УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
Том 151, кн. 1 Физико-математические науки *2009*

УДК 57.083.12

НАНОМОДИФИЦИРОВАННЫЕ БАКТЕРИИ: ДЕТЕКЦИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНО-УСИЛЕННОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.И. Замалеева, М. Кахраман, М. Чулха, Р.Ф. Фахруллин

Аннотация

В данной работе описан метод модификации клеток нанопленками и серебряными наночастицами для усовершенствования техники поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии. Первоначально клетки покрывали полиэлектролитными пленками поли(аллиламин) гидрохлорида и/или поли(стирен) сульфоната, обрабатывали серебряными наночастицами и повторно наносили бислойную пленку для закрепления наночастиц на поверхности клетки. Методами сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии было показано, что наночастицы и их агрегаты формируют плотный, равномерный слой на поверхности клеток. Предложенная нами техника обработки клеток наночастицами облегчает визуализацию модифицированных клеток вследствие способности наночастиц отражать свет. В качестве объекта исследования были выбраны клетки *Escherichia coli*, в качестве контроля – клетки *Staphylococcus cohnii*. Было показано, что спектры наномодифицированных бактерий содержат пики, характерные для каждого вида микроорганизма, обусловленные химическим составом клеточной стенки бактерий. Было также установлено, что сигнал рамановского спектра характеризуется высокой воспроизводимостью. Мы предполагаем, что описанный нами метод позволит идентифицировать единичные клетки разных видов бактерий в смеси.

Ключевые слова: метод послойного нанесения, полиэлектролитные нанопленки, серебряные наночастицы, единичная клетка, поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия.

Введение

Высокоточная детекция и идентификация микроорганизмов является актуальной проблемой для биологии и биомедицины. Используемые ныне микробиологические методы не всегда эффективны, особенно в тех случаях, когда необходимо детектировать единичные клетки. Генетические методы (полимеразная цепная реакция и другие) значительно эффективнее, но требуют больших затрат времени, реактивов и дорогостоящего оборудования [1]. Спектроскопические методы сочетают в себе высокую точность и простой процесс подготовки образца к анализу [2, 3]. Широкие возможности открывает спектроскопия комбинационного рассеивания (рамановская спектроскопия), позволяющая определять микроорганизмы по уникальному для каждого вида спектру [4]. Однако для детекции незначительного количества клеток необходимо усилить слабый спектроскопический сигнал. Это достигается путем модификации клеток металлическими наночастицами [5]. В основе усиления сигнала комбинационного рассеивания лежит явление поверхностно-плазмонного резонанса, когда делокализованные поверхностные электроны наночастиц благородных металлов на порядки усиливают сигнала рамановского спектра (данная техника анализа называется поверхностно-усиленной

рамановской спектроскопией) [6]. Обычно нанесение наночастиц на поверхность клеток осуществляется непосредственно, путем внесения клеток в суспензию наночастиц [7]. Клетки вступают в контакт с наночастицами, которые хаотически присоединяются к клеточной стенке. Это приводит к агрегации клеток, что делает невозможным идентификацию единичных микроорганизмов. Более того, неравномерное покрытие клеток наночастицами при непосредственном смешивании также неблагоприятно влияет на воспроизводимость анализа [8]. Таким образом, весьма актуальным представляется разработка метода, который позволил бы закрепить наночастицы на поверхности клеток равномерно и без образования межклеточных агрегатов для эффективной детекции отдельных клеток с помощью поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии.

1. Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: поли(аллиламингидрохлорид, PAH) (MB – 15 кДа) (Sigma, США), поли(стиренсульфонат, PSS) (MB – 70 кДа) (Sigma,США). Для приготовления всех растворов использовали бидистиллированную воду bdH_2O.

Объектами исследования явились клетки *Escherichia coli*. Клетки бактерий *Staphylococcus cohnii* использовали в качестве контроля. Культивирование микроорганизмов проводили при 37^oC в течение 24 ч на питательной агаризованной среде.

1.1. Синтез серебряных наночастиц [9]. 45 мг нитрата серебра растворяли в 250 мл дистиллированной воды, доводили до кипения. Затем в кипящий раствор нитрата серебра в круглодонной колбе вливали по капле 40 мл цитрата натрия с концентрацией 1 мг/мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Смесь кипятили 10 мин до выпадения осадка. Затем наночастицы фильтровали с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 220 нм. Последним этапом раствор наночастиц диализовали в бидистиллированной воде в течение недели и фильтровали через фильтры диаметром 0.22 мкм.

1.2. Метод модификации клеток. В работе использовали 2 метода модификации клеток. Первый из них включал следующие этапы.

Первоначально клетки покрывали противоположно заряженными полиэлектролитами PAH и PSS путем послойного нанесения, затем обрабатывали серебряными (nanoAg) наночастицами, стабилизированными цитратом натрия. На последнем этапе на поверхность клеток наносили бислойную пленку PAH/PSS для закрепления наночастиц и уменьшения агрегации клеток. В результате была получена следующая структура покрытий клеток микроорганизмов: PAH/PSS/PAH/nanoAg/PAH/PSS.

Второй метод осуществлялся аналогично описанному выше методу, но без использования отрицательно зараженного полиэлектролита PSS. В результате получали клетки микроорганизмов, модифицированные многослойной пленкой PAH/nanoAg/PAH.

1.3. Сканирующая электронная микроскопия. Для получения изображений наномодифицированных клеток с высоким разрешением использовали сканирующий электронный микроскоп Carl Zeiss Evo-40 (Германия). Образцы помещали в камеру электронного микроскопа и получали изображение при напряжении электронного луча 10 kV. Были получены типичные изображения клеток при увеличении 20000–25000 раз.

Подготовка образцов заключалась в следующем: 5 мкл суспензии клеток наносили на обезжиренную поверхность покровного стекла и высушивали в термостате при 37 °C в течение 12 ч. Затем покровные стекла помещали в прибор для напыления (Baltec SCD 005) и наносили тонкий слой золота (~ 10 нм) на поверхность стекол.

1.4. Атомно-силовая микроскопия. Эксперименты выполнялись на атомно-силовом микроскопе Park Systems (Япония) с использованием бесконтактных кремниевых кантилеверов с радиусом кривизны острия менее 10 нм. Сканирование проводилось в бесконтактном режиме АСМ.

Подготовка образцов заключалась в следующем: 10 мкл суспензии клеток наносили на обезжиренную поверхность покровного стекла и высушивали в термостате при 37 °C в течение 1 ч. При сканировании наночастиц 10 мкл раствора наночастиц наносили на поверхность слюды и высушивали в термостате при 37 °C в течение 1 ч.

1.5. Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия. Спектры были получены с помощью автоматизированного рамановского микроскопа Renishaw InVia Reflex (Renishaw Plc., Англия), оснащенного диодом (830 нм) и аргоновым лазером (514 нм). Образцы помещали в камеру рамановского микроскопа, фокусировались при помощи микроскопа отраженного света и через 10 с получали спектр при интенсивности лазерного луча $0.2 \div 6$ mW. В работе использовали объектив с увеличением $\times 50$, числовой апертурой – 0.6. Подготовка образцов осуществлялась следующим образом: 20 мкл суспензии модифицированных клеток наносили на поверхность подложек, изготовленных из фторида кальция, и высушивали под струей азота.

2. Результаты и обсуждение

Подготовка образца живых клеток для получения рамановского спектра является одной из ключевых стадий спектрометрической идентификации микроорганизмов и во многом ограничивает детекцию единичных клеток. Наночастицы благородных металлов должны находиться в непосредственном контакте с клеточной стенкой, и в то же время нежелательно проникновение наночастиц внутрь клетки. Ранее было показано, что процедура обработки клеток наночастицами в результате неопосредованного смешивания приводит к формированию большого количества агрегатов клеток, что делает невозможным детекцию единичных клеток и существенно понижает воспроизводимость анализа [10].

В данной работе клетки покрытвались наночастицами таким образом, что клеточные стенки были предварительно инкапсулированы в оболочки, состоящие из полиэлектролитных нанопленок. Метод нанесения противоположно-заряженных полимеров широко используется для модификации планарных поверхностей и частиц [11–15]. Мы использовали в качестве поликатиона поли(аллиламин)гидрохлорид, а в качестве полианиона – поли(стирен)сульфонат. Серебряные наночастицы синтезировали цитратным методом. Было показано, что суспензия наночастиц обладает высокой коллоидной стабильностью. По гистограммам распределения наночастиц по высоте (рис. 1), полученных при помощи атомно-силовой микроскопии, были установлены средние размеры наночастиц: 45 ± 7 нм. В результате формирования чередующихся слоев пленок и наночастиц суспензии клеток приобретали характерную бурую окраску (типичную для серебряных наночастиц), что детектировалось невооруженным глазом.

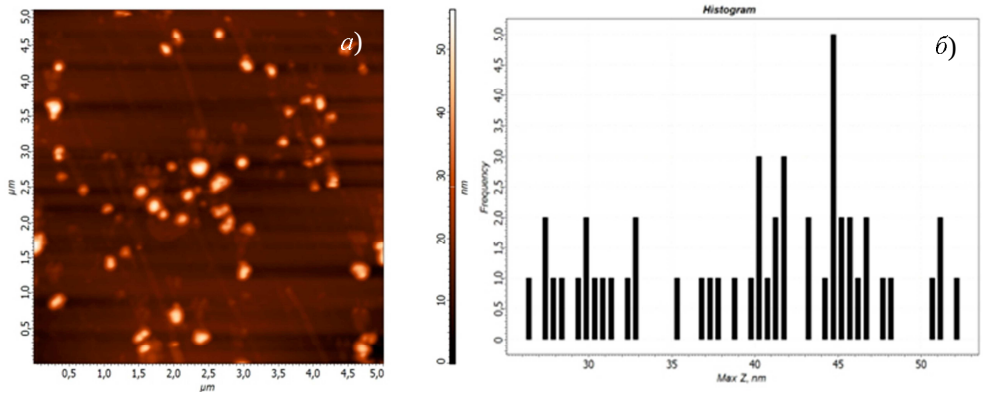

Рис. 1. *а*) АСМ-изображение серебряных наночастиц, *б*) гистограмма распределения серебряных наночастиц по высоте

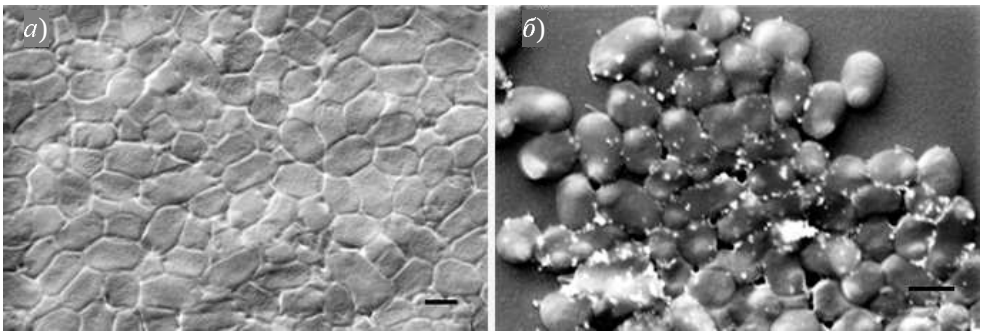

Рис. 2. Электронные микрофотографии бактерий *E. coli*: *а*) интактные клетки, *б*) модифицированные серебряными наночастицами

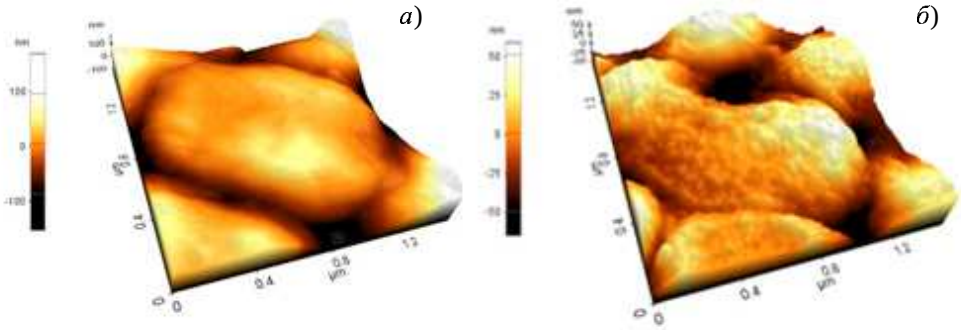

Рис. 3. АСМ-изображения клеток *E. coli*: *а*) интактная, *б*) модифицированная серебряными наночастицами

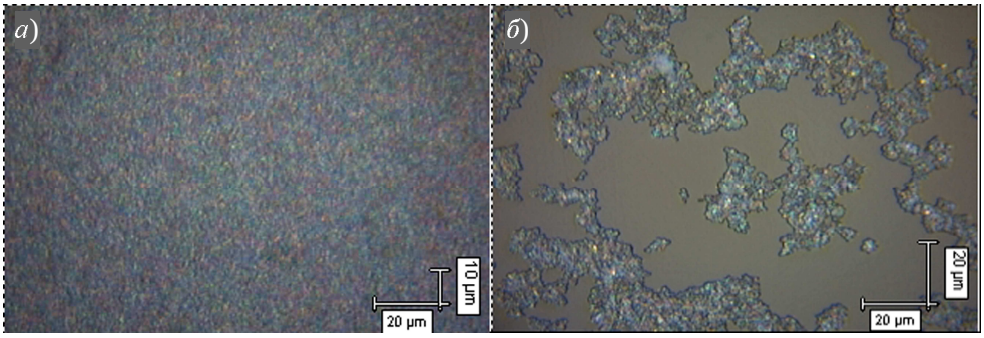

Рис. 4. Микрофотографии микроскопии отраженного света бактерий *E. coli*: *а*) интактные клетки, *б*) модифицированные серебряными наночастицами

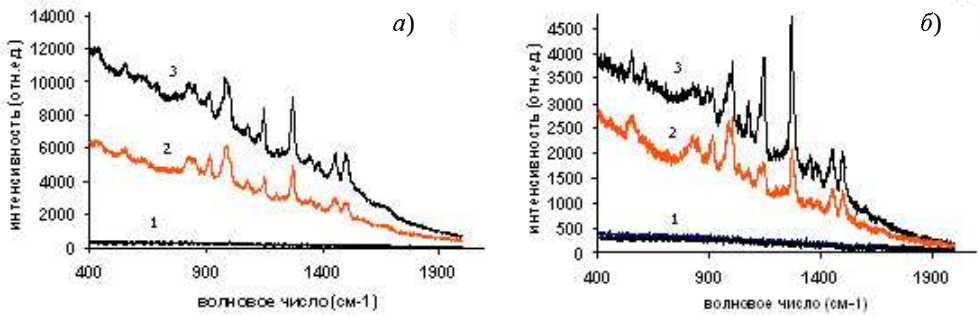

Рис. 5. Рамановский спектр клеток *E. coli* в зависимости от типа модификации: *а*) PAH/nanoAg/PAH, *б*) PAH/PSS/PAH/nanoAg/PAH/PSS; 1) интактные, 2, 3) модифицированные клетки

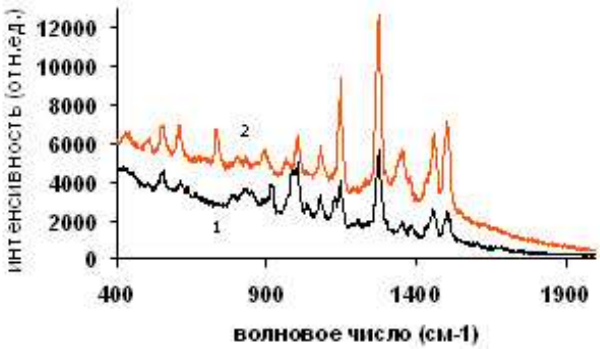

Рис. 6. Рамановские спектры модифицированных клеток *E. coli* (1) и *S. cohnii* (2)

Далее поверхность бактерий *E. coli* была исследована методом сканирующей электронной микроскопии, которая позволяет изучить модифицированную поверхность с высоким разрешением. На электронных микрофотографиях бактерии *E. coli* (рис. 2), модифицированной пленками и наночастицами, четко видны агрегаты металлических наночастиц, изменяющих однородную, ровную поверхность клеток.

Атомно-силовая микроскопия показала формирование плотного и равномерно распределенного слоя наночастиц на поверхности клеток. Как показано на рис. 3, модифицированная клетка *E. coli* характеризуется шероховатой поверхностью, обусловленной присоединением отрицательно заряженных наночастиц к положительно заряженной пленке. При этом нанесение дополнительных пленок поверх наночастиц позволяет зафиксировать их на поверхности клеток, предотвратив механическое удаление наночастиц при манипуляциях с образцом. Для сравнения показана немодифицированная клетка, поверхность которой относительно ровная и гладкая.

Автоматизированная система рамановского микроскопа представляет собой комбинацию микроскопа отраженного света и спектрометра комбинационного рассеивания. Как видно из рис. 4, после обработки наночастицами клетки приобретают металлический блеск, характерный для серебра. Этот факт объясняется способностью наночастиц при высушивании агрегировать и отражать видимый свет. Была также замечена тенденция к уменьшению количества агрегатов, модифицированных нанопленками и наночастицами клеток, по сравнению с интактными (рис. 4, *б*). Благодаря этим двум свойствам стало возможным сфокусироваться на отдельных клетке и получить спектр единичной клетки *E. coli*.

Два различных подхода к модификации клеток были применены в данной работе. В первом случае мы использовали пленку, состоящую из PAH/nanoAg/PAH, а во втором – PAH/PSS/PAH/nanoAg/PAH/PSS. Рамановские спектры модифицированных и немодифицированных клеток показаны на рис. 5. Видно, что спектр клеток, модифицированных как первым, так и вторым способом, содержит характерные для данного микроорганизма пики, тогда как в спектре немодифицированных клеток невозможно различить четкие пики. Экспериментальные результаты говорят о том, что наночастицы находятся в непосредственной близости от клеточной стенки, но не проникают внутрь, так как расположение спектральных пиков существенно отличается от картины, полученной при введении коллоидного серебра внутрь клеток кишечной палочки [16]. Подробные сведения о природе возникновения спектральных пиков при характеристике *E. coli* с помощью рамановской спектроскопии опубликованы ранее [17].

Было показано, что сигнал рамановского спектра модифицированных клеток характеризуется высокой воспроизводимостью независимо от метода модификации. На рис. 5 (2 и 3) представлены рамановские спектры от разных образцов модифицированных клеток *E. coli*.

Для того чтобы продемонстрировать возможность применения данного метода для распознавания клеток бактерий, мы получили спектры клеток микроорганизма *S. cohnii*, обработанного наночастицами и полиэлектролитами. Как видно из рис. 6, спектр стафиллокока существенно отличается от спектра кишечной палочки. Это связано с различным содержанием поверхностных биомакромолекул данных видов бактерий (первый вид является грамотрицательным, а второй – грамположительным микроорганизмом) [18]. Совпадение ряда пиков вызвано наличием ряда веществ (полисахаридов, белков), одинаково присущих и для *E. coli*, и для *S. cohnii*.

Заключение

Предложенный нами метод в обеих вариациях позволяет эффективно иммобилизовать наночастицы на поверхности клеток бактерий и затем определять их видовой состав методом рамановской спектроскопии. Использование таких методик, как картирование участков поверхности при помощи рамановского микроскопа и визуализация клеток по заданному характеристическому пику, позволило не только детектировать клетки одного вида, но и разделить несколько видов микроорганизмов в смеси. Если применение системы PAH/nanoAg/PAH для модификации является менее ресурсоемким и более быстрым, то использование пленок PAH/PSS/PAH/nanoAg/PAH/PSS позволяет получить высокодисперсные суспензии единичных клеток. Описанный нами метод может быть использован не только для модификации клеток бактерий, но и микромицетов, водорослей, а также в перспективе – растений и животных.

Summary

A.I. Zamaleeva, M. Kahraman, M. Culha, R.F. Fakhrullin. Nanomodified Bacteria: Detection of Individual Cells Using Surface-Enhanced Raman Scattering.

The layer-by-layer method of coating bacterial cells with polyelectrolytes and silver nanoparticles for improving the surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra is reported. First, the bacteria cell wall is coated with poly(allylamine) hydrochloride (PAH) and/or poly(styrene) sulfonate (PSS) and then with citrate reduced silver nanoparticles. In order to increase the stability of the coating, other layers of PAH/PSS are formed on the surface. The SEM and AFM images indicate isolated nanoparticles and aggregates of nanoparticles on the bacterial wall. The coating of bacterial cells with silver nanoparticles not only serves for their preparation for SERS measurement but also helps to visualize the coated bacterial cells under the ordinary whitelight microscope objective due to efficient light scattering properties of silver nanoparticles. The two bacteria that differ in shape and cell wall biochemical structure, *Escherichia coli* and *Staphylococcus cohnii*, Gram-negative and Gram-positive respectively, are used as models. Reproducible SERS spectra were obtained from single and aggregated silver nanoparticle-coated cells. These spectra can provide valuable information about chemical structure of bacterial cell wall. Preliminary results reveal that the approach could be used for single bacterial cell identification. Key words: layer-by-layer, polyelectrolyte nanofilms, silver nanoparticles, single cell, surface-enhanced Raman scattering.

Key words: layer-by-layer method, polyelectrolyte nanofilms, silver nanoparticles, single cell, surface-enhanced Raman scattering.

Литература

1. *Smith C.J., Osborn A.M.* Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology // FEMS Microbiol Ecol. – 2009. – V. 67, No 1. – P. 6–20.
2. *Naumann D., Helm D., Labischinski H., Giesbrecht P.* The characterization of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) // Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis. – 1991. – P. 133–141.
3. *Puppels G.J., De Mul F.F., Otto C., Greve J., Robert-Nicoud M., Arndt-Jovin D.J.* Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy // Nature (London). – 1990. – V. 347. – P. 301–303.
4. *Otto A.* Investigations of electrode surfaces in acetonitrile solutions using surface-enhanced Raman spectroscopy // Light Scattering. In Solids. – 1984. – V. 4. – P. 289–296.
5. *Premasiri W.R., Moir D.T., Klempner M.S., Krieger N., Jones G., Ziegler L.D.* Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria // J. Phys. Chem. – 2005. – V. 109. – P. 312–320.

6. *Chang R.K., Furtak T.E.* Surface Enhanced Raman Scattering. – New York, London: Plenum Press, 1982. – 432 p.

7. *Laucks M.L., Sengupta A., Junge K., Davis E.J., Swanson B.D.* Comparison of Psychroactive Arctic Marine Bacteria and Common Mesophillic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // Appl. Spectrosc. – 2005. – V. 59. – P. 1222–1228

8. *Kahraman M., Yazici M.M., Єahin F., Bayrak Ö.F., Çulha M.* Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles // Appl. Spectrosc. – 2007. – V. 61. – P. 479–485.

9. *Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L.* // Science. – 2000. – V. 289. – P. 1757.

10. *Jarvis R.M., Brooker A., Goodacre R.* Rapid analysis of microbiological systems using SERS // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – P. 5198–5202.

11. *Arida A.I., Al-Tabakha M.M.* Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2007. – V. 66, No 1. – P. 48–54.

12. *Correa-Duarte M.A., Kosiorek A., Kandulski W., Giersig M., Liz-Marzan L.M.* Layer-by-Layer Assembly of Multiwall Carbon Nanotubes on Spherical Colloids // Chem. Mater. – 2005 – V. 17, No 12. – P. 3268–3272.

13. Multilayer Thin Films / Eds. G. Decher, J.B. Schlenoff. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2002. – 535 p.

14. *Diaspro A., Silvano D., Krol S., Cavalleri O., Gliozzi A.* Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells // Langmuir. – 2002. – V. 18. – P. 5047–5050.

15. *Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A., Möhwald H.* Layer-by-layer Self Assembly of Polyelectrolytes on Colloidal Particles // Colloid Surface A. – 1998. – V. 137, No 1–3. – P. 253–266.

16. *Zeiri L., Bronk B., Shabtai V.Y., et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria // Appl. Spectrosc. – 2004. – V. 58. – P. 33–40.

17. *Kahraman, M. Muge Y. M., Fikrettin Süahin, Culha M.* Convective Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering // Langmuir. – 2008. – V. 24. – P. 894–901.

18. *Sengupta A., Mujacic M., Davis E.* Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy // J. Anal. Bioanal. Chem. – 2006. – V. 386. – P. 1379–1388.

Поступила в редакцию
21.01.09

Замалеева Алсу Ильгизовна – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.
E-mail: *alsu130ksu@mail.ru*

Мехмет Кахраман – аспирант Стамбульского технического университета, Турция.
E-mail: *mkahraman@yeditepe.edu.tr*

Мустафа Чулха – кандидат химических наук, доцент факультета генетики и биоинженерии Университета Едитепе (Yeditepe University), г. Стамбул, Турция.
E-mail: *mculha@yeditepe.edu.tr*

Фахруллин Равиль Фаридович – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии Казанского государственного университета.
E-mail: *biosensor@bk.ru*