

拉曼光谱在微生物研究中的应用

王桢干, 周志慧

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院感染科, 浙江 杭州)

摘要: 微生物研究依赖于微生物分离和鉴定, 传统技术是以培养作为金标准, 但是存在耗费时间、影响因素多、培养失败等情况。拉曼光谱能够快速、准确、无损伤的鉴定目标微生物, 结合单细胞分离技术还能获得单细胞菌株, 进行后续培养、单细胞分析等。虽然还存在一些难题未解决, 但拉曼光谱技术已经展现出了革命性的潜力。本综述整理了拉曼光谱的原理、分类、优缺点、目前的科研应用及新进展等。

关键词: 拉曼光谱; 菌种鉴定; 单细胞技术

中图分类号: R136.4

文献标识码: A

DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.71.070

本文引用格式: 王桢干, 周志慧. 拉曼光谱在微生物研究中的应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 151-152.

0 引言

微生物与人类生活息息相关, 在食品制造、食品安全、医疗卫生、生物能源等领域都有重要的价值。微生物研究的基础是分离和鉴定。以病原微生物为例, 早诊断早治疗对于感染性疾病的诊治至关重要, 直接影响患者预后。然而在实际的临床工作中, 微生物的分离、鉴定依赖于培养, 往往需要数天, 甚至数周的时间。还有很多病原微生物的培养条件苛刻, 甚至无法被培养。另外, 抗生素应用、标本污染、多种病原菌混合感染等因素的影响, 使得培养结果判断起来更加复杂。所以, 加快微生物的培养、鉴定一直是微生物相关行业的努力方向。

从 20 世纪 90 年代开始, 拉曼光谱技术被应用于微生物研究。该技术能够以相对较少的标本, 快速、准确、无损伤地检测微生物, 辅助进行单细胞研究。随着理论的创新、技术的进步、研究成本的降低, 使得拉曼光谱表现出越来越高的应用价值。近年来相关研究突飞猛进, 而国内拉曼光谱在微生物领域研究应用相对薄弱。本综述从拉曼光谱的基本原理开始拓展, 阐述了拉曼光谱的基本原理及衍生技术, 以及在微生物研究领域的新进展, 包括鉴定数据库的建立、表面增强拉曼标记 (ESRS-Tags)、同位素探针、光镊技术等。

1 什么是拉曼光谱

当光线透过物质时, 会发生散射, 大部分的散射光线与入射光线能量一致, 称为弹性散射, 而如果散射后光子能量发生变化, 则为非弹性散射。这一现象在 1928 年由印度物理学家拉曼首次报道, 将之命名为拉曼散射, 该散射光线的光谱称为拉曼光谱^[1]。根据散射后光子能量的变化情况, 拉曼散射可以分为斯托克斯拉曼散射 (Stokes Raman scattering) 和反斯托克斯拉曼散射 (anti-Stokes Raman scattering)。斯托克斯拉曼散射的能量较入射光线低, 反斯托克斯拉曼散射则从被照射分子中获得能量。斯托克斯散射光线强度更大, 更容易被接收。拉曼光谱反应的是物质分子内部化学键的情况, 故而能够通过测定代谢分子情况确定微生物的种类、生理特征、营养情况和突变类型等。

发生拉曼效应的光子仅为入射光线的 $1/10^6$, 所以拉曼光谱的检测需要昂贵的仪器和专业的操作人员, 这也极大地限制了拉曼光谱的研究和应用。为了增强拉曼效应, 稳定拉曼光谱, 加强特异性检测的能力, 发展出了很多衍生方法。表面增强拉曼光谱 (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS), 应用纳米级金属微粒 (多为金、银) 包裹或待测微生物置于粗糙金属的表面能够将拉曼效应提高 $10^6 \sim 10^{14}$ 倍^[2,3]。将用于 SERS 测定的纳米颗粒进一步修饰获得表面增强拉曼标记 (ESRS-Tags), 能够在抗体的作用下特异性结合待检测物, 并且能够进一步强化拉曼效应, 大大降低了对于标本量的要求^[4]。当可激发物质被光线照射成为激发状态后, 会产生不同能量等级的拉曼散射, 被称作共振拉曼散射^[5] (resonance Raman scattering)。共振拉曼意味着使用不同的激发光线能够选择性地增强可激发物质的检测, 特别适用于产色素微生物的检验。

2 拉曼光谱技术目前在微生物研究领域的应用

2.1 用于细菌代谢产物的检测

与显微技术结合的拉曼显微光谱学 (Raman microspectroscopy) 能够在 $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 单细胞水平检测全细胞拉曼光谱指纹图谱 (whole-cell Raman spectroscopic fingerprints), 故而能够在少量的样本中

检测出较低浓度的微生物^[6]。全细胞拉曼光谱指纹图谱包含了细胞内所有生物学信息, 包括核酸、蛋白质、脂质和糖类等, 可以通过一些物质的特异表现来进行测定。以细胞壁研究为例, Lemma T 等^[7]应用纳米银颗粒完成了阴性菌和阳性菌 SERS 的测定, 对比发现阳性菌会在 497cm^{-1} 处形成一个代表细胞壁多糖类物质的波峰, 这是阴性菌所没有的。

类胡萝卜素是一种细菌产生的色素, 因结构不同而在共振拉曼光谱 157cm^{-1} 和 $1500 \sim 1550 \text{cm}^{-1}$ 的波谱上表现出特征性变化。德国科学家^[8]通过这一原理成功从混合菌群中将 5 种不同的细菌分离出来。我国陶站华等^[9]通过测定金黄色葡萄球菌拉曼光谱, 发现 1523cm^{-1} 处的峰值强度与紫外可见分光光度法所测得色素含量有很好的线性关系, 相关系数为 0.9772, 以此建立了拉曼光谱测定金黄色葡萄球菌色素合成的方法。

拉曼光谱技术与同位素探针 (Stable isotope probing, SIP) 结合可以用于细菌代谢的检测, 常用的同位素为 ^2H , ^{13}C , ^{15}N ^[10]。若细菌利用 ^{13}C 为碳源进行生物合成, 拉曼光谱会发生红移现象, 其中最具有代表性的是苯丙氨酸的光谱变化。如果苯丙氨酸苯环第 0、2、4、6 位碳原子使用 ^{13}C 来合成, 那么其对应的峰值会向前移动, 从 1004cm^{-1} 处前移至 969cm^{-1} 处^[11]。LI 等^[12]人使用 ^{13}C 标记的 CO_2 作为光合作用的原料, 从野生型海藻中筛选出固碳作用更强的菌株。

2.2 用于细菌菌种及耐药性的鉴定

拉曼光谱的高敏感性使其能够在不同种的病原微生物之间表现出足够大的差异, 从而完成鉴定。并且由于其省略了培养过程, 检测结果快速, 能够极大地提高早诊断早治疗的能力。其鉴定过程类似于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF), 通过已知分类的标准菌株进行拉曼光谱测定, 建立拉曼光谱数据库, 以电脑分析的方法建立预测模型, 测量待测微生物拉曼光谱后使用模型完成鉴定^[16]。

拉曼光谱鉴定系统仍然处于开发阶段, 有些问题亟待解决。如菌株光谱的识别问题, 金黄色葡萄球菌的 SERS 光谱与腺嘌呤的光谱类似, 鲍曼不动杆菌的 SERS 光谱与黄嘌呤的光谱类似^[13]。所以只有建立足够庞大的光谱数据库, 才能建立准确地识别方法, 保证鉴定的准确性。德国科学家检测了 26 种分枝杆菌, 包括结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和鸟分枝杆菌等, 共 8845 株菌株, 建立了分枝杆菌的拉曼光谱数据库, 能够将未知分枝杆菌鉴定至种水平, 准确率达到了 94.3%^[14]。

菌种鉴定的准确性同样有赖于算法的优化。在一篇最新的研究中^[15], 实验人员将 5 种常见的尿路感染病原菌混合, 使用了三种不同的多元变量分析方法 (principal component analysis, PCA; partial least square-discriminate, PLS-DA; support vector machine, SVM) 来构建预测模型, 结果显示 PCA、PLS-DA 均存在缺陷, 预测效果不佳, 而 SVM 模型预测准确率达到 96%。

除了菌种的鉴定, 拉曼光谱还能够直接检测菌株的耐药性。Tien N 等^[16]收集了尿路感染患者的脓尿标本, 同时进行培养和拉曼光谱测定, 培养后行药敏检测, 将大肠杆菌分为产 ESBLs (Extended Spectrum Beta-Lactamases, 超广谱 β 内酰胺酶) 组和非产 ESBLs 组, 发现产 ESBLs 的大肠杆菌会在 729cm^{-1} 处会比头孢菌素敏感的大肠杆菌呈现更低的峰值。

2.3 用于菌株的分离

拉曼光谱技术可以快速检测细菌, 定位目标细菌, 而不对细菌

产生损伤。结合其他的单细胞分离技术,比如光镊技术,可以获得单细胞菌株。光镊技术(laser tweezers),也叫激光陷阱(optical trapping),能够通过强光束来控制单个细菌移动,从而达到单细胞分离的目的,对于混合菌群、苛养菌、异质性细菌研究有很重要的意义。

2018年德国科学家^[17]开发了一块微流控芯片,结合光镊技术分离出单细胞大肠埃希菌,比较了有无抗生素压力下单细胞大肠埃希菌共振拉曼光谱的变化情况,发现了多个明显变化的峰,后续PCA分析峰值差异存在明显的统计学意义。对于单个细菌的耐药性研究能够让我们更好地理解异质性耐药的问题。

Huang W E等^[18]从酿酒酵母、大肠埃希菌和荧光假单胞菌的混合液中,通过表面增强拉曼光谱测定,使用光镊技术分离,成功获得单细胞菌株,并且能够通过培养再次形成菌落,经鉴定为同一种菌株。另外还验证了单细胞测序的方法,接近一半的菌株基因组能被正确扩增。

3 总结和展望

拉曼光谱检测的优点显而易见:所需的样品量少、检测能力强、标本鉴定预处理简单、结果报告快、对于菌体无损伤、分离和鉴定可以同时进行。但是同样存在一些问题,比如拉曼光谱的高敏感性,细菌种类、生长环境、生长状态、标本制备过程等因素都能够影响光谱的形态^[19,20]。而目前的鉴定系统主要针对少数几个菌种的混合标本,对于全菌种的鉴定还有一定的距离。拉曼光谱测定的入射光线波长、检测波谱范围、样本的预处理等均不统一,期待标准检测方案地制订,能过规范标本的获取、预处理、光谱数据处理等。

虽然目前这项技术还未足够成熟,不能直接应用于工作,而且存在各种问题,但是我们可以看到它具有革命性的潜能,值得推广研究。

参考文献

- [1] Ivleva N P, Kubryk P, Niessner R. Raman microspectroscopy, surface-enhanced Raman scattering microspectroscopy, and stable-isotope Raman microspectroscopy for biofilm characterization[J]. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2017,409(18):4353-4375.
- [2] Cialla D, Maerz A, Boehme R, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends[J]. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2012,403(1):27-54.
- [3] Pahlow S, Maerz A, Seise B, et al. Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy[J]. ENGINEERING IN LIFE SCIENCES, 2012,12(2):131-143.
- [4] Tien N, Chen H, Gau S, et al. Diagnosis of bacterial pathogens in the dialysate of peritoneal dialysis patients with peritonitis using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. CLINICA CHIMICA ACTA, 2016,461:69-75.
- [5] Lorenz B, Wichmann C, Stoeckel S, et al. Cultivation-Free Raman Spectroscopic Investigations of Bacteria[J]. TRENDS IN MICROBIOLOGY, 2017,25(5):413-424.
- [6] Stoeckel S, Kirchhoff J, Neugebauer U, et al. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms[J]. JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY, 2016,47(1S):89-109.
- [7] Lemma T, Salinemi A, Hynninen V, et al. SERS detection of cell surface and intracellular components of microorganisms using nano-aggregated Ag substrate[J]. VIBRATIONAL SPECTROSCOPY, 2016,83:36-45.
- [8] Kumar V B N, Kampe B, Roesch P, et al. Characterization of carotenoids in soil bacteria and investigation of their photodegradation by UVA radiation via resonance Raman spectroscopy[J]. ANALYST, 2015,140(13):4584-4593.
- [9] 陶站华,刘军贤,师德强,等.基于单细胞拉曼光谱技术的葡萄球菌黄色素生物合成分析[J].分析化学,2016,44(03):456-461.
- [10] Wang Y, Huang W E, Cui L, et al. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy[J]. CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 2016,41:34-42.
- [11] Kubryk P, Koelschbach J S, Marozava S, et al. Exploring the Potential of Stable Isotope (Resonance) Raman Microspectroscopy and Surface-Enhanced Raman Scattering for the Analysis of Microorganisms at Single Cell Level[J]. ANALYTICAL CHEMISTRY, 2015,87(13):6622-6630.
- [12] Li M, Canniffe D P, Jackson P J, et al. Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities[J]. ISME JOURNAL, 2012,6(4):875-885.
- [13] Premasiri W R, Lee J C, Sauer-Budge A, et al. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS[J]. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2016,408(17):4631-4647.
- [14] Stoeckel S, Meisel S, Lorenz B, et al. Raman spectroscopic identification of Mycobacterium tuberculosis[J]. JOURNAL OF BIOPHOTONICS, 2017,10(5):727-734.
- [15] Yogesha M, Chawla K, Bankapur A, et al. A micro-Raman and chemometric study of urinary tract infection-causing bacterial pathogens in mixed cultures[J]. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2019,411(14):3165-3177.
- [16] Tien N, Lin T, Hung Z, et al. Diagnosis of Bacterial Pathogens in the Urine of Urinary-Tract-Infection Patients Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy[J]. MOLECULES, 2018,23(337412).
- [17] Pilat Z, Bernatova S, Jezek J, et al. Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman Spectroscopy of E-coli under Antibiotic Stress[J]. SENSORS, 2018,18(16235).
- [18] Huang W E, Ward A D, Whiteley A S. Raman tweezers sorting of single microbial cells[J]. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY REPORTS, 2009,1(1):44-49.
- [19] Neugebauer U, Roesch P, Popp J. Raman spectroscopy towards clinical application: drug monitoring and pathogen identification[J]. INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, 2015,46(1):S35-S39.
- [20] Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, et al. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy[J]. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 2015,89:105-120.

(上接第 150 页)

- [1] Am Heart J, 2012,164:893-901.
- [2] Burks TN, Andres-Mateos E, Marx R, et al. Losartan restores skeletal muscle remodeling and protects against disuse atrophy in sarcopenia[J]. Sci Transl Med, 2011,3(82):82ra37.
- [3] 毛智慧,刘晓亭,孙晓婷,等.刘晓亭运用“脾主肌肉四肢”理论治疗老年肌肉衰减综合征思路浅析[J].辽宁中医杂志,2017,44(07):1407-1409.
- [4] 李魏,刘晓亭.药膳干预对衰老大鼠骨骼肌抗氧化能力的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(16):3985-3987.
- [5] 张淑,袁明,吴士文.血府逐瘀胶囊对模拟失重下骨骼肌萎缩的防护

作用[J].中华灾害救援医学,2016,4(11):618-623.

- [11] 杨静,陈鹏.经筋推拿改善老年肌少症患者下肢肌肉力量与质量临床观察[J].浙江中医杂志,2016,51(10):753.
- [12] 何兴伟,黄建华.痿证从督脉论治探讨[J].中国针灸,2008(03):231-233.
- [13] 邱凤娟,韩云,商庆新.带脉与痿证治疗关系体会[J].山东中医杂志,2013,32(03):171-172.
- [14] 孙晓婷,李魏,于睿,等.穴位贴敷对衰老大鼠 Caspase-3 和 Caspase-8 因子表达的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(15):3754-3756.