



Использование спектроскопии КР для анализа одиночных клеток бактерий и их видов в растворе.

Способность идентифицировать микробы в образце остается серьезной проблемой экологических и медицинских исследований. Поскольку многие бактерии не могут быть изолированы и культивированы, традиционные аналитические методы на основе культур, имеют ряд существенных недостатков для анализа бактерий. Сочетание метода комбинационного рассеяния (Раман) и микроскопии в конфокальной микроскопе КР, таком как LabRAM, позволяет успешно проанализировать даже отдельные бактериальные клетки в течение нескольких минут, без необходимости культивирования



Рисунок 1. Настольный микроскоп КР LabRAM

Анализ бактерий

Преыдушие исследования показали, что КР микроскопы обеспечивает метод для анализа одиночных бактерий. Исследовательская работа, описанная в этом документе, предполагает не только анализ одиночных клеток бактерий, но при помощи полученных спектров идентификацию конкретных бактериальных видов.

На рисунке 2 показана легкость, с которой отдельные клетки могут быть распознаны при помощи микроскопа, получая хорошее качество спектра КР для каждой клетки (при лазерном возбуждении ~ 8 мВт 532 нм). Предварительное положение полос в спектре показывает вклад от нуклеиновых кислот, углеводов, белков и липидов - все основные молекулы клеток.

Многомерный анализ

Большой объем информации, присутствующий в спектре комбинационного рассеяния затрудняет анализ - каждый спектр (рисунок 2) включает перекрывающиеся полосы от различных компонентов. Спектры, полученные из отдельных клеток того же вида, и различных видов, все показывают многочисленные небольшие изменения, которых слишком много, чтобы отличить невооруженным глазом.

Тем не менее, многомерные методы, включая анализ главных компонентов (РСА), дискриминант функционального анализа (ДКА) и иерархическая кластерного анализа (НСА) позволяют различить многочисленные тонкие спектральные различия, чтобы использовать их для классификации типов клеток

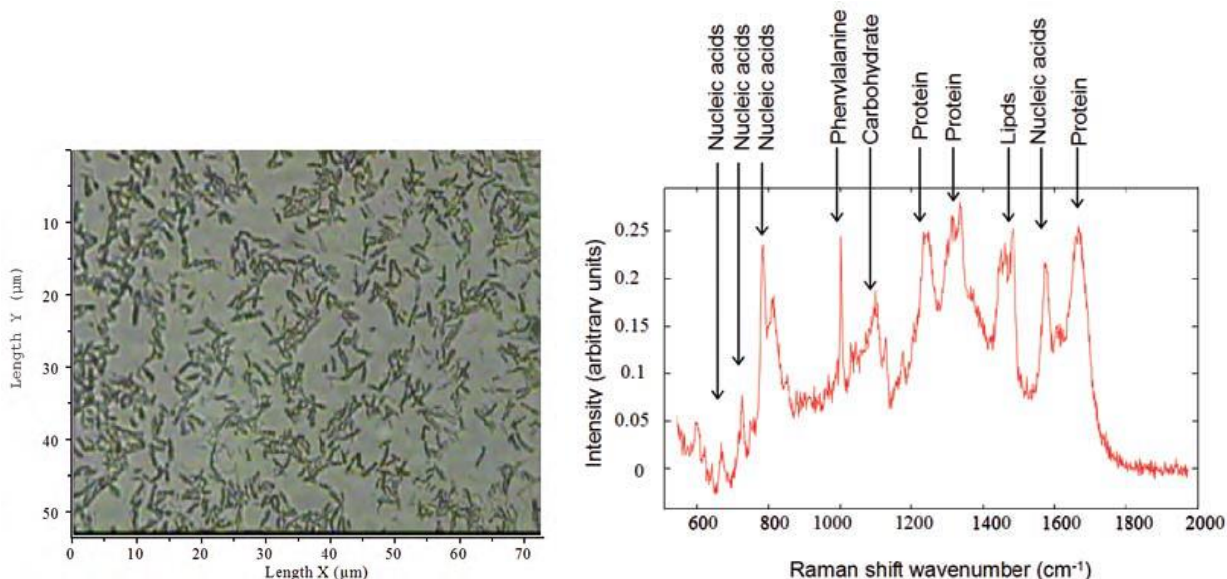


Рисунок 2. Слева: изображение бактериальных клеток при 100х объективе. Справа: изображение спектра КР единичной бактерии

Идентификация видов

Три вида бактерий (ацинетобактер *Acinetobacter sp*, ADP1 кишечная палочка *E. coli* DH5 α и Псевдомоназ флуоресцентный *Pseudomonas fluorescens* SBW25) были изучены. Для каждого вида были взяты клетки трех этапов роста (соответствующих инкубации 4ч, 8ч, и 22ч). Первоначальный многомерный анализ (Рисунок 3) показал превосходную кластеризацию для трех видов бактерий, ясно указывая на способность КР-метода различать физиологические отличия между клетками разных видов. Интересно отметить, что этот эксперимент показал, что кластеризация устойчива к фенотипическим различиям видов, несмотря на временные различия в клеточной физиологии во время различных фаз роста. Это показывает, что независимо от того на какой стадии роста конкретная клетка находится, КР является быстрым методом идентификации видов.

a *Acinetobacter sp*

b ADP1 *E.coli* DH5 α

c *Pseudomonas fluorescens* SBW25

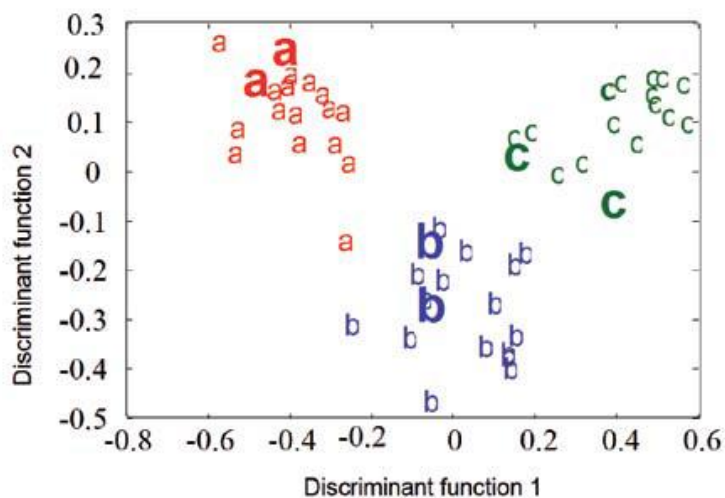


Рисунок 3. Многомерный анализ спектров от трех видов бактерий показывает хорошую дискриминацию между видами. Для каждого вида буквы нормальным шрифтом указывают на данные, полученные стандартным методом, а буквы, выделенные жирным шрифтом, отражают данные тестирования

Дискриминация фазы роста

Отдельная СПС анализ спектров от одного вида выделены изменения в относительных концентраций клеточных компонентов в различных фазах роста (4ч, 8ч и 22ч Инкубации). Как показано на рис.4, для всех трех штаммов была в некоторой степени разделение между экспоненциальной (8ч) и стационарной (22ч) фазами роста. Анализ причины различий в спектре показал, что отношение РНК к белкам, углеводам и липидам было выше в экспоненциальной фазе, чем в стационарной фазе.

Сдвиг спектра КР, вызванный добавлением ^{13}C

Анализ спектров комбинационного рассеяния показал, что для *P. Fluorescens* SBW25, выращенной на 100% $^{13}\text{C}_6$ глюкозе, ряд пиков смещается в сторону более низких длин волн по сравнению с образцами, выращенными в 100% ^{12}C (рис 5). Анализ PCA выявил закономерности от низкого до высокого процента ^{13}C -глюкозы по второй главной оси компонента. Дальнейший анализ показал, что основной вклад в наблюдаемых спектрах дифференциации был от белков и нуклеиновых кислот, что вероятно связано с тем, что эти два компонента представляют ~ 75% от общей биомассы клеток.

Рамановская карта клеток бактерий

Благодаря конфокальности КР микроскопа LabRAM достигается хорошее пространственное разрешение, что очень важно при анализе одиночных клеток бактерий порядка 1-2 мкм. Картирование экспериментов (Рисунок 6), показывает, что даже одиночные клетки бактерий имеют четкое изображение, несмотря на их небольшой размер

Выводы

Рамановская микроскопия, использованная для идентификации одиночных клеток бактерий с многомерным анализом, показала, что различные виды и фазы роста могут быть быстро различимы. Клетки, выращенные на среде, обогащенной с различным количеством ^{13}C и питательных веществ, показали смещение полос КР в сторону низких волновых чисел из-за присутствия тяжелого изотопа. При дальнейшем многомерном анализе, клетки могут быть классифицированы в соответствие с процентным поглощением ^{13}C .

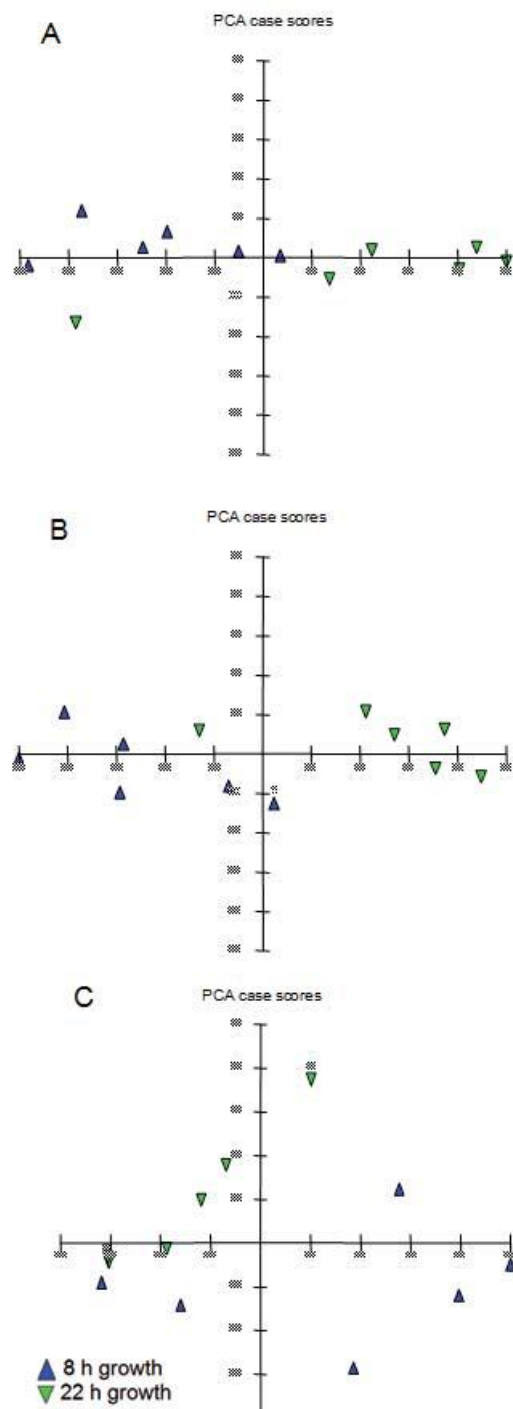


Рисунок 4 PCA анализ экспоненциальной (8ч) и стационарной (22ч) фаз роста *Acinetobacter* sp. ADP1 (A), *E.coli* DH5α (B) и *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (C).

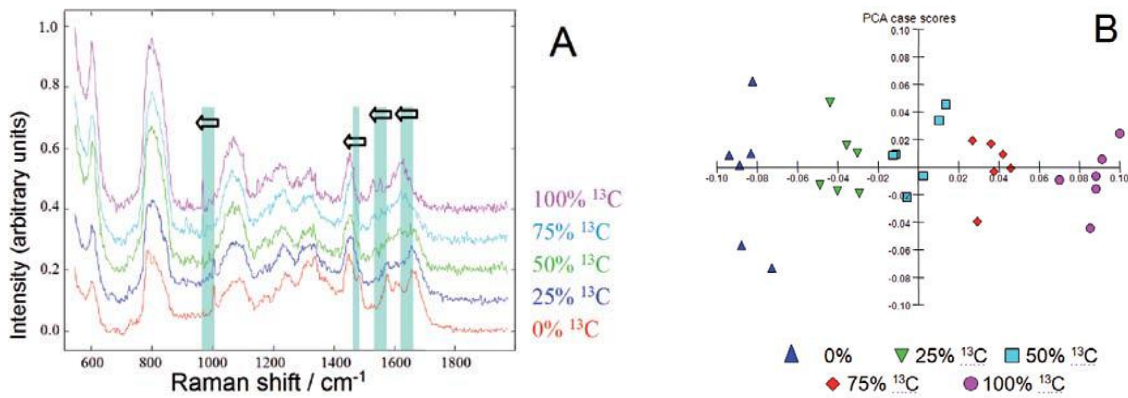


Рисунок 5. (А) Волновой сдвиг в зависимости от присутствия ^{13}C (В) PCA анализ спектров КР *P. fluorescens SBW25*, инкубированных с различным процентом содержания $^{13}\text{C}_6$ -глюкозы

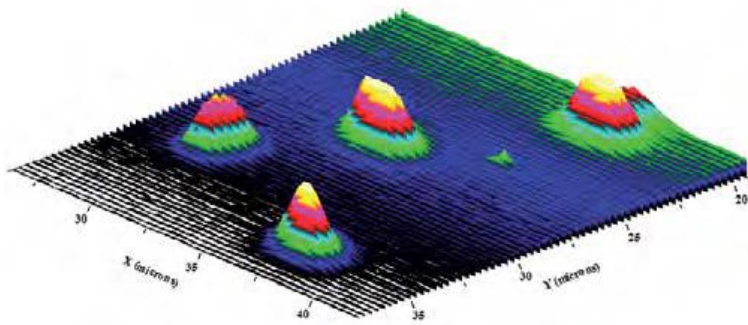


Рисунок 6. Картированное КР изображение клеток бактерий

Есть работы 2012г., посвященные использованию метода спектроскопии комбинационного рассеяния для идентификации видов бактерий и культивируемых штаммов в воспроизводимых условиях, где использовали лазер с длиной волны 785 нм, чтобы уменьшить собственную флуоресценцию некоторых типов бактерий или среды. В экспериментах использовался микроскоп КР на базе Leica DM2500 с моторизованным столиком, 5x, 20x, 50x, 100x объективами, лазером 785 нм. Образцы были расположены непосредственно под 50x объективом микроскопа, лазерное пятно фокусировали последовательно на центральной поверхности каждой бактериальной колонии. Спектральный диапазон был продлен до 600-1600 cm^{-1} для покрытия наиболее подходящей зоны.