

知識天地

以奈米銀粒子陣列放大細菌表面分子的振動光譜

王懷賢博士生、王玉麟研究員(原子與分子科學研究所)

摘要

拉曼散射自 1928 年被諾貝爾獎得主錢德拉塞卡拉·拉曼 (Chandrasekhara V. Raman) 博士發現後，已經被廣泛地利用來測量各種分子與物質的振動光譜，並藉此來研究分子的結構與物質的組成。但是它有一個很大的限制就是拉曼光譜訊號非常小，所以要取得一個樣品的拉曼光譜常常曠日廢時。

利用緊密且有序排列的奈米金屬銀粒子陣列來大幅地增強吸附在其表面上分子的拉曼光譜訊號，加上這種奈米粒子陣列的高重現性與均勻度，大大的改變了拉曼光譜技術在化學與生物科技的實用性。這種創新的工具讓我們在發展菌種檢測上獲得了許多的成果，利用光學的即時反應偵測特性，跳脫傳統的生物培養檢測，使我們面對未知的細菌能有更快速的了解，在治療和預防上節省寶貴的時間。

拉曼散射 (Raman scattering) 的發現

當我們撥動琴弦，琴就會開始發出一種具有特殊音色的聲音。只要是聽過的樂器，大多數的人都能從它的音色分辨是何種樂器，因為每個樂器的聲音頻譜都是由一組特定的泛音所合成，只要分析它的頻譜就可以聽出是那種樂器。用一束雷射光打在一個分子上，分子也會被彈出「聲音」，所不同的是這種震盪的頻率非常高 ($\sim 10^{12}$ /秒)，我們的耳朵無法偵測到。

拉曼博士在 1922 年首次證實光線會在引發分子震盪後損失一些能量，光線本身的震盪頻率也因此改變了，例如用綠光去打分子就可能看到黃光或是其他顏色的光發射出來。這些各種顏色的光所反應的就是該分子本身的各種自然震盪頻率，就像是一把琴特有的音色。而這種利用光散射現象來測定分子震動的光譜學，就稱為拉曼散射 (Raman scattering)。更仔細的說，當光線被原子或分子所散射，大部分的光子會做彈性碰撞而分散，而這些光子和入射的光子有相同的能量和波長。有一很小部分光子產生所謂的拉曼散射，光子的能量與波長改變，而其改變量所反應的就是分子的振動能階之改變程度。因為不同分子有不同的分子結構其振動能階也大都不同，所以拉曼光譜可以算是一種「分子指紋」。

雖然拉曼光譜在分子鑑定上很有用，但是它有個很大的缺點：訊號太微弱。這種本質上的微弱訊號，使拉曼光譜在對敏感度要求較高的應用中受到了許多限制，也因強度太弱，容易被環境螢光背景給遮蔽，且為了得到夠強的拉曼訊號，常常需要長時間的偵測，在測量低濃度物質及生物體微量分子上的應用很有限，所以需要可以增強拉曼散射的技術。

表面增強拉曼光譜 (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)

1974 年 M. Fleischmann 與其合作者發現將分子放在粗糙的銀電極表面，可得到增強數百萬倍的拉曼光譜訊號，也自此開啟了表面增強拉曼散射光譜的首頁。後來的研究發現貴重金屬（如金、銀）所製成的奈米粒子也可以增強拉曼訊號，尤其是當一對奈米粒互相靠近到 10 奈米以內時所產生表面電漿共振 (surface plasmon resonance) 使得在其中的致分子感受到極大地局部電磁場，因此拉曼散射的機會也隨之增強。

傳統上使用增強式拉曼光譜技術是將樣品放在粗糙的金屬表面或是將其和奈米金屬粒子混在一起測拉曼光譜。然而這兩種方式都有其缺點：拉曼增強效力的強度和均勻性重複性難以兼得。特殊的表面製作技術很難產生夠小的奈米結構，拉曼增強效力不佳。膠態奈米金屬粒子可以因為本身互相的吸附靠的很接近，卻是一個不均勻的結構。以應用增強式拉曼光譜技術的角度來看，一個既有高強度拉曼增強效力 (SERS-active) 又均勻的基板材料，才是真正可行的方案。於是我們想到了一個自然界很特殊的材料：孔洞氧化鋁 (porous anodic aluminum oxide, AAO)。將一鋁片在特定的電解液下，通入直流電氧化，其氧化物會形成一個一個自我組裝 (self-assembly) 的最密堆積奈米孔洞。這些孔洞的孔洞大小和間距和所加的電壓有關，藉由控制電壓和使用可以腐蝕氧化鋁的酸，我們可以任意的控制孔洞間牆壁的厚度，再以此 AAO 材料做為模具，將有拉曼增強效用的貴金屬 (以銀為主) 成長於此孔洞內，便可得到一個可調控粒子間距的奈米粒子陣列 (增強拉曼奈米光學晶片)。這樣製作出來

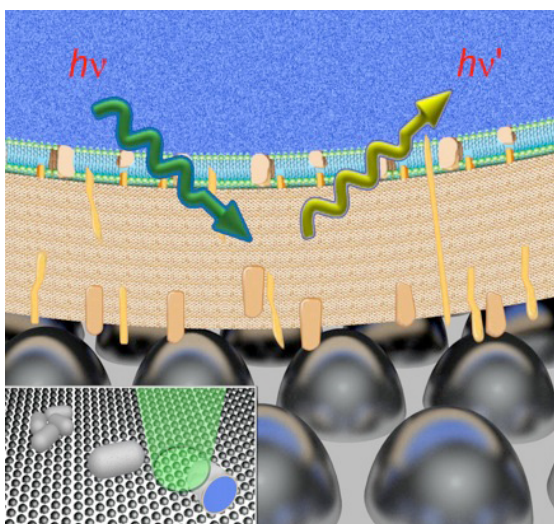
奈米結構同時兼具：(1) 高均勻性：氧化鋁是目前世界上少有的自組成奈米孔洞陣列結構，靠著利用氧化鋁當作模具，可達成同等級均勻度的奈米金屬粒子陣列。(2) 高強度拉曼增強效力：要有好的拉曼增強效力就必須讓金屬粒子靠的越近越好，而我們此製程中，利用酸液去控制氧化鋁孔洞的壁厚，進而控制粒子的間距，使用此做法，我們甚至於可以將整個奈米金屬粒子陣列間距控制到5奈米，是世界上首次達成的技術，造成高強度的拉曼增強效力。而此具有高均勻性及拉曼增強效力的奈米，便可應用於微生物鑑定上，將細菌放置在晶片上，照射雷射光取得其拉曼光譜，讓我們聽見細菌的「聲音」-----細菌表面分子的振動光譜(圖一)。

應用增強拉曼光譜於生醫微生物快速鑑定

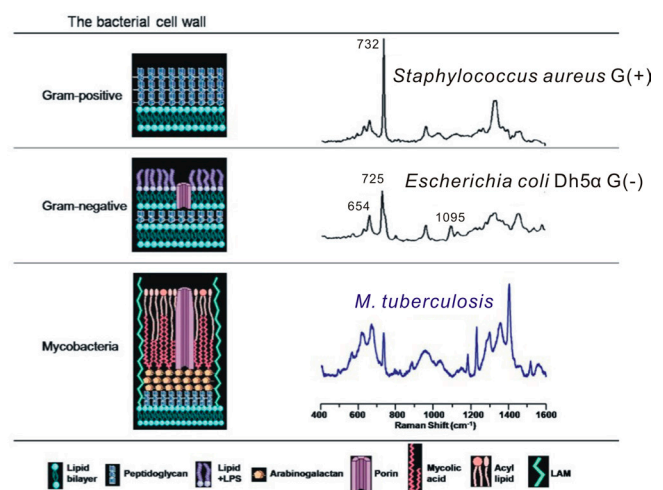
微生物分離與鑑定，一直以來都是生物醫學研究發展上相當重要的挑戰。傳統的分析鑑定方法，須經過耗時的分離、培養、觀察、測試等程序。我們利用奈米金屬粒子陣列，建構一個可快速鑑測生物樣本的表面增強拉曼散射光譜系統。由於拉曼訊號以精確鑑定分子指紋，這套系統在蛋白質、酵素、DNA 等生物分子的結構與反應動態學研究都有許多應用。

我們可利用增強拉曼光譜此項技術來鑑定不同的細菌。將細菌置放在奈米金屬粒子陣列上，細菌細胞壁上緊貼在金屬粒子表面上的分子所產生的拉曼光譜訊號就是我們採到的分子指紋。不同種細菌之間細胞壁的組成會有差異，因此我們會得到不同的增強拉曼訊號。首先我們以格蘭氏陽性菌 (Gram-positive)、格蘭氏陰性菌 (Gram-negative) 和分枝桿菌 (mycobacteria) 三大類去量測其表面拉曼散射光譜(圖二)。格蘭氏染色法是常見的細菌鑑別染色法，利用不同細菌細胞壁對於染劑結晶紫滯留的差異性，可分成格蘭氏陽性菌與陰性菌。格蘭氏陽性菌之胞壁是由厚度約 20 至 80nm 的多層肽聚醣 (peptidoglycan) 組成。相較之下，格蘭氏陰性菌則通常具有約 1-7nm 的較薄肽聚醣層，在肽聚醣層外包覆了外膜及脂多醣 (lipopolysaccharides, LPSs)，整體結構較為複雜。而分枝桿菌在許多生理特質上是異於一般細菌，其具有富含脂質的細胞壁又更為複雜，這使得分枝桿菌無法以一般格蘭氏染色法染色，要使用特殊的染劑以染色。而觀察其增強拉曼散射光譜，我們可以明顯將其分成三組不同的光譜型態，並可對應其細胞壁組成的差異性。革蘭氏陽性菌其細胞壁組成最為簡單，主要由肽聚醣構成，其光譜表現出來的分子振動波峰 (peak) 最少；陰性菌的細胞壁組成結構較多，包含肽聚醣及脂多醣的分子結構，其分子震動波峰則略有增加；而分枝桿菌因其細胞壁結構最是複雜，光譜也顯現出最多的分子振動波峰。

而這樣的技術也可用於細菌的即時抗藥性反應實驗，藉由藥物破壞細菌外殼結構，立即在細菌的拉曼光譜上出現反應，而對藥物有抗藥性的細菌並不會有外殼結構的損害，細菌光譜舊維持不變，快速的反應出細菌對施加的藥物有無抗藥性，大大的縮減以往還需培養的時間。



圖一



圖二