

一种酵母细胞生长现象的实时单细胞拉曼光谱观察*

王桂文¹ 姚辉璐¹ 彭立新¹ 何碧娟² 黎永青^{3**}

(广西科学院生物物理实验室 南宁 530003) (广西科学院 南宁 530003)

(美国东卡罗莱纳大学物理系 Greenville NC 27858-4353 USA)

摘要 用拉曼镊子观察单个即发活性干酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞在2.0%葡萄糖溶液中的活化过程,收集其拉曼光谱。结果发现,在某一批次的产品中,酵母细胞的1364 cm⁻¹峰强度随着细胞的活化而显著增加,531cm⁻¹、652cm⁻¹、1053 cm⁻¹等源自葡萄糖或葡萄糖基的信号峰也会随细胞的生长而增强,随后增强的还有1432cm⁻¹、1448cm⁻¹、1561cm⁻¹等源自脂类物质的峰,而源自蛋白质及脂类的1000cm⁻¹、1445cm⁻¹、1655 cm⁻¹等峰的信号强度基本不变,酵母细胞代谢活跃的标志峰1603 cm⁻¹也基本不变。该批次产品中,10次实验有7次观察到上述现象,而在别的批次产品中并没有观察到该现象。用单细胞拉曼光谱实时记录了这一特殊的生长现象。

关键词 面包酵母,拉曼光谱,单细胞分析

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1109-05

Real-time Raman Spectrum of a Phenomenon in the Activation Process of Single Yeast Cell Cultured in Glucose Solution*

WANG Gui-Wen¹ YAO Hui-Lu¹ PENG Li-Xin¹, HE Bi-Juan², LI Yong-Qing^{3**}

(Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003) (Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003)

(Department of Physics, East Carolina University, Greenville, North Carolina 27858-4353, USA)

Abstract Raman tweezers, a novel technique that combines Raman spectroscopy with optical tweezers, has the potential to become an effective tool for analysis single cell suspended in solution. To real-time investigate the biochemical proceedings in single cell, a Raman tweezers setup was used to trap a single instant active dry yeast cell and to acquire the real-time Raman spectrum of the trapping cell from dormancy to activation cultured in 2.0% (W/V) glucose. During the activating process, the intensity of bands derived from protein or lipids, such as 1000 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹, 1655 cm⁻¹, were not changed evidently. The intensity of the 1603 cm⁻¹ band, which was considered as the signature of metabolic activity, was not changed evidently too. But the bands at 531cm⁻¹, 652cm⁻¹, 1053cm⁻¹, 1364 cm⁻¹, which were assigned to trehalose, or glucose-base carbohydrates, were increased as the cell grew. This phenomenon, occurred in seven individual experiments of ten repeats using a batch of instant active yeast cells as tested cells, but did not occur when other batches of instant active yeast cells were tested. This peculiar process of adaptation was recorded by real-time Raman spectrum and the result indicates Raman tweezers is an effective tool for single-cell analysis.

Key words Baker's yeast, Raman spectroscopy, Single-cell analysis

光学技术的进步,突破了以往受物质低浓度的影响,可以获得灵敏的检测信号,为在诸如生物物理、生物医学等领域的应用开启了新的机遇。新的方法或技术的出现,可以获知很多以往无法得到的信息。作为一种很有应用潜力的工具,拉曼光谱正在生命科学研究领域广泛应用,从拉曼光谱的特征峰的位置、强度和线宽可以获得样品的分子组成及

结构信息^[1]。通常我们对类似酵母个体大小的生命活动的认识都是通过研究其群体样品而得到的统计平均信息。在微生物学领域,已有多种方法和技术用于研究单个微生物细胞^[2],但由于人为的用物理或化学方法固定或标记目标细胞,细胞或细胞周围的环境发生改变,甚至细胞死亡,可能会对细胞的生理带来了未知的影响。拉曼镊子(Raman tweezers)技

* 广西自然科学基金(桂科青 No. 0542034)

** 通讯作者 E-mail: liy@mail.ecu.edu

收稿日期:2007-03-19,修回日期:2007-06-19

术,是将光学操控与显微拉曼光谱相结合用于单细胞探测的新技术,可以在接近其自然的生理状态下研究单个细胞或细胞器,得到的是接近自然生理状态的单个活细胞的拉曼光谱,获知很多掩盖在群体平均信息下的个体生命信息^[3-7]。

面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是进行细胞研究和分子生物学的模式生物,也是和我们日常生活息息相关的普通微生物。研究发现,当酵母细胞生长在营养物质缺乏、生长受限制的环境时,可能会在胞内积累特殊的物质(如海藻糖),以适应环境,应对胁迫^[8]。我们在用拉曼镊子观察活性干酵母单细胞活化过程中,当以2.0%葡萄糖溶液作为培养基时,在某个批次的即发活性干酵母中曾观察到这样一种现象:酵母细胞能正常的活化与初步生长,部分细胞在萌生子代细胞一定的时间后生长停滞,在记录其细胞生长的实时拉曼光谱中,与糖类物质有关的拉曼信号峰在加入溶液20min后逐步升高,而后出现并逐渐增强的有 1432cm^{-1} , 1448cm^{-1} , 1651cm^{-1} , 1745cm^{-1} 等源自脂类物质的峰,而蛋白质类物质的信号峰基本不变。本文用拉曼镊子记录了这种特殊的生长现象,既可实时观察单个细胞活化过程的光谱变化,又可获知细胞间的差异。

1 材料与方 法

1.1 实验系统

本实验所用的拉曼镊子系统如文献所描述^[3,4]:不同的是光谱仪为SpectraPro2300(Acton, USA),衍射光栅参数为闪耀波长650 nm,每毫米600线。光谱仪耦合到电荷耦合器件CCD(Spec-10, Princeton Instruments, USA)上,CCD用液氮冷却到 -120°C 。去除离轴的散射光的针孔大小为150 μm 。样品槽由一个厚4 mm,中心有一个直径为6 mm的孔的玻璃板构成,底部用0.1 mm厚的石英玻璃密封,含有细胞的培养液就放置在样品槽里,加入样品后上部用盖玻片密封。

1.2 实验方法

研究对象为广州梅山马利酵母有限公司生产的梅山即发活性干酵母(Instant active dry yeast, *S. cerevisiae*),生产日期为2004年10月。培养液为2.0%葡萄糖溶液,0.22 μm 滤膜过滤灭菌。

酵母样品用 32°C 的2.0%葡萄糖溶液快速溶解,取200 μL 加入样品槽,样品槽放在 30°C 的显微

镜恒温平台上。100倍油浸物镜随机寻找单个细胞,光镊俘获单个酵母细胞,把细胞提升至石英片上方8 μm ,用12 mW激光激发细胞,收集拉曼光谱,收集时间为20 s,得到带背景的酵母单细胞拉曼光谱,移开细胞约15 μm ,保持激光束聚焦高度不变,用同样的时间收集背景拉曼光谱。从加入葡萄糖培养液起,每隔10 min收集1次拉曼光谱,直到细胞萌发,持续观察同一个细胞,收集光谱的间隙,把激光功率降为2 mW。以无菌水代替2.0%葡萄糖溶液做对照实验。

为检验群体内细胞间的差异,每次随机收集4个细胞的光谱,重复3次,共收集12个细胞的光谱。同样以无菌水代替2.0%葡萄糖溶液做对照实验。

已知样品的拉曼光谱收集,激光功率7 mW,收集时间10 s,重复5次,取平均值。对照样品有:葡萄糖,分析纯生化试剂,无水晶体,高纯度海藻糖,由南宁市中诺生物技术有限公司惠赠,纯度 $>99\%$,为含二分子水的结晶。

1.3 数据处理

用光谱仪自带的软件WinSpec32将光谱数据转换为ASCII数据,输入软件Micro Origin 6.0处理。每个细胞测得的光谱 $S_{\text{act}}(\nu)$ 先减去来自溶液、盖玻片和光学部件的背景光谱 $S_{\text{bg}}(\nu)$,再经系统响应函数 $R(\nu)$ 校正得到酵母细胞的实际光谱: $S_{\text{act}}(\nu) = [S_{\text{act}}(\nu) - S_{\text{bg}}(\nu)]R(\nu)$ 。

2 结果与分析

2.1 持续观察单个细胞的拉曼光谱变化

图1A是持续观察单个酵母细胞活化过程的拉曼光谱。光谱反映了酵母胞内物质的组成与变化,表1是其主要信号峰可能对应的分子基团的指认。从图1A中可以直观地看到,持续观察单个细胞,其拉曼光谱的变化特点是 532cm^{-1} , 652cm^{-1} , 1364cm^{-1} , 1561cm^{-1} 等拉曼信号峰在逐渐增强,特别是 1364cm^{-1} 的拉曼信号强度显著增加,而源自蛋白质、脂类的 852cm^{-1} , 1000cm^{-1} , 1030cm^{-1} , 1603cm^{-1} , 1655cm^{-1} 等峰基本不变。从图1B中看到, 1364cm^{-1} 的信号强度从20 min后开始显著升高,而 1655cm^{-1} 的信号强度基本不变。产生上述这种现象的原因可能是活性干酵母在葡萄糖溶液中活化,受生长条件的限制,在胞内累积某些物质。而生长

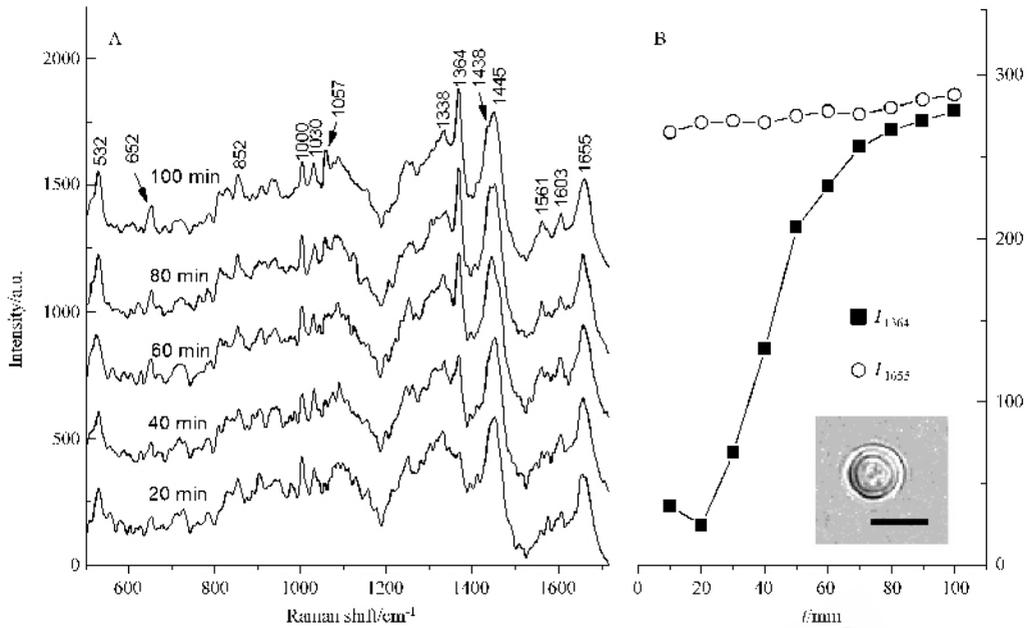


图1 单个活性干酵母细胞以葡萄糖作为单一营养物质生长时的实时拉曼光谱(A)及 1364 cm^{-1} 和 1655 cm^{-1} 峰强度的变化(B)插图为光镊俘获的单个细胞,Bar=5 μm 。

表1 酵母细胞的主要拉曼信号峰及其可能对应的生物大分子(基团)^[9-12]

峰值	来源及可能对应的生物分子
532	葡萄糖或葡萄糖基,可能起因于骨架
652	葡萄糖或葡萄糖基,可能起因于骨架
715	腺嘌呤
852	酪氨酸/或葡聚糖(C—O, C—C, C—H 弯曲)
1000	苯丙氨酸(苯环呼吸峰)
1030	苯丙氨酸(C—H 键)
1050—1150	糖类(主要是吡喃糖环的C—C, C—O 键伸展振动模)及蛋白质、脂类(C—C, C—N 键伸展振动模)
1364	葡萄糖或葡萄糖基
1425—1480	CH_2/CH_3 变形振动模, 1438 cm^{-1} 主要来源于碳氢链, 而 1445 cm^{-1} 来源于脂肪链
1604 cm^{-1}	酪氨酸和苯丙氨酸(C=C 键振动模)
1655 cm^{-1}	蛋白质(酰胺 I, C=O 键伸展振动)

在无菌水中的对照细胞,则没有这种现象。

2.2 随机选择 12 个细胞的拉曼光谱

图2是随机选择12个细胞的平均拉曼光谱(A),及 1364 cm^{-1} 、 1655 cm^{-1} 峰的信号强度变化图(B)。从中可见,群体细胞的 1364 cm^{-1} 、 1655 cm^{-1} 峰平均趋势和单个细胞的(图1)是基本相同的,随着细胞的生长, 1655 cm^{-1} 的信号强度基本没有变化,而 1364 cm^{-1} 的信号强度从20 min后开始增强且很显著。对照细胞的 1364 cm^{-1} 峰基本不变, 1655 cm^{-1} 的

信号强度在平缓地减弱。至于对照细胞的 1364 cm^{-1} 信号,应是源自酵母细胞壁的糖类物质的拉曼信号, 1655 cm^{-1} 的减弱可能是胞内物质消耗造成的。

从图2B看到,同一时间点的不同细胞, 1364 cm^{-1} 的光谱信号强度差异比较大,如在90 min时, 1364 cm^{-1} 的平均峰高为253.1,标准差为61.7,最小值为153.4,最大值为329.8,细胞之间差异显著($P < 0.05$)。说明面包酵母在葡萄糖溶液中活化时,细胞间生长状态是明显不同,对物质的积累量有所差异。

2.3 酵母细胞累积物质初步分析

酵母细胞累积的是什么物质呢?图3是60 min、100 min和24 h的光谱与20 min时的差异光谱,从中看到:在活化的前100 min出现并逐渐增强的信号峰是 518 cm^{-1} , 531 cm^{-1} , 653 cm^{-1} , 807 cm^{-1} , 1019 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , 1364 cm^{-1} , 1432 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} 等,而100 min以后才出现的峰是 612 cm^{-1} , 835 cm^{-1} , 861 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} , 1745 cm^{-1} 等峰。对比单糖与多糖的拉曼、红外光谱^[13,14]及葡萄糖、海藻糖的拉曼光谱峰位置(图3),面包酵母细胞累积的物质峰,如 518 cm^{-1} , 531 cm^{-1} , 653 cm^{-1} , 807 cm^{-1} , 835 cm^{-1} , 1019 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , $1364/1366\text{ cm}^{-1}$, 1448 cm^{-1} 等峰与海藻糖的

主要峰接近,可能是由于累积的糖类在胞内以糖颗粒或无定形态存在,不同于溶液或结晶状态,因而峰的位置和信号强度有偏移。 1432cm^{-1} , 1561cm^{-1} , 1597cm^{-1} , 1651cm^{-1} , 1745cm^{-1} 等峰在单糖和寡糖中没有找到对应的峰,但在脂蛋白,甘油酯类物质中可以观察到这几个峰: 1432cm^{-1} (CH_2 变形振动, CH_3 非对称变形振动), 1448cm^{-1} (CH_2 变形振动), 1651cm^{-1} (脂类的 $\text{C}=\text{C}$), 1742cm^{-1} ($-\text{CH}_2-\text{COOR}$

中 $\text{C}=\text{O}$) 的伸缩振动)^[15,16], 而 1561cm^{-1} 源自糖蛋白的酰胺基团($-\text{CONH}-$)。由此推测酵母细胞在前期主要吸收葡萄糖, 累积以葡萄糖为基本单元的寡糖或多糖, 后期可能逐步转化为复杂的糖蛋白、糖脂肪, 而糖类物质和脂类物质均为细胞的能量储备物质。图3的插图b也显示, 24 h后的细胞内累积了很多颗粒状物质, 萌生的子代细胞仅生长到一定阶段, 没有脱离母细胞。

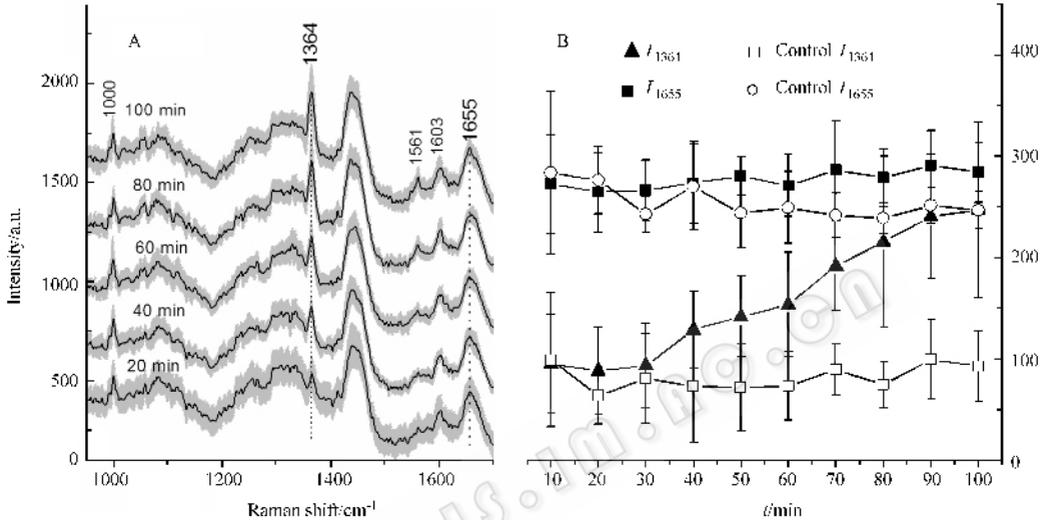


图2 (A) 12个在2%葡萄糖溶液中活化细胞的平均拉曼光谱(阴影部分为标准差)(B) 1364cm^{-1} 峰(I_{1364})、 1655cm^{-1} 峰(I_{1655})平均信号强度变化(误差线为标准差, control为8个对照细胞)

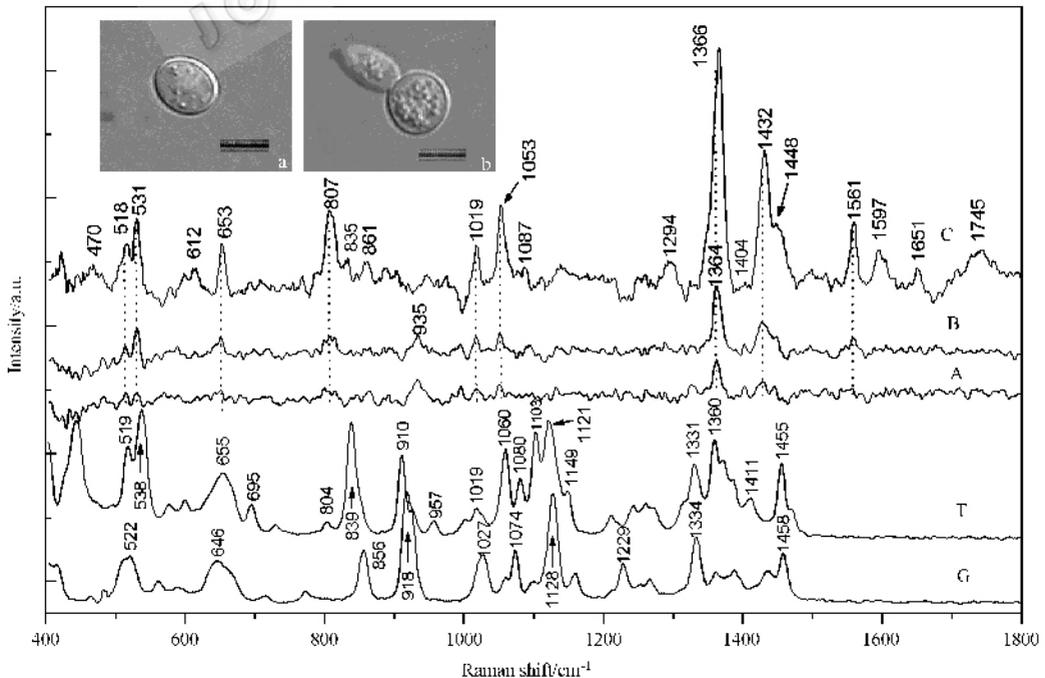


图3 单个酵母细胞在2.0%葡萄糖溶液培养60 min(A), 100 min(B), 24 h(C)与20 min时的差异光谱, 及海藻糖(二水)和葡萄糖晶体的拉曼光谱。插图为酵母细胞在培养20 min(a)与24 h(b)后的DIC图像(标尺 = $5\ \mu\text{m}$)。
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在同样实验条件下,用同一批次的产品,在10次重复实验中有7次观察到上述现象,但在别的批次产品中并没有观察到。这是一种特殊的生长现象,相关研究有待进一步的探索。

在以 YPD 培养基进行的酵母活化实验中观察到, 1603cm^{-1} 会随着细胞活跃生长而增强,是酵母细胞代谢旺盛的标志,但在图 1A、图 2A 和图 3 中都没有观察到 1603cm^{-1} 信号强度的明显变化,可能是受营养物质的限制,酵母细胞无法活跃生长。在裂殖酵母中,该峰也只有在生长条件很好的情况下才出现^[9]。

3 小结

作为拉曼光谱技术与激光镊子结合的拉曼镊子,对研究处于溶液中接近其生理状态的单个细胞或细胞器,具有明显的优势。即发活性干酵母细胞在 2.0% 葡萄糖作为唯一的营养物质的溶液中基本可以完成活化,单细胞实时拉曼光谱显示来源于葡萄糖或葡萄糖基的强信号峰 518cm^{-1} , 531cm^{-1} , 653cm^{-1} , 1019cm^{-1} , 1053cm^{-1} , 1432cm^{-1} 和 1364cm^{-1} 等峰会随细胞的生长而增加,而源自蛋白质及脂类的 1000cm^{-1} , 1445cm^{-1} 和 1655cm^{-1} 等峰的信号强度基本不变,酵母细胞代谢活跃的标志峰 1603cm^{-1} 也基本不变。我们首次应用单细胞拉曼镊子实时观察了这一现象。同样实验条件下,用同一批次的产品做的 10 次实验中有 7 次观察到了该现象,而在别的批次产品中并没有观察到这种现象。结果显示,拉曼镊子既可以获知单个酵母细胞生长过程的实时生化变化,又可以获知细胞之间的差异,是进行单活细胞分析的实用工具,在实时观察单个细胞对某些物质

的合成与分解过程,或者单个细胞对药物或有毒物质的反应等领域具有很好的应用潜力。

参考文献

- [1] Petry R, Schmit M, Popp J. *Chemphyschem*, 2003, **4**(1): 14 ~ 30.
- [2] Brehm-Stecher B F, Johnson E A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, **68**(3): 538 ~ 559.
- [3] Xie C A, Dinno M A, Li Y Q. *Optics Letters*, 2002, **27**: 249 ~ 251.
- [4] Xie C A, Li Y Q. *Journal of Applied Physics*, 2003, **93**: 2982 ~ 2986.
- [5] Xie C A, Mace J, Dinno M A, *et al.* *Anal Chem*, 2005, **77**: 4390 ~ 4397.
- [6] Ojeda J F, Xie C A, Li Y Q, *et al.* *Optics express*, 2006, **14**(12): 5385 ~ 5393.
- [7] Chen D, Huang S S, Li Y Q. *Anal Chem*, 2006, **78**(19): 6936 ~ 6941.
- [8] Thevelein J M. *Microbiological Reviews*, 1984, **48**: 42 ~ 59.
- [9] Huang Y S, Karashima T, Yamamoto M, *et al.* *Biochemistry*, 2005, **44**: 10009 ~ 10019.
- [10] Notinger I, Verrier S, Haque S, *et al.* *Biopolymers*, 2003, **72**(4): 230 ~ 240.
- [11] 许以明编著. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp. 90 ~ 100.
- [12] Huang W E, Griffiths R I, Thompson I P, *et al.* *Anal Chem*, 2004, **76**: 4452 ~ 4458.
- [13] Barrett T W. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1981, **37**(4): 233 ~ 239.
- [14] Kacuráková M and Mathlouthi M. *Carbohydrate Research*, 1996, **284**(2): 145 ~ 157.
- [15] Chan J W, Motton D, Rutledge J C, *et al.* *Anal Chem*, 2005, **77**(18): 5870 ~ 5876.
- [16] Gussemma K D, Vandenabeele P, Verbeke A, *et al.* *Spectrochimica Acta Part A*, 2005, **61**: 2896 ~ 2908.