

# 利用表面增强拉曼光谱技术分析温度及 pH 值对 H1N1 亚型流感病毒增殖的影响

贾潇潇<sup>1,2</sup>, 李芸<sup>1</sup>, 范文辉<sup>1</sup>, 孙清岚<sup>3</sup>, 周铁忠<sup>4</sup>, 刘文军<sup>1,2</sup>, 李晶<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 中国科学院微生物研究所 网络信息中心, 北京 100101

4 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001

贾潇潇, 李芸, 范文辉, 等. 利用表面增强拉曼光谱技术分析温度及 pH 值对 H1N1 亚型流感病毒增殖的影响. 生物工程学报, 2016, 32(4): 447-456.

Jia XX, Li Y, Fan WH, et al. Effects of temperature and pH on the growth of H1N1 subtype of influenza A virus by surface-enhanced Raman spectroscopy. Chin J Biotech, 2016, 32(4): 447-456.

**摘要:** 表面增强拉曼光谱 (SERS) 是一种基于纳米颗粒的拉曼光谱, 可以高灵敏度地检测流感病毒等重要病原微生物, 鉴定不同毒株间的差异。为了建立一种快速检测流感病毒 SERS 的方法, 本实验利用 SERS 技术对流感病毒 H1N1 亚型不同毒株在不同温度和 pH 值的条件下进行了病毒毒价强弱的检测, 将流感病毒样品与金纳米颗粒混合静置后用拉曼共聚焦显微镜进行激光扫描。结果显示在 pH 为 7.2、温度为 37 °C 的条件下 3 个 H1N1 亚型的毒株 SERS 检测结果显示均出现至少 1 个大于 (或等于) 3 000 的峰值, 该状态下病毒毒价最强, 最适合病毒生长。另外, 细胞生物学方法与 SERS 技术结果一致, 检测中均表现出较好的稳定性和准确性。

**关键词:** 表面增强拉曼光谱, 流感病毒, 温度, pH 值

**Received:** August 9, 2015; **Accepted:** September 17, 2015

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB955501), National Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2013ZX10004-610), National Natural Science Foundation of China (No. 31100644).

**Corresponding author:** Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB955501), “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2013ZX10004-610), 国家自然科学基金 (No. 31100644) 资助。

# Effects of temperature and pH on the growth of H1N1 subtype of influenza A virus by surface-enhanced Raman spectroscopy

Xiaoxiao Jia<sup>1,2</sup>, Yun Li<sup>1</sup>, Wenhui Fan<sup>1</sup>, Qinglan Sun<sup>3</sup>, Tiezhong Zhou<sup>4</sup>, Wenjun Liu<sup>1,2</sup>, and Jing Li<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Network Information Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China

**Abstract:** Surface enhanced Raman spectroscopy technology (SERS), using gold nanoparticles as a base, was developed for rapid and sensitive detection of virus strains. SERS can be used as a rapid and reliable method to distinguish the titers of viral replication. In the present study, we characterized H1N1 subtypes of influenza A virus strains in different conditions of pH or temperatures, while we analyzed data from SERS technology using gold nanoparticles as a base and cell cultures were employed to further confirm the data from virus strains. Origin8.0 was used to collect Raman spectra, smooth and homogenize data, and to contrast spectra. Our results indicated that the peaks of different virus strains in optimal environmental conditions ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{pH}=7.2$ ) reached  $\geq 3\ 000$ . This criterion was verified by subsequent virological method. The present data indicate that the established SERS protocol can be used as a rapid and reliable method to distinguish the replication rate of virus, which can be further used in clinical samples.

**Keywords:** SERS, influenza A virus, temperature, pH

流感病毒属正粘病毒科，含有单股负链 RNA 基因组，是在世界范围内流行并引发疾病和死亡的一种病毒。至今正粘病毒科包括：A 型流感病毒<sup>[1]</sup>、B 型流感病毒<sup>[2]</sup>、C 型流感病毒、托高土病毒<sup>[3]</sup>和婢媒病毒<sup>[4]</sup>。A 型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 根据其表面血凝素蛋白 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的变异情况分为不同的亚型，HA 分 16 个亚型，NA 分 9 个亚型，以 H<sub>x</sub>N<sub>x</sub> 方式组合，从 H1N1 至 H15N9，目前共有 135 种亚型。绝大多数的 A 型流感病毒都分离自鸟类，历史上易引起人或禽类间大范围传播的主要是 H1N1<sup>[5]</sup>、H3N2<sup>[6]</sup>等亚型，H5N1、H7N9<sup>[7]</sup>等亚型的流感病毒致死率较高。然而，

目前涉及环境因子 (如温度、pH 值等) 与流感病毒粒子毒价相互影响及作用关系的报道较少。

1928 年，印度科学家 (Raman C.V.) 发现了由光子的非弹性碰撞产生的一种光散射现象——拉曼散射并因此命名<sup>[8]</sup>。这种非弹性碰撞的原理是在碰撞过程中光子与分子之间发生不完全碰撞，从而光子与分子之间进行能量的传递，使得光子既改变了运动方向也改变了运动的频率<sup>[9]</sup>。拉曼光谱被发现后主要应用于物质结构的测定。表面增强拉曼光谱作为拉曼光谱的一种，其主要原理是利用纳米金属颗粒与被测分子间的相互作用来提高图谱的信噪比，增强不同样品之间的峰图差异<sup>[10]</sup>。近年来研究人员利用

SERS 技术对一些常见病原菌进行了快速检测鉴定,并对混合菌种进行了区分<sup>[11-13]</sup>,本文旨在构建表面增强拉曼光谱技术检测不同温度及 pH 值条件下 H1N1 亚型流感病毒毒价强弱的方法,并初步探究与细胞生物学方法的关联性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒株

流感病毒 A/WSN/33 (H1N1) (以下简称为 WSN)、A/PR/8 (H1N1) (以下简称为 PR8)、A/California/04/2009 (以下简称为 CA04),由中国科学院微生物研究所分离、鉴定和保藏。

### 1.2 细胞株及鸡胚

犬肾上皮连续细胞系 MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养,由本实验室传代和保藏。SPF 鸡胚 (10 日龄) 购自 (北京) 梅里亚动物保健有限公司。

### 1.3 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶购自英潍捷基 (上海) 贸易有限公司;青链霉素混合液 (储存浓度  $10^7$  U/mL、终浓度  $10^4$  U/mL)、TPCK-Trypsin (储存浓度 2 mg/mL、终浓度 2  $\mu$ g/mL) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;0.1 mol/L 柠檬酸购自国药集团化学试剂有限公司;实验中运用的 Klarite™ 金纳米基底购自 D3 技术 (英国) 有限责任公司,由国家纳米科学中心合成并惠赠。

### 1.4 病毒样品的收集与纯化

将流感病毒毒株 WSN、CA04、PR8 分别接种于 SPF 鸡胚,72 h 收集尿囊液以 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液;将上清液以  $10^5 \times g$  (Ti40) 离心 2 h,将沉淀物用 1 mL 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 悬浮,振荡均匀;加至依次由 30%、

40%、50%、60%蔗糖制成的密度梯度上,以  $10^5 \times g$  (SW40) 离心 2 h,取沉淀条带;取沉淀条带加 10 倍量 PBS 悬浮、振匀。再次以  $10^5 \times g$  (Ti40) 离心 2 h,取沉淀用 200  $\mu$ L 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 悬浮、振匀,  $-80$   $^{\circ}$ C 保存。

### 1.5 拉曼光谱仪检测参数的设定

设置拉曼光谱仪的如下参数。

关键参数为: Spectral acquisition setup.

在 Range 界面设置如下参数:

Grating scan type: Extended; Confocality: Standard; Spectrum Range: Low 100.00; Centre Raman shift/ $\text{cm}^{-1}$ ; High 2 000.00; Configuration: Laser name 532 nm edge; Grating name 1 800 l/mm.

在 Acquisition 界面设置如下参数:

Exposure time/s: 20.00; Accumulations: 1; Objective: 50; Laser power %: 100.

### 1.6 不同毒株 SERS 稳定性检测

在温度条件为  $37$   $^{\circ}$ C, pH 条件为 7.2 的环境下分别培养 WSN、CA04、PR8 三种病毒并纯化。将纯化后的流感病毒液样品滴加 10  $\mu$ L 到载玻片中,向载玻片的样品中滴加 5  $\mu$ L 100 nm 金纳米颗粒,静置 10 s,拉曼光谱仪检测。实验结果使用 Origin8.0 收集峰图并进行平滑均一化处理,最后将峰图进行拟合。

### 1.7 细胞感染及病毒滴定检测

取生长良好的细胞,运用 10% FBS、1% PS DMEM 制备细胞悬液,对细胞进行计数,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的悬液,然后加入到 96 孔细胞培养板中,100  $\mu$ L/孔,  $37$   $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养过夜,使其铺满单层。将待测定病毒进行 10 倍梯度稀释,选取 6-8 个梯度进行试验。

96 孔板中细胞长满单层后,将原培养液弃掉;在 96 孔板的第 11、12 两列每孔各加 100  $\mu$ L

含 TPCK-Trypsin (终浓度为  $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 1% PS 的 DMEM 作为阴性对照。病毒稀释液从低浓度开始每个稀释度加 8 个复孔, 每孔  $100\mu\text{L}$ , 用  $10^{-1}$  至  $10^{-10}$  连续梯度稀释的病毒稀释液依次感染 96 孔板中的细胞。置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 72 h, 观察细胞病变孔数并记录, 按 Reed-Muench 氏法<sup>[14]</sup>计算  $\text{TCID}_{50}$ 。

### 1.8 不同温度条件拉曼技术检测

将在温度条件分别为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $52.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $57.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养的病毒进行纯化后, 将纯化的流感病毒液样品滴加  $10\mu\text{L}$  到载玻片中, 随后向载玻片的样品中滴加  $5\mu\text{L}$   $100\text{ nm}$  金纳米颗粒, 静置 10 s, 拉曼光谱仪检测。实验结果使用 Origin8.0 收集峰图并进行平滑均一化处理, 最后将峰图进行拟合。

### 1.9 不同 pH 条件拉曼技术检测

将在 pH 条件分别为 4.6、5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.2 下培养的病毒进行纯化后, 将纯化的流感病毒液样品滴加  $10\mu\text{L}$  至载玻片中, 随后向载玻片的样品中滴加  $5\mu\text{L}$   $100\text{ nm}$  金纳米颗粒, 静置 10 s, 拉曼光谱仪检测。实验结果使用 Origin8.0 收集峰图并进行平滑均一化处理, 最后将峰图进行拟合。

## 2 结果与分析

### 2.1 流感病毒颗粒形态

为观察流感病毒颗粒的形态, 利用电镜将 PR8 毒株按不同倍数放大, 分别得到比例尺为  $50\text{ nm}$ 、 $100\text{ nm}$  及  $0.5\mu\text{m}$  的流感病毒颗粒形态图 (图 1)。电镜结果显示流感病毒颗粒呈球状或丝状, 表面不光滑且有突起, 可见核心、包膜与基质蛋白区域。

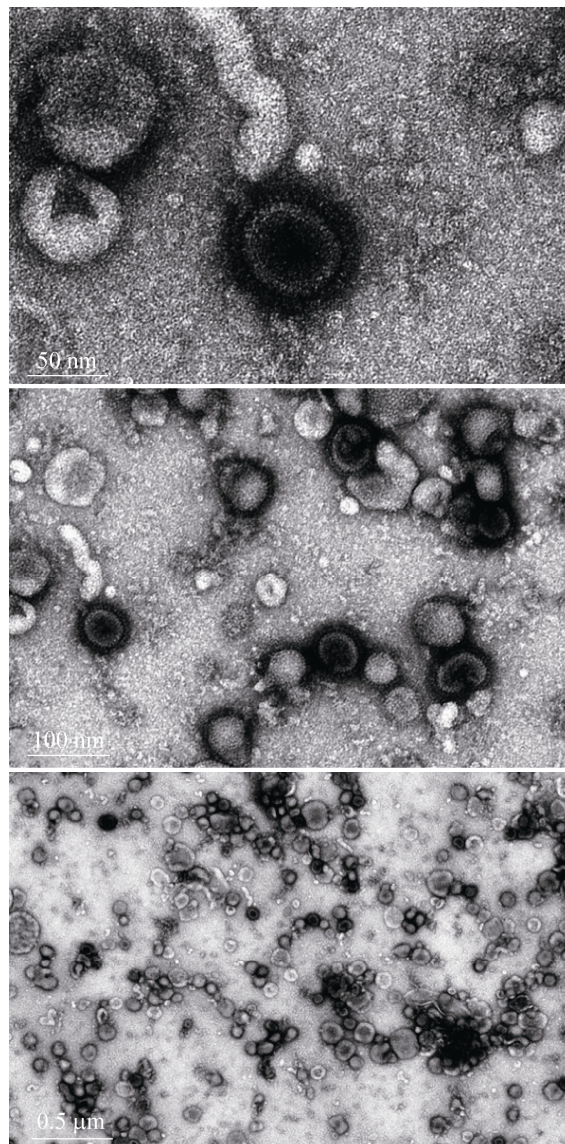


图 1 电镜下的流感病毒颗粒形态

Fig. 1 Influenza A virus particles under electron microscope.

### 2.2 SERS 技术稳定性的检测

为了检测 SERS 技术的稳定性, 将 WSN、PR8、CA04 流感病毒毒株置于 pH 值为 7.2、温度为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件下培养并制备样品分别进行多次重复实验。横坐标表示拉曼峰位移值, 纵坐标表示拉曼信号相对强度, 如图 2 峰图显示, CA04

毒株的主要出峰位置在  $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$  处, PR8 毒株主要毒株出峰位置在  $950\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$  处, WSN 毒株的主要出峰位置在  $950\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 125\ \text{cm}^{-1}$  处。结果显示峰图重现性良好, 表明该方法在

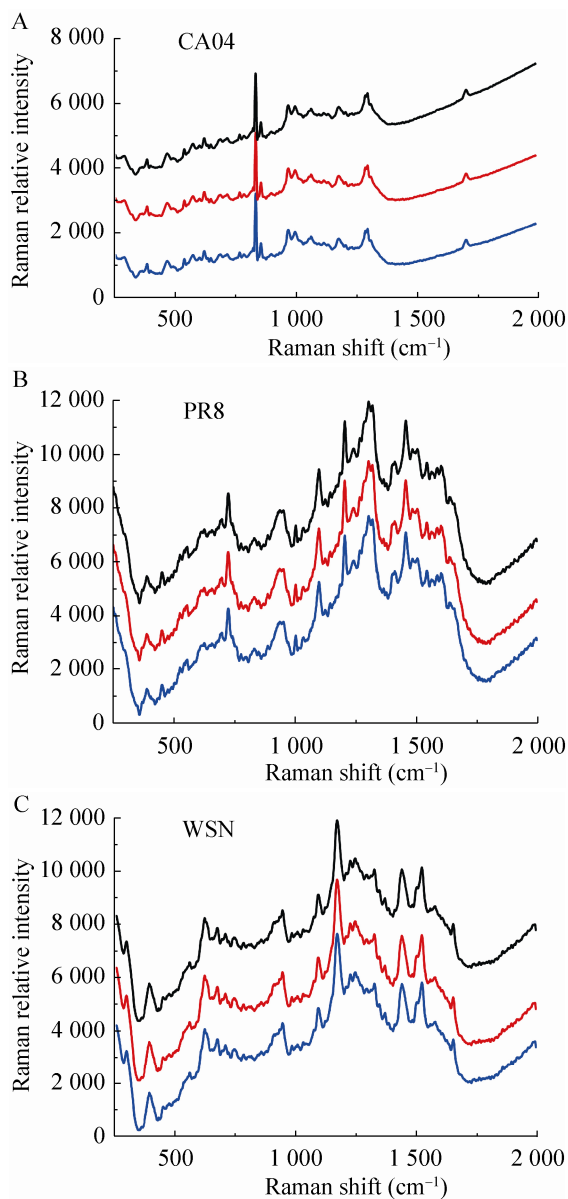


图 2 pH 值为 7.2、温度为 37 °C 的条件下不同毒株 SERS 稳定性检测  
Fig. 2 Stability of influenza A virus strains tested by SERS.

此实验中具有良好的稳定性。另外, 图 1 显示在 pH 值为 7.2、温度为 37 °C 的条件下 3 个毒株的 SERS 检测结果均出现至少 1 个大于 (或等于) 3 000 的峰值。

### 2.3 细胞感染及病毒滴度的检测

为了检测在不同环境因子条件下 A 型流感病毒 H1N1 亚型不同毒株的病毒滴度变化, 我们使用细胞生物学的方法使病毒感染细胞并在相应条件下培养, 检测  $\text{TCID}_{50}$  值。图 3 中横坐标表示不同环境因子, 纵坐标表示不同流感病毒滴度, 结果显示在不同 pH 值条件下, CA04、WSN、PR8 三株毒株在 pH 值为 5.0 及以下时基本丧失毒价, 而随着 pH 值的上升病毒滴度逐渐

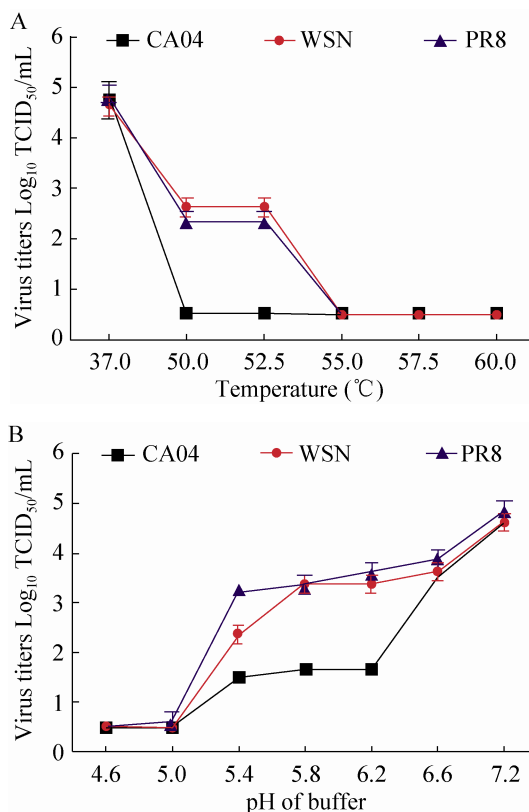


图 3 H1N1 不同亚型毒株感染细胞后病毒滴度检测  
Fig. 3 Viruses growth ability tests of three influenza A virus strains.

升高,在 pH 值为 7.2 时复制能力最强。在环境温度改变的情况下,CA04 毒株在 50 °C 及以上条件下毒价基本丧失,WSN 和 PR8 毒株在温度由 37 °C 上升至 50 °C 时毒价显著下降,在 50 °C–52.5 °C 时病毒滴度平稳,温度上升至 55 °C 及更高后基本丧失毒价,二者下降趋势基本一致。

#### 2.4 不同温度条件下 SERS 检测

为了检测 A 型流感病毒在不同温度条件下病毒滴度的变化,我们将流感病毒在不同环境下培养后使用 SERS 技术进行快速检测。图 4 中横坐标表示拉曼峰位移值,纵坐标表示拉曼信号相对强度,峰图显示在 50 °C–60 °C 范围内

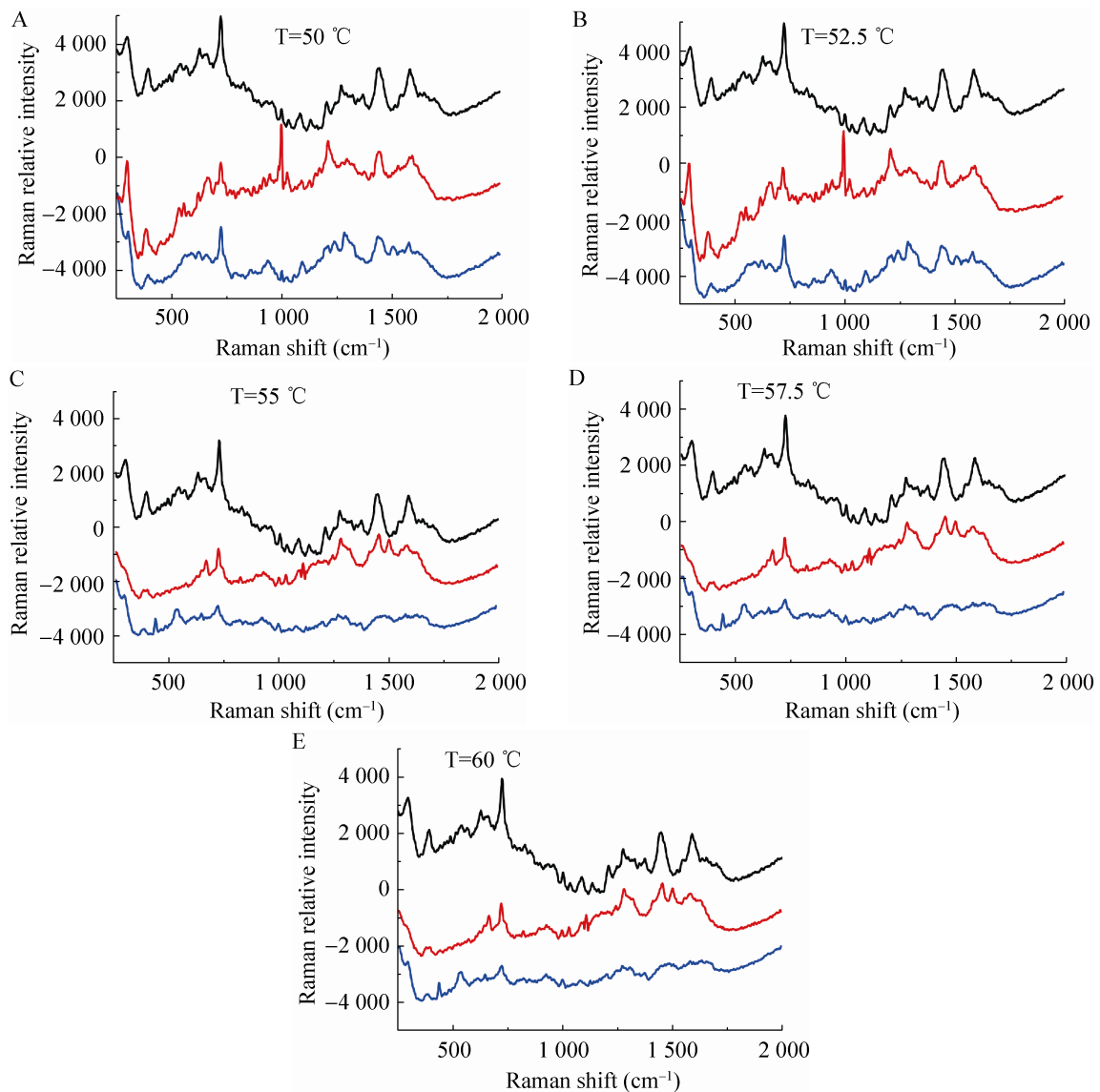


图 4 不同温度毒株拉曼技术检测

Fig. 4 Three influenza A virus strains, CA04 (Black), WSN (Red), and PR8 (Blue), were analyzed under different temperatures using SERS.

温度变化的条件下, CA04 毒株的峰图变化不显著, 主要出峰点均集中在  $1\ 000\text{--}1\ 100\ \text{cm}^{-1}$  等位置, 峰图的趋势及走向一致。PR8 和 WSN 毒株的峰图在  $55\ ^\circ\text{C}\text{--}60\ ^\circ\text{C}$  范围内与  $50\ ^\circ\text{C}\text{--}52.5\ ^\circ\text{C}$  范围内发生了显著的改变, 其中 PR8 毒株在  $50\ ^\circ\text{C}$  和  $52.5\ ^\circ\text{C}$  时  $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$  位置的峰强度在  $55\ ^\circ\text{C}\text{--}60\ ^\circ\text{C}$  范围内显著变弱, WSN 毒株在  $50\ ^\circ\text{C}$  和  $52.5\ ^\circ\text{C}$  时

$910\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$  位置的峰强度在  $55\ ^\circ\text{C}\text{--}60\ ^\circ\text{C}$  范围内显著变弱, 以上结果显示, SERS 技术与细胞生物学检测的结果基本一致。

## 2.5 不同 pH 值条件下 SERS 检测

为了检测 A 型流感病毒在不同 pH 条件下病毒滴度的变化, 我们将流感病毒在不同环境下培养后使用 SERS 技术进行快速检测。图 5

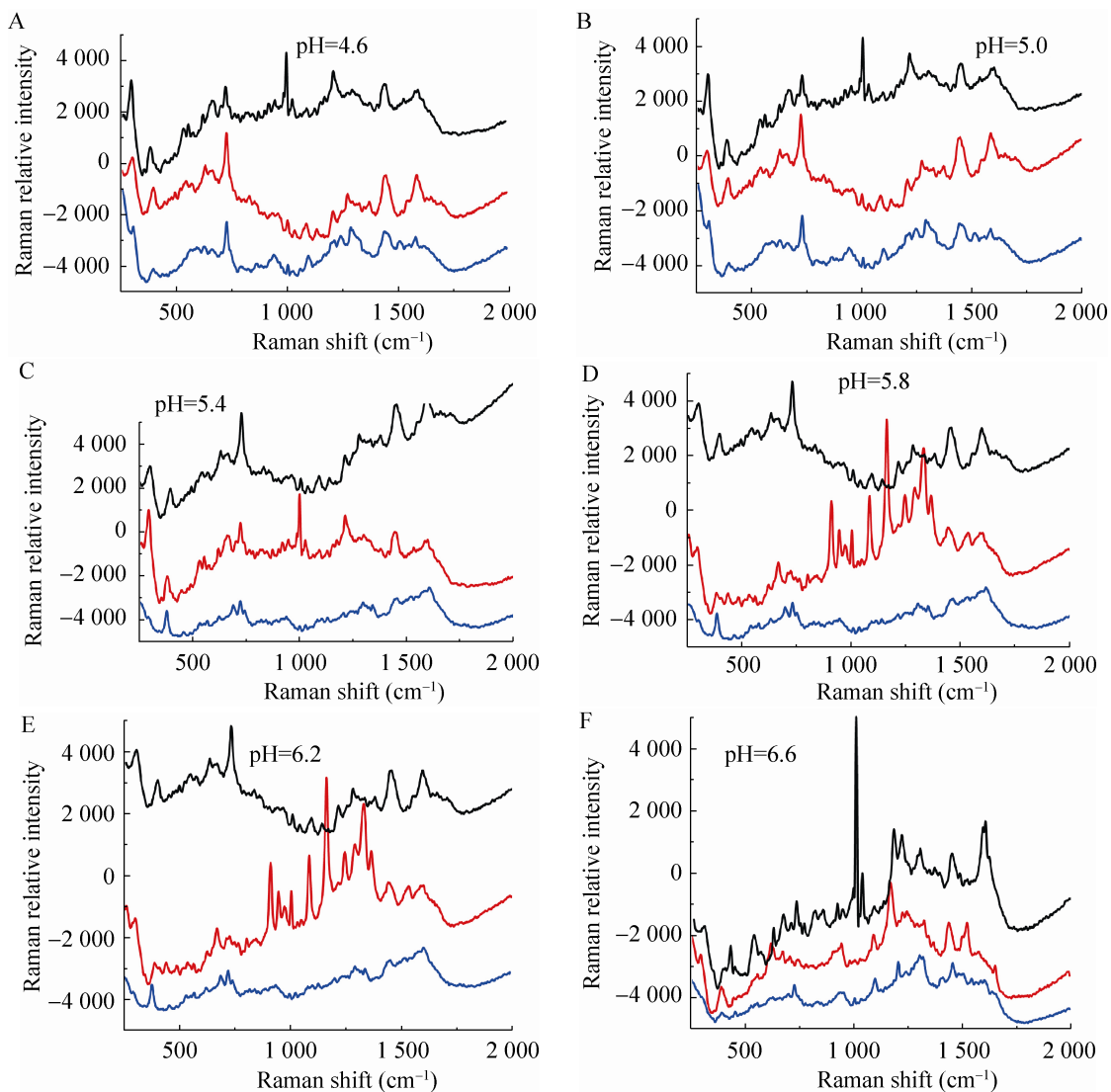


图 5 不同 pH 值毒株拉曼技术检测

Fig. 5 Three influenza A virus strains, CA04 (Black), WSN (Red), and PR8 (Blue), were analyzed under different pH using SERS.

中横坐标表示拉曼峰位移值,纵坐标表示拉曼信号相对强度,结果显示 CA04、WSN、PR8 三株毒株在 pH 为 4.6 和 5.0 时峰图基本一致,CA04 和 PR8 毒株各自的峰图在 pH 为 5.4、5.8、6.2 时基本一致,与前两个 pH 的峰图相比  $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$  左右的峰强度减弱,而 WSN 毒株的结果显示 pH 从 5.4 变化至 5.8 后峰图发生了显著改变, $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$  左右出现了多峰现象。在 pH 为 6.2 时峰图与 5.8 时基本一致,在 pH 上升至 6.6 后,3 株毒株的峰图均发生了显著改变。3 株毒株在 pH 条件改变过程中峰图的变化趋势与细胞实验学检测结果一致。

### 3 讨论

近年来,随着应用技术的发展,对于病原菌的检测手段也从传统的分离培养、血清学检测发展到了聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、ELISA、Realtime-PCR 等方法,表面增强拉曼光谱 (SERS) 的应用很大程度提高了检测的灵敏度并大幅缩短了所需时间,研究人员可以在样品不使用标签标记的情况下在几分钟之内得到准确的检测结果。表面增强拉曼光谱技术是一种高灵敏度和快速的检测方法,目前在微生物领域,我国应用较广的是对食源性大肠杆菌<sup>[15]</sup>、金黄色葡萄球菌<sup>[16]</sup>、军团菌<sup>[17]</sup>、芽孢杆菌<sup>[18]</sup>等常见致病菌的快速分离鉴定<sup>[19]</sup>。目前 SERS 技术在病毒检测中的应用远没有细菌检测方面成熟和广泛。但有研究结果显示,SERS 技术可以用来快速区别和鉴定流感病毒的种类,如 Zhao 等<sup>[20]</sup>利用银纳米颗粒作为基底,对流感病毒的 3 种不同毒株 A/HKx31、A/WSN/33 和 A/PR/8/34 进行了 SERS 的鉴定。在病毒样品体积小于  $5\ \mu\text{L}$  的情况下拉曼光谱仪

1 min 内完成了收集,并且根据峰图之间的区别可以清楚地鉴别出不同种毒株,结果发现 SERS 可以用来鉴别同一病原菌的不同种毒株。

根据目前已知的研究结果,流感病毒 M2 蛋白是一种离子通道蛋白<sup>[21]</sup>,病毒所处环境的 pH 值会影响到离子通道蛋白的功能。有研究发现在 pH 值升高至 8.5 的情况下 M2 蛋白中的 4 个组氨酸会形成一个边缘-面的  $\pi$  堆叠状的结构,阻止了水分子通过氢键形成长链来传导质子。在低 pH 值的导通状态下,组氨酸和水形成氢键,并发生环-再定向反应<sup>[22]</sup>。从本实验的结果得出,在不同酸碱度的条件下,病毒表面膜蛋白结构和功能可能会发生改变,从而影响病毒的复制能力。热休克蛋白 (HSP)是一种应激蛋白,广泛存在于真核和原核细胞内<sup>[23]</sup>,一些 HSP 家族的蛋白,如 HSP40、HSP70 在抗病毒感染过程中发挥重要作用<sup>[24]</sup>,能够抑制病毒在细胞内的繁殖。多项研究证明,流感病毒的 M2、PB1-F2 等蛋白会与宿主的热休克蛋白 Hsp40、Hsp70 发生相互作用<sup>[25]</sup>。本实验结果表明在温度由  $37\ ^\circ\text{C}$  开始上升后病毒滴度逐渐或迅速下降,并且 SERS 结果也显示病毒滴度改变的情况下峰图发生了显著变化,这一现象可能是由于在高温侵袭的状态下,宿主体内 HSP 迅速增加,对病毒复制的抑制增强,导致病毒滴度下降。

SERS 峰图中每一位移处的拉曼峰都代表着某一种或一类原子团、化学键等物质。如  $720\ \text{cm}^{-1}$ – $800\ \text{cm}^{-1}$  可能为 C-F 键, $800\ \text{cm}^{-1}$ – $950\ \text{cm}^{-1}$  可能为 C-O-C 键, $910\ \text{cm}^{-1}$ – $960\ \text{cm}^{-1}$  为羧酸二聚物, $990\ \text{cm}^{-1}$ – $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$  可能为芳环, $1\ 010\ \text{cm}^{-1}$ – $1\ 095\ \text{cm}^{-1}$  可能为 Si-O-C 或 Si-O-Si 键, $120\ \text{cm}^{-1}$ – $1\ 225\ \text{cm}^{-1}$  可能为 C=S 键等<sup>[26]</sup>。本实验 SERS 结果中随着温度的升高或 pH 值的



降低毒株的峰图发生显著变化, 细胞生物学结果显示毒价显著下降, 结合二者的结果推测可能是流感病毒中关键蛋白的构象改变导致病毒复制受到抑制或功能丧失, 而具体的机制还需要更进一步分子生物学实验验证。因此, 峰图变化显示的外界培养条件的改变对病毒毒价影响的更深入的分子机制探究也将是我们下一步工作的重点。

综上所述, 根据本实验中的 TCID<sub>50</sub> 结果和 SERS 结果的对比, 发现在细胞生物学结果显示毒价变化时, SERS 图谱也相应显示了峰图的变化, 表明 SERS 技术的检测结果是对细胞生物学实验结果的良好佐证。在 pH 值为 7.2、温度为 37 °C 的条件下不同毒株的细胞生物学及 SERS 检测结果说明, 该状态下病毒毒价最强, 最适合病毒生长, 为最适的培养条件。日后, 我们将收集不同毒株峰图进行汇总和归纳, 建立起具有快速查阅比对功能的拉曼数据库, 应用于临床样本的检测。

## REFERENCES

- [1] Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, et al. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 274–298.
- [2] Fujinaga S, Hara T. Acute kidney injury following plastic bronchitis associated with influenza B virus in a child with nephrotic syndrome. Indian Pediatr, 2015, 52(6): 523–525.
- [3] Kosoy OI, Lambert AJ, Hawkinson DJ, et al. Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. Emerg Infect Dis, 2015, 21(5): 760–764.
- [4] Bílý T, Palus M, Eyer L, et al. Electron tomography analysis of Tick-Borne encephalitis virus infection in human neurons. Sci Rep, 2015, 5: 10745.
- [5] Huang SSH, Lin Z, Banner D, et al. Immunity toward H1N1 influenza hemagglutinin of historical and contemporary strains suggests protection and vaccine failure. Sci Rep, 2013, 3: 1698.
- [6] Bedford T, Riley S, Barr IG, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. Nature, 2015, 523(7559): 217–220.
- [7] Taft AS, Ozawa M, Fitch A, et al. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. Nat Commun, 2015, 6: 7491.
- [8] Li R, Zhou JC, Lu CF. Application of Raman scattering technology in biology. Biotech Bull, 2009(12): 62–64 (in Chinese). 李睿, 周金池, 卢存福. 拉曼光谱在生物学领域的应用. 生物技术通报, 2009(12): 62–64.
- [9] Zhao YC, Jackson SD. Passively Q-switched fiber laser that uses saturable Raman gain. Opt Lett, 2006, 31(6): 751–753.
- [10] Jia XX, Li J, Qin T, et al. Current views on surface enhanced Raman spectroscopy in microbiology. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 611–620 (in Chinese). 贾潇潇, 李晶, 秦天, 等. 表面增强拉曼光谱技术在微生物鉴定中的应用进展. 生物工程学报, 2015, 31(5): 611–620.
- [11] Cheng IF, Chang HC, Chen TY, et al. Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy. Sci Rep, 2013, 3: 2365.
- [12] Lin CC, Yang YM, Liao PH, et al. A filter-like AuNPs@MS SERS substrate for *Staphylococcus aureus* detection. Biosens Bioelectron, 2014, 53: 519–527.
- [13] Lin HY, Huang CH, Hsieh WH, et al. On-line SERS detection of single bacterium using novel SERS nanoprobe and a microfluidic dielectrophoresis device. Small, 2014, 10(22): 4700–4710.
- [14] Brown WF. Variance estimation in the Reed-Muench fifty per cent end-point determination. Am J Hyg, 1964, 79: 37–46.
- [15] Fan C, Hu ZQ, Mustapha A, et al. Rapid detection

- of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates. *Appl Microbiol Biot*, 2011, 92(5): 1053–1061.
- [16] Lu XN, Samuelson DR, Xu YH, et al. Detecting and tracking nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a microfluidic SERS biosensor. *Anal Chem*, 2013, 85(4): 2320–2327.
- [17] Li J, Qin T, Jia XX, et al. Rapid identification of *Legionella* pathogenicity by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biomed Environ Sci*, 2015; 28(6): 437–444.
- [18] Deng AH, Sun ZP, Zhang GQ, et al. Rapid discrimination of newly isolated *Bacillales* with industrial applications using Raman spectroscopy. *Laser Phys Lett*, 2012, 9(9): 636.
- [19] Cao YC, Jin RC, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297(5586): 1536–1540.
- [20] Zhao YP, Shanmukh S, Liu YJ, et al. Silver nanorod arrays can distinguish virus strains. *Phys Rev Lett*, 1997, 78: 1667–1670.
- [21] Nguyen H, Le L. Steered molecular dynamics approach for promising drugs for influenza A virus targeting M2 channel proteins. *Eur Biophys J*, 2015, 44(6): 447–455.
- [22] Hu FH, Luo WB, Hong M. Mechanisms of proton conduction and gating in influenza M2 proton channels from solid-state NMR. *Science*, 2010, 330(6003): 505–508.
- [23] Finka A, Sharma SK, Goloubinoff P. Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Front Mol Biosci*, 2015, 2: 29.
- [24] Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, et al. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 2001, 291(5508): 1553–1557.
- [25] Guan ZH, Liu D, Mi SF, et al. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. *Protein Cell*, 2010, 1(10): 944–955.
- [26] Tammer MG. Sokrates: infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. *Colloid Polym Sci*, 2004, 283(2): 235.

(本文责编 郝丽芳)