

基于 SERS 微针尖的定位拉曼生物检测模块研制与应用

陈颖, 梅荣超, 赵喜珍, 王运庆

(中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 本研究开发了拉曼光谱仪与纳米针尖穿刺系统耦合的新型模块。它主要由激光共聚焦拉曼光谱仪 (DXR Raman Microscope)、微注射三维操控平台及新型表面增强拉曼散射 (SERS) 微针尖组成。作为应用型举例, 该新型耦合模块不仅可用于单个肝细胞 (HL-7702) 质内的 pH 值的检测及缺氧状态的监测, 还可应用于活体生物 pH 与缺氧监测。本研究开发的新型拉曼检测模块扩增了商业拉曼光谱仪的应用范围, 解决了传统 SERS 探针用于细胞分析的随机聚集与特定区域定位难问题, 在单细胞及活体的 SERS 检测分析中展现了巨大的应用潜力。

关键词: 表面增强拉曼散射 (SERS); 微针尖; pH 检测; 缺氧监测

Development and application of positioning Raman biodetection module based on SERS micro tips

Chen Ying, Mei Rongchao, Zhao Xizhen, Wang Yunqing

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: In this study, a new module for the coupling of Raman spectrometer and nanotip puncture system was developed. It is mainly composed of laser confocal Raman spectrometer, microinjection three-dimensional control platform and novel surface enhanced Raman scattering (SERS) micro tips. As an example of application, the new coupling module can be used not only to detect the pH value and monitor the hypoxia state of single hepatocyte (HL-7702), but also to monitor the pH and hypoxia of living organisms. The new module developed in this study amplified the application scope of the commercial Raman spectrometer, solved the problems of random aggregation and localization in specific areas of the traditional SERS probes used for cell analysis, and showed great application potential in SERS detection and analysis of single cells and living organisms.

Keywords: Surface enhanced Raman scattering (SERS); micro tip; pH detection; Oxygen monitoring

1 前言

DXR Raman Microscope 在材料研发、生命分析化学、环境科学等科研领域得到了广泛的应用^[1-3]。该款仪器光路和软件技术成熟，其激光共聚焦光路可以将激发光斑限定在 2 μm 左右的微区，测试空间分辨率较高。通过移动载物平台，可实现特点定平面区域的光谱扫描，并且在拉曼光谱采集过程中自动扣除荧光背景，自动全波长校标，保证了光谱的精确度与重复性。尽管该仪器已经得到了广泛应用，但使用过程中，特别是在基于 SERS 探针标记微区样品应用中，依旧存在一些应用瓶颈和缺陷，限制了仪器的测试应用范围。包括：（1）SERS 探针和待测生物样品共孵育后，探针在样品中随机分布，而获取信号决定于探针位置，因此难以获取特定微区的光谱信息。（2）纳米粒子团聚-分散状态不稳定，SERS 信号显著取决于颗粒分散状态，探测信号强度的准确度不能保证。（3）测试对象种类受到局限，对于无法吞噬探针粒子的生物样品，无法开展测试应用。针对该仪器存在的上述应用缺陷问题，发展与 DXR Raman Microscope 联用的 SERS 纳米探针可控递送技术和配套装置，解决“定点微区”拉曼信号高灵敏检测问题，是拓展该仪器应用范围的关键。

本研究发展了基于微针尖 SERS 基底的生物原位拉曼检测系统，该系统将微注射操作技术与激光共聚焦拉曼光谱仪相结合，实现了基于 SERS 微针尖的定点检测模式。仪器开发后，不仅保留了原有的优势，还解决了现阶段该仪器使用过程中的上述缺陷问题，扩增了激光共聚焦拉曼光谱仪的应用范围，并为后续的科研工作提供重要技术支撑。

2 模块研制总体方案设计

基于 SERS 微针尖的定位拉曼生物检测模块由微针尖 SERS 基底、微针尖三维操控平台和光谱测试仪器三部分组成，其总体流程设计图如图 1 所示。其中微针尖 SERS 基底由 SERS 探针与微针尖构成，可防止纳米粒子在生物体内的团聚，保证探测信号强度的准确度；三维操控平台确保纳米探针在生物体微区内的精确可控；通过研制不同针尖大小的 SERS 微针尖可实现对测试分辨率的提升及测试对象种类的扩增；光谱测试仪器可实现材料的特征性光谱表征。

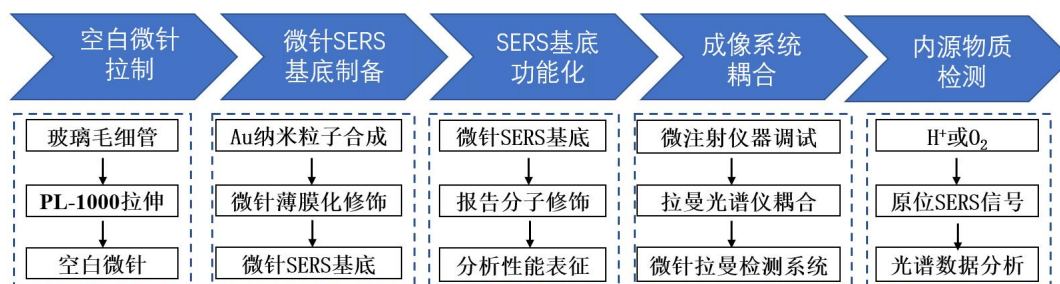


图1 新型拉曼生物检测模块总体方案图

Fig.1 Overall scheme diagram of the new Raman biodetection module

2.1 空白微针尖的制备

SERS 技术提供的高检测灵敏度为生命体系拉曼光谱探测奠定了基础^[4], 但贵金属增强基底标记生物样本的方式 (细胞内吞, 活体动物静脉注射) 没有定位的能力^[5]。开发微针和控制系统, 耦合在商品化拉曼光谱仪形成集成系统, 可以实现精确定位和微针检测模式。普通的玻璃毛细管通过拉伸技术可以得到尖端直径在纳米级至微米级的微针尖, 分别应用于细胞尺度及活体的分析。通过拉针仪 (图 2A) 对长度为 10 cm 高硼酸玻璃毛细管进行拉伸, 仪器预热 15 min 后, 将玻璃毛细管放置于卡槽上固定, 测试熔点, 设置加热温度大于熔点。设置不同的参数可得到不同大小的针尖, 每根 10 cm 高硼酸玻璃毛细管可拉伸成两根针尖。微针尖的大小决定了定位检测的空间分辨率, 需通过考察拉针仪不同参数 (Heat, Pull, Vel, Time, Pressure, Ramp), 拉制了两种尖端直径的微针。一种是纳米级 (图 2B), 直径约为 200 nm, 适用于细胞水平的微损伤监测, 拉制具体参数为: Heat 600, Pull 100, Vel 50, Time 250, Pressure 250; 另一种是适用于活体生物检测的微米级大小针尖 (图 2C), 其直径约为 2 μm, 有足够的强度满足组织穿刺要求, 具体控制参数为: Heat 580, Pull 50, Vel 20, Time 250, Pressure 100。

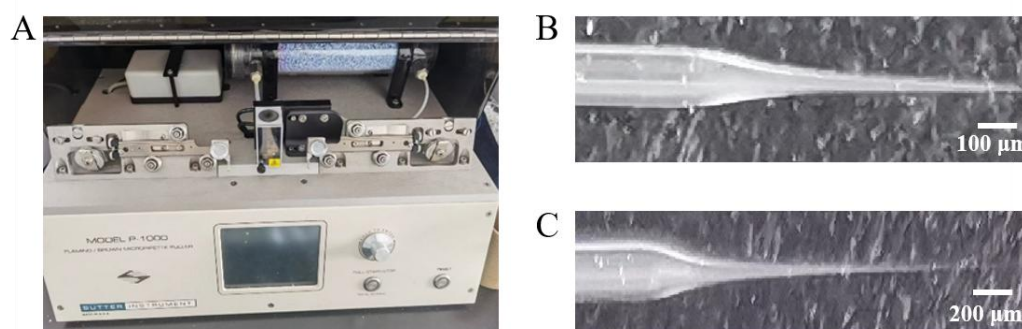


图2 拉针仪图片 (A) 与微米级 (B) 及纳米级 (C) 空白针尖的显微图片

Fig. 2 Picture of needle puller (A) and micrograph of blank tip of micron (B) and nanometer (C)

2.2 微针尖 SERS 纳米粒子的制备

贵金属纳米粒子可以通过静电吸附等作用力结合在玻璃微针尖表面, 形成具有 SERS 活性的增强基底^[9]。针对不同的内源物质检测对象, 选择对应的功能化报告分子, 通过 Au-S 键结合在纳米粒子表面, 报告分子和检测物质发生化学反应, 引起拉曼特征峰形变化, 从而实现定量检测。核-卫星 Au 纳米粒子信号强度较传统 Au 纳米粒子显著提高^[7], 该基底兼具样本穿刺和拉曼信号增强的作用, 通过精确调控针尖在生物样品中定位, 在细胞、组织和活体层次上实现关键内源活性物质的高灵敏、高空间分辨率和原位检测。

2.3 SERS 微针尖的制备

SERS 微针尖由空白玻璃毛细管针尖及具有 SERS 增强能力的纳米粒子组成^[8], 将 SERS 探针技术与微针尖技术结合, 实现了原位定位监测。微针尖端曲率大, 表面积小, 可装载的 SERS 探针颗粒很少, 这造成了检测时, 尖端灵敏度极低问题。因此, 提高单位颗粒的信号增强能力至关重要。两亲性聚合物 PS-b-P4VP 修饰玻璃毛细管针尖形成薄膜^[9], P4VP 薄膜在酸性 (pH4.74) 纳米粒子溶液中质子化, 表面带正电荷, 与核-卫星 Au 纳米粒子表面的柠檬酸配体发生静电相互作用, 将其吸附到针尖表面。PS 嵌段结构具有的疏水性, 有助于防止微粒子聚集, 提高微针尖处装载微粒子的均匀性。利用 PS-b-P4VP 将核-卫星 Au 纳米粒子吸附于空白微针尖上, 即可获得装载有核-卫星 Au 纳米粒子的 SERS 微针尖。

2.4 基底功能化

开展 SERS 微针尖用于生物细胞或活体组织中活性物质 (H⁺、O₂) 的拉曼检测, 其基本原理是 SERS 微针尖表面装载上对 H⁺、O₂ 敏感的报告分子, 根据 SERS 信号反应前后的变化, 可实现 H⁺、O₂ 检测。所以选择合适的报告分子对于 H⁺、O₂ 检测至关重要。一般要求报告分子既能与 SERS 微针尖结合力强, 也需要对待测物高灵敏。4-巯基苯甲酸 (MBA) 及 4-硝基苯硫酚 (NT) 这两种报告分子都可以通过 Au-S 键强烈地结合在 SERS 微针尖上。MBA 在碱性下, -COOH 质子化, vs (COO⁻) 位置处拉曼峰信号随 pH 增高而增强^[10]; NT 在缺氧下, -NO₂ 被还原为偶氮苯, 形成 4,4'-二巯基偶氮苯 (DMAB), 分别在 1170 cm⁻¹、1380 cm⁻¹ 和 1420 cm⁻¹ 左右处出现新的峰位^[11]。因此, 选择 MBA 及 NT 监测生物体内 pH 及氧气变化, 将 SERS 纳米针尖浸入浓度为 5×10⁻³ mol/L 的 MBA 及 NT 乙醇溶液中 3 h, 用超纯水清洗并干燥后即得到功能化的 SERS 微针尖。

2.5 微针尖三维操控平台的构建

商品化的 DXR Raman Microscope 如图 3 A 所示, 仪器只能在关闭样品仓盖的条件下检测样品, 这将不便于 SERS 纳米针尖的原位操作与检测。耦合后的新型纳米针尖检测模块如

图 3B 所示, 拆除了样品仓盖, 并改变了相关插件的连接方式, 从而新增了可敞盖检测模式。调整好微注射三维操控平台的位置, 使 SERS 纳米针尖可通过拉曼光谱仪载物台的检测区域后, 用固定夹固定该平台。通过调节微注射三维操控平台的 X、Y、Z 三个方向, 可实现对 SERS 纳米针尖的精密操作。在实际的单细胞穿刺与检测中, 可先在 10 倍显微镜镜下调节清晰后, 将纳米针尖沿平台 z 轴降落到目标细胞, 调节纳米针尖与细胞同一界面, 随后缓慢的穿刺于细胞中。最后调节激光光斑与纳米针尖重合, 在 40 倍显微镜镜下进行原位 SERS 光谱检测。

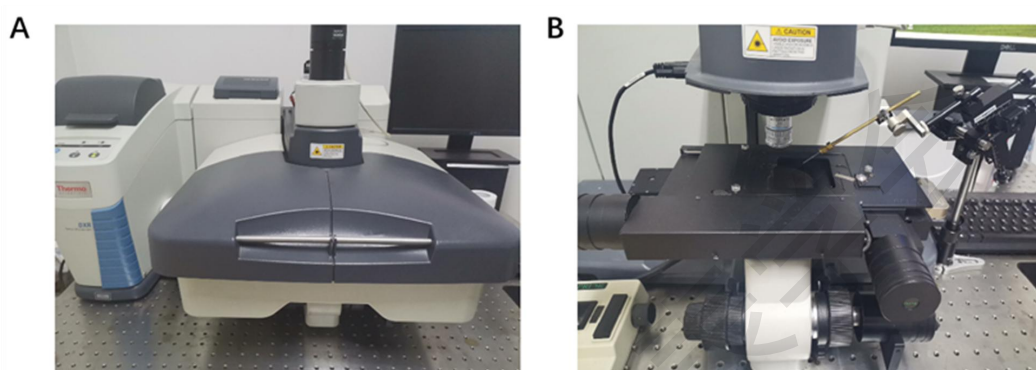


图 3 (A) 商品化的 DXR Raman Microscope; (B) 新型纳米针尖拉曼检测模块

Fig.3 (A) Commercial DXR Raman Microscope; (B) New nano-tip Raman detection module

3 新型拉曼检测模块的应用

3.1 细胞内源物监测

利用新型拉曼生物检测模块, 可精密操控 SERS 纳米针尖直接穿刺单细胞到达细胞质中不同位置或不同的细胞器, 实现纳米粒子在细胞内的精确定位。纳米级的针尖大小不仅保证了穿刺过程中对细胞的无损性, 还可以提高检测的空间分辨率。本研究分别以单细胞的 pH 值的检测与缺氧状态的监测为例, 来展示开发的新型耦合系统在单细胞分析中的应用。选择正常肝细胞 HL-7702 为模型, 利用三维注射系统调节功能化的 SERS 纳米针尖进入细胞内, 结合拉曼光谱仪进行原位监测。图 4 A 为 SERS 纳米针尖穿刺于单细胞质后的明场图像, 可见穿刺后细胞仍保持良好状态, 表明该新型耦合系统可用于单细胞的无损定位穿刺研究。图 4C 为 MBA 修饰的 SERS 纳米针尖穿刺入细胞质后的原位 SERS 光谱, 其在 1400 cm^{-1} 左右处出现了明显的 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 信号峰, 由体外实验得到的标准曲线 (4B) 可计算实验的 HL-7702 细胞质的 pH 为 7.78, 该结果与已报道的细胞质 pH 值相近^[12], 表明该新型耦合系统可用于单细胞 pH 的检测。图 4D 为 NT 修饰的 SERS 纳米针尖穿刺正常氧浓度条件下及缺氧 12 h 后的 HL-7702 细胞原位检测得到的 SERS 谱图, 可明显观察到缺氧培养后, 分别

在 1170 cm^{-1} 及 1380 cm^{-1} 处出现了新特征峰，表明该新型耦合系统可用于单细胞缺氧状态的监测。

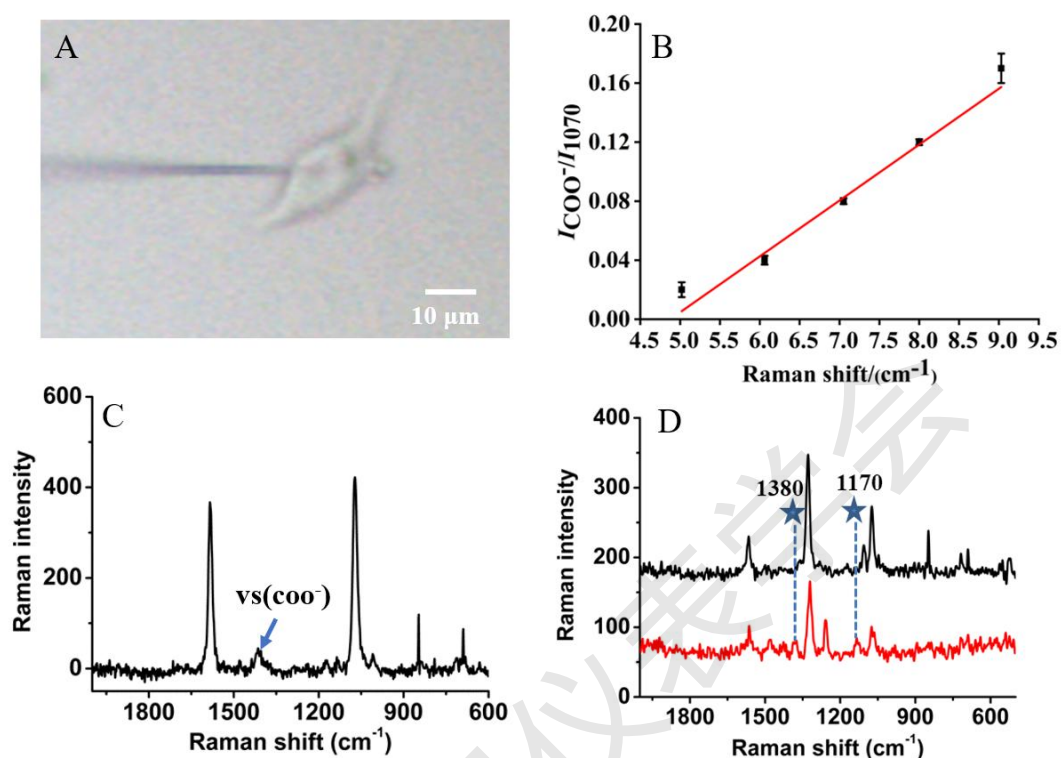


图 4 (A) SERS 纳米针尖穿刺于单细胞质的明场图像；(B) SERS 纳米针尖在体外对于不同 pH 值的响应 SERS 光谱相对应的标准曲线图；(C) SERS 纳米针尖定位于 HL-7702 细胞质后 pH 值响应的 SERS 光谱图；(D) SERS 纳米针尖定位于正常条件与缺氧 12 h 后 HL-7702 细胞质后 SERS 光谱图

Fig.4(A) Bright field image of SERS nanotips punctured in single cells; (B) Standard curves of SERS nanotips corresponding to SERS spectra in response to different pH values in vitro; (C) SERS spectra of pH response after SERS nanotips were positioned in HL-7702 cytoplasm; (D) SERS spectra of SERS nanotips positioned in normal conditions and HL-7702 cytoplasm after 12h of hypoxia

3.2 活体生物 pH 与缺氧监测

分别选择了斑马鱼和黄粉虫为水生和陆地模式生物，验证活体原位无损定位检测的可行性。利用 NT 及 MBA 功能化的 SERS 微针尖分别检测了离水后斑马鱼鳃处 O_2 变化情况（图 5A），以及黄粉虫肠道不同位置处 pH 值分布情况（图 5C）。结果发现斑马鱼离开水环境后，直至死亡的过程间，鱼鳃处未显示明显的缺氧状态（图 5B）。黄粉虫肠道不同位置处 pH 值呈现明显差异，如图 5D 所示，前肠呈酸性（ $\text{pH} < 5$ ），中肠呈碱性（ $\text{pH} > 9$ ）。表明 SERS 微针尖可用于活体生物的检测，为后续的活体生物生理、毒理研究提供了基础信息。

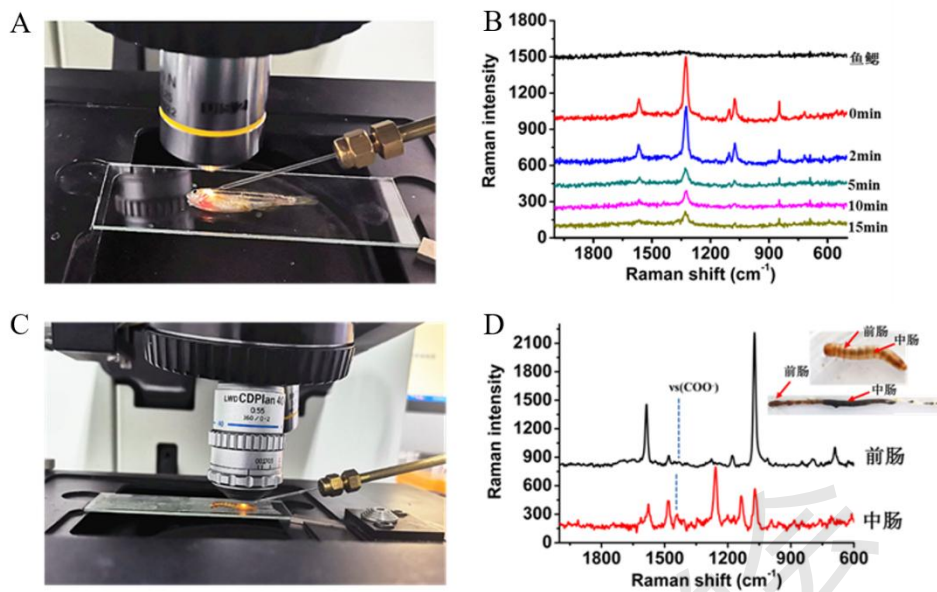


图5 SERS微针尖分别用于斑马鱼(A)与黄粉虫(C)检测的图片;(B)SERS微针尖用于斑马鱼鳃处O₂检测的实时SERS光谱图;(D)SERS微针尖用于黄粉虫肠道处不同位置pH检测的SERS光谱图

Fig. 5 Pictures of SERS micro tips used for zebrafish (A) and yellow mealworm (C) detection respectively; (B) Real-time SERS spectra of SERS micro tips for O₂ detection at zebrafish gills; (D) SERS spectra of SERS micro tips used for pH detection at different positions in the intestine of yellow mealworms

4 小结

本研究开发了一种新型SERS微针尖拉曼生物检测模块, 扩增了商业的DXR-Raman Microscope的定位、穿刺与检测的一体化功能。以核-卫星Au纳米粒子为增强基底构建的新型SERS微针尖显著提高了分析灵敏度, MBA和NT报告分子功能化后赋予SERS纳米针尖对pH和O₂的检测能力。将微针尖组装在微注射系统的三维操控平台, 实现了针尖在生物体内的精确定位, 进一步开展单个HL-7702肝细胞内及活体pH和缺氧状态监测研究。该拉曼生物检测模块的研制克服了纳米颗粒SERS探针用于生物分析面临的粒子聚集、难以精确定位等问题, 在单细胞及活体组织原位传感分析中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] TRENEUSZ S, MAGDALENA W-K, PIOTR D, MACIEJ S, RYSZARD K. Analytica Chimica Acta, 2013, 787(17): 260-266.
- [2] ELMOBARAK W F, ALMOMANI F, MOHAMMED A H, SAAD S. GREENH GASES. 2020, 10(4): 759-770.

- [3] PANG S, LABUZA T P, HE L L. *Analyst*, 139(8):1895-1901.
- [4] ZONG C, XU M, XU L J, WEI T, MA X, ZHENG X S, HU R, REN B. *Chem. Rev.*, 2018, 118(10): 4946-4980.
- [5] LUO X H, CHEN J Y, MARZIEH A, ABRAHAM L. *Biosensors*. 2022, 12(2): 58.
- [6] ZHAO X J, CAMPBELL S, EI-KHOURY P Z, JIA Y C, WALLACE G Q, CLAING A, BAZUIN C G, MASSON J F. *ACS Sens.*, 2021, 6(4): 1649-1662.
- [7] MEI R C, WANG Y Q, YU Q, YIN Y C, ZHAO R F, CHEN L X. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(2): 2059-2066.
- [8] GUO J, HE J. *Biophys. J.*, 2019, 116(3): 146A-146A.
- [9] ZHU H, MASSON J F, BAZUIN C G. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2020, 3(1): 516-529.
- [10] ZHAO X J, CAMPBELL S, WALLACE G Q, CLAING A, BAZUIN C G, MASSON J F. *ACS Sens.*, 2020, 5(7): 2155-2167.
- [11] HUANG Y F, ZHU H P, LIU G K, WU D Y, REN B, TIAN Z Q. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(27): 9244-9246.
- [12] ZHOU J, FANG C L, CHANG T J, LIU X J, SHANGGUAN D. *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1(5): 661-667.