

## · 论著 ·

## 表面增强拉曼光谱法快速鉴别失活白色念珠菌

王科兵, 陈志红, 郭步, 陆国忠 (解放军 169 医院药械科, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的** 建立表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)法快速判别失活白色念珠菌。方法 利用热、甲醛、杀菌药(两性霉素 B)分别灭活白色念珠菌,然后利用 SERS 法对失活前后的白色念珠菌进行光谱考察比较。**结果** 白色念珠菌灭活后的 SERS 光谱显示出相似的特征峰,且与失活前的光谱有明显差异。**结论** 该实验方法快速、简便,实现了对失活白色念珠菌的快速检测,有望成为快速鉴别更多病原微生物失活状态的有利工具。

**[关键词]** 白色念珠菌;表面增强拉曼光谱法;失活;快速鉴别

**[中图分类号]** O657.37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)05-0422-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.009

## Rapid identification of inactivated *C. albicans* by surface-enhanced Raman spectroscopy

WANG Kebing, CHEN Zhihong, GUO Bu, LU Guozhong (Department of Pharmacy, No. 169 Hospital of PLA, Hengyang 421001, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a rapid method for the identification of inactivated *C. albicans* by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Methods** Live *C. albicans* cultures were exposed to heating, formaldehyde and fungicidal drug (amphotericin B). The corresponding SERS spectra were acquired for the investigation and comparison. **Results** The spectra acquired with three different inactivation methods exhibited similar features of dead *C. albicans*, which showed significant difference from the spectra of the live culture. **Conclusion** This SERS method can identify the inactivated *C. albicans* rapidly. Hopefully it will provide a convenient tool for quick identification of other inactivated pathogenic microorganisms.

**[Key words]** *C. albicans*; surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS); inactivation; rapid identification

随着微生物病原菌在全世界范围内的肆意蔓延,如何对其进行快速鉴别变得十分有意义<sup>[1-3]</sup>。其中,不同生理状态(如菌株是否失活)的检测对人类健康护理、食品安全、公共保护尤为重要。通常来说,只有能够进行不断倍增的活菌才会导致疾病。到目前为止,许多用于快速检测的方法包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链式反应(PCR)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)、荧光原位杂交技术(FISH)等都能够分析全部或部分的病原菌<sup>[4-6]</sup>。但这些方法无法区分菌株是否失活,且都需要复杂的前处理过程,分析时间长,需要配备昂贵的仪器和专门的人员。因此,亟需一种快速、免或少前处理的区分菌株是否失活的方法。

拉曼光谱尤其是表面增强拉曼光谱(surface-

enhanced Raman spectroscopy, SERS)法或可成为一种有效的解决途径<sup>[7]</sup>。该法是一种简便、快速的实时原位检测方法,具有指纹识别特征。借助于贵金属纳米粒子, SERS 能够大大增强光谱信号;且与传统分子生物学法相比,无需复杂的前处理操作,这使得该方法更加适用于生物样品研究<sup>[8,9]</sup>。基于以上优点,笔者将 SERS 用于快速鉴别白色念珠菌灭活前后的不同生理状态。

### 1 实验方法

**1.1 仪器与试剂** K-sens 拉曼光谱系统(上海复享光学股份有限公司),激光器的激发波长为 785 nm,光谱分辨率  $6\text{ cm}^{-1}$ ,光谱测定波段为  $175\sim 2\,100\text{ cm}^{-1}$ ,并配置 kpRaman-K100 显微装置,兼有 2 种放大物镜( $\times 10$ ,  $\times 100$ ),激光束形成光斑直径为  $1\ \mu\text{m}$ 。TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);TG16-WS 型高速离心机(上海卢湘离心机有限公司);Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf);KQ-250DB 型

**[作者简介]** 王科兵,本科,主任药师,研究方向:医院药学,Email: PLA169yyxk@163.com

**[通讯作者]** 陆国忠,硕士,主管药师,研究方向:临床药学,Email: 1339036689@qq.com

数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Zeiss EVO MA-10 扫描电镜显微镜(Carl-Zeiss, 德国)。不锈钢立式电热压力蒸汽灭菌锅(三申, 上海); Vortex-Genie2 多功能旋涡混合器(Scientific Industries, 美国); TS-1 型脱色摇床(江苏海门市麒麟医用仪器厂); MJX 型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂); Multiskan MK3 酶标分析仪(Thermo Fisher, 美国)。

硝酸银、二水合柠檬酸三钠、丙酮、乙醇、双氧水(30%  $H_2O_2$ )、硝酸、浓硫酸、氯化钠、氯化钾、十二水合磷酸一氢钠、磷酸二氢钾、二甲亚砜等均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。白色念珠菌 451、33、J18 及 940 由第二军医大学附属长海医院皮肤科提供。实验用水为三蒸水和去离子水。酵母浸膏、蛋白胨、葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )、琼脂、两性霉素 B 均购自百灵威公司。

## 1.2 样品准备

**1.2.1 银胶的制备** 称取硝酸银 36 mg, 溶于 200 ml 去离子水中, 加热至沸腾, 加入 4 ml 1% 的柠檬酸钠, 然后保持沸腾 0.5 h, 冷却备用<sup>[10]</sup>。

**1.2.2 两性霉素 B 溶液的制备** 称取 1 mg 两性霉素 B, 溶于 1 ml 的二甲亚砜溶液中, 备用。

**1.2.3 真菌传代** 取冰箱冻存的临床敏感白色念珠菌分别接种于 1 ml YPD 培养液中, 于 30 °C 200 r/min 振荡培养 16 h, 使真菌处于指数生长后期, 活化 2 次。然后划线并使其生长于沙氏培养基上, 2 d 后长至正常菌株大小。待拉曼光谱测定前, 将这些白色念珠菌接种于 1 ml YPD 培养液中, 于

上述条件下传代 16 h。

**1.2.4 灭活过程** 热灭活: 将传代 16 h 后的真菌置于 65 °C 的水浴锅内 1 h 以确保其灭活。甲醛灭活: 将 3.7% 的甲醛溶液加入到菌液中作用 1 h。两性霉素 B 灭活: 将制备好的两性霉素 B 溶液加入到菌液中 1 h, 该药物的终浓度为 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $MIC_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$ ) 以确保真菌被全部灭活。

**1.3 SERS 检测** 灭活后的菌液经去离子水洗后, 与制备好的银胶均匀混合, 吸取 3  $\mu\text{l}$  混合液滴于清洗并干燥后的硅片上用于 SERS 待测。混合溶液无需干燥, 直接于光谱仪下进行光谱检测。光谱检测参数: 积分时间 5 s, 激光功率 100 mW, 显微系统放大倍数为 100。

**1.4 数据处理方法** 采用 Matlab 13.0 软件对所得光谱进行数据预处理, 依次对光谱进行平滑(Sgolay 法)、基线校正(airPLS 法)及归一化(Min-Max Normalization), 选取 550 ~ 1 800  $\text{cm}^{-1}$  用于光谱分析。

## 2 结果与分析

**2.1 纳米银胶的表征** 本实验采用纳米银胶用于拉曼光谱信号的增强, 制备方法为经典的 Lee 法。制备完成后对该纳米银胶分别进行了紫外吸收和扫描电镜表征(图 1)。由图 1A 可见, 所制备的纳米银胶仅有一个单峰, 而且半峰宽也较窄, 表明该纳米银颗粒分散度良好、均匀。图 1B 的扫描电镜图也可见分散较为均匀的纳米银颗粒, 粒径约 75 nm。上述银胶将有助于后续 SERS 光谱采集。

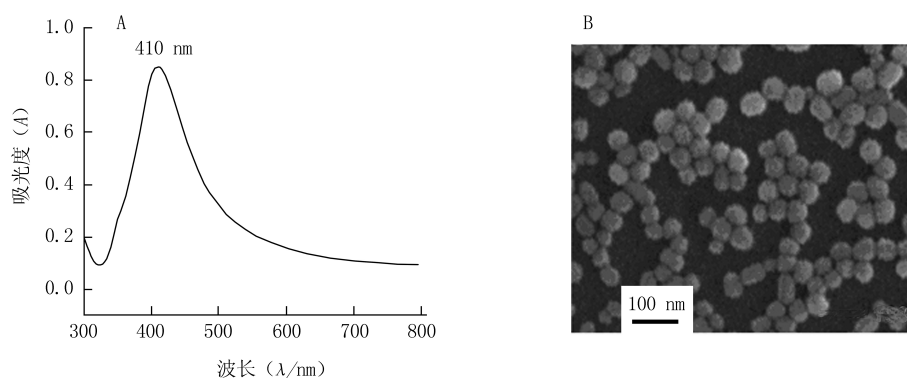


图 1 纳米银胶(粒径 75 nm)的紫外吸收图(A)和扫描电镜图(B)

**2.2 动态 SERS 考察** 传统的表面增强拉曼光谱(C-SERS)在进行真菌检测时, 通常是将纳米银胶与菌株混合, 待混合液干燥后再进行 SERS 光谱采集。此举会带来以下问题: ①干燥时间较长, 通常为 15 ~ 30 min; ②形成干态膜后菌株的 SERS 信号往往较弱, 且重现性不够。③激光对干燥后的菌株细胞造

成一定的破坏, 并不能反映出其原始状态。为了解决 C-SERS 检测出现的问题, 笔者采用动态 SERS(D-SERS)法, 即从湿态到干态的过程中采集光谱, 获取高灵敏度、高重现性的 D-SERS 信号, 且该法无需 C-SERS 方法下采集光谱前等待的时间, 整个过程仅需约 2.5 min。将 D-SERS 与 C-SERS 的增强

效果进行比较(图2),发现 D-SERS 较 C-SERS 的拉曼峰强提高了一个数量级,且 10 个不同批次的白色念珠菌的 D-SERS 光谱重复性良好(图3)。上述结果表明 D-SERS 法是一种稳定可靠的方法,可用于快速检测白色念珠菌。

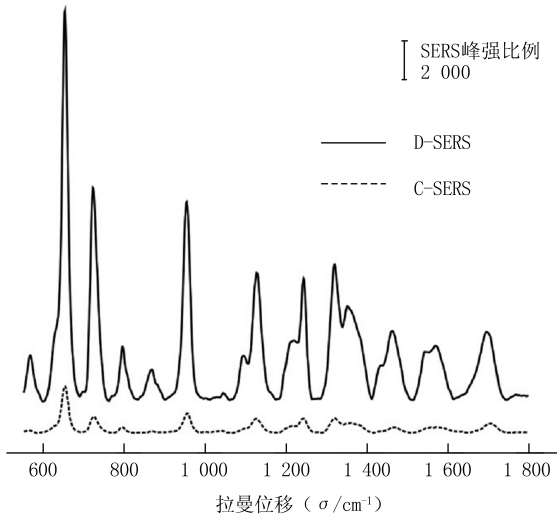


图2 白色念珠菌在 2 种采集方式(D-SERS 与 C-SERS)下的峰强比较

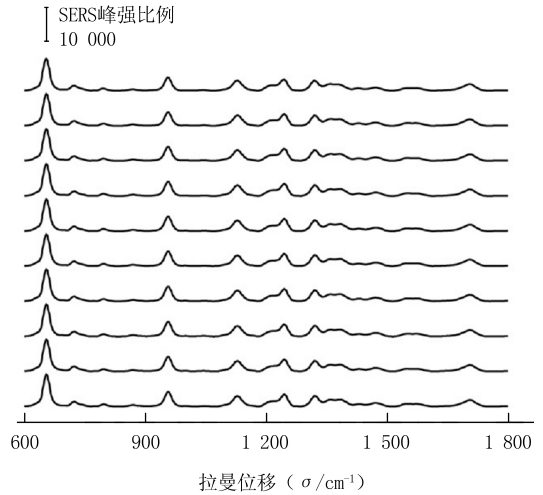


图3 D-SERS 下采集的 10 个批次白色念珠菌光谱图

2.3 灭活菌株的光谱分析 本实验采用 4 株白色念珠菌,分别对其进行热(65 °C)、甲醛、两性霉素 B (MIC<sub>80</sub>)灭活,结果如图 4 所示。4 株菌经 3 种方式灭活后展现出的光谱十分接近,且与未灭活的光谱有较大差异,除 724 和 1 325 cm<sup>-1</sup>外,灭活后的菌

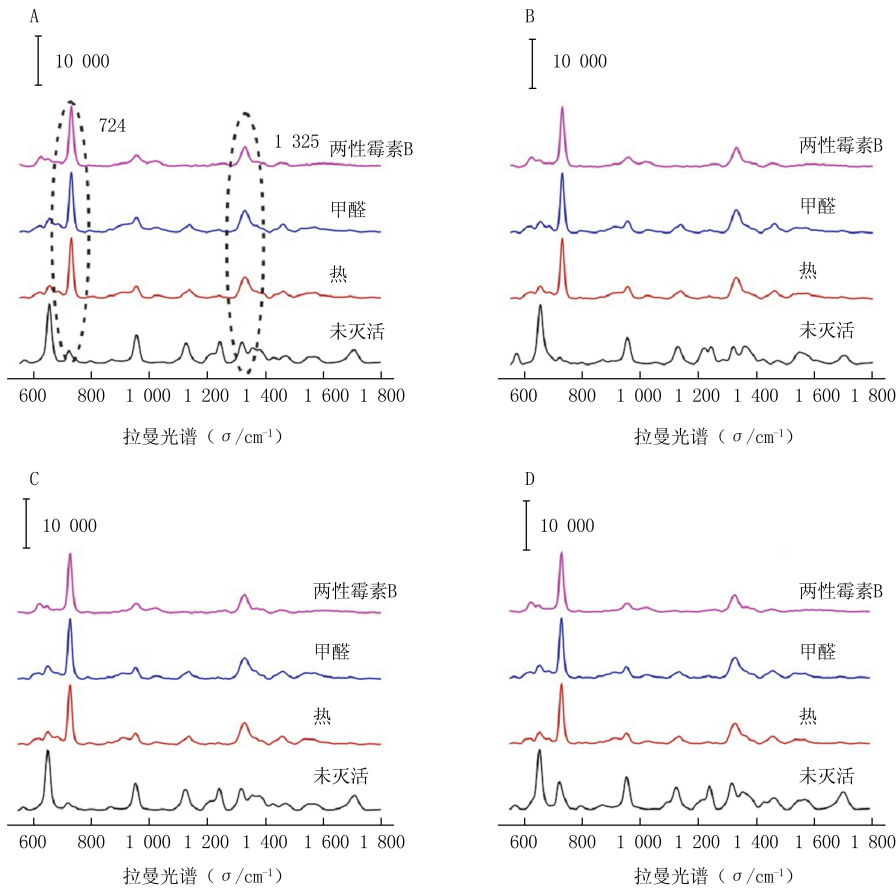


图4 不同白色念珠菌未灭活及经热(65 °C)、甲醛、两性霉素 B 灭活后的 D-SERS 光谱图

A. 菌株 451; B. 菌株 33; C. 菌株 J18; D. 菌株 940

注:图中椭圆虚线所标为未灭活菌与灭活菌的差异特征峰;比例尺为 SERS 峰强比例

株几乎无其他明显特征光谱峰。

**2.4 常规药理学方法的验证** 常规用于判定菌株是否灭活的方法为微量稀释法和生长曲线法,笔者采用生长曲线法对灭活(热、甲醛、两性霉素B)前后的4株白色念珠菌进行了测定,结果见图5。3种灭活方式下,不同的白色念珠菌呈现出相似的生长曲

线,几乎为一直线,表明即使在有 YPD 培养液的情况下,灭活后的菌株无法再生长,而在此条件下获取的光谱结果能与之——对应。因此,SERS 光谱中出现的 724 和 1 325  $\text{cm}^{-1}$  特征峰可作为菌株被完全灭活的标志。与常规的药理学方法相比,D-SERS 法仅耗时几分钟即可快速判别菌株的失活状态。

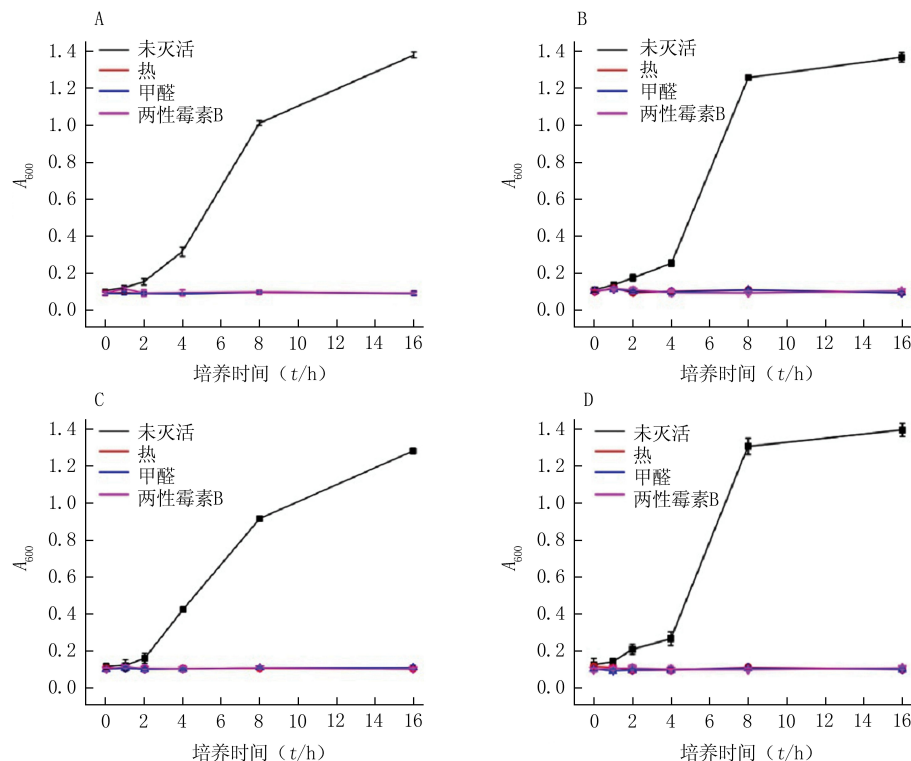


图5 不同白色念株菌未灭活及经热(65 °C)、甲醛、两性霉素B灭活后的生长曲线

A. 菌株 451; B. 菌株 33; C. 菌株 J18; D. 菌株 940

### 3 讨论

**3.1 其他灭活念珠菌的鉴别** 实验发现白色念珠菌灭活后呈现出明显特征的 SERS 光谱峰,为了考察其他念珠菌是否也会出现相似的特征,笔者又对近平滑念珠菌、克柔念珠菌及热带念珠菌等其他菌株进行了相应的灭活,之后采集 D-SERS 光谱。结果发现,其他念珠菌经灭活后呈现出与白色念珠菌相似的光谱特征,即均有 724 和 1 325  $\text{cm}^{-1}$  这 2 个明显的特征光谱峰。念珠菌属作为最主要的一类真菌,几类念珠菌灭活后呈现出几乎一致的光谱特征,说明 D-SERS 快速鉴别失活念珠菌具有一定的通用性。该方法是否能够推广到更多种类的真菌甚至其他病原菌,还需进一步的实验探索。

**3.2 特征峰来源的分析** 文献[8,9]报道,724 和 1 325  $\text{cm}^{-1}$  这 2 个特征峰可能来自于腺嘌呤的苯环振动峰。由于不同的文献对峰的归属基于不同的实验条件,因此笔者研究了本实验条件下获得的这 2

个特征峰是否来源于腺嘌呤,并采集了腺嘌呤及相关嘌呤代谢物的 SERS 光谱。图 6 显示腺嘌呤对照品的 SERS 光谱特征峰与 4 种白色念珠菌灭活后的光谱基本一致。原因可能是菌株灭活后,细胞形态产生了一定破坏,原先胞内的嘌呤代谢物释放出胞

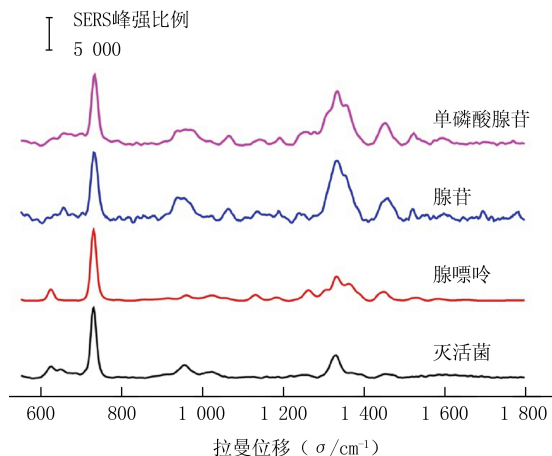


图6 灭活菌及3种嘌呤代谢物的D-SERS光谱图

外,又由于腺嘌呤及其衍生物有较强的 SERS 谱峰,因此念珠菌灭活后的光谱可能主要来自该类物质的贡献。

#### 4 结论

本研究采用 D-SERS 法用新出现的 2 个特征光谱峰作为重要标志,快速鉴别 4 株白色念珠菌的失活状态,同时也得到了常规药理学方法的验证。该法简便、快速、专属、灵敏,有望成为临床快速检测病原菌生理状态的有效工具。

#### 【参考文献】

[1] Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bloodstream infections due to *Candida species*: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(3): 747-751.

[2] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited [J]. Clin Infect Dis, 2003, 37(9): 1172-1177.

[3] Szweda P, Gucwa K, Romanowska E, et al. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(6): 610-619.

[4] Blasco L, Ferrer S, Pardo I. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 225(1): 115-123.

[5] Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 1): 197-207.

[6] Perez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology [J]. Infect Genet Evol, 2013, 16: 38-53.

[7] 张雁, 尹利辉, 冯芳. 拉曼光谱分析法的应用介绍[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1236-1241.

[8] Culha M, Kahraman M, Cam D, et al. Rapid identification of bacteria and yeast using surface-enhanced Raman scattering [J]. Surf Interface Anal, 2010, 42(6-7): 462-465.

[9] Sayin I, Kahraman M, Sahin F, et al. Characterization of yeast species using surface-enhanced Raman scattering [J]. Appl Spectrosc, 2009, 63(11): 1276-1282.

[10] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391-3395.

【收稿日期】 2017-05-10 【修回日期】 2017-07-06  
【本文编辑】 顾文华

(上接第 406 页)

[3] 陈才铭, 张苗苗, 胡利明. 大黄酸对肥胖糖尿病大鼠肾皮质 PPAR $\gamma$  和 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 表达的影响[J]. 中药材, 2015, 38(4): 810-812.

[4] 吴影懿, 段俗言, 钱军, 等. 大黄酸对糖尿病小鼠肾脏的保护作用[J]. 江苏医药, 2015, 41(16): 1864-1866.

[5] 陈卫东, 常保超, 张燕, 等. 大黄酸增加 2 型糖尿病大鼠肾组织 SIRT1 的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(5): 615-619.

[6] Geng CC, Chen GR, Wu QJ, et al. The molecular mechanism of rhein in diabetic nephropathy [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 20(14): 487-497.

[7] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠心肌 AGEs 及 CTGF 的影响及其机制[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 536-541.

[8] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍预防糖尿病大鼠主动脉病变及对 VEGF 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1079-1084.

[9] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠心肌结构及血流动力学的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7): 1012-1016.

[10] 陈颖, 刘竹影, 周福兴, 等. 双丹口服液对大鼠糖尿病肾病的作用研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(1): 56-61.

[11] Chen Y, Liu Z Y, Zhou F X, et al. Effects of Shuangdan Oral Liquid on diabetic nephropathy rat models [J]. Northwest Pharm J, 2016, 31(1): 56-61.

[12] 李梦莹, 谢春光, 王晓灿. 大黄酸治疗糖尿病肾病实验研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(10): 172-173.

[13] Loeffler I, Hopfer U, Koczan D, et al. Type VIII collagen modulates TGF- $\beta$ <sub>1</sub> induced proliferation of mesangial cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(4): 649-663.

[14] Overstreet JM, Samara Koon R, Meldrum KK, et al. Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF-beta target genes through SMAD cooperativity [J]. Cell Signal, 2014, 26(7): 1427-1436.

[15] Kim D, Lee AS, Jung YJ, et al. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor alpha-mediated transforming growth factor-beta/Smad signaling pathway [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(11): 2043-2053.

[16] Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF-beta signal in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities[J]. Cell Signal, 2013, 25(1): 264-268.

[17] Zhang J, Zhang X, Xie F, et al. The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination [J]. Protein Cell, 2014, 5(7): 503-517.

[18] Xie F, Zhang Z, van Dam H, et al. Regulation of TGF-beta superfamily signaling by SMAD mono-ubiquitination [J]. Cells, 2014, 3(4): 981-993.

【收稿日期】 2017-05-18 【修回日期】 2017-06-26  
【本文编辑】 李睿旻