

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.08.07

· 临床检验技术研究 ·

万古霉素修饰玻片用于金黄色葡萄球菌的表面增强拉曼光谱检测*

邵秋园^{1,2}, 屈晓君¹, 赵艳丰¹, 柏婷婷¹, 郭志睿¹, 朱叶飞¹(1. 南京医科大学第二附属医院检验医学中心, 南京 210011; 2. 南京市溧水区人民医院检验科, 南京 211200)

摘要:目的 建立基于表面增强拉曼光谱(SERS)技术的金黄色葡萄球菌检测方法。方法 在碳二亚胺催化下, 氨基化玻片与万古霉素形成共价结合, 用紫外分光光度计测量玻片偶联万古霉素含量。利用万古霉素修饰玻片捕获并固定金黄色葡萄球菌, 在银纳米颗粒增强下, 用激光显微拉曼光谱仪检测其 SERS 光谱。结果 傅里叶红外光谱仪检测修饰玻片在 1 538 cm⁻¹ 处具有红外特征峰, 紫外分光光度法测定修饰玻片万古霉素含量达 0.02 mg/cm²。在激光显微拉曼光谱仪 633 nm 激光下, 检测出金黄色葡萄球菌在 724 cm⁻¹、780 cm⁻¹、1 001 cm⁻¹、1 050 cm⁻¹、1 100 cm⁻¹、1 240 cm⁻¹ 具有 SERS 特征峰。结论 万古霉素修饰玻片成功捕获金黄色葡萄球菌并检测出其 SERS 光谱, 为直接从人体体液中捕获、鉴定金黄色葡萄球菌提供基础依据。

关键词: 万古霉素; 金黄色葡萄球菌; 表面增强拉曼光谱

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

Surface-enhanced Raman spectroscopy detection of *Staphylococcus aureus* based on vancomycin-modified slide

TAI Qiuyuan^{1,2}, QU Xiaojun¹, ZHAO Yanfeng¹, BAI Tingting¹, GUO Zhirui¹, ZHU Yefei¹(1. Clinical Laboratory Medicine Center, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu; 2. Department of Laboratory Medicine, Lishui District People's Hospital of Nanjing City, Nanjing 211200, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To develop a method for *Staphylococcus aureus* detection based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Methods** By the catalysis of carbodiimide, vancomycin formed covalent binding with the aminated slide. The content of vancomycin coupled to the slide were measured by UV spectrophotometer. Using vancomycin-modified slide to capture and fix *Staphylococcus aureus*, the SERS spectrum of *Staphylococcus aureus* was detected by laser micro Raman spectrometer with the enhancement of silver nanoparticles. **Results** The characteristic infrared peak was detected by Fourier transform spectroscopy at 1 538 cm⁻¹. The content of vancomycin in the modified slide reached to 0.02 mg/cm² by UV spectrophotometer. Under laser of 633 nm SERS characteristic peaks of *S. aureus* was detectable at 724 cm⁻¹, 780 cm⁻¹, 1 001 cm⁻¹, 1 050 cm⁻¹, 1 100 cm⁻¹ and 1 240 cm⁻¹ by Raman micro-spectrometer. **Conclusion** The vancomycin-modified slide may be used to capture *Staphylococcus aureus* successfully and measured its SERS spectrum. The developed method in this study should provide a basis for direct capture and identification of *Staphylococcus aureus* in human body fluids.

Key words: vancomycin; *Staphylococcus aureus*; surface-enhanced Raman spectroscopy

拉曼光谱技术是一种光散射技术, 因其具有快速、实时、无损伤、易于操作、受水分干扰小等优势, 在临床微生物检测领域具有很大的应用潜力^[1]。表面增强拉曼光谱(surface-enhanced raman spectroscopy, SERS)利用拉曼光谱技术与纳米技术结合, 能增强其光谱强度达 10³ ~ 10⁶ 倍^[2], 克服了拉曼光谱信号微弱的不足^[3]。上世纪末, Efrima 等^[4]首次描述了大肠埃希菌的 SERS 光谱, 开启了利用 SERS 技术进行微生物检测的探索。

为提高从复杂环境中检出细菌的能力, 很多学者采用拉曼光谱报告分子和抗体、噬菌体等识别分

子修饰金属纳米结构表面, 但这些识别分子的成本高, 稳定性较差, 制备方法困难^[5]。万古霉素作为糖肽类抗菌药物, 其羧基与细菌细胞壁成分胞壁酰五肽末端 D-Ala-D-Ala 形成氢键复合物, 从而抑制细菌细胞壁合成。因其具有稳定性好、成本低、质量可控等优点, 万古霉素修饰的 SERS 底物可用于细菌捕获和检测^[6]。

有学者利用万古霉素修饰介孔二氧化硅纳米颗粒选择性识别革兰阳性细菌^[7]或者万古霉素修饰银磁性纳米颗粒快速检测金黄色葡萄球菌的 SERS 光谱^[6], 而本研究利用万古霉素捕获细菌的特性,

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81802071)。

作者简介: 邵秋园, 1985 年生, 女, 主管技师, 大学本科, 从事微生物检验工作。

通信作者: 朱叶飞, 教授, 博士, E-mail: zhuyf@njmu.edu.cn。

制作万古霉素修饰玻片基底,用于金黄色葡萄球菌的捕获及其 SERS 光谱的检测,以期在不需要进行体外细菌培养下,建立快速检测金黄色葡萄球菌的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 显微镜盖玻片(规格 18 mm×18 mm×0.16 mm,世态公司),氢氧化钠、无水乙醇(国药集团),3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-Aminopropyltrimethoxysilane, APTES,赛默飞世尔公司),万古霉素、碳二亚胺[N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride purum, EDC, Sigma-Aldrich 公司],2-(N-吗啉)乙磺酸[2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, MES, Alfa Aesar 公司],胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB,海博生物公司),Milli-Q Reference 超纯水(Merck Millipore 公司),直径约 40 nm 的胶体银悬浮颗粒^[8](自制)。

1.2 仪器 inVia 激光显微拉曼光谱仪(Renishaw 公司),NICOLET 5700 傅里叶红外光谱仪(Thermo 公司),UV3600 紫外可见分光光度计(Shimadzu 公司),Ultra Plus 扫描电子显微镜(Zeiss 公司),Vitek 2 细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)。

1.3 菌株 金黄色葡萄球菌临床分离菌株经 Vitek 2 细菌鉴定仪鉴定为金黄色葡萄球菌。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养 金黄色葡萄球菌在 37 ℃、TSB 培养基中培养 12 h,取 1 mL,用灭菌的 PBS 离心洗涤 3 次,最后用生理盐水配制成 1 麦氏浊度单位的细菌悬液,备用。

1.4.2 玻片氨基化 显微镜盖玻片在 250 g/L 氢氧化钠溶液中浸泡 30 min,使玻片表面羟基化,依次用超纯水、无水乙醇洗涤 3 次;再置于含有 1% APTES 的无水乙醇中,50 ℃ 温育 12 h,使玻片氨基化,分别用无水乙醇、MES 缓冲液洗涤 3 次,备用。

1.4.3 万古霉素修饰玻片 万古霉素与 EDC 以物质的量之比 1:4 溶于 MES 缓冲液(50 mmol/L, pH 6.0),总体积为 0.5 mL,活化 15 min。将氨基化玻片置于其中,室温反应 6 h 后,用超纯水洗涤 3 次。在 EDC 作用下,通过万古霉素的羧基与玻片氨基共价结合,形成万古霉素修饰玻片。利用傅里叶红外光谱仪检测羟基化玻片、氨基化玻片及万古霉素修饰玻片的红外特征峰。

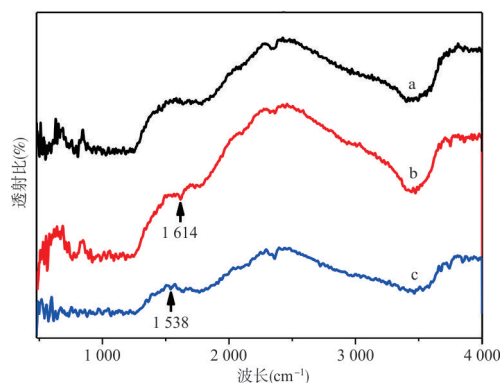
1.4.4 玻片表面万古霉素含量测定 用紫外分光光度计分别检测 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.25、

1.5 mg/mL 万古霉素溶液在 260 nm 波长的吸光度(A)值,建立标准曲线。检测与玻片作用前后的万古霉素溶液 A 变化,根据标准曲线计算玻片表面偶联万古霉素含量。

1.4.5 SERS 光谱检测 将制备的金黄色葡萄球菌溶液滴加于万古霉素修饰玻片及空白玻片表面,37 ℃ 温育 1 h, PBS 洗涤 3 次,晾干后滴加胶体银纳米悬浮液,干燥,并在扫描电子显微镜下观察玻片捕获金黄色葡萄球菌情况。用激光显微拉曼光谱仪在 633 nm 激光下检测空白万古霉素修饰玻片、未滴加银纳米颗粒的金黄色葡萄球菌和滴加银纳米颗粒的金黄色葡萄球菌的表面增强拉曼光谱。

2 结果

2.1 万古霉素修饰玻片 傅里叶红外光谱仪检测结果显示,万古霉素修饰玻片在 1 538 cm⁻¹ 处具有苯环特征峰,与氨基化玻片在 1 614 cm⁻¹ 形成的氨基特征峰明显区别,见图 1。偶联前后溶液中万古霉素的 A 差值 $\Delta A = 2.123 - 1.699 = 0.424$,见图 2。绘制万古霉素浓度与 A 的标准曲线,得到回归方程: $Y = 2.257X + 0.126$ ($R^2 = 0.994$,其中 Y 指 A, X 指万古霉素浓度),见图 3,将 ΔA 代入回归方程计算出偶联至玻片的万古霉素浓度为 0.132 mg/mL,质量为 0.132 mg/mL×0.5 mL = 0.066 mg,进一步计算出每 cm² 玻片表面含有 0.02 mg 万古霉素。



注:a,羟基化玻片的红外光谱特征峰;b,氨基化玻片的红外光谱特征峰;c,万古霉素修饰玻片的红外光谱特征峰。

图 1 傅里叶红外光谱仪检测图谱

2.2 玻片捕获金黄色葡萄球菌 玻片与金黄色葡萄球菌经过温育、洗涤,利用扫描电子显微镜分别对玻片的细菌捕获能力进行表征,结果显示空白玻片无细菌黏附,而万古霉素修饰玻片能够结合较多数量的金黄色葡萄球菌,见图 4。

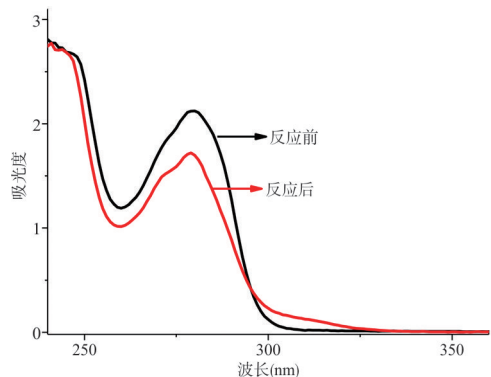


图 2 万古霉素溶液修饰玻片前后的紫外吸收光谱

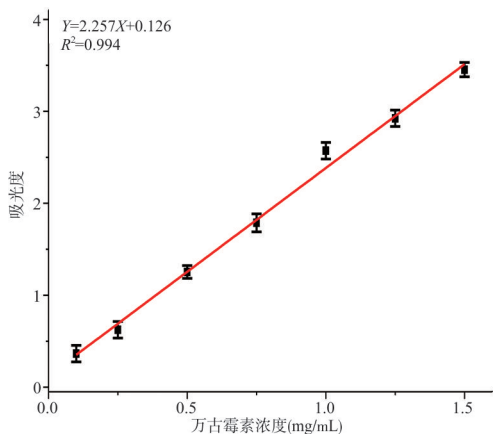
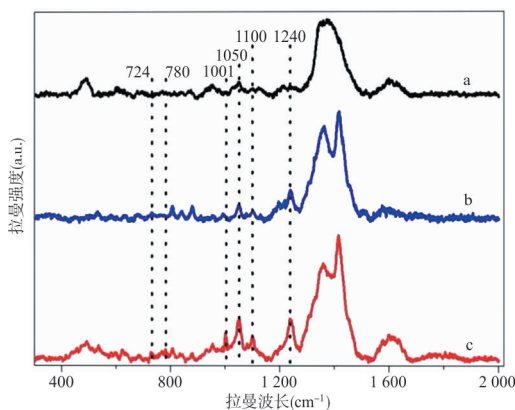


图 3 不同浓度万古霉素溶液与紫外吸光度的标准曲线

2.3 金黄色葡萄球菌 SERS 光谱的检测 选择激光显微拉曼光谱仪的 633 nm 激光器,对玻片表面金黄色葡萄球菌的 SERS 光谱进行检测。与阴性对照相比,捕获金黄色葡萄球菌后在 724 cm^{-1} 、 780 cm^{-1} 、 $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 均出现特征峰。滴加银纳米颗粒的金黄色葡萄球菌 SERS 信号明显高于未滴加银纳米颗粒的金黄色葡萄球菌的 SERS 信号。见图 5。



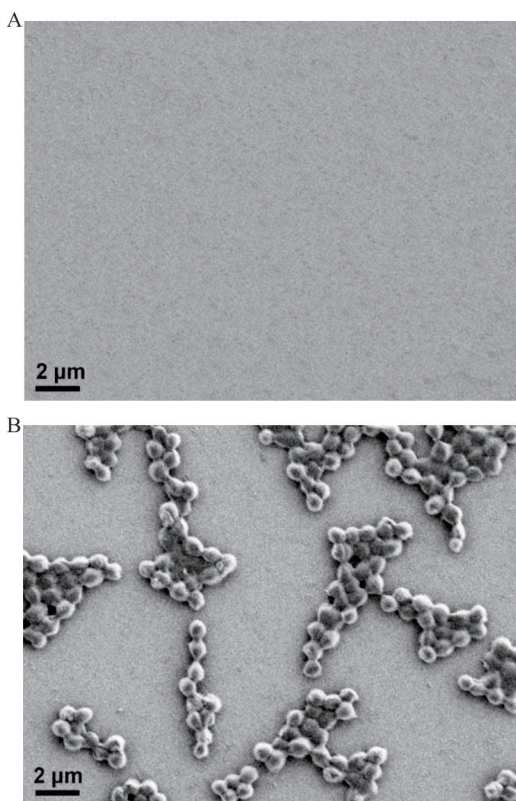
注:a,空白的万古霉素修饰玻片的 SERS 光谱;b,万古霉素修饰玻片捕获金黄色葡萄球菌的 SERS 光谱;c,在银纳米颗粒的增强作用下,万古霉素修饰玻片捕获金黄色葡萄球菌的 SERS 光谱。

图 5 激光显微拉曼光谱仪检测

3 讨论

本文制备的万古霉素修饰玻片可从细菌悬液中捕获、固定金黄色葡萄球菌,在银纳米颗粒的增强下,检测出金黄色葡萄球菌 SERS 光谱,与 Mosier-Boss^[9]所述的检测细菌 SERS 方法一致。在 EDC 的催化作用^[7,10],玻片表面成功修饰万古霉素 0.02 mg/cm^2 ,即使经 3 次标准洗涤,金黄色葡萄球菌仍黏附在万古霉素修饰玻片表面,而空白玻片表面无细菌黏附。这是因为万古霉素与金黄色葡萄球菌细胞壁形成的氢键作用增强了基底捕获细菌的能力。Liu 等^[11]也认为万古霉素修饰 Ag/AAO 纳米基底显著增强在液体中捕获细菌的能力。

在本实验中未捕获细菌的万古霉素修饰玻片的 SERS 光谱没有明显的特征峰,说明万古霉素对金黄色葡萄球菌 SERS 光谱的背景干扰小。同时万古霉素修饰玻片批量制备成本低、操作简便,自特异性结合金黄色葡萄球菌到检测其 SERS 光谱约 2 h,与传统的细菌培养所需时间 12~48 h 相比,明显缩短细菌检测时间。因此,万古霉素因其特异性、富集性、干扰性小、受水分子影响小等优点,可以从溶液中直接富集金黄色葡萄球菌,并在不损坏细菌结构的情



注:A,未修饰万古霉素玻片;B,万古霉素修饰玻片。

图 4 扫描电子显微镜观察玻片捕获金黄色葡萄球菌效果

况下进行细菌 SERS 光谱的检测,为直接从人体体液标本中捕获细菌并建立细菌 SERS 光谱奠定方法基础。

本实验检测到金黄色葡萄球菌在 724 cm^{-1} 、 780 cm^{-1} 、 $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 具有明显的特征峰。细菌细胞壁肽聚糖主要由 N-乙酰胞壁酸(NAG)、N-乙酰葡萄糖胺(NAM)和 L-氨基酸组成。Avci 等^[12]认为 724 cm^{-1} 归属富含 N-乙酰胞壁酸的特征峰, $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ 归属酰胺 III, $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 归属苯丙氨酸。当然细菌 SERS 光谱的起源尚有争议,多数学者认为细菌 SERS 光谱特征主要归因于细菌细胞壁(肽聚糖、脂多糖、膜蛋白等)和细胞内小分子的排泄^[13-14]。Premasiri 等^[15]认为细菌 SERS 光谱是由细菌分泌的代谢产物而非细胞壁成分引起。从我们观察到的金黄色葡萄球菌 SERS 特征峰,更倾向认为细菌的 SERS 光谱起源于细菌细胞壁。

但因细菌 SERS 光谱影响因素较多,会因实验条件的不同而有明显的改变,如 SERS 活性底物和激发波长、细菌的生长周期及生长环境等都会影响 SERS 光谱的检测^[9]。因此,利用表面增强拉曼光谱仪检测细菌光谱时需要建立同质化、标准化的实验条件以及各类细菌的标准 SERS 光谱图谱库,以便 SERS 运用于细菌的鉴定。

4 参考文献

- [1]董金颖,张阳,刘皓,等.拉曼光谱技术在病原微生物快速检测中的应用与展望[J].中华检验医学杂志,2018,41(1):5-8.
- [2]Sundaram J, Park B, Kwon Y, et al. Surface enhanced raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 167(1): 67-73.
- [3]刘建芝,朱桂池,胡勇军. SERS 标记方法在生化分析中的应用 [J]. 激光生物学报, 2015, 24(1): 17-24.
- [4]Efrima S, Bronk BV, Czege J. Surface-enhanced raman spectroscopy of bacteria coated by silver[J]. SPIE, 1999, 3602: 164-171.
- [5]Meng XY, Yang GT, Li FL, et al. Sensitive detection of *Staphylococ-*

- cus aureus* with vancomycin-conjugated magnetic beads as enrichment carriers combined with flow cytometry [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(25): 21464-21472.
- [6]Wang CW, Gu B, Liu QQ, et al. Combined use of vancomycin-modified Ag-coated magnetic nanoparticles and secondary enhanced nanoparticles for rapid surface-enhanced Raman scattering detection of bacteria [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 1159-1178.
- [7]Qi GB, Li LL, Yu FQ, et al. Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(21): 10874-10881.
- [8]Sun Y, Xia Y. Mechanistic study on the replacement reaction between silver nanostructures and chloroauric acid in aqueous medium [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(12): 3892-3901.
- [9]Mosier-Boss PA. Review on SERS of bacteria [J]. Biosensors, 2017, 7(4): 51.
- [10]Meng XY, Li FL, Li F, et al. Vancomycin modified PEGylated-magnetic nanoparticles combined with PCR for efficient enrichment and detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Sens Actuators B Chem, 2017, 247: 546-555.
- [11]Liu TY, Tsai KT, Wang HH, et al. Functionalized arrays of Raman-enhancing nanoparticles for capture and culture-free analysis of bacteria in human blood [J]. Nat Commun, 2011, 2: 538.
- [12]Avci E, Kaya NS, Ucanus G, et al. Discrimination of urinary tract infection pathogens by means of their growth profiles using surface enhanced Raman scattering [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(27): 8233-8241.
- [13]Liu SS, Li HH, Hassan MM, et al. Amplification of Raman spectra by gold nanorods combined with chemometrics for rapid classification of four *Pseudomonas* [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 304: 58-67.
- [14]Franco D, De Plano LM, Rizzo MG, et al. Bio-hybrid gold nanoparticles as SERS probe for rapid bacteria cell identification [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020, 224: 117394.
- [15]Premasiri WR, Lee JC, Sauer-Budge A, et al. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(17): 4631-4647.

(收稿日期:2020-02-13)

(本文编辑:刘群)