个关键点. 图3(e)显示, 当体积小于6 μL 时, miR-150-5p在1330 cm^{-1} 处的强度随着SERS探针的增加而增加, 而当体积大于6 μL 时, 强度呈下降趋势. 这一结果可能与背景信号的持续增强有关. 因此, miR-150-5p的最适SERS探针体积为6 μL , miR-122-3p的最适SERS探针的体积优化为5 μL . 由于缓冲液的种类会影响杂交效率, 选择合适的缓冲液对提高检测灵敏度至关重要. 图3(f)显示了在不同缓冲溶液下检测结果的强度, PBS缓冲液显示出最高的杂交效率. 因此, PBS被选为后续实验的缓冲液.

2.5 SERS微流控芯片的表征

将红色和蓝色墨水加入芯片加样口, 以测试其亲水性和封闭性. 图4(a)显示墨水在亲水表面张力和末端梳状结构毛细作用力的驱动下自动流动, 在60 s内填满整个通道, 没有任何泄漏. 因此, 芯片的亲水性和封闭

性是令人满意的. 图4(b)记录了图4(c)中两个区域的SERS光谱. 无论是在1083 cm^{-1} 还是在1330 cm^{-1} , 区域I测量到的信号强度都远小于区域II. 为了评估SERS微流控芯片的最佳测试时间, 在检测过程中, 根据时间对矩形收集室进行SERS检测. 如图4(d)所示, 随着检测时间的增加, 越来越多HP₁-HP₂复合物聚集, 引起1083和1330 cm^{-1} 处特征峰强度的增强. 当时间达到5 min时, 增长趋势几乎消失. 因此, SERS微流控芯片表现出良好的磁性富集分离能力, 最佳测试时间为5 min.

2.6 SERS微流控芯片的可重复性、稳定性和特异性评估

在成功制备SERS微流控芯片后, 对其性能进行评估. (1) 可重复性. 使用5个不同批次制备的SERS微流控芯片检测相同浓度miRNAs溶液(miR-122-3p和miR-150-5p浓度均为1 nmol/L)的SERS光谱. 如图5(a)所示, 这些光谱之间几乎没有差异. 图5(b)为1083和

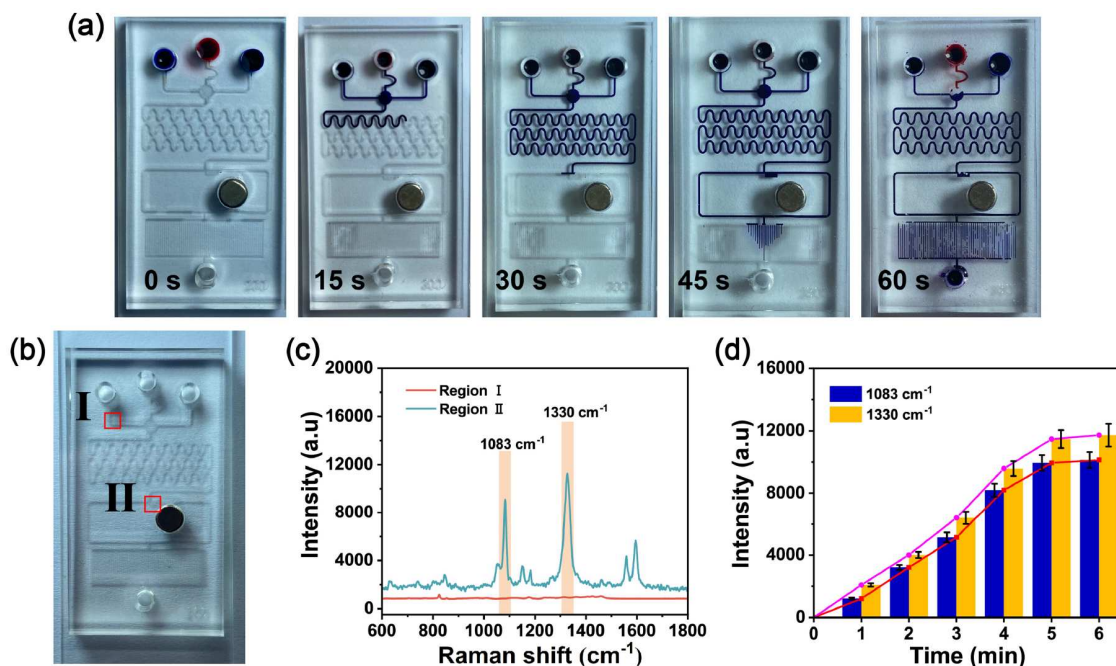


图4 (网络版彩色)SERS微流控芯片的表征。(a) 墨水在微流控通道中随毛细管力自动流动的数字图像;(b) 免泵微流控芯片中I和II两个区域的照片;(c) I和II两个区域测得的SERS光谱;(d) 矩形收集室中HP₁-HP₂复合物在1083和1330 cm⁻¹处特征峰强度随反应时间变化的折线图

Figure 4 (Color online) Characterization of the SERS microfluidic chip. (a) Digital images of ink automatically flowing in the microfluidic channel over time due to the capillary action; (b) photographs of regions I and II in the pump-free microfluidic chip; (c) SERS spectra measured for regions I and II; (d) line chart showing the intensity of characteristic peaks at 1083 and 1330 cm⁻¹ for the HP₁-HP₂ complex in the rectangular collection chamber over time

1330 cm⁻¹处特征峰强度的柱状图, 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)分别为6.23%和7.39%。因此, 该芯片具有良好的可重复性。(2) 稳定性。将制备的SERS微流控芯片在室温下储存不同时间(1、7、14和21天)后检测miR-122-3p(1 nmol/L)和miR-150-5p(1 nmol/L)溶液, 记录SERS光谱(图5(c))。在第21天, 1083和1330 cm⁻¹处特征峰的强度仅下降了7.58%和8.07%(图5(d))。(3) 特异性。将空白、随机、单碱基错配序列(MT1-1&MT1-2)、三碱基错配序列(MT3-1&MT3-2)和miR-122-3p&miR-150-5p分别作为靶标, 分析SERS微流控芯片的特异性。如图5(e)所示, miR-122-3p和miR-150-5p可以特异性触发CHA信号放大反应, 其SERS光谱强度(图5(f))明显高于其他干扰源和空白对照。因此, SERS微流控芯片具有良好的特异性。

2.7 miR-122-3p和miR-150-5p的定量检测

将miR-122-3p和miR-150-5p加入血清, 配制不同浓度(100 amol/L~1 nmol/L)的miR-122-3p和miR-150-5p溶液。使用SERS微流控芯片定量检测血清中miR-122-3p

和miR-150-5p。如图5(g)所示, SERS光谱的强度随着miRNAs浓度的增加而逐渐升高。在浓度100 amol/L~1 nmol/L范围内, 1083 cm⁻¹特征峰处SERS强度与miR-122-3p浓度的对数之间呈线性关系, 线性回归方程为 $y=1605.61x-1987.90$, $R^2=0.9745$ (图5(h)); 同理, 1330 cm⁻¹特征峰处SERS强度与miR-150-5p浓度的对数之间的线性回归方程为 $y=1590.82x-1969.59$, $R^2=0.9703$ (图5(i))。因此, 计算得到miR-122-3p和miR-150-5p的LOD分别为19.74和16.35 amol/L。与最新报道的检测方法(表2)相比, 该SERS微流控芯片LOD和定量范围更令人满意。

2.8 临床样本的分析

通过SERS微流控芯片测得30名健康人和30名CRC患者血清的SERS光谱, 并获得平均SERS光谱(图6(a))。如图6(b)所示, 将1083和1330 cm⁻¹处特征峰的SERS强度代入线性回归方程, 计算得到健康人和CRC患者血清中miRNAs的表达水平。与健康人相比, CRC患者血清中的miR-122-3p和miR-150-5p表达水平

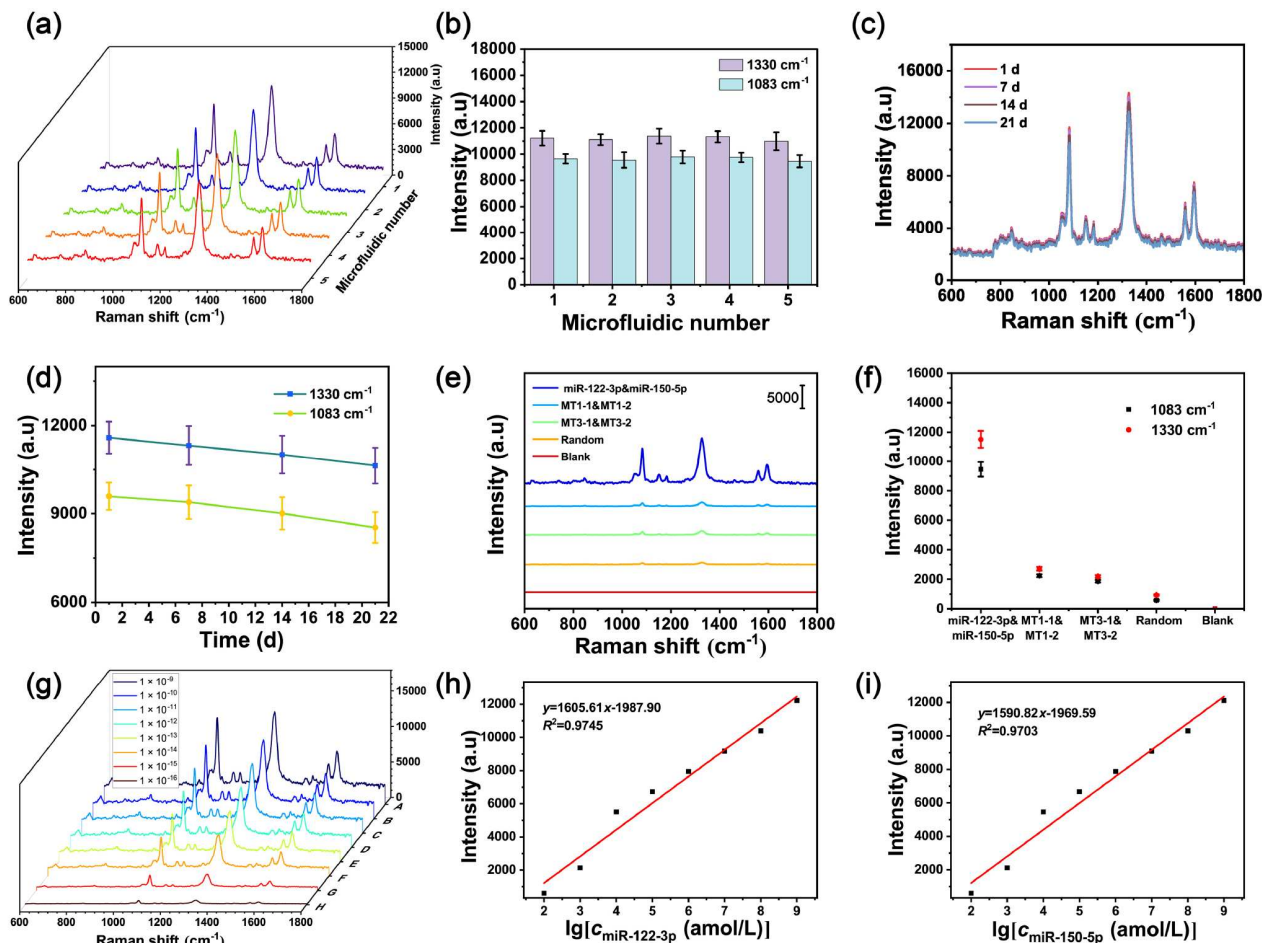


图 5 (网络版彩色)SERS微流控芯片的性能评估和定量分析。5个不同批次SERS微流控芯片检测相同浓度miRNAs溶液的SERS光谱图(a)及其特征峰处的柱状图(b); SERS微流控芯片在储存1、7、14和21 d后的SERS光谱图(c)及其特征峰SERS强度折线图(d); SERS微流控芯片检测空白、随机、MT1-1&MT1-2、MT3-1&MT3-2和miR-122-3p&miR-150-5p的SERS光谱图(e)及其特征峰SERS强度散点图(f); (g) 血清中不同浓度的miR-122-3p和miR-150-5p的SERS光谱(100 amol/L、1 fmol/L、10 fmol/L、100 fmol/L、1 pmol/L、10 pmol/L、100 pmol/L和1 nmol/L); (h) 1083 cm^{-1} 处特征峰的强度与miR-122-3p浓度对数之间的校准曲线; (i) 1330 cm^{-1} 处特征峰的强度与miR-150-5p浓度对数之间的校准曲线

Figure 5 (Color online) Performance evaluation and quantitative analysis of SERS microfluidic chips. SERS spectra (a) and bar graph of characteristic peaks (b) of five different batches of SERS microfluidic chips detecting the same concentration of miRNAs solution; SERS spectra of SERS microfluidic chips after 1, 7, 14 and 21 days of storage (c) and line plot of SERS intensity of characteristic peaks (d); SERS spectra of blank, random, MT1-1&MT1-2, MT3-1&MT3-2 and miR-122-3p&miR-150-5p detected by the SERS microfluidic chip (e) and SERS intensity scatter plot of characteristic peaks (f); (g) SERS spectra of serum miR-122-3p and miR-150-5p at different concentrations (100 amol/L, 1 fmol/L, 10 fmol/L, 100 fmol/L, 1 pmol/L, 10 pmol/L, 100 pmol/L and 1 nmol/L); (h) calibration curve between the intensity of the characteristic peak at 1083 cm^{-1} and the logarithm of miR-122-3p concentration; (i) calibration curve between the intensity of the characteristic peak at 1330 cm^{-1} and the logarithm of miR-150-5p concentration

显著性升。此外，SERS结果与qRT-PCR测量的结果一致，两种方法的相对标准偏差(RSD)均小于10% (图6(c, d))。因此，该平台满足临床样本中miR-122-3p和miR-150-5p的准确检测，可以用于识别和区分健康人和CRC患者。

3 结论

本研究成功制备了一种基于CHA的SERS微流控

芯片，用于检测健康人和CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-5p。首先，CHA扩增和MBs聚集分离作用引起AuNCs聚集，实现了SERS信号的放大，实现了miR-122-3p和miR-150-5p的高灵敏、特异性、量化检测。其次，免泵微流控芯片微通道处于封闭状态，避免了样本被外部环境污染或氧化，提高了检测结果的可重复性。微流控芯片自动化的检测流程，克服了传统微流控芯片使用注射泵、蠕动泵等带来的体积庞大和操作复

表 2 SERS微流控芯片与其他miRNA检测方法的比较

Table 2 Comparison of the SERS microfluidic chip with other miRNA detection methods

策略	目标物	线性范围(mol/L)	检测限(mol/L)	文献
qRT-PCR	miR-21	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-7}$	9.1×10^{-12}	[25]
电化学检测	miR-155	$2 \times 10^{-15} \sim 8 \times 10^{-12}$	6.0×10^{-13}	[26]
荧光检测	miR-92a-3p	$1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-11}$	3.1×10^{-14}	[27]
色度分析	miR-21	$1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-9}$	5.0×10^{-13}	[28]
SERS-CHA	miR-21	$5 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$	1.50×10^{-13}	[29]
SERS微流控芯片	miR-21	$1 \times 10^{-14} \sim 1 \times 10^{-8}$	2.33×10^{-15}	[30]
SERS微流控芯片	miR-122-3p	$1 \times 10^{-16} \sim 1 \times 10^{-9}$	1.97×10^{-17}	本工作
	miR-150-5p		1.65×10^{-17}	

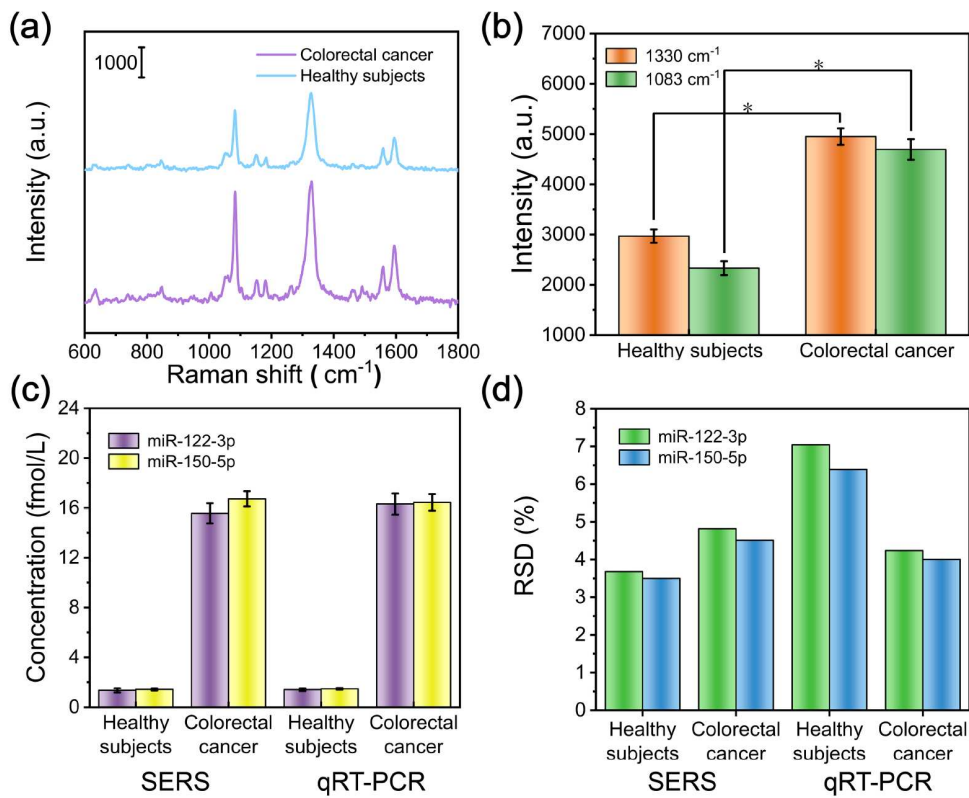


图 6 (网络版彩色)SERS微流控芯片检测临床样本及与qRT-PCR检测对比图。(a) SERS微流控芯片测得健康人和CRC患者血清的平均SERS光谱;(b) 1083和1330 cm^{-1} 处特征峰的SERS强度柱状图(* $p < 0.05$); SERS微流控技术和qRT-PCR测得健康人和CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-5p表达水平(c)及对应的RSD值(d)

Figure 6 (Color online) Comparison of SERS microfluidic chip detection of clinical samples and qRT-PCR detection. (a) Average SERS spectra of sera from healthy individuals and CRC patients measured by the SERS microfluidic chip; (b) histograms of SERS intensity of the characteristic peaks at 1083 and 1330 cm^{-1} (* $p < 0.05$). The expression levels of miR-122-3p and miR-150-5p in serum of healthy people and CRC patients (c) and their corresponding RSD values (d) were measured by SERS microfluidic technology and qRT-PCR

杂等弊端,大大缩短了检测周期。微通道的截面非常小,长度仅有几厘米,测试时需要的样本量极少,可极大节约实验成本。

SERS微流控芯片能够在很短时间内测得待测样

本中miR-122-3p和miR-150-5p的浓度,且有较宽的线性范围和较低的检测限。此外,该平台表现出优异的可重复性、稳定性和特异性。使用SERS微流控芯片准确检测了健康人和CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-

5p的表达差异。结果显示CRC患者血清中miR-122-3p和miR-150-5p的表达水平显著性高于健康人(* $p < 0.05$)。

SERS微流控技术为临床样本中miRNA检测的一种可靠的替代方法,有助于实现CRC的早期诊断和预后监测。

参考文献

- 1 Longo D L, Sinicrope F A. Increasing incidence of early-onset colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2022, 386: 1547–1558
- 2 Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: A review. *Updat Surg*, 2016, 68: 7–11
- 3 Goel A, Boland C R. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1442–1460.e1
- 4 Yang Y, Huang J, Yang X, et al. Gold nanoparticle based hairpin-locked-DNAzyme probe for amplified miRNA imaging in living cells. *Anal Chem*, 2017, 89: 5850–5856
- 5 Zhang Z, Jiao Y, Zhu M, et al. Nuclear-shell biopolymers initiated by telomere elongation for individual cancer cell imaging and drug delivery. *Anal Chem*, 2017, 89: 4320–4327
- 6 Ma Y, Zhang P, Yang J, et al. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: Systematic review profiling studies and experimental validation. *Intl J Cancer*, 2012, 130: 2077–2087
- 7 Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, et al. Epigenetics of colorectal cancer: Biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 111–130
- 8 Zhao Y, Song X, Niu L, et al. Circulating exosomal miR-150-5p and miR-99b-5p as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Front Oncol*, 2019, 9: 1129
- 9 Sun L, Liu X, Pan B, et al. Serum exosomal miR-122 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer with liver metastasis. *J Cancer*, 2020, 11: 630–637
- 10 Li C, Du X, Xia S, et al. MicroRNA-150 inhibits the proliferation and metastasis potential of colorectal cancer cells by targeting iASPP. *Oncol Rep*, 2018, 40: 252
- 11 Iino I, Kikuchi H, Miyazaki S, et al. Effect of miR-122 and its target gene cationic amino acid transporter 1 on colorectal liver metastasis. *Cancer Sci*, 2013, 104: 624–630
- 12 Asadzadeh-Firouzabadi A, Zare H R. Application of cysteamine-capped gold nanoparticles for early detection of lung cancer-specific miRNA (miR-25) in human blood plasma. *Anal Methods*, 2017, 9: 3852–3861
- 13 Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5830–5840
- 14 Ye J, Xu M, Tian X, et al. Research advances in the detection of miRNA. *J Pharm Anal*, 2019, 9: 217–226
- 15 Valoczi A. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e175
- 16 Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e179
- 17 Liu H, Gao X, Xu C, et al. SERS tags for biomedical detection and bioimaging. *Theranostics*, 2022, 12: 1870–1903
- 18 Fan M, Andrade G F S, Brolo A G. A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. *Anal Chim Acta*, 2020, 1097: 1–29
- 19 Gao R, Mao Y, Ma C, et al. SERS-based immunoassay of myocardial infarction biomarkers on a microfluidic chip with plasmonic nanostripe microcones. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 55414–55422
- 20 Ma L, Ye S, Wang X, et al. SERS-microfluidic approach for the quantitative detection of miRNA using DNAzyme-mediated reciprocal signal amplification. *ACS Sens*, 2021, 6: 1392–1399
- 21 Zhang C S, Xing D, Li Y Y. Applications of laser technique for polymerase chain reaction microfluidic chips (in Chinese). *Chin J Analyt Chem*, 2008, 36: 259–265 [章春笋, 邢达, 李彧媛. 激光技术在聚合酶链式反应微流控芯片中的应用. *分析化学*, 2008, 36: 259–265]
- 22 Huang G, Yang X, Zhu J, et al. Detection and application of microfluidic isothermal amplification on chip. *J Innov Opt Health Sci*, 2008, 01: 257–265
- 23 Barbee K D, Chandransu M, Huang X. Fabrication of DNA polymer brush arrays by destructive micropatterning and rolling-circle amplification. *Macromol Biosci*, 2011, 11: 607–617
- 24 Wang G, Wu M, Chu L T, et al. Portable microfluidic device with thermometer-like display for real-time visual quantitation of Cadmium(II) contamination in drinking water. *Anal Chim Acta*, 2021, 1160: 338444
- 25 Povedano E, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Gamella M, et al. A novel zinc finger protein-based amperometric biosensor for miRNA determination. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 5031–5041
- 26 Azimzadeh M, Rahaie M, Nasirizadeh N, et al. An electrochemical nanobiosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 99–106

- 27 Sun Z, Li J, Tong Y, et al. Ratiometric fluorescence detection of colorectal cancer-associated exosomal miR-92a-3p with DSN-assisted signal amplification by a MWCNTs@Au NCs nanoplatfrom. [Biosensors](#), 2022, 12: 533
- 28 Aamri M E, Mohammadi H, Amine A. Paper-based colorimetric detection of miRNA-21 using pre-activated nylon membrane and peroxidase-mimetic activity of cysteamine-capped gold nanoparticles. [Biosensors](#), 2023, 13: 74
- 29 Si Y, Xu L, Deng T, et al. Catalytic hairpin self-assembly-based SERS sensor array for the simultaneous measurement of multiple cancer-associated miRNAs. [ACS Sens](#), 2020, 5: 4009–4016
- 30 Wang Z, Ye S, Zhang N, et al. Triggerable mutually amplified signal probe based SERS-microfluidics platform for the efficient enrichment and quantitative detection of miRNA. [Anal Chem](#), 2019, 91: 5043–5050

Summary for “基于催化发夹自组装的SERS微流控芯片用于结直肠癌患者血清中miRNA的快速和高灵敏检测”

Rapid and highly sensitive detection of miRNAs in serum of colorectal cancer patients by surface-enhanced Raman spectroscopy microfluidic chip based on catalytic hairpin assembly

Chun Dai¹, Ming Tan¹, Zengyuan Liu¹, Juncheng Shi¹, Feng Wang⁴, Xiaowei Cao³, Kang Shen³, Haifan Yang³ & Wei Wei^{2*}

¹ Department of General Surgery, Yangzhong People's Hospital, Zhenjiang 212200, China

² Department of Gastrointestinal Surgery, Jiangdu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225200, China

³ Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

⁴ Department of Laboratory Medicine, Yangzhou People's Hospital, Yangzhou 225001, China

* Corresponding author, E-mail: jd.kenny@163.com

Colorectal cancer (CRC) is among the most prevalent forms of cancer globally, with a high mortality rate. In response to the urgent need for improved diagnostics, this study presents a novel approach that employs catalytic hairpin assembly (CHA) as a signal amplification strategy, in conjunction with the rapid enrichment and separation capabilities of magnetic beads (MBs), to construct a surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) microfluidic chip. This chip is specifically designed for the detection of two CRC-related microRNAs, miR-122-3p and miR-150-5p.

The SERS microfluidic chip is fabricated by synthesizing gold nanocages (Au nanocage, AuNCs) as a liquid enhancement substrate. Two Raman signal molecules, 4-aminothiophenol (4-ATP) and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), along with hairpin DNA1 (HP₁), are used to modify the surface of AuNCs, creating two types of SERS probes (AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁ and AuNCs@DTNB@HP₁₋₂). Additionally, hairpin DNA2 (HP₂) is immobilized on the surface of MBs to prepare two capture probes (MBs@HP₂₋₁ and MBs@HP₂₋₂).

The detection process involves introducing the sample solution, SERS probes, and capture probes into three separate inlets of the microfluidic chip. The target miRNA in the sample triggers a CHA reaction, leading to the formation of a large number of HP₁-HP₂ complexes (AuNCs@4-ATP@HP₁₋₁-MBs@HP₂₋₁ and AuNCs@DTNB@HP₁₋₂-MBs@HP₂₋₂). These complexes are then enriched in a rectangular collection chamber under the influence of a miniature magnet, significantly amplifying the SERS signal. The presence and concentration of miR-122-3p and miR-150-5p are determined by the characteristic peak positions and intensities of 4-ATP and DTNB at 1083 and 1330 cm⁻¹, respectively. The SERS microfluidic chip offers a linear detection range for miR-122-3p and miR-150-5p from 100 amol/L to 1 nmol/L, with limits of detection (LOD) as low as 19.74 amol/L and 16.35 amol/L, respectively.

This method is characterized by its simplicity, speed, and ease of operation, with the entire detection process being completed within 5 minutes. It also offers a wide linear range and low detection limits. Moreover, the SERS microfluidic chip exhibits high stability, strong specificity, and excellent repeatability. Using the SERS microfluidic chip, the expression differences of miR-122-3p and miR-150-5p in the serum of healthy individuals and CRC patients were accurately detected. The results indicated that the expression levels of miR-122-3p and miR-150-5p in the serum of CRC patients are significantly higher than those in healthy individuals (**p*<0.05). The SERS microfluidic technology provides a reliable alternative approach for the detection of miRNA in clinical samples, which is instrumental for the early diagnosis and prognostic monitoring of CRC.

colorectal cancer, surface enhanced Raman scattering, microfluidic chip, catalytic hairpin assembly, miRNA

doi: [10.1360/TB-2024-0980](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0980)