

银胶浓度对电穿孔获取细胞内 表面增强拉曼光谱的影响*

俞允^{1, 2)} 林居强¹⁾ 黄浩²⁾ 陈燕坪³⁾ 冯尚源¹⁾ 苏颖³⁾ 陈杰斯¹⁾ 陈荣^{1)**}

(¹⁾ 福建师范大学, 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福州 350007;

(²⁾ 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350108; (³⁾ 福建省肿瘤医院, 福州 350001)

摘要 探究了银胶浓度对于电穿孔导入银纳米粒子获取细胞内表面增强拉曼光谱(SERS)的影响. 对 6 组含有不同浓度银胶的鼻咽癌细胞 C666 进行电穿孔, 测量电穿孔后活细胞内表面增强拉曼光谱. 以测得的 SERS 信号、光谱强度积分值和谱线重复性为指标, 研究银胶浓度对电穿孔获取细胞内 SERS 的影响, 对电穿孔后活性 C666 细胞内 SERS 平均光谱进行初步谱峰归属. 在脉冲电场强度 875 V/cm, 脉冲持续时间 1 ms, 电脉冲 2 次的条件下, 每 500 μ l 电击缓冲液中含有 50 μ l 银胶时测得的细胞内 SERS 光谱信噪比高, 且光谱具有较好的重复性. 结果说明, 正确选择银胶浓度可以提高电穿孔-SERS 效果, 获取高质量的活细胞内 SERS 信号. 此研究有助于扩展表面增强拉曼光谱的应用, 包括实时检测分析活细胞内生化成分及分布, 实时监测细胞生化变化过程等.

关键词 表面增强拉曼散射(SERS), 电穿孔, C666 细胞, 银胶浓度

学科分类号 G633.91, Q6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00106

表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)具有良好的特异性、选择性和敏感性, 在生物化学分析中发挥重要作用. 人们将金、银纳米粒子导入活细胞内增强拉曼信号, 然后检测细胞 SERS 光谱, 可分析活细胞内生化物质成分^[1](如核酸、蛋白质等), 利用光谱成像监测细胞内生化物质分布以及变化过程^[2-3]. 当金、银纳米粒子结合各种信号探针以及不同抗体、蛋白质后, 导入细胞具有靶向作用, 可与细胞内特定物质结合, 利用 SERS 光谱的高灵敏性形成 SERS 传感作用, 如细胞 pH 探针^[4]、SERS 免疫探针^[5]等. 当前将金、银纳米粒子导入活细胞的常用方法是将细胞与纳米粒子混合孵育培养, 利用细胞内吞作用使金、银纳米粒子进入细胞作为增强基底, 测得细胞内 SERS 信号^[6-7], 从而分析细胞内的生化结构信息. 但采用上述方法实现 SERS 测量前, 细胞与纳米粒子一般要孵育培养 20 h^[8], 而细胞生命活动一直在进行, 未能实现实时测量即可能影响所获得信息的准确度. 此外, 银纳米粒子对细胞具有生物毒性, 长时间孵育可能影响细胞活性^[9]. 因此, 研究

寻找一种方法使纳米粒子快速进入细胞, 以实现细胞内 SERS 光谱实时检测, 对细胞等生命组织的研究具有重要意义.

为实现上述目标, 我们首次提出并实现了电穿孔-SERS 方法, 即利用电穿孔技术, 在 1 min 内快速将金、银纳米粒子导入活性细胞, 并成功测得活细胞内 SERS 信号^[8]. 电穿孔-SERS 技术将细胞置于可控电场中, 在适当的脉冲电场作用下, 细胞膜出现可逆性微小孔洞, 暂时提高细胞膜通透性^[9-10], 使周围介质中的纳米粒子更容易进入细胞内, 细胞膜恢复后纳米粒子就滞留在细胞内, 作为拉曼信号增强基底. 控制电脉冲参数使细胞膜发生可逆性穿孔, 就可以在保证细胞活性的情况下, 实现快速活

* 国家自然科学基金资助项目(60778046, 60910106016), 福建省科技项目(2008J0016, 2009J01276)和卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2008-2-046).

** 通讯联系人.

Tel: 0591-83489919, E-mail: chenr@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-06, 接受日期: 2011-03-30

细胞 SERS 检测. 之前的实验为了成功测得活细胞内 SERS 信号, 采用了高浓度的银胶^[8], 但我们注意到银胶浓度直接影响电穿孔导入活细胞内的银纳米粒子数量和聚集程度, 银胶浓度过低将导致电穿孔后测不到 SERS 信号或信噪比差, 而过量的银胶容易聚集附着于细胞外, 难以清洗干净, 同时对实验的重复性造成影响. 因此, 正确选择银胶浓度对于提高电穿孔-SERS 方法的效果, 实现良好的细胞内 SERS 光谱检测具有重要意义.

本文以人鼻咽癌细胞 C666 为研究对象, 利用电穿孔将银纳米粒子导入活细胞内, 测量 6 组不同银胶浓度下 C666 细胞电穿孔后的 SERS 光谱, 研究银胶浓度对于电穿孔法获取细胞内 SERS 光谱的影响, 以获取最佳电穿孔-SERS 测量效果.

1 实验器材与方法

1.1 实验试剂

硝酸银(AgNO_3)、氢氧化钠(NaOH)、盐酸羟胺(HONH_2Cl)均为分析纯化学用品; RPMI 1640 细胞培养液购自 GIBCO 公司; PBS 购自 BOSTER 公司; 实验均使用超纯水.

1.2 实验仪器

ECM 830 电穿孔仪(BTX 公司); 电极杯(间距 4 mm, BTX 公司); Renishaw inVia 型共聚焦显微拉曼光谱仪.

1.3 银胶制备

银胶制备采用盐酸羟胺还原硝酸银方法^[10]. 将 4.5 ml 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)加入到 5 ml 盐酸羟胺溶液(0.06 mol/L)中, 再将混合物快速添加到 90 ml 硝酸银溶液(1.1×10^{-3} mol/L)中, 加入过程中快速搅拌直至得到均匀乳灰色溶液. 室温下避光封存. 使用前, 10 000 r/min 离心 10 min 后弃去上层液即可获得银胶.

1.4 细胞培养

人鼻咽癌 C666 细胞株由福建省肿瘤医院提供, 福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室培养. C666 细胞单层贴壁生长于 pH 7.4, 含 10% 小牛血清及双抗(100 U/ml 青霉素、链霉素)的 RPMI 1640 培养基中(以下简称 RPMI 1640 完全培养液), 于 5% CO_2 、饱和湿度、37℃ 培养箱中传代培养. 选择对数期细胞进行实验, 电穿孔前收集 C666 细胞, 离心并重悬于 RPMI 1640 完全培养液中(电击缓冲液即为 RPMI 1640 完全培养液), 计数调节细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$.

1.5 实验方法

分别将 5 μl 、10 μl 、25 μl 、50 μl 和 75 μl 银胶用 RPMI 1640 完全培养液稀释成 100 μl , 再取 100 μl 银胶(不稀释), 制成 6 组不同浓度银胶各 100 μl . 将这 6 组银胶各取 100 μl , 分别与 400 μl 细胞悬液充分混匀于电极杯中. 6 个电穿孔组中每 500 μl 银胶浓度分别为: 5 μl 、10 μl 、25 μl 、50 μl 、75 μl 和 100 μl . 对照组不加银胶, 直接将 100 μl RPMI 1640 完全培养液与 400 μl 细胞悬液均匀混合于电极杯中. 穿孔前电极杯冰浴(0~4℃) 10 min. 电穿孔脉冲参数参考我们之前的研究报告^[8], 脉冲电场强度 875 V/cm, 脉冲持续时间 1 ms, 电脉冲 2 次. 电击后将电极杯冰浴 10 min. 穿孔结束后, 将细胞从电极杯移至 EP 管中, PBS 清洗细胞 3 次后, 将细胞置于样品池中, 使用 Renishaw inVia 型共聚焦显微拉曼光谱仪测量细胞拉曼光谱. 对照组及 6 个不同银胶浓度组均随机测量 30 个形态结构完整的细胞拉曼光谱.

测量条件为激发光波长 785 nm, 功率 20 mW, CCD 取谱时间 10 s. 在 50×物镜下测量细胞拉曼信号, 加入 pinhole, 调节光斑大小使其覆盖整个细胞, 从而获取全细胞信号. 测量获得的光谱原始数据均扣除荧光背景, 从而获取细胞 SERS 光谱.

2 结果与讨论

2.1 银胶电镜鉴定及紫外/可见/近红外吸收光谱

银胶透射电镜鉴定由中国科学院福建物质结构研究所完成, 银纳米粒子直径约为 40 nm. 使用 Lambda 950 紫外/可见/近红外分光光度计测定银胶吸收光谱, 银胶吸收峰在 416 nm 处(图 1).

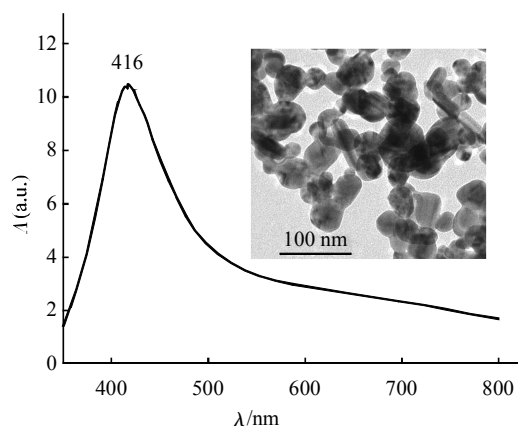


Fig. 1 UV-visible-NIR absorption spectra of pure silver colloid

The inserted picture shows the TEM micrograph of silver colloid.

2.2 不同银胶浓度电穿孔后细胞内 SERS 光谱

图 2a 为对照组及 6 个不同银胶浓度组电穿孔后细胞内 SERS 光谱. 图中编号 5、10、25、50、75 和 100 μl 分别代表 6 个银胶浓度组中测得的细胞 SERS 谱线, 谱线 Ctrl 为对照组(电穿孔时不加银胶). 如图 2a 所示, 对照组没有明显的拉曼谱峰, 说明在激发光功率 20 mW, CCD 取谱时间 10 s 的测量条件下, 未导入银纳米粒子的 C666 细胞难以测得拉曼信号. 5 μl 银胶浓度组同样难以获取拉曼信号. 在 10 μl 银胶浓度组中, 谱线出现了一些 SERS 谱峰, 但是光谱信噪比较差. 在 25 μl 银胶浓度组中, 出现更多 SERS 谱峰, 光谱信噪比有很大改善. 在 50、75 和 100 μl 银胶浓度组中, 细胞都能获取信噪比很好的 SERS 光谱. 说明随着银胶浓度增加, 在两次 875 V/cm, 1 ms 电脉冲作用下,

有足量银纳米粒子通过细胞膜上由电脉冲刺激而产生的孔洞进入到细胞内部, 滞留聚集成簇, 对细胞内 SERS 测量起到很好的表面增强作用.

拉曼光谱强度积分值直接反映导入细胞的银纳米粒子数量和 SERS 增强效果^[8], 我们通过强度积分值统计图来比较不同浓度银胶电穿孔后 SERS 增强效果. 对于每一条光谱, 计算谱线下方 400~1 800 cm^{-1} 所包围面积的积分值(即为光谱强度积分值). 对照组和 6 个银胶浓度组均计算并统计测得的 30 条光谱的强度积分值, 形成强度积分值统计图(图 2b).

如图 2b 所示, 对照组的光谱强度积分值最低. 5 μl 银胶浓度组的光谱强度积分值与对照组相比没有改善. 10 μl 银胶浓度组测量的 30 个细胞中, 有 3 个细胞出现了较高的光谱强度积分值, 说

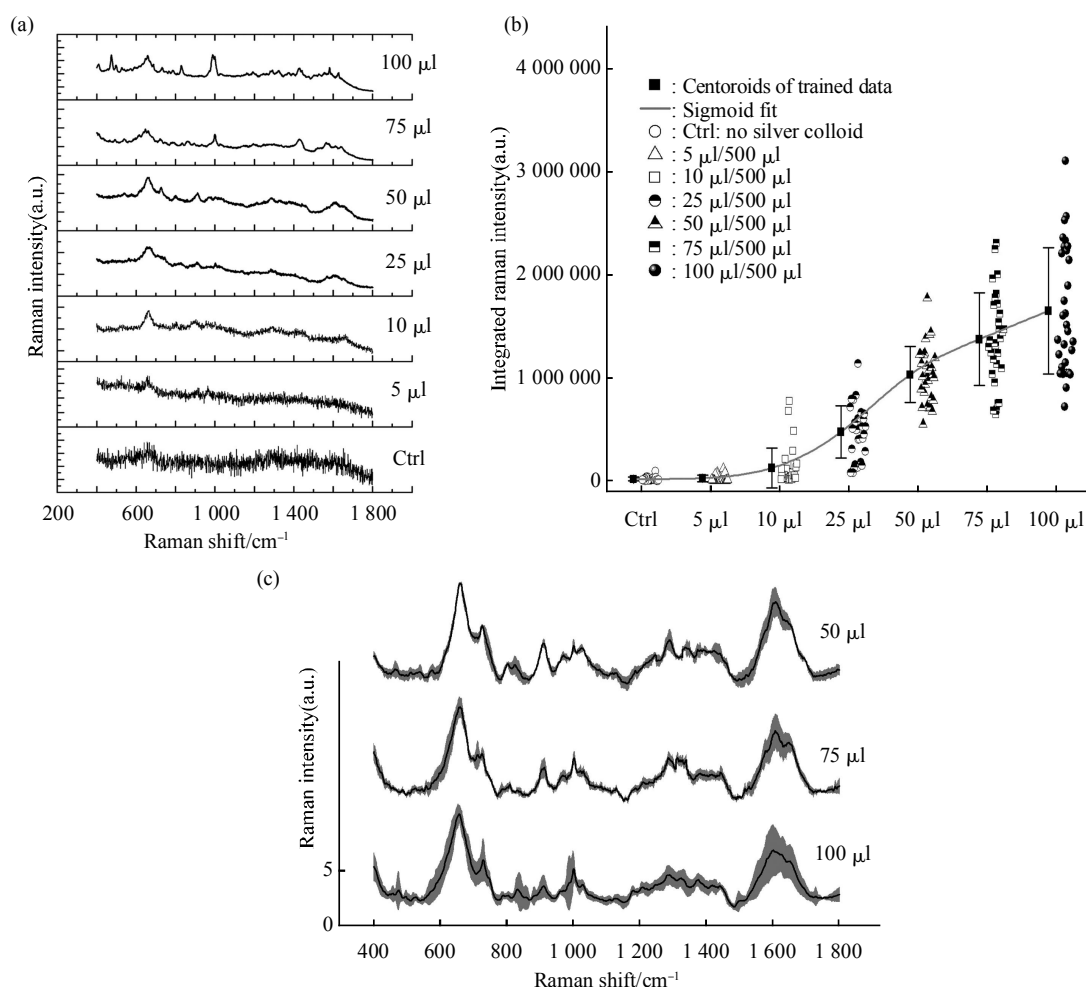


Fig. 2 SERS spectra of cells treated in electroporation experiments with different silver colloid concentration

SERS spectra (a) and the integrated SERS intensity (b) obtained from control experiment (electroporation without silver colloid) and 6 electroporation experiments of different silver colloid concentration: 5 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$, 10 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$, 25 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$, 50 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$, 75 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$, and 100 $\mu\text{l}/500 \mu\text{l}$. (c) The mean spectrum for 50 μl , 75 μl , 100 μl silver colloid concentration experiments. The shaded areas represent the SD of the means.

明这 3 个细胞测得信噪比较好的 SERS 信号. 低浓度银胶电穿孔后只有个别细胞获得增强效果, 这是由于低浓度下进入细胞的银纳米粒子较少, 只有当银纳米粒子聚集成簇才能形成较好的增强效果^[12-14]. 在 25 μl 银胶浓度组中, 半数细胞测得到信噪比较好的 SERS 光谱, 而在 50、75 和 100 μl 银胶浓度组中, 每组 30 个细胞都有很高的光谱强度积分值.

拉曼谱线的重复性对于谱线分析是必需的. 如图 2b 所示, 50、75 和 100 μl 银胶浓度组的 SERS 强度积分值统计平均值和标准差分别为: $1.03 \times 10^7 \pm 0.27 \times 10^7$ (26%)、 $1.37 \times 10^7 \pm 0.45 \times 10^7$ (33%) 和 $1.65 \times 10^7 \pm 0.61 \times 10^7$ (37%). 银胶浓度增加, SERS 强度积分值标准差增大, 说明同一电穿孔组不同细胞个体 SERS 谱线差异随着银胶浓度增加而增大. 我们通过平均谱线来比较 50、75 和 100 μl 这 3 个银胶浓度组的 SERS 光谱重复性. 每组 30 条谱线均面积归一化^[14]后计算平均谱及标准差, 形成平均光谱(图 2c), 图中谱线的阴影部分为平均谱的标准差.

如图 2c 所示, 50 μl 银胶浓度组显示了较好的光谱重复性. 在 75 和 100 μl 银胶浓度组中, 随着银胶浓度增大, 平均谱的标准差(谱线阴影部分)也增大. 说明增加银胶浓度降低了谱线重复性, 这可能是由于高浓度银胶带来显著的 SERS 增强效果, 而 SERS 的高灵敏度造成不同细胞个体之间 SERS 谱线差异. 此外, 随着银纳米粒子数量及聚集程度增加, SERS 特有的光谱“闪烁”现象(blinking effect)也更加明显^[15].

综合对比 6 个不同银胶浓度组电穿孔后测得的细胞 SERS 信号、光谱强度积分值和谱线重复性, 500 μl 电击缓冲液中含有 50 μl 银胶时电穿孔后测得的细胞内 SERS 效果最好, 不仅可以测得信噪比较好的 SERS 信号, 而且谱线重复性好, 这有利于通过细胞 SERS 谱线分析细胞内生化成分. 因此, 在电场强度 875 V/cm, 脉冲持续时间 1 ms, 电脉冲 2 次的条件下, 选择每 500 μl 电击缓冲液中含有 50 μl 银胶可以获取最佳电穿孔-SERS 测量效果.

2.3 C666 细胞内 SERS 光谱

将 50 μl 银胶浓度组中测得的 30 条 SERS 光谱取平均值以获取平均 SERS 光谱(图 3). 电穿孔将银纳米粒子导入细胞内作为增强基底, 测得的 SERS 光谱包含丰富的细胞内生化物质信息. 谱峰初步归属见表 1.

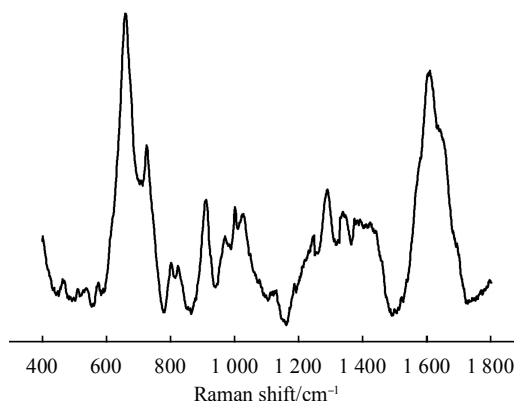


Fig. 3 The averaged SERS spectra of living C666 cell after electroporation

Table 1 SERS peak positions and tentative vibrational mode assignment

Peak position /cm ⁻¹	Vibrational mode	Assignment	Reference
580	Out of plane ring deformations	A, G, C	[16]
661	Vibration of the RNA backbone	G, T, tyrosine	[17]
727	C-C stretching	A, proline	[16, 18]
809	O-P-O symmetric stretching	Phosphate	[5, 16, 18]
826	O-P-O stretching	Tyrosine	[18-19]
914	C-O stretching	Ribose-phosphate	[16]
971	C-O stretching	Ribose-phosphate	[16]
1003	C-C skeletal	Phenylalanine	[5, 17, 20]
1028	Protein: C-N stretching	Phenylalanine	[17]
1251	Ring stretching	T, C, A	[5]
1292	CH ₃ CH ₃ deformation	Proteins, lipids: amide III	[5]
1343	CH ₂ deformation	Nucleotides	[20]
1427	Ring stretching, CH deformations	A, G	[5, 16-17]
1606	Protein: C=C	Tyrosine, phenylalanine	[17, 19]

* A: Adenine, G: Guanine, C: Cytosine, T: Thymine.

3 结 论

本文基于我们研发的电穿孔-SERS 技术, 研究不同浓度银胶电穿孔后 C666 细胞内 SERS 光谱. 在穿孔脉冲电场强度 875 V/cm, 脉冲持续时间 1 ms, 电穿孔 2 次的条件下, 每 500 μ l 电击缓冲液中含有 50 μ l 银胶测得的细胞内 SERS 信号信噪比好、且光谱具有较好的重复性. 对活性 C666 细胞内 SERS 光谱进行初步谱峰归属. 研究表明, 正确选择银胶浓度以及相应的实验条件, 可以提高电穿孔-SERS 效果, 快速获取高质量的活细胞内 SERS 信号, 从而有可能进一步扩展 SERS 方法在生物医学领域的应用, 包括实时检测分析活细胞内生化成分及分布, 实时监测细胞生化变化过程等.

参 考 文 献

- [1] Hao Y. Review: Optical methods for tumors diagnosing. *Chin J Biomed Eng*, 2008, **17**(1): 34-46
- [2] Vo-Dinh T, Wang H, Scaffidi J. Plasmonic nanoprobe for SERS biosensing and bioimaging. *J Biophotonics*, 2010, **3**(1-2): 89-102
- [3] Sirimuthu N M S, Syme C D, Cooper J M. Monitoring the uptake and redistribution of metal nanoparticles during cell culture using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Anal Chem*, 2010, **82**(17): 7369-7373
- [4] Pallaoro A, Braun G, Reich N, *et al.* Mapping local pH in live cells using encapsulated fluorescent SERS nanotags. *Small*, 2010, **6**(5): 618-622
- [5] Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, *et al.* Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells. *Nanomedicine*, 2010, **6**(2): 214-226
- [6] Kneipp J. Nanosensors Based on SERS for Applications in Living Cells//Kneipp K, Moskovits M, Kneipp H. Surface-Enhanced Raman Scattering. Berlin: Springer, 2006: 335-349
- [7] Kneipp K, Haka A S, Kneipp H, *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Appl Spectrosc*, 2002, **56**(2): 150-154
- [8] Lin J, Chen R, Feng S, *et al.* Rapid delivery of silver nanoparticles into living cells by electroporation for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biosens Bioelectron*, 2009, **25**(2): 388-394
- [9] 王 丰, 陈霞芳, 田毓华, 等. 电穿孔介导质粒 DNA 肿瘤内转移抑制恶性肿瘤生长与转移. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(5): 734-740
- [10] Wang F, Chen F X, Tian Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(5): 734-740
- [11] Kanduđer M, Miklavčič D. Electroporation in biological cell and tissue: an overview // Eugène V, Nikolai L. *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*. New York: Springer, 2009: 1-37
- [12] Leopold N, Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J Phys Chem B*, 2003, **107**(24): 5723-5727
- [13] Feng S, Lin J, Cheng M, *et al.* Gold nanoparticle based surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of cancerous and normal nasopharyngeal tissues under near-infrared laser excitation. *Appl Spectrosc*, 2009, **63**(10): 1089-1094
- [14] Jiang J, Bosnick K, Maillard M, *et al.* Single molecule Raman spectroscopy at the junctions of large Ag nanocrystals. *J Phys Chem B*, 2003, **107**(37): 9964-9972
- [15] Feng S, Chen R, Lin J, *et al.* Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biosens Bioelectron*, 2010, **25**(11): 2414-2419
- [16] Sládková M, Vlcková B, Pavel I, *et al.* Surface-enhanced Raman scattering from a single molecularly bridged silver nanoparticle aggregate. *J Mol Struct*, 2009, **924-926**: 567-570
- [17] Hobro A J, Rouhi M, Blanch E W, *et al.* Raman and Raman optical activity (ROA) analysis of RNA structural motifs in Domain I of the EMCV IRES. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(4): 1169-1177
- [18] Chan J W, Taylor D S, Zwerdling T, *et al.* Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J*, 2006, **90**(2): 648-656
- [19] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev*, 2007, **42**(5): 493-541
- [20] Guo J, Cai W, Du B, *et al.* Raman spectroscopic investigation on the interaction of malignant hepatocytes with doxorubicin. *Biophys Chem*, 2009, **140**(1-3): 57-61
- [21] 姚辉璐, 朱 淼, 王桂文, 等. 单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(9): 1761-1764
- [22] Yao L H, Zhu M, Wang G W, *et al.* *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(9): 1761-1764

Effect of Silver Colloid Concentration on Electroporation for Intracellular Surface Enhanced Raman Scattering*

YU Yun^{1,2)}, LIN Ju-Qiang¹⁾, HUANG Hao²⁾, CHEN Yan-Ping³⁾, FENG Shang-Yuan¹⁾,
SU Ying³⁾, CHEN Jie-Si¹⁾, CHEN Rong^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of OptoElectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education,

Fujian Provincial Key Laboratory of Photonic Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China;

²⁾ Department of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

³⁾ Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract The effect of silver colloid concentration was explored for fastest delivery of silver nanoparticles into living C666 cells (a human nasopharyngeal carcinoma cell line) for intracellular surface enhanced raman scattering (SERS) by Electroporation. SERS spectra, the integrated SERS intensity and the reproducibility of spectrum were compared in 6 electroporation experiments of the same electric pulse parameters but different concentration of silver colloid. The silver nanoparticle concentration is best under the condition of 500 μ l electroporation buffer containing 50 μ l silver colloid using 875 V/cm, 1 ms rectangular electric pulses for electroporation twice. Increasing the concentration of silver nanoparticle could improve the SERS intensity while decrease the reproducibility of the spectrum. Moreover, the observed SERS bands of living C666 cell were tentatively assigned. This work is promising for the practical application of SERS technology, such as real time detection and analysis of the biochemical substance in living cells.

Key words surface enhanced Raman scattering(SERS), electroporation, C666 cell, silver colloid concentration

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00106

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (60778046, 60910106016), The Science and Technology Project of Fujian Province (2008J0016, 2009J01276), and The Project of Science Foundation of Ministry of Health and United Fujian Provincial Health and Education Project for Tackling the Key Research (WKJ2008-2-046).

**Corresponding author.

Tel: 86-591-83489919, E-mail: chenr@fjnu.edu.cn

Received: March 6, 2011 Accepted: March 30, 2011