

研究报告

表面增强拉曼散射纳米针尖用于单细胞内环境的检测研究

陈颖^{1,2} 梅荣超² 王运庆^{*2,3} 刘万卉¹ 陈令新^{*2,3}

¹(烟台大学药学院, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学),
新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 烟台 264005)

²(中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 烟台 264003)

³(山东省海岸带环境过程重点实验室, 烟台 264003)

摘要 表面增强拉曼散射(SERS)纳米针尖是一类单细胞分析新技术,在细胞内环境检测和细胞生理功能研究等方面具有良好的应用潜力。由于SERS纳米针尖可负载的贵金属粒子数量少,因此,筛选和修饰高SERS增强能力的纳米粒子是确保其检测灵敏度的关键。本研究制备了一种核-卫星结构的Au纳米粒子,单颗粒信号较传统Au纳米球和Au纳米星显著提高。将此粒子涂覆在尖端直径约为200 nm的玻璃毛细管表面,形成SERS纳米针尖,进一步功能化修饰靶标敏感型拉曼报告分子,使其具备检测微区环境中pH值和O₂的能力。作为应用性能考察,采用SERS纳米针尖实现了单个HL-7702细胞内pH值和缺氧状态监测。本研究解决了传统颗粒态SERS探针用于细胞分析面临的随机聚集和难以精确定位等瓶颈问题,为单细胞内环境检测分析提供了一种新的分析工具。

关键词 表面增强拉曼散射; 单细胞检测; 纳米针尖; 细胞pH值; 细胞缺氧

单细胞内活性物质检测是揭示细胞生理功能和异质性的的重要途径^[1]。表面增强拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS)探针是一种重要的单细胞分析工具,通常由贵金属纳米颗粒和拉曼报告分子组成^[2]。细胞内特定活性物质可引起报告分子发生结构改变,引发探针Raman信号的变化,可高灵敏、实时、动态地反映活性物质的时空变化以及指征分子事件的发生^[3-4]。目前,SERS探针用于单细胞分析的常规手段是将纳米粒子与细胞共孵育^[5-6],该方法虽然简单,但存在如下问题:纳米粒子通过内吞方式进入细胞后,在细胞内随机分布,难以实现特定细胞器的精确靶向定位;细胞内纳米粒子团聚-分散状态不稳定,严重影响SERS信号的重现性和准确性;检测的空间分辨率取决于激光光斑大小(微米尺度),对单细胞的分析性能尚需提高。

SERS纳米针尖是将SERS纳米探针负载在纳米尺度针尖的新型分析传感器件^[7],可在外界精密操控下穿刺单细胞,将纳米探针递送至细胞质的不同位置或不同的细胞器,实现细胞内的精确定位^[8]。由于纳米粒子已预先固定在针尖处,避免了随机团聚造成的检测重现性差的问题。另外,纳米尺度针尖避免了穿刺对细胞造成的明显损伤,还可提高检测的空间分辨率^[9]。这些优势使得SERS纳米针尖在单细胞分析中表现出良好的应用前景^[10-17]。Zhao等^[15]制备了4-巯基吡啶修饰的SERS纳米针尖,并将其用于细胞内Ag⁺和Hg²⁺的高灵敏监测,为阐明重金属离子的细胞毒性效应提供了有益信息。Liu等^[16]结合SERS纳米针尖技术开发了一种单细胞等离子体免疫三明治分析法(scPISA)方法,实现了单个活细胞中低拷贝数蛋白的定量检测,揭示了细胞内蛋白质表达和分布的异质性,为蛋白相关疾病的发生和发展提供了重要信息。但是,目前SERS纳米针尖技术也面临一些问题亟待解决,如针尖位置曲率大、表面积小、可装载的贵金属粒子数量少以及检测灵敏度亟需提升等,而筛选和修饰具有高信号增强能力的纳米粒子是解决该问题的关键。

2022-04-06 收稿; 2022-10-13 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 42076199, 21976209)资助。

* E-mail: yqwang@yic.ac.cn; lxchen@yic.ac.cn

本研究制备了核-卫星结构的 Au 纳米粒子,其单颗粒信号强度较传统 Au 纳米球或 Au 纳米星显著提高。将此粒子涂覆在尖端直径约为 200 nm 的玻璃毛细管表面,形成 SERS 纳米针尖,并进行靶标敏感型拉曼报告分子功能化修饰,使其具备微区环境中 pH 值和 O₂ 的检测能力。借助微注射系统与 SERS 纳米针尖偶联,实现了其在单细胞的精确定位,为进一步开展单个 HL-7702 细胞内 pH 值和缺氧状态监测研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司); DXR 激光共聚焦显微拉曼光谱仪、紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); 精密微注射三维操控平台(日本 Narishige 公司); 拉针仪(美国 Sutter Instrument 公司)。

H₂SO₄(AR 级)、抗坏血酸(L-AA, AR 级)、NaBH₄(98%)、对硝基苯硫酚(NT, 90%)、对巯基苯甲酸(MBA, 99%)、四氢呋喃(THF, AR 级)、NaBr(AR 级)、柠檬酸钠(C₆H₅Na₃O₇, 99%)、AgNO₃(AR 级)和 HCl(AR 级)均购自国药集团化学试剂有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 99%)和十六烷基三甲基氯化铵(CTAC, 97%)购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司; 高硼酸玻璃毛细管购自美国 Sutter Instrument 公司; 厌氧产气袋购自日本三菱 MGC 公司; 聚苯乙烯-聚 4-乙烯吡啶嵌段共聚物(PS-b-P4VP)购自西安瑞禧生物科技有限公司; 蛋黄磷脂(Lipoid E80)购自艾伟拓(上海)医药科技有限公司; PBS 缓冲液、DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)、胰蛋白酶和胎牛血清购自赛默科技公司; 花菁类近红外报告分子 cy7 为本实验室合成。实验用水为经过二次纯化的蒸馏水(18.2 MΩ·cm)。

1.2 实验内容

1.2.1 核-卫星 Au 纳米粒子的合成

核-卫星 Au 纳米粒子的合成主要分 3 个步骤,即采用种子法合成 80 nm Au 纳米球、合成磷脂双层包裹的 80 nm Au 纳米球^[18]及合成核-卫星 Au 纳米粒子^[19]。

采用种子生长法合成 80 nm Au 纳米球。将 0.6 mL NaBH₄ 溶液(0.01 mol/L)加入到 10 mL HAuCl₄(0.25 mmol/L)和 CTAB(0.1 mol/L)混合溶液中,快速搅拌 2 min 后,在 27 °C 下静置 3 h。取 50 μL 所得溶液与 1.5 mL AA(0.1 mol/L)在 27 °C、搅拌条件下加入 2 mL 0.2 mol/L CTAC 溶液中,再加入 2 mL 0.5 mmol/L HAuCl₄ 溶液,反应 15 min 后,14000 r/min 离心 45 min,弃去上清液,沉淀用 1 mL 0.02 mol/L CTAC 溶液分散,得到 10 nm Au 种子溶液。将 40 mL 0.1 mol/L CTAC 溶液、3 mL 0.01 mol/L AA 溶液与 100 μL 10 nm 金种子溶液在搅拌下混合,然后以 40 mL/h 的速度匀速加入 40 mL 0.5 mmol/L HAuCl₄ 溶液,27 °C 反应 30 min,得到 80 nm Au 纳米球。

称取 0.2 g 蛋黄磷脂溶于 40 mL 乙醇,旋蒸后加入相应体积的水,超声使其分散,采用细胞破碎仪超声后(200 W, 30 min)得到脂质体溶液。将 40 mL 80 nm Au 纳米球溶液以 3200 r/min 离心 10 min。弃去上清液,以相同体积的脂质体溶液重新分散沉淀,室温下孵育过夜后,以 3200 r/min 离心 10 min,用 20 mL 水重新分散沉淀,即得到磷脂双层包裹的 80 nm Au 纳米球溶液。

将 15 mL 上述溶液配制为吸光度 A=1.0 的溶液,在 27 °C 下分别加入 1.5 mL 0.1 mol/L AA 及 1.5 mL Au⁺ 溶液(0.1 mol/L, 60 μL HAuCl₄ 中加入 2.04 mL 水,搅拌条件下加入 300 μL 0.2 mol/L NaBr,逐滴加入 0.5 mol/L AA,直至溶液无色),在室温下搅拌 5 min,即得到核-卫星 Au 纳米粒子。

1.2.2 纳米粒子 SERS 增强能力比较

根据文献方法分别合成 100 nm Au 纳米球^[18]和 Au 纳米星^[20]。取 1 mL Au 纳米星溶液,以 7000 r/min 离心 10 min 后,沉淀加等体积水分散; 1 mL Au 纳米球以 3200 r/min 离心 10 min 后,沉淀加等体积水分散。分别取 3 种纳米粒子溶液各 1 mL,加入 10 μL 报告分子 cy7 溶液(10⁻⁵ mol/L),超声下混匀,放置孵育 2 h。溶液离心后,沉淀加水分散,稀释 2000 倍,滴加在洁净玻璃片上烘干,利用暗场成像筛选单颗粒并进行 SERS 光谱检测。

1.2.3 纳米针尖的制备

通过拉针仪(P-1000)对长度为 10 cm 的高硼酸玻璃毛细管进行拉伸。仪器预热 15 min 后,将玻璃毛细管放置于卡槽上固定,测试熔点,设置加热温度大于熔点。设置不同的参数可得到不同大小的针尖,每根高硼酸玻璃毛细管可拉伸成两根针尖。本研究的纳米级针尖制备参数为: Pull, 100; Vel, 40; Time, 250 s; Pressure, 250。

1.2.4 核-卫星 Au 纳米粒子 SERS 纳米针尖的制备

空白纳米针尖置于食人鱼溶液(浓 H_2SO_4 -30% H_2O_2 (7:3, V/V)混合溶液)中浸泡 60 min,用水彻底清洗后干燥。将清洗干净的纳米针尖浸于 PS-b-P4VP 的 THF 溶液(0.1 mol/L)中 5 min 后,用水清洗并干燥;取核-卫星 Au 纳米粒子 30 mL,加入 1.2 mL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 溶液(3 mmol/L)混匀,离心,弃去上清液,沉淀以 1.2 mL 水分散后加入 1.8 mL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 溶液(3 mmol/L)。超声处理后,调节溶液至 pH=4.7。取该溶液 0.15 mL,将上述表面修饰 PS-b-P4VP 的纳米针尖浸泡在其中 24 h 后,分别用无水乙醇与水清洗针尖表面,干燥后,即得核-卫星 Au 纳米粒子 SERS 纳米针尖。将 SERS 纳米针尖分别浸入浓度为 5×10^{-3} mol/L 的 MBA 和 NT 乙醇溶液中 3 h,用水清洗并干燥,即得到功能化 SERS 纳米针尖,用于 pH 值和缺氧测试。

1.2.5 SERS 纳米针尖检测模块的搭建

拆下显微拉曼光谱仪 DXR Raman Microscope 的样品仓盖,通过固定夹将装载 SERS 纳米针尖的微注射三维操控平台固定在载物台附近。调节三维操控平台,精确调控 SERS 纳米针尖的空间位置,完成细胞穿刺和 SERS 信号定位检测。

1.2.6 细胞培养

HL-7702(正常肝细胞)接种在含有胎牛血清(FBS, 10%, m/m)和青霉素(1%, m/m)的 DMEM 培养基中,在含 5% CO_2 (V/V)的增湿培养箱中于 37 °C 下培养。待细胞贴壁后,以 PBS 洗涤,并用胰蛋白酶消化处理,并将其重新悬浮在新鲜的培养基中。HL-7702 细胞接种在灭菌盖玻片上培养 24 h,以 PBS 清洗 3 次后置于载玻片上,进行单细胞分析。

1.2.7 单细胞内 pH 值检测

表面接种 HL-7702 细胞的载玻片置于拉曼光谱仪的载物台上固定。将 MBA 修饰的 SERS 纳米针尖固定于三维平台上,调节针尖与细胞平面呈 30°,在 40 倍物镜下调节 SERS 纳米针尖穿刺进入 HL-7702 细胞质,精密调控纳米针尖和激发光斑的重合,静置 5 min 后进行原位 SERS 光谱检测。设置激光照射功率为 20 mw,曝光时间为 1 s。

1.2.8 单细胞缺氧状态监测

HL-7702 细胞在厌氧产气袋中培养 12 h,氧气浓度达到 0.1% 以下时,取出盖玻片,并以正常培养条件下的细胞作为对照组,分别置于拉曼光谱仪的载物台上固定,采取与单细胞内 pH 值检测相同的方法,利用 NT 修饰的 SERS 纳米针尖分别检测正常组(空气条件,氧气浓度为 21%)与缺氧组的 SERS 光谱。

2 结果与讨论

2.1 SERS 纳米针尖灵敏度的考察

SERS 纳米针尖由玻璃毛细管纳米针尖及负载的 SERS 探针粒子构成。其尖端检测区域表面积小,负载粒子数量少,因此筛选具有高 SERS 增强能力的纳米粒子是制备高灵敏度 SERS 纳米针尖的关键。本研究制备了尺寸相近(约为 100 nm)的 Au 纳米球、Au 纳米星(已报道用于制备 SERS 纳米针尖的粒子^[21-22])与核-卫星 Au 纳米粒子,并测试出 3 种粒子的 SERS 增强因子(AEF)分别为 1.1×10^5 、 4.8×10^5 和 2.5×10^6 (电子版文后支持信息图 S1),表明核-卫星纳米粒子具有明显的检测灵敏度优势。进一步比较了单颗粒的 SERS 信号增强能力,通过暗场成像筛选并定位玻璃片上的单个颗粒(图 1),确保采集的 SERS 信号源自单个粒子。在相同的检测条件下,Au 纳米球与 Au 纳米星未检测到报告分子 cy7 的特征峰,而核-卫星 Au 纳米粒子检测到明显的特征信号。此粒子优越的 SERS 性能归因于其核心与相邻卫星粒子之间的众多热点提供了强电磁场增强;此外,内部的脂质双分子层也有助于吸附更多的拉曼报告分子并传递到热点区域,达到最大的信号增强^[19]。

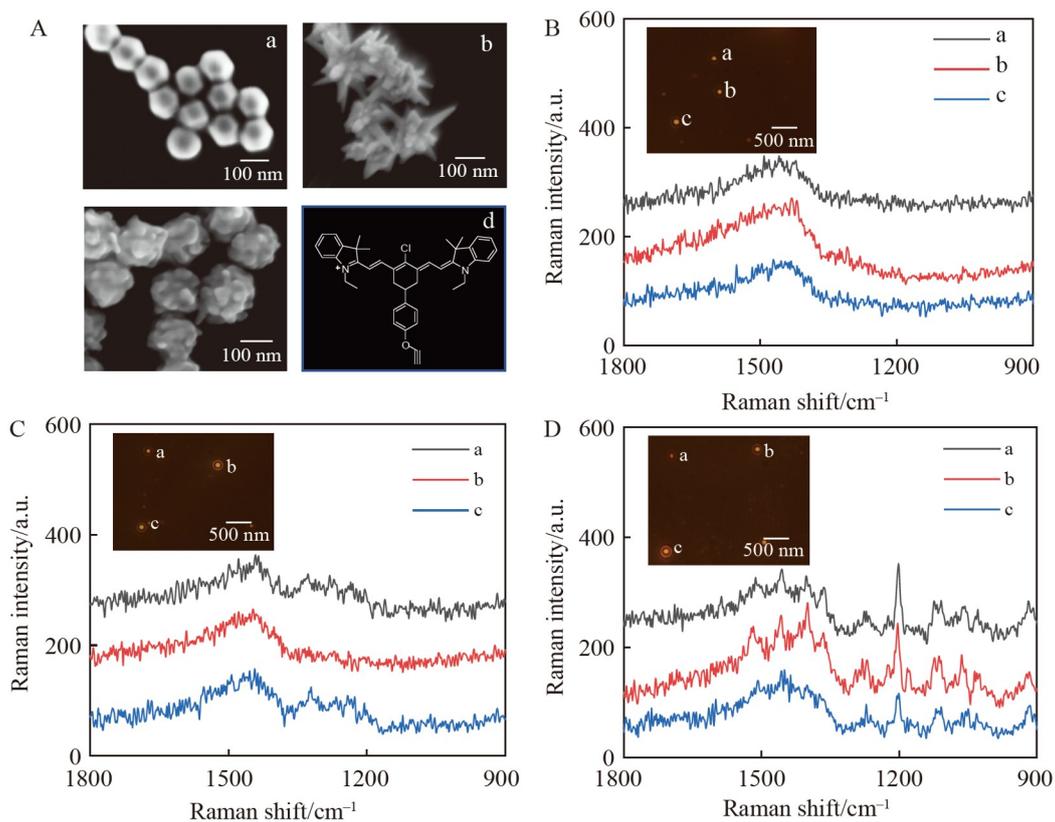


图1 (A) Au 纳米球(a)、Au 纳米星(b)和核-卫星 Au 纳米粒子(c)的扫描电镜(SEM)图及报告分子 cy7 的化学结构式(d); (B) Au 纳米球、(C) Au 纳米星及(D)核-卫星 Au 纳米粒子单颗粒的表面增强拉曼散射(SERS)光谱图(报告分子 cy7)和暗场成像照片

Fig.1 (A) Scanning electron microscope (SEM) images of 100 nm Au nanospheres (a), Au nanostars (b) and core-satellite Au nanoparticles (c), and chemical structural formula of cy7 (d); Surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra and dark field images of reporter molecule cy7 on the surfaces of single Au nanospheres (B), Au nanostars (C) and single core-satellite Au nanoparticle (D)

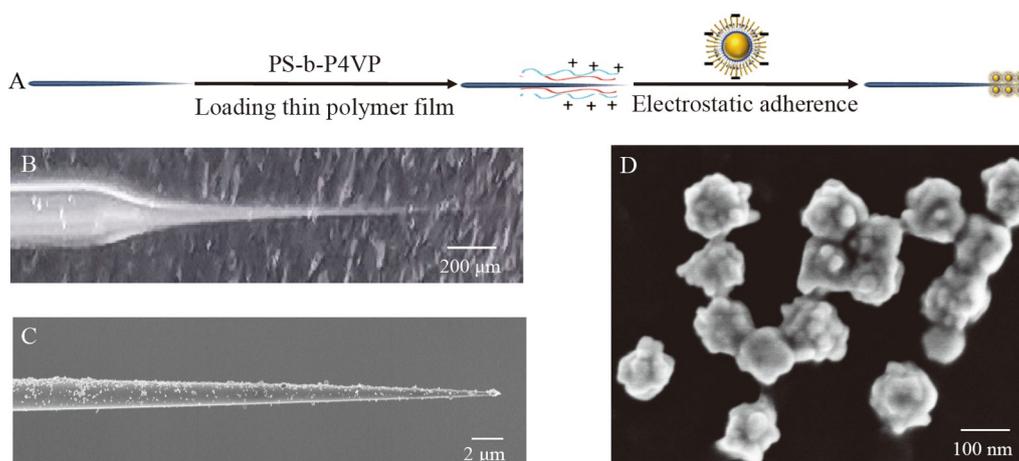


图2 (A) SERS 纳米针尖制备过程示意图; (B) 空白玻璃毛细管纳米针尖显微照片; (C) SERS 纳米针尖扫描电镜照片; (D) SERS 纳米针尖负载的核-卫星 Au 纳米粒子扫描电镜照片

Fig.2 (A) Schematic diagram of preparation process of SERS nanotips; (B) Photograph of a blank glass capillary nanotip; (C) SEM image of a SERS nanotip; (D) SEM image of core-satellite Au nanoparticles adsorbed on a SERS nanotip

2.2 SERS纳米针尖的制备与表征

SERS 纳米针尖的制备过程如图 2A 所示。首先拉制玻璃毛细管纳米针尖,进一步在其表面修饰两亲性聚合物 PS-b-P4VP 形成薄膜^[23]。P4VP 嵌段结构在酸性纳米粒子溶液(pH=4.7)中质子化,使针尖表面带正电荷,可与核-卫星 Au 纳米粒子的柠檬酸配体发生静电作用,将其吸附到针尖表面。PS 嵌段结构具有疏水性,有助于防止针尖表面的纳米粒子团聚,提高针尖结构的均匀性。图 2B 为玻璃毛细管纳米针尖的明场显微照片,图 2C 和 2D 分别为 SERS 纳米针尖以及负载粒子的扫描电镜照片,单个 SERS 纳米针尖尺寸约为 200 nm,表面吸附大量的核-卫星 Au 纳米粒子,密度约为 27 particles/ μm^2 。

2.3 单细胞内 pH 值与缺氧状态监测

细胞内的 pH 值在调节细胞功能如囊泡运输、细胞代谢、增殖和凋亡等过程中起着至关重要的作用^[24]。细胞缺氧会抑制细胞内生物酶活性,干扰细胞内离子平衡,影响细胞的生物合成、分解、代谢等氧化过程,导致细胞能量供应不足,引起酸中毒或碱中毒,使细胞失去活性^[25]。本研究分别以单细胞 pH 值的检测与缺氧状态的监测为例,展示 SERS 纳米针尖在单细胞内环境分析中的应用。

2.3.1 检测原理

分别选择 MBA(pH 值响应)与 NT(缺氧响应)作为拉曼报告分子标记 SERS 纳米针尖用于单细胞 pH 值与缺氧监测(图 3A),MBA 与 NT 可通过 Au-S 键强烈结合在纳米针尖核-卫星 Au 纳米粒子表面。首先考察了 SERS 纳米针尖的 pH 值敏感性。如图 3B 所示,随着 pH 值升高,MBA 中 1070 cm^{-1} 处特征峰强度不变,而 1392 cm^{-1} 处的峰向高波数位移至 1408 cm^{-1} 处,并且强度增加。这是因为在碱性条件下,

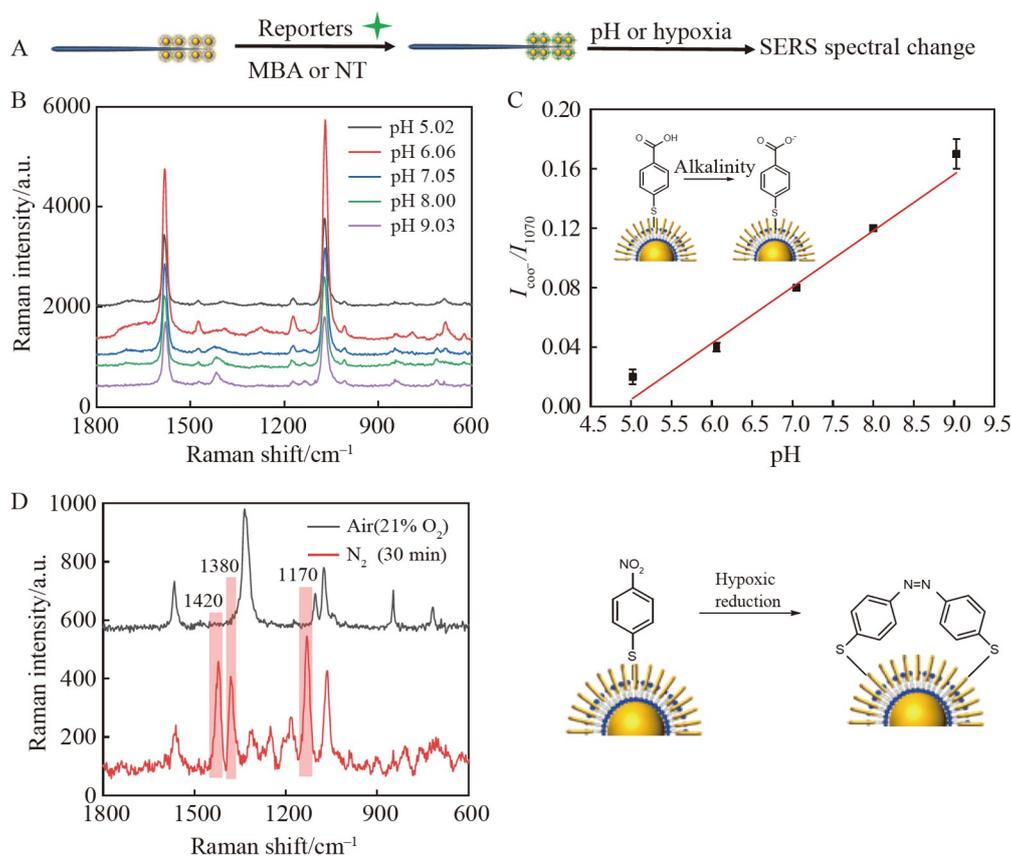


图 3 (A) SERS 纳米针尖检测 pH 值与缺氧原理示意图; (B) SERS 纳米针尖在不同 pH 值条件下的 SERS 光谱图; (C) 与图 B 相对应的标准曲线图; (D) SERS 纳米针尖在空气(氧气浓度 21%)和 N_2 中放置 30 min 后的 SERS 光谱图,以及缺氧检测原理图

Fig.3 (A) Schematic diagram of detection of pH value and hypoxia with SERS nanotip; (B) SERS spectra of SERS nanotip under different pH values; (C) Standard curve corresponding to Fig. B; (D) SERS spectra of SERS nanotip in air (Oxygen concentration 21%) and N_2 for 30 min, and schematic diagram for hypoxia detection

MBA 中—COOH 去质子化形成—COO⁻, 导致—COO⁻的 SERS 信号增强^[17]。因此, 以—COO⁻和 1070 cm⁻¹ 处峰强度的比值($I_{\text{COO}^-}/I_{1070}$)与 pH 值绘制标准曲线, 如图 3C 所示, 在 pH 5.0~9.0 之间时, $I_{\text{COO}^-}/I_{1070}$ 与 pH 值呈较好的线性关系($R^2 = 0.97$)。

在缺氧条件下, NT 中的—NO₂ 易被还原成为偶氮键, 形成 4, 4'-二巯基偶氮苯(DMAB)。如图 3D 所示, SERS 纳米针尖置于氮气中 30 min 后, 分别在约 1170、1380 和 1420 cm⁻¹ 处出现新的 Raman 峰, 归属于—N=N—, 与已报道的 DMAB 中的特征峰相符^[26]。

2.3.2 单细胞检测

首先构建了微注射三维操控平台耦合的新模块(图 4A)。调整好微注射三维操控平台的位置, 使 SERS 纳米针尖可通过激光共聚焦显微拉曼光谱仪载物台的检测区域, 用固定夹固定该平台。通过调节微注射三维操控平台的 3 个方向(x 、 y 、 z), 可实现对 SERS 纳米针尖空间位置的精密操作。在单细胞穿刺与检测过程中, 需在 10 倍物镜下调节清晰, 将纳米针尖沿平台 z 轴下降到目标细胞位置, 调节纳米针尖与细胞同一成像焦平面, 随后缓慢穿刺进入细胞中。调节激光光斑与 SERS 纳米针尖重合, 在 40 倍物镜下进行原位 SERS 光谱检测。SERS 纳米针尖进入单细胞后的明场图像如图 4B 所示, 细胞仍保持良好状态。图 4C 为 MBA 修饰的 SERS 纳米针尖在细胞质中的 SERS 光谱, 在 1408 cm⁻¹ 处出现了明显的 COO⁻ 信号峰, 由图 3C 的标准曲线计算 HL-7702 细胞质的 pH=7.78, 与已报道的细胞质 pH 值相近^[27]。NT 修饰的 SERS 纳米针尖在正常及缺氧条件下培养 12 h 后, 细胞内检测得到的 SERS 光谱如图 4D 所示, 缺氧处理后, 在 1170 和 1380 cm⁻¹ 处出现了新的特征峰, 与溶液测试的结果一致, 证实了 SERS 纳米针尖

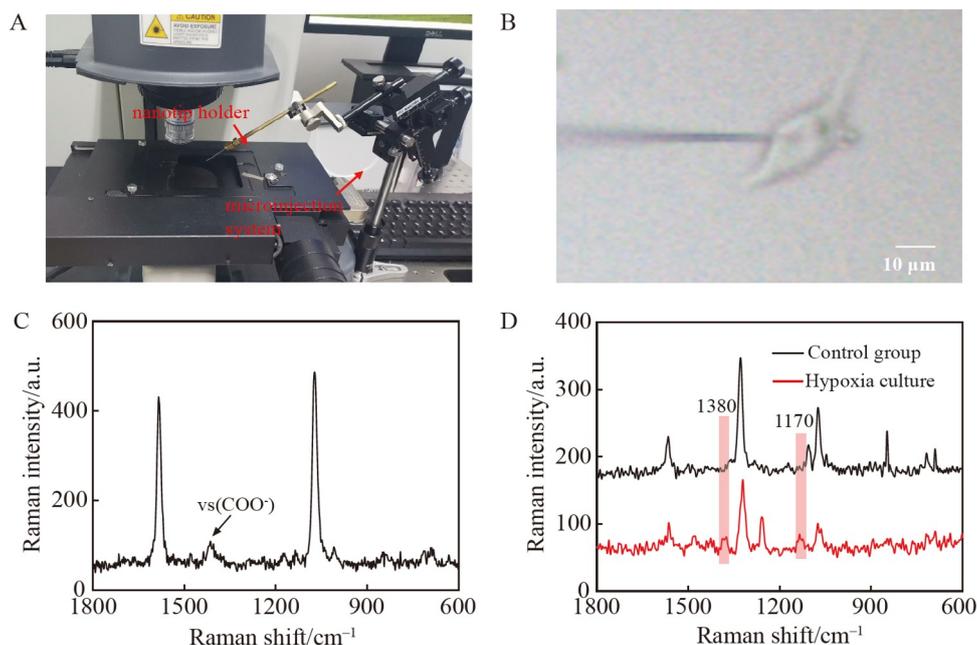


图4 (A)SERS 纳米针尖用于单细胞检测装置; (B)SERS 纳米针尖穿刺进入单细胞的明场图像; (C)对巯基苯甲酸(MBA)修饰 SERS 纳米针尖定位于 HL-7702 细胞质的 SERS 光谱图; (D)对硝基苯硫酚(NT)修饰 SERS 纳米针尖定位于正常与缺氧培养 12 h 后 HL-7702 细胞质的 SERS 光谱图

Fig.4 (A) SERS nanotip detection module for single cell analysis; (B) Bright field image of SERS nanotip punctured in a single cell; (C) SERS spectrum of an mercapto benzoic acid (MBA) modified SERS nanotip located in the cytoplasm of HL-7702 cell; (D) SERS spectra of *p*-nitrobenzenethiol (NT) modified SERS nanotips located in the cytoplasm of HL-7702 cell under normal or hypoxia culture condition for 12 h

用于单细胞缺氧状态监测的可行性。此外, 还验证了 SERS 纳米针尖信号增强能力的储存稳定性、可重复修饰性和信号再生能力(电子版文后支持信息图 S2~S4), 结果显示了 SERS 纳米针尖具有良好的实际应用价值。

3 结论

本研究开发了适用于单细胞内环境分析的高灵敏 SERS 纳米针尖,以尖端直径约为 200 nm 的玻璃毛细管为载体,表面涂覆具有高拉曼信号增强能力的核-卫星 Au 纳米粒子。在 Au 纳米粒子表面修饰 MBA 和 NT 报告分子,赋予 SERS 纳米针尖对 pH 值和 O₂ 的检测能力。将纳米针尖组装在微注射系统的三维操控平台,实现了针尖在细胞微区内的精确定位以及对单个 HL-7702 肝细胞内 pH 值和缺氧状态的监测。本方法克服了纳米颗粒 SERS 探针用于细胞内分析所面临的胞内粒子聚集、难以精确定位等问题。未来可通过筛选更多的靶标敏感型报告分子,拓展分析对象种类,在单细胞或活体组织原位传感分析中具有良好的发展前景。

References

- [1] KELLER L, PANTEL K. *Nat. Rev. Cancer*, 2019, 19(10): 553-567.
- [2] ARABI M, OSTOVAN A, ZHANG Z, WANG Y, MEI R, FU L, WANG X, MA J, CHEN L. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 174: 112825.
- [3] GONG T, CUI Y, GOH D, VOON K K, SHUM P P, HUMBERT G, AUGUSTE J L, DINH X Q, YONG K T, OLIVO M. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 64: 227-233.
- [4] YANG Dan, ZHOU Jing, LI Yu-Jing, ZHAO Rui, FENG Wen-Nan, HE Jin, WANG Zhe, YANG Guo-Cheng. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, 48(6): 742-749
杨丹, 周晶, 李语静, 赵锐, 冯文南, 何劲, 王哲, 杨国程. *分析化学*, 2020, 48(6): 742-749.
- [5] CUI J, HU K, SUN J J, QU L L, LI D W. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, 85: 324-330.
- [6] MEI R, WANG Y, YU Q, YIN Y, ZHAO R, CHEN L. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(2): 2059-2066.
- [7] GUO J, HE J. *Biophys. J.*, 2019, 116(3): 146A.
- [8] HANIF S, LIU H L, AHMED S A, YANG J M, ZHOU Y, PANG J, JI L N, XIA X H, WANG K. *Anal. Chem.*, 2017, 89(18): 9911-9917.
- [9] ZHU D, LI A, DI Y, WANG Z, SHI J, NI X, WANG Y. *Nanotechnology*, 2022, 33(11): 115702.
- [10] GUO J, RUBFIARO A S, LAI Y H, MOSCOSO J, CHEN F, LIU Y, WANG X W, HE J. *Analyst*, 2020 145(14): 4852-4859.
- [11] WANG J Q, GENG Y J, SHEN Y T, SHI W, XU W Q, XU S P. *Sens. Actuators, B*, 2019, 290: 527-534.
- [12] HANIF S, LIU H, CHEN M, MUHAMMAD P, ZHOU Y, CAO J, AHMED S A, XU J, XIA X, CHEN H, WANG K. *Anal. Chem.*, 2017, 89(4): 2522-2530.
- [13] CHEN J, WANG J, GENG Y, YUE J, SHI W, LIANG C, XU W, XU S. *ACS Sens.*, 2021, 6(4): 1663-1670.
- [14] LUSSIER F, BRULÉ T, VISHWAKARMA M, DAS T, SPATZ J P, MASSON J F. *Nano Lett.*, 2016, 16(6): 3866-3871.
- [15] ZHAO X, CAMPBELL S, EL-KHOURY P Z, JIA Y, WALLACE G Q, CLAING A, BAZUIN C G, MASSON J F. *ACS Sens.*, 2021, 6(4): 1649-1662.
- [16] LIU J, HE H, XIE D, WEN Y, LIU Z. *Nat. Protoc.*, 2021, 16(7): 3522-3546.
- [17] ZHAO X, CAMPBELL S, WALLACE G Q, CLAING A, BAZUIN C G, MASSON J F. *ACS Sens.*, 2020, 5(7): 2155-2167.
- [18] ZHENG Y, ZHONG X, LI Z, XIA Y. *Part. Part. Syst. Charact.*, 2014, 31(2): 266-273.
- [19] MEI R, WANG Y, LIU W, CHEN L. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10(28): 23605-23616.
- [20] SANCHIS-GUAL R, TORRES-CAVANILLAS R, CORONADO-PUCHAU M, GIMÉNEZ-MARQUÉS M, CORONADO E. *J. Mater. Chem. C*, 2021, 9(33): 10811-10818.
- [21] VITOL E A, ORYNBAYEVA Z, BOUCHARD M J, AZIZKHAN-CLIFFORD J, FRIEDMAN G, GOGOTSI Y. *ACS Nano*, 2009, 3(11): 3529-3536.
- [22] NGUYEN T D, SONG M S, LY N H, LEE S Y, JOO S W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(9): 2710-2714.
- [23] ZHU H, MASSON J F, BAZUIN C G. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2020, 3(1): 516-529.
- [24] KOYUNCU I, TEMIZ E, DURGUN M, KOCYIGIT A, YUKSEKDAG O, SUPURAN C T. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, 201: 37-46.
- [25] YU S, YOON J, LEE J, MYUNG S, JANG E, KWAK M, CHO E, JANG J, KIM Y, LEE H. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2011, 32(7): 912-920.
- [26] HUANG Y F, ZHU H P, LIU G K, WU D Y, REN B, TIAN Z Q. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(27): 9244-9246.
- [27] ZHOU J, FANG C, CHANG T, LIU X, SHANGGUAN D. *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1(5): 661-667.

Detection of Single Cell Intracellular Environment by Surface Enhanced Raman Scattering Nanotip

CHEN Ying^{1,2}, MEI Rong-Chao², WANG Yun-Qing^{*2,3}, LIU Wan-Hui¹, CHEN Ling-Xin^{*2,3}

¹(Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

²(CAS Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

³(Shandong Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, Yantai 264003, China)

Abstract Surface-enhanced Raman scattering (SERS) nanotip is a kind of new technique for single cell analysis, which shows excellent application potential in detection of intracellular environment and study of cell physiological function. Due to the small number of noble metal particles that can be loaded on SERS nanotips, screening and modifying nanoparticles with high SERS enhancement ability is the key to ensure their detection sensitivity. In this study, core-satellite Au nanoparticles were prepared, and the single particle signal was significantly higher than that of traditional Au nanospheres and Au nanostars. The particle was coated on the surface of glass capillary with tip diameter of about 200 nm to form SERS nanotips, which further functionalized and modified with target-sensitive Raman reporter molecules, enabling them to detect pH value and O₂ content in micro-area environment. As application performance investigation, SERS nanotips realized pH value and anoxic state monitoring in single HL-7702 cell. This study solved the bottleneck issues such as random aggregation and difficulty in precise localization faced by traditional granular SERS probes for cell analysis, providing a new analytical tool for detection and analysis of single cell environment.

Keywords Surface enhanced Raman scattering; Single cell detection; Nanotip; Cell pH value; Cell hypoxia

(Received 2022-04-06; accepted 2022-10-13)

Supported by the National Natural Foundation of China (Nos. 42076199, 21976209).