



·前沿技术与交叉科学·

## 新型冠状病毒 S 蛋白在金纳米粒子中的 表面增强拉曼效应\*

乐 玮<sup>1</sup>, 黄景林<sup>1</sup>, 羊 强<sup>2</sup>, 祁道健<sup>1</sup>, 倪 爽<sup>1</sup>, 魏 来<sup>1,3</sup>, 范全平<sup>1,3</sup>, 杨 月<sup>1,3</sup>,  
温家星<sup>3</sup>, 莫文博<sup>3</sup>, 陈 果<sup>1</sup>, 赵松楠<sup>1</sup>, 何智兵<sup>1</sup>, 李 波<sup>1</sup>, 杜 凯<sup>1</sup>

(1. 中国工程物理研究院 激光聚变研究中心, 四川 绵阳 621900; 2. 中国工程物理研究院, 四川 绵阳 621900;  
3. 等离子体物理重点实验室, 四川 绵阳 621900)

**摘 要:** 表面增强拉曼光谱技术因其高灵敏度、操作简单、快速检测等优点, 被广泛用于病毒检测方面。国内外的病毒拉曼检测研究主要集中在检测病毒核酸以及组成核酸的各种碱基的表面增强拉曼光谱(SERS), 但少见对病毒蛋白的 SERS 检测。以新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 S 蛋白为检测对象, 采用无标记 SERS 检测方法, 对比 SARS-CoV-2 固态、饱和和液态 S 蛋白的普通拉曼光谱和选用 40 nm 金纳米粒子为基底的 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白 SERS 光谱。结果表明, 以 40 nm 金纳米粒子为基底, 采用 SERS 技术检测 SARS-CoV-2 的 S 蛋白是完全可行的。SARS-CoV-2 的 S 蛋白分子中的羧基与金纳米粒子发生了分子增强, 氨基与金纳米粒子发生了电磁增强, 从而使得 SARS-CoV-2 的 S 蛋白拉曼效应得到了增强, 并使得峰位发生一定移动。实验获得了较好的 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白 SERS 光谱, 为建立敏感、特异、快速的 SARS-CoV-2 检测新技术提供了一种方法。

**关键词:** 表面增强拉曼光谱技术; 新型冠状病毒; 金纳米粒子; 蛋白质; 相互作用

中图分类号: O657.37

文献标志码: A doi: 10.11884/HPLPB2021133.210466

## Surface-enhanced Raman effect of new coronavirus S protein in gold nanoparticles

Le Wei<sup>1</sup>, Huang Jinglin<sup>1</sup>, Yang Qiang<sup>2</sup>, Qi Daojian<sup>1</sup>, Ni Shuang<sup>1</sup>, Wei Lai<sup>1,3</sup>, Fan Quanping<sup>1,3</sup>, Yang Yue<sup>1,3</sup>,  
Wen Jiaying<sup>3</sup>, Mo Wenbo<sup>3</sup>, Chen Guo<sup>1</sup>, Zhao Songnan<sup>1</sup>, He Zhibing<sup>1</sup>, Li Bo<sup>1</sup>, Du Kai<sup>1</sup>

(1. Laser Fusion Research Center, CAEP, Mianyang 621900, China;

2. China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China;

3. Science and Technology on Plasma Physics Laboratory, Mianyang 621900, China)

**Abstract:** Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) technology has been widely used in viral molecular detection due to its high sensitivity, simple operation and rapid detection. The research of virus detection by Raman technology at home and abroad mainly focuses on the detection of the SERS spectrum of viral nucleic acids and various bases that make up the nucleic acids, and detection of viral proteins is rare. In this paper, the S protein of the new coronavirus (SARS-CoV-2) is used as the detection object, and with the label-free SERS detection method, the ordinary Raman spectra of solid and saturated liquid S protein of the SARS-CoV-2 and the SERS spectra of the low-concentration S protein of SARS-CoV-2 on the substrate of gold nanoparticles with a size of 40 nm are compared. The results show that it is completely feasible to use SERS technology to detect the S protein of SARS-CoV-2 on the substrate of 40 nm gold nanoparticles. The carboxyl groups in the S protein molecule of SARS-CoV-2 and gold nanoparticles are molecularly enhanced, and the amino groups and gold nanoparticles are electromagnetically enhanced, so that the Raman effect of the S protein of the SARS-CoV-2 is enhanced and the peak position is moved to a certain extent. The experiments obtained relatively good SERS spectra of the low-concentration S protein of SARS-CoV-2, which provides a method for the establishment of a sensitive, specific and rapid detection technology for the S

\* 收稿日期: 2021-10-20; 修订日期: 2021-11-10

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFA0206001); 国家自然科学基金项目(11804318)

联系方式: 乐 玮, lelele1217@126.com。

通信作者: 杜 凯, dukai@caep.cn。

protein of the SARS-CoV-2.

**Key words:** surface-enhanced Raman spectroscopy technology; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); gold nanoparticles; protein; interaction

2020年1月11日,中国健康委员会将2019新型冠状病毒命名为2019-nCoV。国际病毒分类委员会将2019-nCoV命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2))<sup>[1]</sup>。SARS-CoV-2具有传染途径隐蔽、传染性强和传染速度快等特点,将导致严重急性呼吸综合征和中东呼吸综合征等疾病。随着SARS-CoV-2疫情在全球蔓延,中国面临的境外疫情输入压力持续加大。截至2021年10月上旬,全球累计确诊逾2.4亿,死亡逾500万例<sup>[2]</sup>。目前,疫情处于胶着状态,仍需继续强化防控和实时检测,现阶段做好疫情防控的基础和关键是建立灵敏、特异、稳定的病毒检测方法。

SARS-CoV-2属于冠状病毒科,是一个有包膜的单股正链RNA病毒。SARS-CoV-2的基因组包括29981nt(GenBank no.MN908947),编码9860个氨基酸,4个结构蛋白:刺突蛋白(S蛋白)、囊膜蛋白(E蛋白)、膜蛋白(M蛋白)及核衣壳蛋白(N蛋白)<sup>[3]</sup>。目前,SARS-CoV-2常见检测方法有荧光聚合酶链反应法<sup>[4]</sup>和胶体金试纸法<sup>[5]</sup>。荧光聚合酶链反应检测病毒独特的基因序列,该方法上机检测与结果分析约需5h<sup>[4]</sup>。胶体金试纸法检测SARS-CoV-2的抗原或SARS-CoV-2的IgM抗体,该方法虽然检测时间可缩短至约20min,但由于病毒感染存在潜伏期,误判率较高<sup>[5-6]</sup>。因此,开发一种快速、准确率高的检测方法是极为迫切的。

表面增强拉曼光谱技术(SERS)是20世纪70年代发展的一种快速无损检测技术,在生化样品检测中具有很大的优势,是生命科学研究不可或缺的一种重要手段<sup>[7]</sup>。目前,国内外的病毒拉曼检测研究主要集中在病毒核酸以及组成核酸的各种碱基的SERS光谱<sup>[8-10]</sup>,本课题组在2020年对SARS-CoV-2刺突蛋白表面增强拉曼光谱检测技术进行初步研究<sup>[11-12]</sup>,但对SARS-CoV-2病毒蛋白的表面增强拉曼作用机理的报道较少。

本文以SARS-CoV-2的S蛋白为检测对象,采用无标记检测,即SARS-CoV-2的S蛋白直接吸附在40nm金纳米粒子表面,利用SERS技术直接获取S蛋白自身的拉曼指纹光谱。对比SARS-CoV-2固态、饱和液态S蛋白的普通拉曼光谱和在40nm金纳米粒子基底上的SARS-CoV-2低浓度S蛋白SERS光谱。依据SERS作用机理,探讨SARS-CoV-2的S蛋白在金纳米粒子表面的吸附状态及其相互作用特点,为建立敏感、特异、快速SARS-CoV-2的S蛋白检测新技术提供一种方法。

## 1 材料与实验

SARS-CoV-2的S蛋白购于北京义翘神州科技股份有限公司,实验时未做进一步纯化。40nm金纳米粒子购于南京先丰纳米科技公司。

拉曼光谱实验:采用法国HORIBA公司的高分辨共聚焦拉曼谱仪。激光光源:632nm激光器;扫描范围:400~1400 $\text{cm}^{-1}$ ;光栅刻线数:1800线/nm;物镜:50 $\times$ 长焦距镜头;光谱信号采集积分时间:10s。

SARS-CoV-2的S蛋白固体样品直接放在载玻片上进行测试。SARS-CoV-2的S蛋白饱和液体样品装入拉曼样品池中,测得拉曼光谱。将 $110^{-3}\text{mol/L}$ 的SARS-CoV-2的S蛋白溶液与金纳米粒子按1:1的体积比混合,将混合物滴在石英测试盒中,在生物安全柜中通风晾干,随后用石英片及胶带将石英盒密封备用,测得拉曼光谱。

## 2 材料与实验结果与讨论

### 2.1 SARS-CoV-2 固态 S 蛋白的拉曼光谱

SARS-CoV-2 固体 S 蛋白拉曼信号来源于构成该蛋白质的氨基酸侧链。图 1 是 SARS-CoV-2 固态 S 蛋白的拉曼谱图。我们可以看到 SARS-CoV-2 固体 S 蛋白的谱峰信息十分丰富,从中可以获得几十个振动谱带的信息,并且具有良好的信噪比及很窄的线宽。537.7, 679.1, 851.6, 915.3, 1 111.1, 1 250.9, 1 326.4 和 1362.7  $\text{cm}^{-1}$  谱峰分别归属于 S-S 伸缩振动、COO<sup>-</sup> 摇摆振动、NH<sub>2</sub> 摇摆振动、C-C 对称伸缩、C-N 摇摆振动、CH<sub>2</sub> 对称变形、COO<sup>-</sup> 对称伸缩振动和色氨酸。

### 2.2 SARS-CoV-2 饱和液态 S 蛋白的拉曼光谱

图 2 是 SARS-CoV-2 饱和液态 S 蛋白的拉曼光谱,只能看到较灵敏的 524.7, 850.7, 917.1, 1111.4, 1 257.2 和 1343.6  $\text{cm}^{-1}$  谱峰,它们分别归属于 S-S 伸缩振动、NH<sub>2</sub> 摇摆振动、C-C 对称伸缩、C-N 摇摆振动、COO<sup>-</sup> 对称伸缩振动和色氨酸。比较 SARS-CoV-2 固态 S 蛋白的拉曼光谱,可以发现一些相邻比较近的峰位分辨率不高,中高强

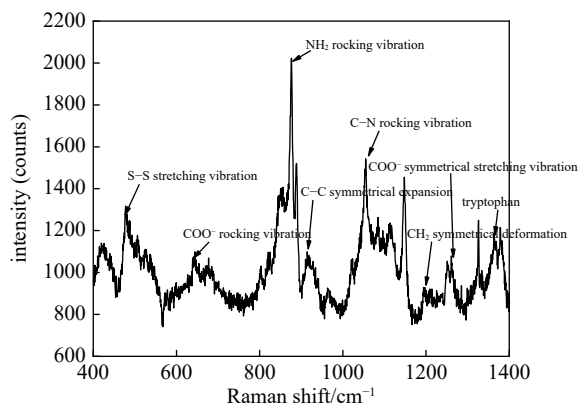


Fig. 1 Raman spectrum of the S protein of SARS-CoV-2 in solid state

图 1 SARS-CoV-2 固态 S 蛋白的拉曼光谱

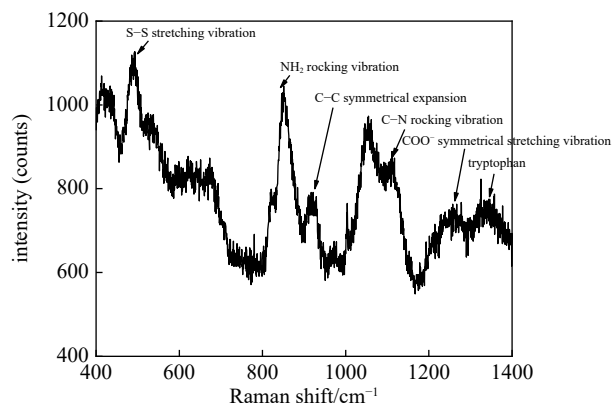


Fig. 2 Raman spectrum of the S protein of SARS-CoV-2 in saturated liquid state

图 2 SARS-CoV-2 饱和液态 S 蛋白的拉曼光谱

度的峰位基本对应,而那些强度低的振动信号在饱和和液态谱中就没有出现。

### 2.3 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白在金纳米粒子中的 SERS 及表面吸附模型

SERS 机制分为电磁增强和分子增强。电磁增强通常发生在凝聚状态的金属凝胶中,主要是由金属表面附近的电磁场因等离子共振引起的入射光场增强,研究表明电磁增强的增强因子可达  $10^{11}$  左右,具有长程增强特性<sup>[12]</sup>;而分子增强通常发生在未凝聚或部分凝聚的凝胶中,主要是由于分子和金属之间的化学吸附和相互影响使体系的有效极化率增从而导致拉曼散射增强,研究表明化学增强因子为  $10 \sim 10^3$ ,具有短程特性<sup>[13]</sup>。

由图 3 可知, SARS-CoV-2 低浓度 ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L) S 蛋白在金纳米粒子中的 SERS 光谱与其常规(固态、饱和态)拉曼光谱主要的峰位置基本一致,但是峰的强度有明显变化,其中部分峰有一定频移,具体拉曼特征频率及指认见表 1<sup>[14-16]</sup>。

通过对比可以看出, SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白吸附在金纳米粒子中后,其分子中的羧基( $\text{COO}^-$ )和氨基( $\text{NH}_2$ )与纳米金粒子的相互作用最为明显。

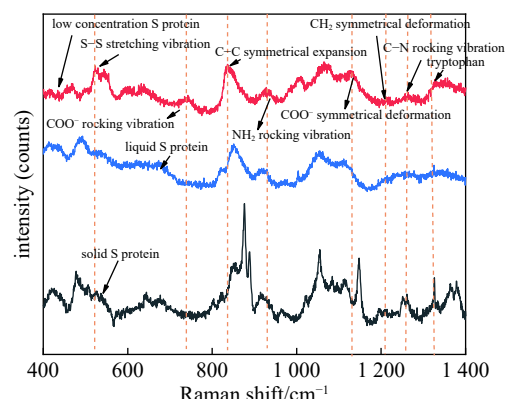


Fig. 3 Conventional Raman spectrum and SERS spectra of the S protein of SARS-CoV-2

图 3 SARS-CoV-2 S 蛋白的常规拉曼光谱和 SERS 光谱

表 1 SARS-CoV-2 的 S 蛋白的主要峰位 ( $\text{cm}^{-1}$ ) 与归属<sup>[14-16]</sup>

Table 1 Raman peaks ( $\text{cm}^{-1}$ ) and their assignment of the S protein of SARS-CoV-2<sup>[14-16]</sup>

peak of pure solid SARS-CoV-2/ $\text{cm}^{-1}$	peak of SARS-CoV-2 in saturated liquid state/ $\text{cm}^{-1}$	SERS of SARS-CoV-2/ $\text{cm}^{-1}$	assignment of the bands
537.7	524.7	523.3	S-S stretching vibration
679.1	/	742.6	$\text{COO}^-$ rocking vibration
851.6	850.7	836.2	$\text{NH}_2$ rocking vibration
915.3	917.1	927.6	C-C symmetrical expansion
1111.1	1111.4	1126.3	C-N rocking vibration
1250.9	/	1211.5	$\text{CH}_2$ symmetrical deformation
1326.4	1257.2	1263.5	$\text{COO}^-$ symmetrical stretching vibration
1362.7	1343.6	1357.3	tryptophan

$\text{COO}^-$  的振动增强最明显,并且  $\text{COO}^-$  的对称伸缩振动峰发生了频移,从  $1326.4 \text{ cm}^{-1}$  移动到了  $1263.5 \text{ cm}^{-1}$ ,  $679.1 \text{ cm}^{-1}$  的  $\text{COO}^-$  摇摆振动峰移动到了  $742.6 \text{ cm}^{-1}$ ,这说明 SARS-CoV-2 的 S 蛋白中带负电  $\text{COO}^-$  基团与金纳米粒子表面上吸附的柠檬酸根负离子产生竞争吸附<sup>[17]</sup>,使其 SERS 信号增强,并带动与其紧密相连的 C-C 基团振动也跟着增强,可见  $\text{COO}^-$  基团在金纳米粒子表面的增强属于电荷转移增强机制,形成分子金属键,具有短程的分子增强的特征<sup>[18]</sup>。

在  $851.6\text{ cm}^{-1}$  的  $\text{NH}_2$  摇摆振动峰移动到了  $836.2\text{ cm}^{-1}$ , 表明  $\text{NH}_2$  的振动得到了增强, 推测  $\text{NH}_2$  也是被吸附基团。由于立体阻碍的原因, SARS-CoV-2 的 S 蛋白分子中的  $\text{COO}^-$  和  $\text{NH}_2$  不可能同时与金纳米粒子发生短程的化学吸附<sup>[8]</sup>。 $\text{COO}^-$  中氧与金纳米粒子的结合能力比  $\text{NH}_2$  基中的氮强, 所以  $\text{NH}_2$  只是靠近金纳米粒子表面, 不与金纳米粒子起化学作用,  $\text{NH}_2$  振动频率的增强和移动是因为与金纳米粒子发生了长程的电磁场增强<sup>[9]</sup>。

### 3 结 论

本文将 SERS 技术运用于 SARS-CoV-2 的 S 蛋白定性检测, 对比了 SARS-CoV-2 固态、饱和液态 S 蛋白的普通拉曼光谱和在 40 nm 金纳米粒子基底上的 SERS 光谱。研究表明: 采用无标记 SERS 技术检测 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白是完全可行的。SARS-CoV-2 的 S 蛋白分子中的  $\text{COO}^-$  与金纳米粒子发生了分子增强,  $\text{NH}_2$  与金纳米粒子发生了电磁增强, 从而使得 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白拉曼效应得到了增强, 并使得峰位发生一定移动, 获得了较好的 SARS-CoV-2 低浓度 S 蛋白 SERS 光谱进一步拓宽了 SERS 技术的应用领域, 为建立一种敏感、特异、快速的 SARS-CoV-2 检测新技术提供一种新思路。

### 参考文献:

- [1] Ceraolo C, Giorgi F M. Genomic variance of the 2019 nCoV coronavirus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(5): 522-528.
- [2] 朱宁. 加强国际合作 携手抗击疫情[J]. 浙江经济期刊, 2020(4): 76. (Zhu Ning. Strengthen international cooperation to fight the epidemic[J]. *Zhejiang Economy*, 2020(4): 76)
- [3] Coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report-65[EB/OL]. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200325-sitrep-65-covid-19.pdf?sfvrsn=ce13061b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200325-sitrep-65-covid-19.pdf?sfvrsn=ce13061b_2).
- [4] He Yi, Yang Xia, Yuan Ruo, et al. Switchable target-responsive 3D DNA hydrogels as a signal amplification strategy combining with SERS technique for ultrasensitive detection of miRNA 155[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(16): 8538-8544.
- [5] 王越珉, 雷喜梅, 邱丽, 等. 新型冠状病毒及其检测方法研究进展[J]. 中国计量大学学报, 2020, 31(1): 1-7. (Wang Yuemin, Lei Ximei, Wu Li, et al. A review of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and its detecting methods[J]. *Journal of China University of Metrology*, 2020, 31(1): 1-7)
- [6] 李晓楠. 一种新型冠状病毒S蛋白和N蛋白联合检测胶体金试纸条及其制备方法和用途: 202010851052.5[P]. 2021-02-26.
- [7] Lipkowski J, Stolberg L, Yang Dongfang, et al. Molecular adsorption at metal electrodes[J]. *Electrochimica Acta*, 1994, 39(8/9): 1045-1056.
- [8] 柯惟中, 吴敏中. 氨基酸在银胶溶液中的表面增强拉曼效应[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(5): 551-553. (Ke Weizhong, Wu Jianzhong. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Amino acids on silver colloid[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(5): 551-553)
- [9] Panikkanvalappil SP, Mackey MA, El-Sayed MA. Probing the unique dehydration-induced structural modifications in cancer cell DNA using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(12): 4815-4821.
- [10] Li Xiaoxiao, Ye Sujuan, Luo Xiliang. Sensitive SERS detection of miRNA via enzyme-free DNA machine signal amplification[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(67): 10269-10272.
- [11] 周民杰. 一种基于增强拉曼光谱和神经网络的新型冠状病毒检测方法及其系统: 202110006417.9[P]. 2021-05-14. (Zhou Minjie. New method and system for SARS-CoV-2 detection based on enhanced Raman spectrum and neural network: 202110006417.9[P]. 2021-05-14.)
- [12] 黄景林, 周民杰, 乐玮, 等. 表面增强拉曼光谱技术检测新型冠状病毒刺突蛋白[J]. 强激光与粒子束, 2020, 32: 069001. (Huang Jinglin, Zhou Mingjie, Le Wei, et al. Detection of spike protein of SARS-CoV-2 by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *High Power Laser and Particle Beams*, 2020, 32: 069001)
- [13] 王晓辉, 徐涛涛, 黄轶群, 等. 表面增强拉曼光谱在食源性致病微生物检测中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(1): 123-129. (Wang Xiaohui, Xu Taotao, Huang Yiqun, et al. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy for foodborne pathogens detection[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(1): 123-129)
- [14] Doering W E, Nie Shuming. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(2): 311-317.
- [15] Stewart S, Fredericks P M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1999, 55(7/8): 1615-1640.
- [16] 胡国进, 余文玉. 生物分子的表面增强拉曼散射[J]. 江西教育学院学报(自然科学), 2002, 23(3): 18-22. (Hu Guojin, Yu Wenyu. On the surface enhancement L-M scatter of biological molecule[J]. *Journal of Jiangxi Institute of Education (Natural Sciences)*, 2002, 23(3): 18-22)
- [17] 张丹. 氨基酸的表面增强拉曼光谱研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2006: 52-54 (Zhang Dan. The study of amino acid by surface-enhanced Raman scattering[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2006: 52-54)
- [18] 潘家来. 激光拉曼光谱在有机化学上的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1986 (Pan Jialai. Application of laser Raman spectroscopy in organic chemistry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1986)
- [19] 朱自莹, 顾仁熬, 陆天虹. 拉曼光谱在化学中的应用[M]. 沈阳: 东北大学出版社, 1998 (Zhu Ziying, Gu Ren'ao, Lu Tianhong. The application of Raman spectroscopy in chemistry[M]. Shenyang: Northeastern University Press, 1998)