

金颗粒为活性基底的裸鼠血清表面增强 拉曼散射光谱分析

刘书朋 朱鸿飞 陈 娜 陈振宜 胡 玲

(上海大学特种光纤与光接入网省部共建国家重点实验室, 上海 200072)

摘要 对肿瘤裸鼠血清进行显微共聚焦拉曼光谱测量,并将血清的普通拉曼光谱与以金纳米颗粒为基底的表面增强拉曼散射(SERS)光谱进行对比,结果表明金纳米粒子作为活性基底对裸鼠血清具有显著的拉曼增强作用,在很多常规拉曼光谱中未能检测出的信息在 SERS 光谱中得以体现。这源于血清中的物质与金纳米颗粒之间的化学吸附和相互作用,使得微量样品也能够通过 SERS 光谱来反映出血清中各种蛋白质、脂类、糖类、核酸以及其他成分的分子结构等信息。血清中各种成分的信息可以反映体内各种细胞和组织的生理代谢及病理变化,血清的 SERS 光谱将为疾病的诊断和治疗提供一种有效手段。

关键词 生物光学;血清;金纳米颗粒;表面增强拉曼散射光谱;裸鼠

中图分类号 TN249 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201239.0504004

Surface Enhanced Raman Scattering Spectrum Analysis of Nude Mouse Serum with Au Nanoparticles Active Substrate

Liu Shupeng Zhu Hongfei Chen Na Chen Zhenyi Hu Ling

(Key Laboratory of Specialty Fiber Optics and Optical Access Networks,
Shanghai University, Shanghai 200072, China)

Abstract Raman spectrum and surface enhanced Raman scattering (SERS) spectrum of the nude mouse serum are measured using laser Raman confocal micro-spectrometry. The results show that the Au nanoparticles active substrate can enhance the Raman spectra dramatically. A lot of information which conventional Raman spectroscopy fails to detect emerges. This is due to the chemical adsorption and interactions between the gold nanoparticles and the substances in serum. The information is important for the analysis of the most components and structures of the serum proteins. With SERS spectrum, even micro-sample can also reflect the molecular structure information of the serum proteins, lipids, carbohydrates, ribonucleic acid and other components. Information of the serum components can reflect physiological and pathological metabolism changes of the cells and tissues in the body. So SERS spectrum of the serum would provide an effective means for the diagnosis and therapy of diseases.

Key words biotechnology; serum; Au nanoparticle; surface enhanced Raman scattering spectrum; nude mouse

OCIS codes 170.1420; 170.5660; 300.6170

1 引 言

血清是人和动物体内重要的体液,主要成分包括水、无机盐、蛋白质和有机小分子等。血清中各种成分的变化,可以反映体内各种细胞、组织生理及病理的变化在临床和生化检验中具有重要价值,可广泛用于肝炎、肿瘤、艾滋病、冠心病等疾病的诊断检

验。如在肿瘤发生癌变的过程中,癌组织或癌细胞的基因产物和代谢产物进入血液,会体现为血清中物质成分、含量及微生物分子环境的变化。由此,从血清的拉曼光谱中,可以获得血清中组织细胞的代谢产物分子结构和含量变化等信息^[1]。有研究表明激光拉曼光谱技术具有区分鼻咽癌及健康人血清的

收稿日期: 2012-01-11; 收到修改稿日期: 2012-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(61027015, 61177088, 61107076)和上海市科委重点项目及重点学科建设项目(10DZ2210900, S30108)资助课题。

作者简介: 刘书朋(1971—),男,博士,副教授,主要从事生物医学工程方面的研究。E-mail: liusp@shu.edu.cn

可能性^[2], 乳腺癌病人血清的拉曼光谱和正常人血清光谱有区别, 具有作为筛选乳腺癌病人的潜在可能性^[3], 其应用价值值得进一步探讨。

但普通拉曼光谱由于分子散射截面太小, 一般只有 $10^{-30} \sim 10^{-29} \text{ cm}^2$, 拉曼散射光强也仅为入射光强的 10^{-10} 倍, 散射效率低。直接检测生物液的拉曼光谱, 进行成分分析和诊断疾病的报道中, 往往存在探测灵敏度较低、低浓度生物液信号弱和分子信息获取量少等问题。如在结直肠癌患者血清的拉曼光谱中, 只体现有 3 个特征峰 $1946, 1932, 1895 \text{ cm}^{-1}$ ^[4]。通过表面增强拉曼散射 (SERS) 光谱技术可大大提高拉曼检测的灵敏度和信噪比, 获得高质量的表面分子信息^[2,5,6]。SERS 光谱技术具有高灵敏性、快速和样品用量少等优点, 如利用银溶胶作为增强基底的血清 SERS 检测, 已获得多达几十个拉曼特征峰, 包括 $1648, 1518, 1433, 1119, 828, 670 \text{ cm}^{-1}$ 等, 可以反映糖、蛋白、核酸、脂类等物质, 获取更丰富的分子信息^[7~10]。

相对细胞等生物样品来说, 金纳米颗粒比银纳米颗粒具有更低的毒性。本文通过采用金纳米粒子作为活性增强基底, 来检测肿瘤裸鼠血清的拉曼光谱, 分析血清中成分和分子结构信息, 为血清的成分和结构分析提供帮助。

2 实验方法

2.1 SERS 活性基底的制备

金纳米粒子的制备方法如下: 将 1 mL 体积分数为 1% 的氯金酸溶液加入到 100 mL 去离子水中,

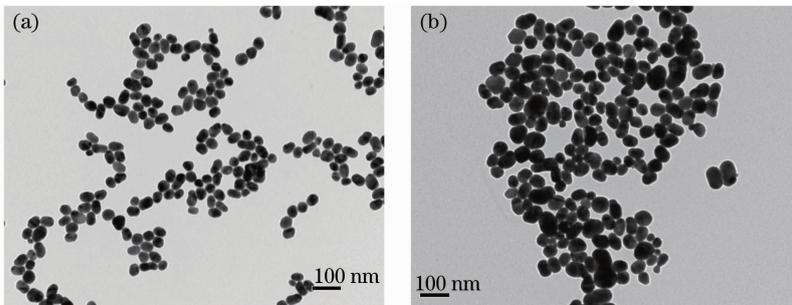


图 1 制备的金纳米颗粒的 TEM 图。(a) 金纳米颗粒粒径在 42 nm 左右; (b) 金纳米颗粒粒径在 55 nm 左右

Fig. 1 TEM images of Au nanoparticles. (a) Size of Au nanoparticles is about 42 nm;

(b) size of Au nanoparticles is about 55 nm

在一般情况下, 生物大分子具有很强的荧光背景且常规拉曼散射效率较低, 使得许多生物分子的常规拉曼光谱特征峰峰值不明显或被湮没在强的荧光背景下。实验中采用 785 nm 的激发光可有效避免荧光背景干扰, 而且在增强基底的作用下, 拉曼光

放在微波炉中加热 150 s 至沸腾。在搅拌下快速加入 2.5 mL 体积分数为 1% 的柠檬酸钠 (沈阳试剂三厂, 分析纯) 水溶液, 再一次放入微波炉中加热 6 min, 取出沸腾状态混合溶液, 自然冷却 10 min 后, 此时混合溶液的颜色逐渐变为酒红色, 即得金溶胶。然后用台式高速离心机以转速 12000 r/s 离心 5 min, 弃上清液, 滴入去离子水, 超声波处理 5 min, 如此离心三次。取提纯后的金溶胶微量滴于铜网上, 用透射电子显微镜 (TEM) 观察。

2.2 血清的制备

获取肿瘤裸鼠血清的操作过程如下: 在麻醉的活体裸鼠心脏部位用 1 mL 注射器抽取血液样本, 不加抗凝剂, 静置 2 h 后, 以转速 3000 r/min 离心 10 min, 移取 200 μL 淡黄色上清液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3 裸鼠血清的 SERS 光谱检测

实验前将金溶胶与样品血清按体积比为 1:1 混合均匀, 放置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温冰箱之中 2 h 左右备用。测量时, 移液器取 2 μL 混合溶液滴于纯金属铝片薄膜上, 室温下自然干燥, 放置在显微共聚焦拉曼光谱仪 (Renishaw Invia) 的样品台上。实验中, 拉曼激发光波长为 785 nm, 经 40 倍物镜聚焦后照射在样品上, 积分时间为 10 s, 累加次数 2 次, 采用 180° 背散射接收方式, 扫描范围为 $300 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 。

3 结果与讨论

制备的金纳米颗粒通过 TEM 观察, 纳米颗粒直径为 40~60 nm, 如图 1 所示。

谱会得到显著增强。以制备的金溶胶作为 SERS 的活性基底, 将血清与金溶胶进行混合, 检测其 SERS 光谱, 见图 2。图中谱 a 是肿瘤血清的拉曼光谱, 谱 b 是金溶胶增强的肿瘤血清拉曼光谱, 谱 c 是金溶胶的拉曼光谱。裸鼠血清的 SERS 光谱中特征峰的

相应归属见表 1。

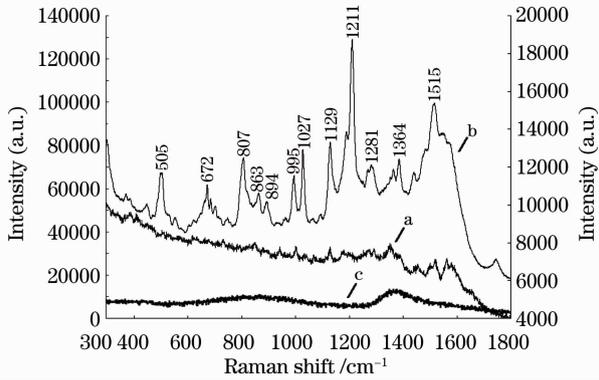


图 2 裸鼠血清的 SERS 光谱和常规拉曼光谱

Fig. 2 SERS Raman spectrum and the normal Raman spectrum of the mouse serum

表 1 裸鼠血清拉曼光谱和 SERS 光谱的可能归属

Table 1 Nude mouse serum Raman spectrum and assignments

Raman peak /cm ⁻¹	Band assignment
505	D-mannose
672	Amide IV : O=C-N deformation
807	Aspartate
863	Tyrosine, collagen, proline
894	In plane COC symmetric deformation
995	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1027	C-H in plane bending mode of phenylalanine
1129	C-C stretching mode of lipids/protein
1211	C-N stretch/glucose
1281	Ring vibration, L-tryptophan, phenylalanine
1281	Amide III : C-N stretching mode of proteins, indicating mainly α -helix of conformation
1364	Lipids
1515	-C=C- carotenoid, adenine

图 2 中金溶胶拉曼光谱中没有明显的杂质干扰峰出现,其中较为明显的包络峰为玻璃载玻片的拉曼峰所致。金溶胶作为 SERS 光谱的基底,当肿瘤裸鼠血清与金溶胶混合后,一部分生物大分子吸附在金纳米颗粒上,拉曼散射时产生表面增强效果,使拉曼光谱谱线强度整体提升,而且激发出很多在常规拉曼光谱中湮没的特征峰信息,对应的常规拉曼光谱中基本上看不到拉曼特征峰信息。

金溶胶的聚集可以形成多个“热点”,如果血清中蛋白质等成分恰好落在“热点”上,那么该处蛋白质分子或者官能团的拉曼散射强度会得到明显的增强。如 672、807、995、1281 cm⁻¹ 等谱线都有明显的增强,而且出现了很多新的拉曼峰,并伴随着一些常

规拉曼谱线的偏移和消失。

对于肿瘤裸鼠血清,白蛋白以及各类球蛋白质的主链构象的 SERS 光谱非常复杂,主要包括分子中肽键的特征振动、主链骨架 C-C 和 C-N 及侧链的振动,还包括酰胺 A、B 和 I-VII 对蛋白质构象的变化十分敏感^[11]。在图 2 中可以看到,672、1281 cm⁻¹ 是血清蛋白酰胺键贡献的拉曼特征峰,属于蛋白质二级结构。995、1027、1211 cm⁻¹ 谱带属于蛋白质的侧链苯丙氨酸的单基取代苯基环,在蛋白质的拉曼光谱中属于强峰,807、863 cm⁻¹ 是含天冬氨酸或酪氨酸或脯氨酸的蛋白特征峰^[12,13]。

肿瘤裸鼠血清中含有少量糖类和脂类,在常规拉曼光谱中难以发现,在 SERS 光谱中却能够检测到,505、1129 cm⁻¹ 谱带属于碳水化合物 D-甘露糖的特征谱带^[14],894 cm⁻¹ 是血清中多糖的特征谱带^[12],1364 cm⁻¹ 谱带属于脂类的拉曼特征峰^[15],1515 cm⁻¹ 是类胡萝卜素或腺嘌呤的拉曼特征峰^[12,16]。由此可知,在用金溶胶作为 SERS 的活性基底时,不仅可以获得血清中含量高的白蛋白的拉曼光谱,还可以获得血清中含量非常低的脂类和糖类成分的拉曼光谱。一些疾病会导致血清中某些微量成分的微量变化,通过 SERS 光谱技术来检测这种微量变化,将有助于疾病的诊断和治疗。

4 结 论

以金纳米粒子作为活性增强基底,检测了肿瘤裸鼠血清的拉曼光谱。实验结果表明,当加入金溶胶作为活性基底时,可以对血清的拉曼光谱起到表面增强的作用。金溶胶作为基底的裸鼠血清 SERS 光谱比常规拉曼光谱有显著的增强,在常规拉曼光谱中不能出现的拉曼峰,在 SERS 光谱中得到明显的体现。血清与金粒子之间通过化学吸附和相互作用,可导致裸鼠血清的一些分子结构的变化而引起拉曼峰的产生和偏移。血清的成分构成非常复杂,拉曼光谱特征峰也非常丰富,包含大量的物质结构信息。本文只是对裸鼠血清的 SERS 光谱进行了初步的测定和分析,还不能完全指认出裸鼠血清所有的拉曼光谱。全面地分析、测定和确定血清中的特征峰,还需要采集大量不同类型的血清进行相关实验,并需要展开深入的分析。

参 考 文 献

- 1 O. Eytan, B. A. Sela, A. Katzir. Fiber-optics evanescent-wave spectroscopy and neural networks: application to chemical blood analysis[J]. *Appl. Opt.*, 2000, **39**(19): 3357~3360

- 2 Pan Jianji, Chen Qisong, Huang Wei *et al.*. The application value of Raman spectra for serum in early nasopharyngeal carcinoma diagnosis [J]. *China Oncology*, 2011, **21**(9): 708~712
潘建基, 陈奇松, 黄伟等. 血清拉曼光谱检测在鼻咽癌早期诊断中的应用价值研究[J]. *中国癌症杂志*, 2011, **21**(9): 708~712
- 3 J. L. Pichardo-Molina, C. Frausto-Reyes, O. Barbosa-García *et al.*. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients[J]. *Lasers Med. Sci.*, 2007, **22**(4): 229~236
- 4 Li Xiaozhou, Yang Tianyue. Detection and discrimination of normal and colorectal cancer serum using Raman spectroscopy [J]. *The Journal of Light Scattering*, 2011, **23**(2): 138~141
李晓舟, 杨天月. 正常人和结肠癌患者血清的拉曼光谱探测与区别[J]. *光散射学报*, 2011, **23**(2): 138~141
- 5 Enzhong Tan, Penggang Yin, Lidong Li *et al.*. Single-molecule surface-enhanced Raman scattering of R6G in aqueous environment under non-resonance conditions [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2011, **9**(8): 082901
- 6 Xi Gangqin, Chen Yanping, Chen Gang *et al.*. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopic assay of immunohistochemically stained human colon cancer tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(9): 0904001
席刚琴, 陈燕坪, 陈刚等. 基于表面增强拉曼光谱的结肠癌组织免疫分析[J]. *中国激光*, 2011, **38**(9): 0904001
- 7 Liu Renming, Liu Ruiming, Wu Yanchun *et al.*. Investigations on NIR-SERS spectra of serum for liver cancer based on NIR-SERS substrate[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0630001
刘仁明, 刘瑞明, 武延春等. 基于新型 NIR-SERS 基底的肝癌血清 NIR-SERS 光谱研究[J]. *光学学报*, 2011, **31**(6): 0630001
- 8 Liu Kun, Wu Shifa, Chen Maodu *et al.*. Surface enhanced Raman spectrum of rat serum in the novel silver colloid[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(2): 339~342
刘琨, 吴世法, 陈茂笃等. 以新型银胶为衬底小鼠血清的表面增强拉曼光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(2): 339~342
- 9 Shupeng Liu, Hongfei Zhu, Shaofeng Chen *et al.*. Surface-enhanced Raman spectroscopy of mouse serum using silver colloid as the substrate[C]. *SPIE*, 2012, **8351**: 83512I
- 10 Han Hongwen, Yan Xunling, Ban Ge *et al.*. Surface enhanced Raman spectra analysis of serum from diabetes mellitus and complication[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1122~1125
韩洪文, 闫循领, 班戈等. 糖尿病及并发症血清的表面增强拉曼光谱[J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1122~1125
- 11 F. S. Parker. Application of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry[M]. New York: Plenum Press, 1983. 315~347
- 12 Xu Yiming. Raman Spectra and the Applications in Structure Biology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 125~139
许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 125~139
- 13 Jianyu Guo, Bing Du, Min Qian *et al.*. Raman spectroscopic identification of normal and malignant hepatocytes [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, **7**(1): 60~63
- 14 H. Zhao, Y. M. Xu, C. Z. Lu. Raman spectroscopic study of D-mannose after the photosensitive damage caused by hypericin [J]. *Int. Asian J. Spectroscopy*, 1997, **1**(1): 71~76
- 15 Xiaohui Wang, Yuan Li, Huafen Wang *et al.*. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, **26**(2): 404~410
- 16 V. E. de Oliveira, E. W. Almeida, H. V. Castro *et al.*. Carotenoids and β -cyclodextrin inclusion complexes: Raman spectroscopy and theoretical investigation [J]. *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**(30): 8511~8519

栏目编辑: 韩峰