

半导体纳米粒子 SERS 基底对大肠杆菌的无损检测研究

宋薇¹, 刘卓², 齐宝玲¹, 郭月¹, 王丽丽¹, 王海^{2*}, 何成彦², 赵冰^{1*}

1. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 吉林 长春 130012

2. 吉林大学中日联谊医院, 吉林 长春 130033

摘要 很多致命的疾病都与细菌感染密切相关, 快速、准确地检测和鉴定细菌及微生物, 一直是微生物学家及有关科研工作者追求的目标, 拉曼光谱可以提供丰富的谱图信息, 而表面增强拉曼光谱(SERS)有很高的检测灵敏度, 然而一些贵金属 SERS 基底却容易使蛋白质变性, 影响检测结果。以大肠杆菌(E. Coli)作为目标检测细菌, 首先检测到大肠杆菌的拉曼光谱, 之后采用两种不同的 SERS 基底(ZnO, Ag 溶胶)进行检测。结果表明 Ag 溶胶基底有很强且较丰富的 SERS 信号, 但是相对于 E. Coli 的本体拉曼谱峰有较大位移, 说明与银溶胶相互作用的细菌存在一定的蛋白质变性过程; 而 ZnO 纳米粒子与细菌作用的 SERS 信号虽然较弱, 但是与 E. Coli 的本体拉曼信号较为相似, 说明 ZnO 纳米粒子对 E. Coli 本体基本无损, 这将有利于 SERS 在生物体系的无损检测。该结果可以为利用生物相容性好的半导体 SERS 基底进行细菌的检测提供有益的参考。

关键词 半导体纳米粒子; 细菌; 表面增强拉曼光谱; 无损检测

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)05-1403-05

引言

细菌是生物系统中数量最多的一类, 对人类活动的影响不可忽视, 很多严重的致命疾病都源于细菌感染。快速、准确地检测和鉴定细菌及微生物, 一直是微生物学家及有关科研工作者追求的目标。常规的鉴定细菌方法主要包括: 细菌形态和生理生化水平鉴定、蛋白质水平的鉴定。一般来说前者作为分类鉴定的经典、常用的方法同样也是现代分类鉴定的依据。后者方法多样, 包括凝集实验、免疫酶技术、免疫荧光技术、放射免疫测定技术、免疫胶体金标记技术和蛋白质图谱分析等^[1-2]。普通拉曼光谱作为重要的有机体指纹鉴定技术, 能够提供物种丰富的谱图信息, 可以用于微生物的检测, 但是灵敏度较低^[3-5]。表面增强拉曼(SERS)活性的基底对吸附在其表面的分子能够产生显著的增强效果, 并且可以猝灭荧光, 能有效提高信噪比。由于 SERS 只对吸附于基底具有拉曼散射截面的分子结构产生增强, 因此 SERS 也能保留高质量的信息。而且, SERS 使用与检测普通拉曼光谱相同的设备, 得益于最近在仪器方面也就是性能和成本上的进步。实际上, 与普通拉曼光谱相比, SERS 大幅度增强, 以

及其荧光强度低, 使得 SERS 的使用更简单、更强大、更灵敏。

对于细菌的 SERS 研究所采用的活性基底一般为胶体金或胶体银^[6-7]。如 Kahraman 等在玻璃上沉积聚集的单分散的胶体金作为 SERS 活性基底, 在 785 nm 激发光下测定不同细菌^[8]; 只有一个在 1 030 cm^{-1} 的尖峰, 与直接和金粒子混合大肠杆菌(E. Coli)的光谱相似。但这个特征只有 E. Coli 非常明显, 绝大多数其他细菌却得不到这样的信号。Goodacre 等研究了在 CaF_2 上干燥的聚集胶体银的细菌菌落混合物^[9-11], 根据对 400~1 000 cm^{-1} 的分析, 结果表明能够区分不同种类的细菌, 研究结果解释了这种关于革兰氏阳性和阴性细菌细胞壁不同组成的差异。Sackalingum 等利用金属胶体作为 SERS 基底对 E. Coli 的检测^[12], 他们用不同的方法混合金属胶体和细菌, 当把样品混合然后在玻片上晾干得到的光谱重现性弱, 而把细菌在有银或金预处理的胶体添加到琼脂板上进行培养时, 得到的结果最好; 然而观察到的细菌的 SERS 与细菌本体的拉曼谱图差异是较大的, 他们认为观察到的丰富的光谱是基本的细胞组成比如脂肪酸、氨基酸、蛋白质和核酸的信号, 这对于细菌的特异性分析不利。虽然利用 SERS 实现对细菌的特异性检测存在一定的难度, 但同

收稿日期: 2016-06-02, 修订日期: 2016-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(20903044, 21327803, 21473068)和吉林省科技发展项目(20140414005GH)资助

作者简介: 宋薇, 女, 1979年生, 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室副教授 e-mail: weisong@jlu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: zhaobing@jlu.edu.cn; jidawanghai@126.com

时该技术仍具有无限的潜力。金银等重金属较容易使蛋白质变性,因此利用金属胶体作为 SERS 基底观察到的细菌拉曼光谱与本体之间的差异有可能是 SERS 活性介质与不同细胞成分的反应,发生了结构和构象的改变。因此尝试其他生物相容性好的 SERS 活性基底代替金属基底是一个挑战。

本研究利用 ZnO 纳米粒子作为 SERS 基底对 E. Coli 进行检测,在 785 nm 激发波长检测到 E. Coli 的拉曼光谱;并在 633 nm 激发波长下,通过与 Ag 溶胶 SERS 基底进行对比, ZnO 纳米粒子的 SERS 信号虽然较弱,但是与 E. Coli 的本体拉曼信号较为相似,说明 ZnO 纳米粒子对 E. Coli 本体基本无损。利用 ZnO 纳米粒子作为 SERS 基底对细菌进行无损检测为半导体纳米粒子在生物体系的应用提供了重要参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

大肠杆菌(E. Coli)菌种冻干粉(ATCC25922 大肠埃希菌),0.9% 250 mL 生理盐水,OXOID 公司的 MAC 琼脂培养基(MacConkey Agar)成分:蛋白胨 17 g、豚胨 3 g、猪胆盐 5 g、NaCl 5 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL、乳糖 10 g、0.01% 结晶紫水溶液 10 mL、0.5% 中性红水溶液 5 mL;硝酸银(AgNO₃)、六水合硝酸锌[Zn(NO₃)₂·6H₂O]、碳酸氢铵(NH₄HCO₃)均为分析纯购于天津光复精细化工公司;氢氧化钠(NaOH)为分析纯,购于北京化工厂;对巯基苯胺(PATP)购于 sigma 公司。

日本电子 JEM-2100F 透射电子显微镜, HORIBA Jobin Yvon scientific 公司 LabRAM ARAMS 型拉曼光谱仪;日本 Rigaku 公司 SmartLab(3)智能粉末 X 射线衍射仪。

1.2 ZnO 纳米粒子的制备

分别称取 1.6 g NaOH 和 5.94 g Zn(NO₃)₂·6H₂O 配成 80 mL 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液和 200 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 Zn(NO₃)₂ 溶液。向 200 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 Zn(NO₃)₂ 溶液中缓慢滴加 80 mL 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液,此过程在搅拌下进行。滴加完全后向混合溶液中加入适量的 NH₄HCO₃ 粉末,此时得到 Zn(OH)₂ 前驱体。继续搅拌 30 min,得到半透明的碱式碳酸锌胶体。将得到的产物用 G3 型号砂芯漏斗减压过滤,并在 80 °C 条件干燥大约 12 h。此后前驱体在 650 °C 下煅烧 2 h,取出产物依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤 3~4 次后用 G4 型号砂芯漏斗过滤,并在 70 °C 下干燥,得到尺寸大约为 150~200 nm 的 ZnO 纳米晶。

1.3 细菌培养基及细菌液的培养

用移液枪吸取一定量的 0.9% 的生理盐水将 E. Coli 的菌种冻干粉活化,混合均匀后,吸取少量活化后的菌液均匀涂布在 MAC 培养基上,最后采用四区划线法将菌种接种在 MAC 培养基中。将接有菌种的 MAC 培养基置于恒温培养箱中 37 °C 培养 24 h,用接种环接种一定数量的细菌于 200 mL 的生理盐水中,混合均匀,孵育 12 h 后进行拉曼测试。用接种环接种一定数量的细菌于 200 mL 的生理盐水中混合均匀,孵育 12 h,之后将制备的 ZnO 溶液和 Ag 溶胶分别与一定量的配制的细菌生理盐水混合,搅拌 8 h,进行拉曼测

试,使用光栅型拉曼光谱仪,在 633 nm 激发波长下,积分时间为 60 s,具体过程如示意图 1 所示。

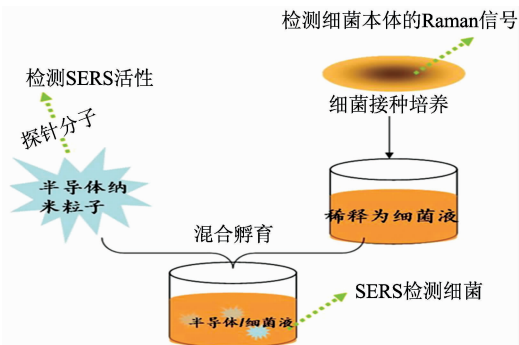


示意图 1 半导体 SERS 基底检测细菌的过程

Scheme 1 Schematic illustration of the process for the detection of bacteria using a semiconductor SERS substrate

2 结果与讨论

2.1 细菌的本体拉曼光谱研究

如图 1(a)所示,MAC 培养上的 E. Coli 呈红色菌落。由图可知,细菌生长状况良好且单个菌落较多,适于下一步的取样和检测。将培养好的 E. coli 菌落用接种环挑出少许固体菌落至于载玻片上,在光栅型拉曼光谱仪下测定 E. Coli 固态聚集菌落光谱,所选用的激发波长 785 nm。积分时间为 60

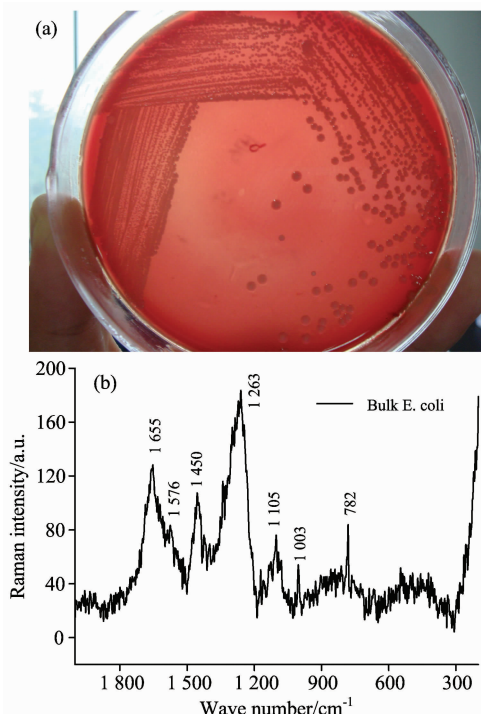


图 1 37 °C 培养 24 h 的 (a) E. Coli 培养皿上照片和 (b) E. Coli 拉曼光谱图

Fig. 1 (a) The photograph and (b) the Raman spectrum of the bulk E. coli cultivating at 37 °C after 24 h

s. 图 1(b)为 E. Coli 的本体拉曼光谱图, 表 1 为拉曼光谱归属, 对照文献[3, 5, 13-14]可知 782 cm^{-1} 为与 DNA 的 O—P—O 伸缩振动相关的胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶的振动, $1\ 003\text{ cm}^{-1}$ 为苯丙氨酸的对称环呼吸振动, $1\ 263\text{ cm}^{-1}$ 为酰胺三带的亚甲基变形振动, $1\ 105\text{ cm}^{-1}$ 为氧合血红蛋白与氧

合肌红蛋白的 O_2 振动, $1\ 450\text{ cm}^{-1}$ 为亚甲基的剪式振动, $1\ 655\text{ cm}^{-1}$ 酰胺一带的 C=O 与 C=C 伸缩振动。由图 6 可知, 此细菌本体的拉曼光谱强度较弱, 采用接种环接种一定数量的 E. coli 于 200 mL 的生理盐水中混合均匀, 12 h 后测量 E. coli 的拉曼光谱, 没有得到拉曼信息。

表 1 E. Coli 的拉曼谱峰归属

Table 1 Peak assignments of the Raman spectra (cm^{-1}) of the E. Coli bacteria^[3, 5, 13-14]

Bulk/E. Coli	Ag/E. Coli	ZnO/E. Coli	Assignment
782			DNA; O—P—O stretch, cytosine, uracil, thymine
1 003	1 003	1 003	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1 105		1 105	O_2 bands of Oxyhemoglobin and oxymyoglobin
	1 128		C—C Stretching mode of lipids
		1 239	Amide II : collagen (CH_2 wag, C—N stretch)
1 263			Amide III : collagen (CH_2 wag)
		1 333	Polynucleotide chain (DNA-purine bases)
	1 349		CH_2 Deformation
1 450		1 450	CH_2 Deformation (lipids)
	1 576		Amide II : collagen (CH_2 wag, C—N stretch)
1 655		1 656	Amide I (collagen)

2.2 ZnO 纳米粒子的表征和作为 SERS 基底的性质研究

图 2(a)为制备的 ZnO 纳米粒子的透射电子显微镜 (TEM) 图片, 如图 2(a)可知制备的 ZnO 纳米粒子尺寸约为 150~200 nm。通过 XRD 衍射图 2(b)可知, 制备的 ZnO 纳米粒子的衍射峰比较尖锐, 峰强较高, 是典型的六方纤锌矿结构, 表明晶粒发育良好, 无其他物相。

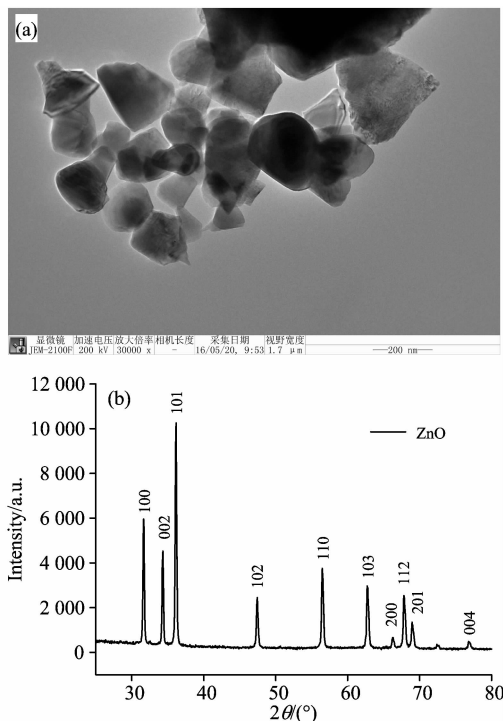


图 2 ZnO 纳米粒子的 (a)TEM 图和 (b)XRD 衍射图
Fig. 2 (a) TEM image and (b) XRD pattern of the ZnO nanoparticles

称取 0.12 g ZnO 固体溶于事先配好的 $10^{-3}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PATP 乙醇溶液, 超声使 ZnO 充分分散在溶液中, 搅拌 12 h 使 ZnO 聚集在 PATP 表面。吸取少许溶液于载玻片上, 待悬浊液自然晾干后, 测定 SERS 信号如图 3, 其中 439 和 475 cm^{-1} 处为 ZnO 的声子振动峰, 其中归属于 PATP 的振动峰为 1 088 (C—S 伸缩), 1 144 (C—H 弯曲), 1 393 (C—C 伸缩), 1 443 (C—C 伸缩和 C—H 弯曲) 和 1 592 cm^{-1} (C—C 伸缩振动), 强度较大, 说明制备的 ZnO 有较好的表面增强效果, 可以作为下一步细菌的 SERS 研究使用。

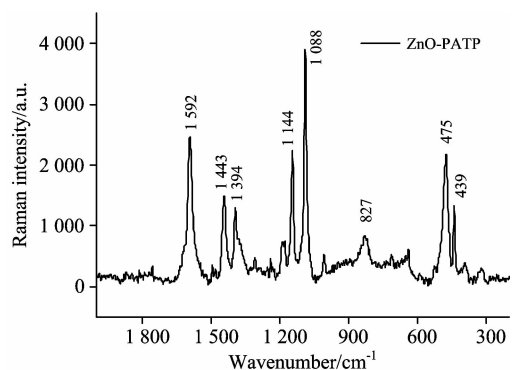


图 3 $10^{-3}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PATP 分子吸附在 ZnO 纳米粒子上的 SERS 光谱图
Fig. 3 The SERS spectra of the $10^{-3}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PATP adsorbed on ZnO nanoparticles

2.3 半导体纳米粒子及贵金属纳米粒子作为 SERS 基底对细菌检测

ZnO 纳米粒子与 Ag 溶胶分别与 E. Coli 孵育所得拉曼光谱图, 如图 4 所示。图 4b 为 E. coli 与 Ag 溶胶混合孵育液的 SERS 谱图, 其中 $1\ 003\text{ cm}^{-1}$ 为苯丙氨酸的对称环呼吸模式

$1\ 349\ \text{cm}^{-1}$ 为亚甲基的剪式振动, $1\ 576\ \text{cm}^{-1}$ 为酰胺二带的变形振动或氨基的伸缩振动^[3, 5, 13-14]。对比 E. coli 的本体拉曼光谱图[图 1(b)], Ag 溶胶的增强效果很好, 得到的谱图信息也很丰富, 但是相对于 E. Coli 本体的谱峰位置发生很大位移, 这说明在 Ag 溶胶与 E. Coli 混合孵育时, 由于金银等重金属较容易使蛋白质变性, SERS 活性介质与不同细胞成分的反应, 使细菌的蛋白质结构和构象发生变化, 改变了其中蛋白质的拉曼信息, 因而对于分析细菌的拉曼信息带来了很大的问题。

图 4b 为 E. coli 与 ZnO 纳米粒子混合孵育液的 SERS 谱图, 其中 $438\ \text{cm}^{-1}$ 为 ZnO 的声子振动峰, $1\ 003\ \text{cm}^{-1}$ 为苯丙氨酸的对称环呼吸模式, $1\ 105\ \text{cm}^{-1}$ 为氧合血红蛋白与氧合肌红蛋白的 O_2 振动, $1\ 239\ \text{cm}^{-1}$ 为酰胺二带的亚甲基变形振动和 C—N 的伸缩振动, $1\ 333\ \text{cm}^{-1}$ 为 DNA 的多核苷酸链(碱基)振动, $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ 为亚甲基的剪式振动, $1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ 酰胺一类的 C=O 与 C=C 伸缩振动^[3, 5, 13-14]。对比 E. coli 的本体拉曼光谱图[图 1(b)], ZnO 纳米粒子的增强效果不是很好, 但是 ZnO 纳米粒子与与菌落的混合液的 SERS 信号更接近 E. coli 的本体拉曼光谱图, 说明 ZnO 纳米粒子的生物相容性很好, 不会破坏细菌的结构和构象, 进而可以得到相对真实的细菌的 SERS 信息, 这将有利于 SERS 在生物体系的无损检测。

3 结 论

以大肠杆菌(E. Coli)作为目标检测细菌, 首先检测到大

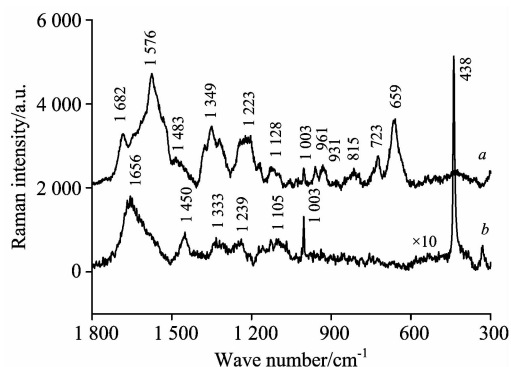


图 4 a Ag 溶胶/E. Coli; b ZnO 纳米粒子/E. Coli 的 SERS 光谱

Fig. 4 The SERS spectra of a the Ag colloid/E. Coli incubate and b the ZnO nanoparticles/E. Coli incubate

肠杆菌的拉曼光谱, 进而采用两种不同的 SERS 基底(ZnO, Ag 溶胶)进行检测。结果表明 Ag 溶胶基底有很强且较丰富的 SERS 信号, 但是相对于 E. Coli 的本体拉曼谱峰有较大位移, 说明存在一定的蛋白质变性过程, 而 ZnO 纳米粒子的 SERS 信号虽然较弱, 但是与 E. Coli 的本体拉曼信号较为相似, 说明 ZnO 纳米粒子对 E. Coli 本体基本无损, 这将有利于 SERS 在生物体系的无损检测, 这些初步的探索可以为利用生物相容性好的半导体 SERS 基底检测细菌提供有益的参考。

References

- [1] SUO Biao, TENG Yao-hui, SHI Xian-ming, et al(索 标, 滕要辉, 史贤明, 等). Food Science(食品科学), 2012, 33(10): 233.
- [2] Templier V, Roux A, Roupioz Y, et al. Tranc-Trend in Anal. Chem., 2015, 79: 71.
- [3] Kast R E, Auner G W, Mikkelsen T, et al. J. Neurooncol, 2014, 120: 55.
- [4] Jamal F M, Natalia K, Thomas S, Helmut H. Spectroscopy: An International Journal, 2012, 27: 361.
- [5] LI Xiao-li, LUO Liu-bin, ZHOU Bin-xiong, et al(李晓丽, 罗榴彬, 周斌雄, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2016, 36(1): 119.
- [6] Efrima S, Zeiri L. J. Raman Spectrosc., 2009, 40: 277.
- [7] HUANG Yu-kun, WANG Yi-qian, WANG Peng, et al(黄玉坤, 王毅谦, 汪 朋, 等). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 2011, 21(12): 2824.
- [8] Kahraman M, Zamaleeva A I, Fakhrullin R F, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2009, 395: 2559.
- [9] Jarvis R M, Goodacre R. Chem. Soc. Rev., 2008, 37: 931.
- [10] Jarvis R, Goodacre R. Anal. Chem., 2004, 76: 40.
- [11] Cowcher D, Xu Y, Goodacre R. Anal. Chem., 2013, 85: 3297.
- [12] Sockalingum G D, Lamfarraj H, Beljebbar A, et al. SPIE Conference on Biomedical Applications of Raman Spectroscopy, SPIE: Enschede, Netherlands, 1999, 3608: 185.
- [13] ZHANG Hai-peng, ZHENG Chao, LU Lu, et al(张海鹏, 郑 超, 路 璐, 等). Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese(高等学校化学学报), 2014, 35(9): 1877.
- [14] Jarvis R, Brooker A, Goodacre R. Anal. Chem., 2004, 76: 5198.

Non-Destructive Detection of Escherichia Coli Based on the SERS Substrate of Semiconductor Nanoparticles

SONG Wei¹, LIU Zhuo², QI Bao-ling¹, GUO Yue¹, WANG Li-li¹, WANG Hai^{2*}, HE Cheng-yan², ZHAO Bing^{1*}

1. State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China

2. China Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China

Abstract Most of diseases are closely related to bacterial infection while the fast and accurate detection of bacteria is always a focus subject which has attracted great attention by microbiologists and other relevant researchers. Raman spectroscopy can provide rich spectrum information, and surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS) has a high detection sensitivity, however, some of the noble metal SERS substrate will cause protein denaturation, which obtained the incorrect results. In this work, it is shown that Escherichia coli (E. Coli) can be detected by the SERS technique by using semiconductor nanoparticles as the substrate. The SERS spectrum of the E. Coli on the ZnO nanoparticle substrate with that on the Ag sol substrate was compared. The results indicated that stronger and richer SERS signals were observed on the Ag sol substrate compared with that on the ZnO substrate. However, an obvious difference was obtained between SERS spectrum of E. Coli on the Ag sol substrate and the Raman spectrum of bulk E. Coli, which could be due to the protein denaturation process. On the other hand, although the SERS signal of the E. Coli on the ZnO nanoparticles substrate is relatively weak, the signal is similar with that of the Raman spectrum of the bulk E. Coli, indicating that ZnO nanoparticles is an efficient and biocompatible SERS substrate for the detection of E. Coli. This study provides the important information for the non-destructive detection of bacteria by SERS technique based on the semiconductor nanoparticles substrate.

Keywords Semiconductor nanoparticles; Bacterial; Surface enhanced Raman spectroscopy; Non-destructive detection

(Received Jun. 2, 2016; accepted Nov. 5, 2016)

* Corresponding authors