

表面增强拉曼光谱检测 食源性细菌的增强方式

汪 朋, 姚卫蓉*

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘 要:因食源性微生物污染引起的疾病已经成为一个重要的卫生问题。传统的检测方法存在着检测时间长、成本高等不足,而拉曼光谱作为一种生物指纹识别技术,在细菌快速鉴定方面具有很大潜力。但是,拉曼光谱信号十分微弱,给实际应用带来了困难。表面增强拉曼光谱(SERS)是将待测物与粗糙金属表面接近,使拉曼信号大大得到增强,使之在临床诊断和快速鉴定方面的应用成为可能。本文以表面增强拉曼光谱检测致病菌为出发点,对增强底物与致病菌的结合方式和结合位点进行了总结。主要的增强方式分2类,一类是分别在细胞外和细胞内实现 SERS,另一类是将纳米材料功能化,在分子水平实现 SERS。这些增强方式将有利于新的增强底物的开发和增强机理的研究。

关键词:表面增强拉曼光谱,致病菌,纳米颗粒,结合位点

The enhanced mode in SERS detection of food-borne bacteria

WANG Peng, YAO Wei-rong*

(School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Food-borne illness caused by microbial contamination has become an important health issue. The traditional detection methods need more time and higher costs. Raman spectroscopy as a biometric fingerprint recognition technology has great potential in the rapid identification of bacteria. However, Raman signal was very weak and difficult for practical use. Surface-enhanced Raman (SERS) let analyte close to the rough metal surface, enhanced the Raman signal greatly, so that it would be used in the clinical diagnosis and rapid identification. In this paper, the enhanced mode of SERS detection of bacteria and the binding sites of pathogen to the enhancement reagent were summarized in the application of surface-enhanced Raman spectroscopy on detection pathogenic bacteria. There were two major enhancement patterns. One was achieving SERS in the extracellular and intracellular respectively; the other was achieving SERS at the molecular level by functionalizing the nano-materials, which would help develop the new enhanced substrate and learn more about the mechanism of SERS.

Key words: surface-enhanced raman scattering; pathogen; nanoparticles; binding site

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)04-0427-04

拉曼光谱技术是一种快速、非破坏性光子散射技术,它能提供有关分析物分子的信息和其特征光谱振动,是基于拉曼散射原理而发展的一种分析技术和工具^[1]。表面增强拉曼散射(Surface Enhanced Raman Scattering, 简称 SERS)是指当一些分子被吸附到某些粗糙的金属(如银、铜、金等)表面上时,其拉曼散射强度会增加 $10^4 \sim 10^6$ 倍。1974 年 Fleischman 等人^[2]首次在电化学池中观测到吸附在粗糙银电极表面上的单层吡啶分子的强 Raman 散射

信号。1977 年, Jeamaire^[3] 和 Albrecht^[4] 等研究者分别独立地证明在 Fleischman 等人的实验中平均每个吡啶分子的 Raman 信号增强了 10^6 倍, 这就是 SERS 效应。最近的一个有意义的发现是, Nie^[5] 等人在激发光波长为 514.5nm 的条件下观察负载有吸附分子的 Ag 颗粒。当这些“热”颗粒的大小在 80~100nm 时, 相对于粗糙表面具有非常大的增强因子(约 $10^{14} \sim 10^{15}$), 这种巨大的增强效果可用于观察单分子的拉曼图谱。目前, SERS 已经应用在物质结构分析、疾病诊断、化学分子检测等许多领域^[6-8]。在 SERS 技术检测致病菌领域, SERS 已经表现出相对于传统检测方法的突出的优越性, 特别是在增强底物与细菌的结合方式上, SERS 独特的技术性和多样的增强制备手段为成功实现 SERS 超灵敏、快速检测致病菌打下了坚实的基础。纵观现有文献, 增强底物与细菌的结合不仅仅有细胞水平的, 还有分子水平

收稿日期: 2011-03-03 * 通讯联系人

作者简介: 汪朋(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2009BADB9B04); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP21124, 30908, 31005, 31106); 江苏省检验检疫局(2010KJ39)。

的^[9],其中细胞水平又包括细胞外增强和细胞内增强。下面针对致病菌检测中的增强方式分别进行论述。

1 细胞水平的增强方式

1.1 细胞外 SERS 增强

1.1.1 细胞外 SERS 增强方式 目前,细胞外的 SERS 增强手段已经比较丰富和成熟。目前有应用的 SERS 增强方式,可以分为三个部分:一是利用纳米技术获得 SERS 活性基底,常用的为一些贵金属纳米粒子所构成的纳米胶体,然后将制备好的菌体与纳米胶体混合,细胞就能够吸附或者靠近金属表面,使得拉曼信号得到增强。从获得的表面增强拉曼光谱中可以分析得出,各种细菌所独有的表面成分或者特殊形态学结构信息。金属溶胶体系具有制备简单和 SERS 增强效果好等特点,其表面增强拉曼散射效应与溶胶纳米粒子的种类、粒径、粒子间距、激发光的波长等因素有关。

Sengupta^[10]等人将制成的银胶与细菌液混合,得到均衡的混合液,然后将其进行拉曼光谱测定。从电子显微图像中发现,一些纳米粒子集群与细菌的表面有许多特殊的结合点;也正是由这些结合点,银胶与细菌才能结合起来。同时,溶胶粒子的聚集程度,能够影响到聚集粒子的大小和增强效果。如果使用改良的方法,粒子的集结速度将变快。这种快速集结的原因被归结为金属粒子状态的变化,但同时,也使金属粒子失去一定的稳定性。在实验中的光谱图上,还发现了一些不同于其他谱图的峰。这些差别可能是由不同的样品制备方法、测量及可能的细胞蛋白质的变化所引起的。Sengupta 指出,目前增强拉曼光谱检测致病菌的难点,在于除了已经有能力检测菌种的基础上,要进一步研究鉴定同种菌种的不同菌株的技术。

二是使细菌分布在银和金等纳米粒子构成的活性膜上得到增强。有研究表明,在多层薄膜上,金纳米粒子在基片表面上的覆盖率提高,粒子间的间距缩小,粒子间的电磁耦合作用增强,因而增强效应得到更大地加强^[11]。

三是形成有序金属纳米粒子自组装阵列使胞外拉曼信号得到增强。近来的研究表明,表面增强拉曼光谱是一种在化学和生物传感方面有很强分析能力的工具。但是 SERS 在使用时可重复性的弱点,限制了它在生物传感方面的应用。最近在倾斜沉积^[12]和其他纳米制造的技术已经克服了这个限制,提供了前所未有的机遇来发展检测通量大的基质,实现在生物病原体检测方面的应用。

1.1.2 细胞外 SERS 增强的优缺点 贵金属胶体与菌体接触是细胞外增强使用最广泛、制备最简便的一类,尤其是利用银胶、金胶。胶体中的金银纳米粒子可以为 SERS 研究提供方便、快捷和较为准确、丰富的信息。但由于颗粒尺寸不均一和形状的无规则性而导致较差的稳定性和重现性,使得对胶体体系的控制和更深入的研究都变得比较困难。而金纳米粒子薄膜和银纳米粒子薄膜的研究,能给 SERS 提供新的底物选择,得到更高的表面增强效果。与此同时,自组装阵列的

应用使胞外拉曼信号的重现性得到一定的增加。

由此得出,为了将 SERS 作为一种常规、在线的分析工具,所制备的胞外 SERS 底物和相应的增强方式应具有增强能力强、稳定、易于制备和储存、使用方便等特点,进一步的研究也将朝着这个方向发展。

1.2 细胞内 SERS 增强

1.2.1 细胞内 SERS 增强方式 由于 SERS 增强的原理在于将分析物通过化学结合或靠近金属表面来获得信号的增强,因此,大多数对微生物生化成分的研究是将细胞外的金或银纳米粒子作为活性基底的。由此,对细菌的 SERS 研究迄今几乎完全专注于对革兰氏阴性菌细胞膜外分析。这可能是由于细菌的空间体积太小,将纳米级别的金属胶体颗粒引入这个小环境会变得十分困难。迄今为止,也没有发展出一个标准的方法来实现胞内增强,这可能是由于表面增强拉曼光谱的重复性方面的问题。许多可能的实验因素包括胶体颗粒形态、几何方面的考虑,分析物的金属界面,颗粒表面饱和度,表面增强拉曼散射活性基底的空间定位都会对实验结果产生影响。

已有的资料显示一些金属会在菌种体内发生还原作用。如 *Shewanella* 和 *Geobacter* 等,能够在细胞内还原种类繁多的高价金属离子,例如在细胞内将 Ag(I) 和 Au(III) 还原为零价金属形成金属颗粒胶体。Jarvis^[13]等人选取 *Geobacter sulfurreducens* 菌作为金属还原菌并尝试在细胞内还原金,并对这种菌还原金离子和阴离子进行 SERS 对比分析。在实验中,外环境是 Ag(I) 条件下得到的整体和截面透射电镜表明,银颗粒沉淀在细胞外。相比之下,金被还原沉淀在紧挨着细胞膜内表面的细胞质内。对细菌还原 Ag(I) 的光谱图分析得到 924cm⁻¹ 和 1061cm⁻¹ 处的峰特别突出,这 2 个峰可能是由于共振而得到增加。酰胺 III(1247cm⁻¹) 和酰胺 I(1562cm⁻¹) 在 2 个光谱图上形状有较大不同。这两处光谱带的特性有助于蛋白质的骨架结构分析。而且从整个光谱图上的一些尖锐的峰可以看出,蛋白质复合物可以得到很大地化学增强。同时通过对金胶环境的 SERS 分析,可以发现酰胺 I 并没有出现在谱图上,同时酰胺 III 在 1250cm⁻¹ 峰表达了一些信息。根据这些关键蛋白的光谱特征,可以分析得到革兰氏阴性菌内层膜相关蛋白的特性。文中还指出在细胞内具有单分散的金颗粒,导致无法得到最大化的 SERS 增强。有研究表明,胶体颗粒聚集的最大特性在于能够最大化的增强拉曼信号。因而单分散的颗粒并不能得到最大增强 SERS 信号。

Kneipp^[14]等人利用液相细胞内吞作用,以金胶作为 SERS 的增强底物,实现了在细胞内对细胞化学成分的分析检测。这种方法能够在很短的时间内获得增强的拉曼信号,实现单细胞水平的鉴定。这将成为短时间内细胞筛选的理论依据。而且,通过对实验中获得的光谱进行分析,能够得到丰富的细胞结构信息,并能监视一些微结构上的改变,如 DNA 条带的变化。正是因为它能监测细胞的微小化学变化,这种活细胞内的超灵敏的拉曼光谱将开辟

一个疾病早期诊断的新局面。这种监视能力是那些只能观察形态较大变化的传统检测方法所不具备的。基于这个发现,还提出了在利用对结构的敏感性和相对快速的细胞筛选能力的基础上,可以将活细胞内的 SERS 技术应用到诸如癌症早期诊断的临床医学上。

在此基础上,他们发现影响纳米粒子进入细胞的因素不仅仅是实验条件,还包括了粒子自身的参数,比如说尺寸、形状以及是否表面功能化等。一些资料表明,非吞噬细胞能够对结构 $1\mu\text{m}$ 以下的物质发生作用,内吞微结构体可将其运送到内涵体和溶酶体中。其中对 10nm 以上的粒子有着最高效率的内吞作用^[15]。经过分析获得的典型的 SERS,可以对细胞内的一些化学成分进行分析,例如酰胺 III、侧链苯丙氨酸以及种类多样的核酸成分。

相对于以上利用细胞自身能力将纳米粒子送入细胞内,Lin^[16]等人实现用电穿孔法快速递送银纳米颗粒进入活细胞进行 SERS。这种方法克服了被动吸收后纳米粒子在细胞内的分布不能控制的缺点,将纳米颗粒控制定位在细胞质中。这种方法时间短,效率高,可控制性强,并且具有一定的重现性。

1.2.2 细胞内 SERS 增强方式的优缺点 Jonathan^[17]等人提出,任何一种分析手段,都有一定的局限性。基于纳米粒子和纳米结构材料的 SERS 分析方法,尽管能够实现单分子的灵敏检测,但是这种分析手段也有以下三个缺点:a.为了实现细胞内检测,需要将增强底物送入细胞内,但是内吞作用和吞噬作用的时间过长,限制了细胞内 SERS 的使用;b.细胞消化作用可能使生态学上特殊的标记标签和配体被细胞消化,或者被细胞排出胞外。除此以外,如果利用细胞本身能力通过溶酶体途径来递送纳米粒子进入细胞,那么进入胞内的纳米粒子分布会很很不均匀,粒子的胞内运输也不均一,这会严重限制获取细胞内信息的数量和性质。即使可以采取包被纳米粒子使之与抗原结合的方法使纳米材料能够均匀地结合在细胞膜上,但是这种情况下无法依靠细胞膜上的信息来显示细胞内的信息和细胞的生理变化;c.Chithrani^[18]等人发现,纳米粒子进入细胞,会对细胞产生一定的细胞毒性。反之,如果纳米粒子没有进入细胞,他们不太容易杀死细胞或改变细胞功能。尽管细胞内的增强方式有一定的局限性和缺点,但是从目前的发展情况来看,细胞内的 SERS 分析能够灵敏和快速地反映胞内化学成分和结构,这是其他检测手段所不具备的,特别是在生物化学、疾病预防、医疗早期诊断以及临床鉴定上,细胞内的 SERS 技术已经越来越引起重视和应用。

2 分子水平的 SERS 增强方式

目前已经出现了很多种分子水平的 SERS 增强方式,它们使用的材料和手段各有特色,但是制备的思路却大同小异:首先用材料包被纳米粒子,使之能够进一步功能化,再用特异性化学分子链接,链接的一端连接纳米粒子,另外一端可以与被测物相连。利用连接分子的特异性,可以准确实现对目标物的

定位;同时目标物与纳米粒子的靠近使得拉曼信号大大增强,由此得到的表面增强拉曼光谱可以作为检测的依据。这样能够实现对 DNA 或者细菌膜表面的一些物质如蛋白质等的检测。

Nguyen^[19]等人使用功能化的金纳米粒子和 SERS 技术对血液恶性肿瘤,慢性淋巴细胞白血病进行检测。在该实验中,孔雀绿异硫氰酸酯(Malachite Green Isothiocyanate,简称 MGITC)和聚乙二醇溶液按一定比例加入到金胶体中,形成被 MGITC 包裹的功能性纳米颗粒,然后将 CD19(CD19 是一个分子量为 95ku 的细胞表面表达的糖蛋白,它通常作为 B 淋巴细胞和 B 细胞恶性肿瘤的标志物)的抗体连接到功能性纳米颗粒上,得到完整的功能性纳米粒子。这种完整的纳米粒子在检测中发挥了巨大作用。

3 展望

随着纳米技术和拉曼光谱仪器的不断发展,新的增强方式会不断地进入人们的视野并且被应用到许多科研方面。SERS 是一种超灵敏、快速的检测工具,必定会在将来有更大的发展。在 SERS 检测致病细菌技术方面,了解表面增强拉曼光谱图上每一个谱带的信息和寻找相对应的化学物质成分,已经成为目前 SERS 检测致病菌研究的重要内容和方向。

参考文献

- [1] Jarvis R M, Brooker A, Goodacre R. Surface-enhanced raman scattering for the rapid discrimination of bacteria [J]. Faraday Discuss, 2006, 132: 281-292.
- [2] Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. Chemical Physics Letters, 1974, 26: 163-165.
- [3] Jeanmaire D J, Van Duyne R P. Surface raman spectroelectrochemistry: heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode [J]. Electroanal Chem, 1977, 84: 1-4.
- [4] Grant Albrecht M, Alan Creighton J. Anomalously intense raman spectra of pyridine at a silver electrode [J]. Am Chem Soc, 1977, 99: 5215-5218.
- [5] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering [J]. Science, 1997, 275: 1102-1106.
- [6] Jarvis R M, Brooker A, Goodacre R. Surface-enhanced raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a raman spectroscopy interface [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76: 5198-5202.
- [7] Shanmukh S, Jones L. Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced raman spectroscopy and multivariate statistical techniques [J]. Analytical Bioanal Chem, 2008, 390: 1551-1555.
- [8] Liu Yongliang, Chao Kuanglin, Nou Xiangwu, et al. Feasibility of colloidal silver SERS for rapid bacterial screening [J]. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, 2008, 3 (2): 100-107.

(下转第 433 页)

- [9] ROY U, BATISH V K, GROVER S, et al. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3 [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 32: 27-34.
- [10] GOURAMA H. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species [J]. Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie, 1997, 30: 279-283.
- [11] ROUSE S, HARNETT D, VAUGHAN A, et al. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104: 915-923.
- [12] MAGNUSSON J, SCHNÜRER J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad - spectrum proteinaceous antifungal compound [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 1-5.
- [13] SCHAEFER L, AUCHTUNG T A, HERMANS K E, et al. The antimicrobial compound reuterin (3 - hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups [J]. Microbiology, 2010, 156: 1589-1599.
- [14] CHUNG T C, AXELSSON L, LINDGREN S E, et al. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* [J]. Microbial Ecology and Health and Disease, 1989, 2: 137-144.
- [15] OUATTARA B, SIMARD R E, HOLLEY R A, et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 37: 155-162.
- [16] CORSETTI A, GOBETTI M, ROSSI J, et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CBI [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50: 253-256.
- [17] MANDAL V, SEN S K, MANDAL N C. Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound (s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 [J]. Natural Product Communications, 2007(2): 671-674.
- [18] WISEMAN D W, MARTH E H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis* [J]. Mycopathologia, 1981, 73: 49-56.
- [19] COALLIER - ASCAH J, IDZIAK E. Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49: 163-167.
- [20] 唐雨蕊, 倪学勤, 曾东. 乳酸杆菌对黄曲霉生长抑制的研究 [J]. 中国饲料, 2008(2): 42-45.
- [21] GOURAMA H, BULLERMAN L B. Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species [J]. Journal of Food Protection, 1995(8): 1249-1256.
- [22] PIOTROWSKA M, ZAKOWSKA Z. The limination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains [J]. Polish Journal of Microbiology, 2005, 54: 279-286.
- [23] NIDERKORN V, BOUDRA H, MORGAVI D P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 101: 849-856.
- [24] EL-NEZAMI H S, POLYCHRONAKI N, SALMINEN S, et al. Binding rather metabolism may explain the interaction of two food - grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative - zearalenol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 3545-3549.
- [25] FUCHS S, SONTAG G, STIDL R, et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 1398-407.
- [26] HASSAN Y I, BULLERMAN L B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121: 112-115.
- [27] SJÖGREN J, MAGNUSSON J, BROBERG A, et al. L. Antifungal 3 - hydroxyl fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB14 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 7554-7557.
- [28] Makarova K S, Koonin E V. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1199-1208.

(上接第 429 页)

- [9] Taejoon Kang, Seung Min Yoo, Ilsun Yoon, et al. Patterned Multiplex Pathogen DNA Detection by Au Particle - on - Wire SERS Sensor [J]. Nano Letters, 2010, 10: 1189-1193.
- [10] Sengupta A, Mujacic M, James Davis E. Detection of bacteria by surface-enhanced raman spectroscopy [J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 386: 1379-1386.
- [11] 余海湖, 何谋春, 周灵德, 等. 自组装金纳米粒子薄膜 SERS 研究 [J]. 胶体与聚合物, 2003, 21(2): 10-12.
- [12] Tripp R A, Dluhy R A, Zhao Yiping. Novel nanostructures for SERS biosensing [J]. Nanotoday, 2008(6-8): 31-37.
- [13] Jarvis R M, Law Nicholas, Shadi I T, et al. Surface-enhanced raman scattering from Intracellular and extracellular bacterial locations [J]. Anal Chem, 2008, 80: 6741-6746.
- [14] Kneipp Katrin, Haka A S, Kneipp Harald, et al. Surface-enhanced raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles [J]. Applied Spectroscopy, 2002, 56(2): 150-154.
- [15] Rejman Joanna, Oberle Volker, Zuhorn I S, et al. Size - dependent internalization of particles via the pathways of clathrin - and caveolae - mediated endocytosis [J]. Biochem, 2004, 377: 159-169.
- [16] Lina Juqiang, Chena Rong, Feng Shangyuan, et al. Rapid delivery of silver nanoparticles into living cells by electroporation for surface - enhanced Raman spectroscopy [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25: 388-394.
- [17] Scaffidi J P, Gregas M K, Seewaldt Victoria, et al. SERS - based plasmonic nanobiosensing in single living cells [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393: 1135-1141.
- [18] Chithrani B D, Ghazani A A, Chan WC W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells [J]. Nano Letters, 2006, 6(4): 662-668.
- [19] Nguyen C T, Nguyen J T, Rutledge Steven, et al. Detection of chronic lymphocytic leukemia cell surface markers using surface enhanced raman scattering gold nanoparticles [J]. Cancer Letters, 2010, 292: 91-97.