

共焦拉曼光谱仪的白光成像 在生物分子拉曼测试中的应用

杨海峰,曹晓卫,王桂华,章宗穰

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 在研究生物活性分子的表面增强拉曼光谱过程中,利用该拉曼系统的白光成像功能,原位获得银电极表面图像,对电极处理方法进行评估,从而获得理想的实验条件,使生物分子的拉曼光谱质量大大改善.

关键词: 白光成像;生物分子;原位;拉曼

中图分类号: O646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2003)02-0041-05

共焦显微拉曼光谱技术有很好的空间分辨率,从而可以获得界面过程中物种分子变化情况、相应的物种分布、物种分子在界面不同区域的吸附取向、确定膜应力分布等等.本实验室的部分工作,是应用共焦显微拉曼原位测试技术,研究生物活性分子(SOD, NAD, ADO等)在电极表面的氧化还原过程或吸附行为.在工作中发现,共焦显微拉曼光谱仪的白光成像系统,在拉曼光谱测试时,无论是对采样区域的定位、还是界面条件的初步认识,都起到了重要的辅助作用.虽然通过STM测定能原位给出明确的电极表面形貌,但有设备和联用技术上的要求.而白光显微成像已具有较高的分辨率(取决于物镜的倍率),一般能够在微米数量级上获得图像,加之与激光拉曼系统的光学部分构成共轭,所以对界面的观察和选择就更为直接、方便,能满足实验的要求.本文将图示共焦显微拉曼系统的基本构造,并举例介绍白光成像系统在生物分子拉曼测试中的应用.

1 实验部分

法国 Dilor 公司 Super LabRam 共焦显微拉曼光谱系统; Olympus 显微镜, Olympus 50 倍长焦距物镜, 陷波滤光片, 液氮冷型 CCD 探测器(800 × 2000), 633nm 氦-氖激光器.

金网栅电极(750 线/英寸, 2 ~ 3 μm/线).

银盘电极用粗砂纸及 5# 金相砂纸打磨,然后再用研细的 Al₂O₃ 在麂皮上将银电极抛成镜面,用二次蒸馏水超声清洗干净,此时可得到零价态的银表面.将处理后的银电极在新鲜配制的 H₂O₂ 和浓 HNO₃ (3: 7) 溶液中浸渍若干秒后,用二次蒸馏水冲洗及超声清洗,备用.马心细胞色素 C (Type III、VI, 美国 SIGMA 公司), 4,4'-二硫基联吡啶(日本 Nacalai Tesque 株式会社), 26mer DNA(上海生工生物工程有限

收稿日期: 2002-10-10

基金项目: 上海市科技发展基金启明星资助项目(00QA14017), 上海市教委高校青年基金(98QN77), 上海市教委重点项目经费(S970403)

作者简介: 杨海峰(1968-), 男, 硕士, 上海师范大学生命与环境科学学院副研究员.

公司)

2 结果与讨论

2.1 共焦显微拉曼仪器构造和原理

1957 年就提出了共焦技术的概念,直到 70 年代随着激光技术的发展,才被应用于拉曼光谱仪. 本实验室的拉曼光谱仪,是法国 Dilor 公司的 Super LabRAM 共焦分析系统,该系统具有精确的三维定位功能,高空间分辨率和纵深对比度,即所谓的共焦激光拉曼光谱仪的优势是所谓的“光学切片”(optical sectioning)功能,与常规拉曼光谱技术相比,在电化学体系的电极表面行为(吸附、电极反应等)和电极溶液界面层(双电层等)诸方面研究中,可获得更为“真实”的分子水平的信息.

在光谱本质上,共焦的与普通的激光拉曼光谱仪并无差别,只是在光路中引进了共焦显微镜. 共焦技术是指把分析样品置于点光源通过显微镜透镜后形成的聚焦点(为一轮廓鲜明的衍射受限光斑)上,激光点激发出的散射光由该透镜收集,成像于像平面上,像平面上放置一针孔光阑,针孔光阑与物平面上的激光焦点构成光学共轭,从而消除来自样品离焦区域(out - of - focus - regions)的杂散光,形成空间滤波,保证了探测器到达的散射光是激光采样焦点薄层(1.9 μ 纵深)微区内的信号,横向分辨率能接近经典分辨率理想值的 0.7 倍. 白光系统与激光共享同一采样光路,需成像时,通过切入分束器,用数码相机获得图像. 其构造示意图图 1.

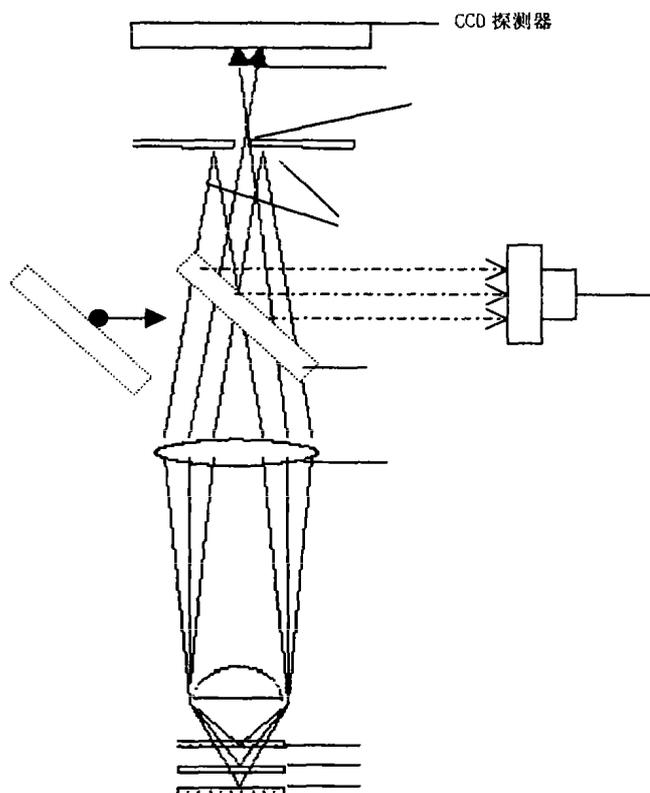


图 1 共焦拉曼原理示意图

2.2 金网栅电极上的细胞色素 C 的拉曼光谱

本研究室曾用吸光光度法,研究了金网栅电极上的细胞色素 C,在 4,4'-二硫基联吡啶(PySSPy)存

在下的电子迁移过程.然而,吸光光度法的局限性,决定了信号不完全来自电极表面.而共焦拉曼光谱可以直接聚焦于金网线上,获得分子的信息.但由于网栅的金线直径只有 $2 \sim 3 \mu\text{m}$,因此,白光成像功能就显得尤为重要.先在显微镜下,获得金网栅电极的图像,然后分别在 A 点(网线间孔穴)和 B 点(网线上)聚焦采谱,实验时,金网栅置于 PySSPy 和细胞色素 C 的溶液中.从图 2 中可知,网线上吸附的 PySSPy 和细胞色素 C 的拉曼信号,因金线的 SERS 效应而增强,光谱特征明显.网间溶液的拉曼谱几乎观察不到 PySSPy 和细胞色素 C 的特征振动.成像有助于共焦激光拉曼的横向定位能力,适合微区、微电极的光谱分析.

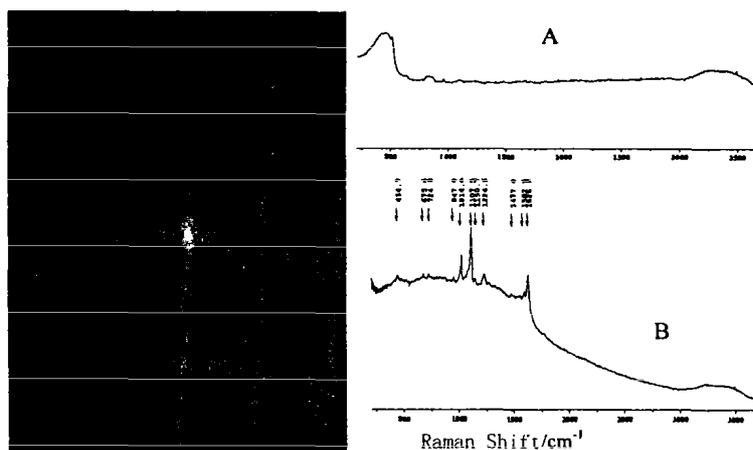


图 2 PySSPy 和细胞色素 C 混合溶液中金网栅电极的显微成像及 A 点和 B 点的拉曼光谱

2.3 DNA 在银电极上的拉曼光谱

DNA 是生物大分子,在拉曼测试时,有较大的荧光背景,为了消除干扰,常将 DNA 修饰在金、银等材质的表面,且这些表面已预先经过表面增强(SERS)处理,以获得高质量的拉曼光谱.为了原位研究 DNA 在银电极表面与稀土离子反应的拉曼光谱,采用 H_2O_2 和浓 HNO_3 (3: 7) 溶液处理银电极,实验结果表明这样的 SERS 表面处理虽操作简单易行,但由于在酸浸时间控制上的问题,表面重现性相对要差一些.在实验过程中发现,利用拉曼系统白光成像功能,辅以计算机图像处理技术,先对处理后的银电极表面进行选择,然后再原位采集反应过程的拉曼光谱,可以获得理想的谱图.

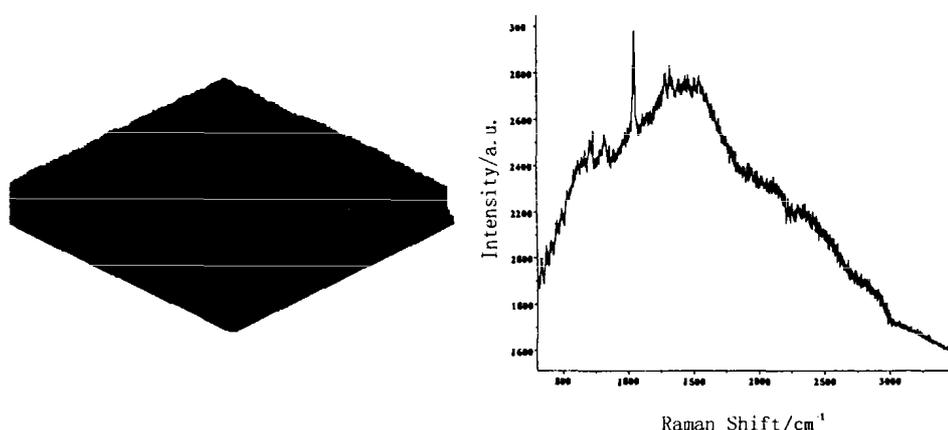


图 3 酸处理 10s 后 Ag 电极表面图像及吸附于该表面上的 DNA 拉曼光谱

从图3的银电极表面的形貌可知,电极在 H_2O_2 和浓 HNO_3 溶液中,由于处理时间比较短(10s),还未形成预期的“银岛”.吸附DNA后,采得的拉曼光谱,虽然能观察到表征碱基中腺嘌呤环呼吸振动峰(728cm^{-1})和磷酸脂键的伸缩振动峰(816cm^{-1} , 1041cm^{-1}),但有很强的荧光背景,无法获得 1200cm^{-1} 以上的光谱信息.

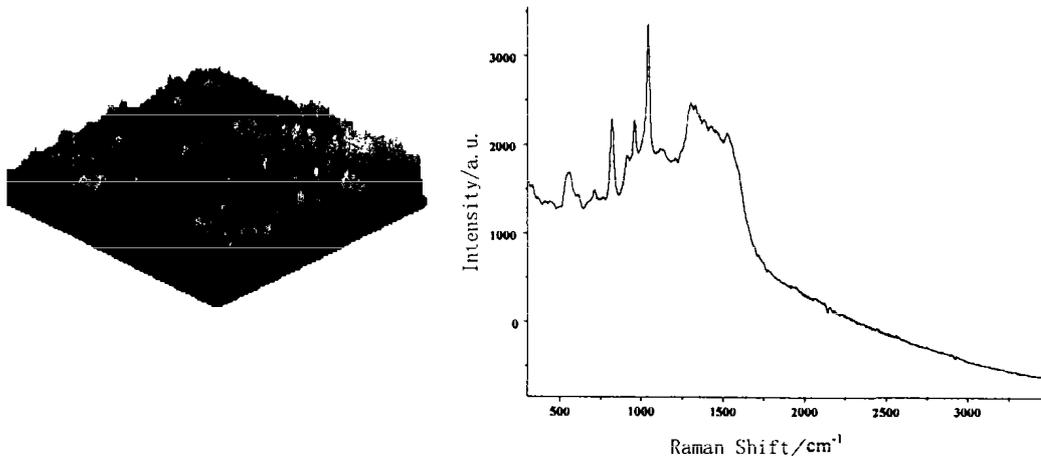


图4 酸处理15s后Ag电极表面图像及吸附于该表面上的DNA拉曼光谱

在酸中处理15s后,银电极表面形成了明显的“银岛”(图4),相应的DNA拉曼散射强度得到增强,荧光背景干扰也有所改善.除了腺嘌呤环呼吸振动峰(725cm^{-1})和磷酸脂键的伸缩振动峰(817cm^{-1} , 1041cm^{-1})外, $600\sim 700\text{cm}^{-1}$ 附近与鸟嘌呤振动有关的拉曼峰也可以被观察到.而 $1200\sim 1550\text{cm}^{-1}$ 范围内的拉曼峰,大多是来自腺嘌呤、胸腺嘧啶和鸟嘌呤振动的共同贡献.该银电极的粗糙处理方法(15s),虽然获得了有拉曼散射增强的表面,但从成像图和拉曼光谱图(图4)上不难看出,形成的“银岛”不够均匀有序;光谱上的荧光背景对 1200cm^{-1} 以上的拉曼峰,仍有一定程度的影响.于是尝试了第三种方法,即在 H_2O_2 和浓 HNO_3 溶液中,先将银电极处理10s后,取出吸干,再次浸入处理5s,然后取出用二次蒸馏水洗净,吸干.吸附DNA溶液后,采集拉曼光谱,发现基本抑制了荧光干扰,谱图质量大大改善.原位的成像图(图5)显示,银电极表面的“银岛岛形”均匀、排列有序度提高.

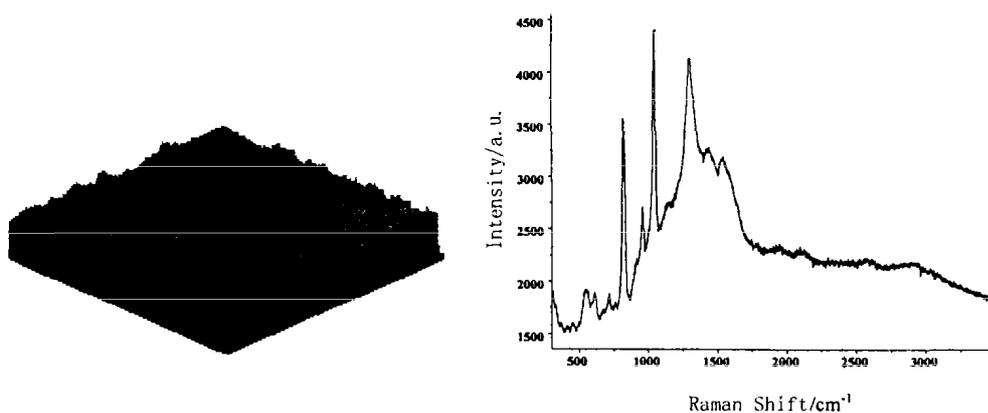


图5 酸处理10s+5s的Ag电极表面图像及吸附于该表面上的DNA拉曼光谱

参考文献:

- [1] KOGLIN E, SEQUARIS J M, VALENTA J P. Surface Enhance Raman Scattering of Nucleic Acids Bases Adsorbed on Ag Electrode[J]. J Mol Struct, 1980,79:185-189.
- [2] 熊 健,盛蓉生. 核酸碱基的表面增强拉曼光谱研究[J]. 光谱学和光谱分析,1989,2(1):59-64.
- [3] 方 晔,钟发平. 双螺旋 DNA 在银和金电极上的现场傅立叶拉曼光谱[J]. 物理化学学报 1995,11(9):854-859.
- [4] 龙耀庭,莫育俊. DNA 碱基在银镜上的表面增强拉曼散射[J]. 光谱学和光谱分析,1992,12(5):25-30.
- [5] 龙耀庭,周立繁. DNA 表面增强傅立叶拉曼光谱研究[J]. 光谱学和光谱分析,1996,16(3):60-64.
- [6] 柯准中,余多慰,陈婉容,缪丽萍. 热处理和紫外辐射对 DNA 影响的拉曼光谱研究[J]. 光学学报,1997,17(2):1681-1686.
- [7] 朱自莹,顾仁教,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.
- [8] 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.
- [9] 杨海峰. 激光共焦拉曼光谱电化学技术及其在生物分子研究中的应用[D]. 硕士论文,2002.
- [10] ALIX A J P, BERNARD L, MANFAIT M. Spectroscopy of biological molecules[M]. John Wiley & Sons, 1985.

White Light Imaging of Confocal Raman System Application in Raman Test of Biomolecules

YANG Hai-feng, CAO Xiao-wei, WANG Gui-hua, ZHANG Zong-rang

(College of Environment and Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: White light imaging of confocal Raman system was employed in SERS studied of biomolecules. Through observing the in-situ images of surfaces of silver electrodes, the different ways of treatment electrode to obtain a well surface were evaluated, which can improve the quality of Raman spectra of biomolecules.

Key words: white light imaging; biomolecule; in-situ; Raman