

学校编号: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520071152566

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

干净、均一的 SERS 基底的制备及其
用于不同种类细胞的鉴别

Preparation of Clean and Uniform Surface-Enhanced
Raman Substrates for Identification of Various Cells

徐 燕 慧

指导教师姓名: 任 斌 教授

石 巍 副教授

专业名称: 生物医学工程

论文提交时间: 2010 年 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予时间: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

**Preparation of Clean and Uniform Surface-Enhanced
Raman Substrates for Identification of Various Cells**



A Thesis Submitted for Degree of

Master of Science

By

Yan-hui Xu

Directed by

Professor Bin Ren

Associate Professor Wei Shi

Department of Biomaterials, Xiamen University

June, 2010

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):
年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 绪论	1
1.1 单细胞研究与癌症诊断	1
1.1.1 细胞的结构与功能	1
1.1.2 癌细胞简介	4
1.1.3 癌症诊断	7
1.1.4 单细胞分析技术概览	8
1.2 拉曼光谱和表面增强拉曼光谱简介	10
1.2.1 拉曼光谱简介	10
1.2.2 表面增强拉曼光谱简介	11
1.3 SERS 基底的制备和除杂	12
1.3.1 SERS 基底的制备方法	12
1.3.2 SERS 基底的除杂方法	16
1.4 拉曼光谱和 SERS 在生物学方面的应用	19
1.4.1 拉曼光谱在生物学方面的应用	19
1.4.2 SERS 在生物学方面的应用	23
1.5 本论文的研究目的和主要内容	29
参考文献	31
第二章 实验	43
2.1 试剂	43
2.2 仪器	44
2.2.1 实验器具及其处理	44
2.2.2 合成和分离实验装置	44
2.2.3 拉曼光谱仪及检测装置	45
2.2.4 扫描电镜	48
2.2.5 等离子体清洗仪	49

2.3 细胞培养及观察	52
2.3.1 细胞培养仪器及器皿	52
2.3.2 器皿的清洗及消毒	53
2.3.3 溶液配制	53
2.3.4 细胞培养操作	54
2.3.5 细胞冻存与复苏	55
2.3.6 细胞培养注意事项	56
参考文献	57
第三章 探索制备均一的、具有强增强效应的 SERS 基底	58
3.1 三种合成直径为 60 nm Au 纳米粒子溶胶的方法	60
3.1.1 盐酸羟胺种子生长法	60
3.1.2 柠檬酸钠一步还原法	61
3.1.3 柠檬酸钠种子生长法	61
3.2 三种合成方法制备的金纳米粒子的比较	61
3.2.1 三种合成方法的纳米粒子的扫描电镜表征	61
3.3 基底的修饰和三种纳米粒子的组装效果比较	62
3.3.1 ITO 基底的清洗、活化和化学处理	62
3.3.2 三种纳米粒子的组装效果比较	63
3.4 SERS 基底的拉曼活性表征	65
3.5 提高基底组装密度的条件优化	66
3.5.1 优化组装时间	67
3.5.2 SERS 基底的活性表征	68
3.6 拉曼显微成像表征基底的均匀性	69
本章小结	70
参考文献	70
第四章 SERS 基底除杂条件探索	74
4.1 等离子体清洗 SERS 基底	75
4.1.1 SERS 基底清洗效果表征	75
4.2 SERS 基底清洗后的活化处理	78

本章小结	92
参考文献	93
第五章 SERS 基底的应用-鉴别不同种类的细胞	95
5.1 不同种类细胞的拉曼光谱	96
5.1.1 肝正常细胞和肝癌细胞的拉曼光谱	96
5.1.2 不同种癌细胞拉曼光谱的比较	97
5.2 SERS 基底鉴别不同种类的细胞	100
5.2.1 肝正常细胞和肝癌细胞的鉴别	101
5.2.2 不同种类癌细胞的鉴别	106
5.2.3 细胞生长状态的 SERS 监测	108
本章小结	112
参考文献	113
结论与展望	115
作者攻读硕士学位期间发表与交流论文	117
致谢	118

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Single cell research and cancer diagnosis	1
1.1.1 Cell structure and function	1
1.1.2 Cancer cell introduction	4
1.1.3 Cancer diagnosis	7
1.1.4 Analytical techniques for single cell	8
1.2 Raman Spectroscopy and Surface-enhanced Raman Spectroscopy	10
1.2.1 Raman Spectroscopy	10
1.2.2 Surface-enhanced Raman Spectroscopy	11
1.3 Preparation and Removing impurities of SERS substrates	12
1.3.1 Preparation of SERS substrates	12
1.3.2 Removing impurities from SERS substrates	16
1.4 Application of Raman Spectroscopy and SERS in biomedicine	19
1.4.1 Application of Raman Spectroscopy in biomedicine	19
1.4.2 Application of SERS in biomedicine	23
1.5 Objectives and main contents of this thesis	29
References	31
Chapter 2 Experimental	43
2.1 Reagents	43
2.2 Instruments	44
2.2.1 Experimental apparatus and cleaning	44
2.2.2 Synthesis and centrifugation apparatus	44
2.2.3 Raman spectroscopy and detection setup	45
2.2.4 Scanning electron microscope	48
2.2.5 Plasma cleaner	49
2.3 Cell culture and observation	52

2.3.1 Instruments and apparatus for cell culture	52
2.3.2 Cleaning and sterilization of instruments	53
2.3.3 Preparation of solutions	53
2.3.4 Cell culture	54
2.3.5 Cell freezing preservation and recovery	55
2.3.6 Cell culture considerations	56
References	57
Chapter 3 Preparation of Strong and uniform SERS substrates	58
3.1 Preparation of gold nanoparticles with 60 nm diameter by three synthesizing methods	60
3.1.1 hydroxylamine seed-mediated growing method	60
3.1.2 trisodium citrate reducing method	61
3.1.3 trisodium citrate seed-mediated growing method	61
3.2 Comparison of gold nanoparticles synthesized by the three methods	61
3.2.1 SEM characterization of gold nanoparticles synthesized by the three methods	61
3.3 Modification of ITO substrates and comparison among three kinds of nanoparticles self-assembly methods	62
3.3.1 Cleaning, activation and chemical treatment of ITO substrates	62
3.3.2 Comparison among three kinds of nanoparticles self-assembly methods	63
3.4 Characterization of SERS substrates	65
3.5 Optimization of the conditions for improving the self-assembly density	67
3.5.1 Optimized self-assembly time	67
3.5.2 Raman characterization of SERS substrates	68
3.6 Raman mapping of SERS substrates	69
Conclusions	70
References	70
Chapter 4 Removing impurities from SERS substrates	74
4.1 SERS substrates cleaned with plasma cleaner	75
4.1.1 Characterization of the cleaning effect of SERS substrates	75
4.2 Activation of SERS substrates after the cleaning treatment	78

Conclusions	92
References	93
Chapter 5 Application of SERS substrates for identification of various cells	95
5.1 Raman study of various cells	96
5.1.1 Raman study of liver normal cells and cancer cells	96
5.1.2 Comparison of Raman Spectra of various cells	97
5.2 SERS substrates for identification of various cells	100
5.2.1 Normal liver cells and cancer cells	101
5.2.2 Different cells	106
5.2.3 Cells in different states	108
Conclusions	112
References	113
Conclusion and perspectives	115
Publication during M. Sc. study	117
Acknowledgements	118

摘 要

细胞是生命活动的基本单位，也是构成一切有机体（除病毒外）和一切疾病发生、发展和转归的基础。目前，细胞的整体和超微结构已基本清楚，细胞的研究已经从单细胞深入到亚细胞和分子水平，但是细胞的恶变与疾病的关系仍有许多问题悬而未决。因此，如何建立和发展多种细胞分析技术来原位检测和分析细胞变化，研究细胞中各种生物分子的结构、组成和数量的变化特征，对研究疾病特别是癌症的发病机制有着十分重要的学术意义和应用价值。

表面增强拉曼光谱(SERS)，是一种基于纳米尺度的粗糙表面或颗粒体系的异常光学增强效应，由于具有很高的检测灵敏度，能从分子水平上获得物质详细的结构和化学组成信息，进而识别各类分子的“指纹”，因此被认为是一种极具前景的分析技术。然而，SERS的实用化，不但要求SERS基底有较强的增强效应和较好的均匀性，还要求基底具有很高的洁净度，没有杂质的干扰。因此，制备干净、均一、具有强增强效应的SERS基底对于SERS发展和进一步应用具有重要的意义。若能利用SERS原位观测和鉴别不同种类的细胞，如肝正常和癌变细胞、不同种类的癌细胞等，可为癌症的临床诊断和发病机制的研究提供很重要的参考依据。

因此，本论文从探索制备干净、均一的、具有强增强效应的SERS基底出发，发展鉴别不同种类细胞的方法，获得的主要成果如下：

1. 比较了三种制备60 nm Au纳米粒子的合成方法（盐酸羟胺种子生长法、柠檬酸钠一步还原法和柠檬酸钠种子生长法），结果发现盐酸羟胺种子生长法制备的纳米粒子粒径均一、大小一致。利用这种纳米粒子自组装形成的SERS基底组装密度较高，具有很好的均匀性和很强的SERS增强效应；

2. 为解决基底的杂质干扰问题，我们通过对氧等离子体清洗基底时间的探索以及不同浸泡液溶解基底氧化层的效果的比较，发现等离子体清洗的最优时间为90 s，1%（V/V）醋酸溶液浸泡（10 min）清洗后的基底的除杂方法最为有效，采用该除杂条件可获得干净的、适合细胞检测的SERS基底；

3. 获得了肝正常细胞（QSG-7701）与癌变细胞（QGY-7703）以及女性宫颈癌细胞（Caski）的细胞膜的 SERS 谱图，发现三种细胞各自都有四个以上的特

征峰使其很容易被区分开,同时在 7703 细胞中出现了归属于 NADH 和 FADH 这种可以增强细胞新陈代谢能力的物质的 723 cm^{-1} 的谱峰,而在其它两种细胞中则未观察到该谱峰,这为常规拉曼中得出的癌细胞比正常细胞、肝癌细胞比宫颈癌细胞具有更强的代谢能力的推测提供了有力的证据。

4. 在利用SERS监测细胞状态时发现,当细胞死亡时,其SERS谱峰明显减少甚至消失,谱峰信号强度也明显下降。同时检测到核酸碱基的信息,说明细胞已经破裂,导致核酸降解溢出细胞。而且在7703细胞中,作为细胞生命信号,体现线粒体活性的归属于蛋白质基团振动的 1604 cm^{-1} 谱峰的消失也可作为评估癌细胞死亡的证据。同时7703细胞中归属于NADH和FADH这种可以增强细胞新陈代谢能力的物质的 723 cm^{-1} 谱峰的消失,也为癌细胞的死亡提供了有力的证据。

因此,经过探索我们制备出了干净、均一的、具有较强增强效应的SERS基底,利用该SERS基底鉴别出了肝正常和癌变细胞,不同种类的癌细胞以及细胞的不同状态的差异,为临床上癌症的早期诊断和癌症发病机制的研究提供了很重要的参考依据。

关键词: SERS; 金纳米粒子; 基底; 除杂; 细胞

Abstract

Cells are the basic unit of life activities and the basis of composing all organisms (except for viruses). The development and prognosis of all diseases always begins from the abnormal changes of cells. At present, the overall and ultrafine structure of cells is essentially clear, and the cell research has also grown from a single cell into sub-cellular and molecular level. However, there are still many unresolved problems, such as the relationship between cell depravation and disease. Therefore, it is very important to establish and develop techniques for cell analysis , detecting cells in situ and studying the changes of structure, component and quantity of biomolecules in various cells for disease research, especially cancer pathogenesis.

Surface-enhanced Raman scattering (SERS), a kind of optical enhancement effect based on nanoscale rough surface or particle system, can be used to obtain the finger-print information of the structure and chemical composition of materials at the molecular level for its high sensitivity. It is considered a very promising analytical technique. In the practical application of SERS, clean and uniform SERS substrates with strong enhancement effect are highly needed. However, it is still a great challenge to realize all these requests. If it is possible to use use this kind of substrates to detect SERS signals of cells, such as liver normal and cancer cells, it is possible to provide some important information for cancer diagnosis and pathogenesis.

This thesis is aimed at preparation of clean and uniform SERS substrates with strong enhancement effect to identify normal and cancer cells. The main results are listed as follows:

1. Three methods were compared to prepare gold nanoparticles (GNPs) with 60 nm diameter, i.e., hydroxylamine seed-mediated growing method, trisodium citrate reducing method and trisodium citrate seed-mediated growing method. GNPs with uniform size and shape distribution were obtained by using hydroxylamine seed-mediated growing method. Furthermore, these GNPs tend to assemble on the substrate to form SERS substrate with compact and uniform structure with strong SERS effect.
- 2. In order to remove impurities from the SERS substrates, the effect of cleaning time during the oxygen plasma cleaning and the solutions used for dissolution of surface oxide were compared. The optimal cleaning time is 90 s and the

3. SERS spectra of cell membranes of normal liver cells (QSG-7701), cancer liver cells (QGY-7703) and cervical cancer cells (CaSki) were obtained. At least four characteristic Raman bands for each cell can be used to discriminate cell types. The band at 723cm^{-1} , only detected from QGY-7703, is attributed to NADH and FADH that can enhance the capacity of cell metabolism. SERS can give a more powerful evidence to prove that cancer cells, especially liver cancer cells, have a stronger metabolism. 4. SERS also can be used to detect the state of cells. When cells are dying, the number and intensity of Raman bands decrease and some of them even disappear. The fact that the signals of nucleic acid and base also were obtained indicates the cells have broken and the nucleic acids were degraded and released from nucleus. In QGY-7703, Raman bands, 1604 cm^{-1} and 723 cm^{-1} disappeared, which are attributed to proteins and NADH/FADH separately, as an indication of life and the ability of metabolism. Their disappearances prove the death of cancer cells.

In conclusion, we fabricated clean and uniform substrates with high SERS effect. The substrates were used as SERS substrate to discriminate normal liver and cancer liver cells. We also found obvious differences for different cancer cells. The ability of SERS to distinguish cancer cell from normal cells, can be used for early diagnosis of cancer and study of cancer pathogenesis.

Key words: SERS; Au nanoparticles; substrate; impurities; cell

第一章 绪论

细胞是生物的形态结构和生命活动的基本单位，也是构成一切有机体（除病毒外）和一切疾病发生、发展和转归的基础。细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动都与细胞的整体状态息息相关^[1,2]。人类对细胞的研究经历了整体、显微、超微和分子几个发展阶段。目前，细胞的整体和超微结构已基本清楚，虽然对细胞的研究已经从细胞整体（单细胞）深入到亚细胞（细胞质、细胞膜、囊泡）和分子水平^[3]（DNA 等生物大分子及单分子），但是细胞的恶变与疾病的关系仍有许多问题悬而未决。因此如何利用和发展多种细胞分析技术来检测、分析细胞变化，研究细胞中各种生物分子的结构、组成和数量的变化特征^[4]，对研究疾病特别是癌症的发病机理有着十分重要的学术意义和应用价值。

1.1 单细胞研究与癌症诊断

1.1.1 细胞的结构与功能

细胞是生物体结构和功能的基本单位，一切生命现象都是细胞活动的表现。细胞的结构大体由细胞膜、细胞质和细胞核三部分组成。其中细胞膜将细胞与外界微环境隔离，是防止细胞外物质自由进入细胞的屏障，它保证了细胞内环境的相对稳定，使各种生化反应能够有序运行，一般其厚度约为7~8 nm。细胞膜的基本结构见Fig 1-1，包括^[3]：（1）脂双层，由磷脂、胆固醇、糖脂组成，其中磷脂的含量超过50%，脂双层厚度约4.5 nm；（2）膜蛋白，分为内在蛋白和外在蛋白两种。内在蛋白以疏水的部分直接与磷脂的疏水部分共价结合，两端带有极性，贯穿膜的内外；外在蛋白以非共价地结合在镶嵌蛋白上，或结合在磷脂分子的亲水头上。膜蛋白是膜功能的主要体现者，种类繁多，不同细胞膜蛋白的种类不同，使得其生理功能存在明显的差异性。其中有的与物质的运输有关，如载体蛋白，具有专一性，对物质运输具有选择性；有的是酶，能催化与膜有关的生化反应；有的是激素或其他有生物活性物质的受体；（3）膜糖和糖衣，细胞膜糖类主要是一些寡糖链和多糖链，多以共价键与膜脂质或蛋白质结合，形成糖脂和糖蛋白；（4）其它，细胞膜中还含有少量水分、无机盐与金属离子等，参与细胞膜表面

的各项生理活动。

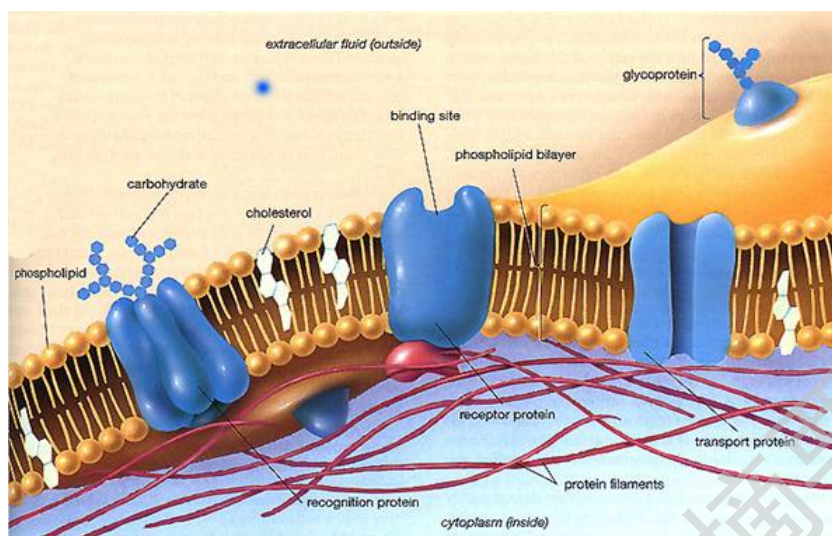


Fig.1-1 Scheme of cell membrane 图片来自<http://phy.mainbi.com>

不同种类的细胞其膜上所含的蛋白和磷脂数量种类不同，即使是同类细胞，当细胞发生病变时，其膜上成分也会有很大的差别，如产生特异性的抗原等等。但是大体上细胞膜具有以下几个方面的共同特征：（1）镶嵌性：磷脂双分子层和蛋白质形成镶嵌面，或按二维排成相互交替的镶嵌面；（2）蛋白质极性：膜内在蛋白质的极性区突向膜表面，非极性部分埋在双层内部；（3）流动性：膜结构中的蛋白质和脂质具有相对侧向流动性；（4）相变性：随着环境条件的变化，脂质分子的晶态和液晶态可发生互变现象；（5）不对称性：细胞膜脂双层中各种分子的种类和数量分布不均匀；（6）更新态：在细胞中，膜的组分处于不断更新的状态；（7）通透性：不同物质通过生物半透膜的难易程度不同。细胞膜的通透性对细胞内水的进出，各种物质的交换，酸碱度和渗透压的维持，均有着重要的生理意义^[3]。

细胞膜的这种特殊结构决定了它具有以下几个功能：（1）分隔、形成细胞和细胞器：为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境，若膜面积显著增加，可提高膜的生物功能；（2）屏障作用：使得膜两侧的水溶性物质不能自由通过；（3）选择性运输：伴随着能量的传递，可对物质进行选择性的运输；（4）生物功能：如激素作用、酶促反应、电子传递等；（5）物质转运功能：通过细胞膜的转运功能实现细胞与周围环境之间的物质交换，主要有自由扩散、协助扩散、主动运输以及入胞和出胞作用四种转运方式；（6）提供细胞识别位点，并完成细胞内外信息的跨膜传递；为多种酶提供结合位点，使酶促反应高效而有序地进行。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库