

利用拉曼光谱原位定量检测技术筛选红酵母类胡萝卜素高产突变株

蒋玉凌^{1,2} 刘军贤² 陈 越^{1,2} 陶站华¹

(¹ 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007
² 广西师范大学物理科学与技术学院, 广西桂林 541004)

摘要 建立了一种利用显微拉曼光谱原位定量技术筛选平板培养基上类胡萝卜素高产突变株的方法。为了消除培养基背景信号对定量结果的影响,采用矢量校正算法对光谱数据进行预处理,得到了不含培养基干扰的菌落净信号。比较了不同光谱收集方式对光谱重现性的影响,发现扫描方式较定点检测能获得重现性更好的菌落净信号。利用共焦显微拉曼光谱分析了平板培养基上红酵母菌落中的类胡萝卜素,并用光镊拉曼光谱法进行验证,两种方法所得类胡萝卜素 1512 cm^{-1} 拉曼峰值呈现良好的线性关系,说明了共焦显微拉曼光谱定量检测平板培养基上菌落内类胡萝卜素的可行性。用该方法对红酵母诱变菌进行筛选,筛选出两株类胡萝卜素高产菌株。研究结果表明该菌种筛选方法比传统方法更客观、高效。

关键词 光谱学; 原位定量检测; 拉曼光谱; 诱变; 类胡萝卜素; 红酵母

中图分类号 O433.4 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.0215002

Screening of Carotenoid High-Producing Mutants from *Rhodotorula glutinis* Using Raman Spectroscopy *in Situ* Quantitative Detection Technology

Jiang Yuling^{1,2} Liu Junxian² Chen Yue^{1,2} Tao Zhanhua¹

(¹ *Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China*
² *College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China*)

Abstract A method is established based on micro-Raman spectroscopy *in situ* quantitative detection technology for the screening of carotenoid high-producing mutants from *rhodotorula glutinis* colonies growing on solid culture medium. In order to eliminate the interference of medium background signal with the quantitative results, vector correction algorithm is used to preprocess spectral data to obtain pure bacterial signal without medium interference. The effect of two different spectral collection modes on spectral repeatability is investigated. The results show that spectral signal collected with area-scan excitation mode can possess better repeatability than with fixed-point detection. Confocal micro-Raman spectroscopy is applied to estimate carotenoid content of *rhodotorula glutinis* colonies on solid culture medium, which is verified by laser tweezers Raman spectroscopy. A good correlation between carotenoid Raman peak intensities at 1512 cm^{-1} by above two approaches is observed. The data indicate that confocal micro-Raman spectroscopy is a reliable approach for the quantitative analysis of carotenoids in *rhodotorula glutinis* colonies on solid culture medium. Two carotenoid high-producing variants are obtained with the screening procedure established above. This evidence confirms that the proposed strains screening method is more objective and efficient than conventional methods.

Key words spectroscopy; *in situ* quantitative detection; Raman spectroscopy; mutagenesis; carotenoids; *rhodotorula glutinis*

OCIS codes 300.6450; 140.3550; 180.5655

收稿日期: 2013-08-19; 收到修改稿日期: 2013-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(31060128)

作者简介: 蒋玉凌(1987—),女,硕士研究生,主要从事光谱学与微生物培养等方面的研究。

E-mail: jiangyuling19@gmail.com

导师简介: 陶站华(1971—),男,博士,副研究员,主要从事光谱学方面的研究。E-mail: taozhanhua@163.com(通信联系人)

1 引言

类胡萝卜素是一类由多个异戊二烯单位构成的化合物,具有抗氧化、提高免疫力、防止衰老和癌变等特性,被广泛用于食品、医药和化妆品等领域。与化学合成的产物相比,生物来源的类胡萝卜素具有安全、生物利用度高等优点。红酵母能在细胞内积累较高含量的类胡萝卜素,且生长速度快、生物量高、发酵易于控制。因此,利用红酵母生产类胡萝卜素受到广泛关注。但野生型红酵母类胡萝卜素的产量仍不能满足工业生产需求,需要通过菌种选育和培养条件优化等手段提高其类胡萝卜素的产量。研究表明,化学诱变剂、紫外辐射等化学和物理手段可以诱导红酵母基因发生突变,通过大量筛选突变菌株可能获得具有优良性状的类胡萝卜素高产菌株^[1-2]。长期以来,诱变后的筛选一般是通过目测观察平板上菌落的形态,挑选形态特殊的菌落经过培养、发酵、产物的提取后再测定其目标产物的含量,这种筛选方法具有很大的主观性和随机性,效率低下,筛选到一个性状优良的菌株常常需要消耗大量的人力和漫长的时间,因此,很有必要建立一种高效、快捷的菌种筛选方法。

拉曼光谱是一种反映物质结构及含量信息的分子振动光谱,具有快速、实时、无损分析等优势,在医学和生命科学等领域的应用日益广泛^[3-5]。近年发展起来的共焦显微拉曼光谱,除了能快速无损分析之外,还具有原位、分辨率高、可对样品内特定的小区域进行扫描的优势。本课题组曾用光镊拉曼光谱(LTRS)分析液体培养基(YEPD)中红酵母单细胞内类胡萝卜素的含量,并获得了良好的定量结果^[6]。在此基础上,本文建立了用共焦显微拉曼技术对平板培养基上红酵母菌落中类胡萝卜素进行原位定量分析的方法,并用该检测方法从诸多红酵母诱变菌株中筛选出类胡萝卜素高产菌株,为菌种筛选提供了一种高效快捷的检测方式。此外,还利用矢量校正算法^[7]对拉曼光谱进行多因素校正,以消除培养基和测量环境等因素的干扰,提高了平板培养基上菌落内目标产物定量的准确性和重现性。

2 实验部分

2.1 菌株和培养基

红酵母菌株由广西大学应用微生物研究所提供。发酵培养基每升含葡萄糖 40 g,酵母提取物 5 g, KH_2PO_4 8 g, MgSO_4 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, 平板

培养基在此基础上每升再加琼脂 20 g。

2.2 实验装置

采用光镊拉曼光谱系统^[8-9]对液体中红酵母单细胞进行拉曼光谱测定。一束二极管激光(785 nm)经过滤波后导入倒置的生物显微镜(Nikon TE2000U)中,经数值孔径为 1.30 的 100 倍油浸物镜聚焦在焦点附近形成一个单光束光势阱(光镊)捕获目标。

对于生长在平板培养基上的红酵母菌落,采用常规共焦显微拉曼光谱并结合扫描方式进行光谱测定。为实现扫描,在激光进入显微镜之前增加电控扫描对镜。扫描对镜电压信号的改变可驱动扫描对镜移动,从而实现激光光斑在 x 轴和 y 轴的移动,对镜电压值的调节可通过信号发生器控制。本实验中,在 x 轴方向和 y 轴方向的扫描频率分别设定为 8 Hz 和 6 Hz,电压设为 2.5 V,光斑扫描面积为 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ 。

2.3 培养基背景光谱信号的扣除

生长在平板培养基上的菌落厚度较小,因此入射光激发的拉曼散射同时来源于菌落和培养基两部分,即为菌落和培养基的混合光谱。来自于培养基的光谱对总光谱的贡献很大,需要排除。然而,由于每次收集光谱时菌落的厚度和激光照射的深度不同以及不同部位培养基所含的水分不同,收集到的混合光谱中包含的培养基信号并非常量,无法用常规方法排除。为解决上述问题,本文采用矢量校正算法对光谱信号进行校正。根据相关文献^[7,9],该方法不仅能扣除培养基信号,还可以扣除混合在培养基中不易察觉的其他背景信号。现将矢量算法的基本思想描述如下:从数学角度来看,由 n 个数据点组成的培养基和菌落的混合拉曼光谱以及平板培养基的光谱均可看作一个 n 维的空间矢量(分别记作 \mathbf{C} 和 \mathbf{M})。菌落和培养基的混合矢量可分解成与培养基矢量 \mathbf{M} 平行和垂直的两个矢量(投影),其中与培养基矢量 \mathbf{M} 平行的投影(记为 $\mathbf{C}_{\text{proj},\mathbf{M}}$)可反映混合光谱信号中来自于培养基 \mathbf{M} 的信息,将其扣除后就可获得与培养基不相关的菌落的拉曼光谱 \mathbf{B} ,即

$$\mathbf{B} = \mathbf{C} - \mathbf{C}_{\text{proj},\mathbf{M}} \quad (1)$$

此外,由于周围环境因素如温度、湿度可影响培养基中水的含量,水的信号对拉曼光谱也有一定影响。因此在信号预处理中采用双重校正过程,即先分别扣除混合光谱和培养基光谱在水矢量 \mathbf{W} 方向的投影来消除水的贡献信号:

$$\mathbf{C}' = \mathbf{C} - \mathbf{C}_{\text{proj},\mathbf{W}} \quad (2)$$

$$\mathbf{M}' = \mathbf{M} - \mathbf{M}_{\text{proj}, \mathbf{W}}, \quad (3)$$

式中下标 proj, \mathbf{W} 表示某个矢量在水矢量方向的投影, 所获得的光谱用来校正含有培养基信号的混合光谱, 最后所获得的光谱信号是菌落的净信号, 即

$$\mathbf{B}' = \mathbf{C}' - \mathbf{C}'_{\text{proj}, \mathbf{M}'}. \quad (4)$$

2.4 菌落与单细胞中类胡萝卜素含量的相关性测定

2.4.1 菌株的培养

为了获得不同类胡萝卜素含量的红酵母菌落, 用划线法将红酵母菌株接种于平板培养基上, 28 °C 下培养 36 h 后置于 4 °C 冰箱中低温培养使其缓慢合成类胡萝卜素。从置于冰箱的时刻算起, 依次培养 1, 2, 3, ..., 7 d, 取不同培养时间的平板进行菌落的拉曼光谱检测, 每个时间点检测 3 个平板。

2.4.2 拉曼光谱测定和数据处理

在 30 mW 激发功率和 60 s 曝光时间下采用扫描方式采集平板培养基上红酵母菌落的拉曼光谱。每个平板上选取 4 个形态大小大致相同的菌落, 每个菌落在其不同的区域采集 5 个光谱, 扫描范围至少覆盖菌落 80% 的面积。再以相同曝光时间和光强采集 3 个背景光谱, 用矢量校正算法对光谱进行背景扣除。扫描完毕后把菌落挑取下来, 用无菌水重悬, 每个菌落采用光镊拉曼光谱法检测 50 个细胞的光谱, 积分时间为 5 s, 再以相同方式采集 5 个背景光谱, 用原始光谱减去背景光谱以达到背景扣除的目的。

2.4.3 相关性曲线的绘制

以不同培养时间平板上红酵母菌落拉曼光谱的 1512 cm^{-1} 的峰值作为纵坐标, 以各菌落中 50 个单细胞拉曼光谱 1512 cm^{-1} 的峰值的平均值作为横坐标, 进行线性拟合。

2.5 菌种的诱变和筛选

在直径为 75 mm 的培养皿中, 加入 3 mL 处于对数生长期的菌液, 以距离为 23 cm, 功率为 11 W 的紫外灯照射, 照射时间分别为 2, 2.5, 3, ..., 4.5 min。然后将菌液以一定比例稀释后涂布于 YEPD 平板上, 28 °C 避光培养 2 d 后进行菌落计数。

$$R_f = C_o - C_r / C_o \times 100\%, \quad (5)$$

式中 R_f 为致死率, C_o 为原菌涂活细胞浓度, C_r 为辐射后菌液活细胞浓度。根据(5)式绘制致死率曲线。

根据致死率曲线, 选取合适的诱变剂量处理红酵母菌液, 涂布平板, 培养至形成大小适宜的菌落后用拉曼光谱技术进行突变株的筛选。从收集到诸多菌落的光谱中挑选出若干类胡萝卜素拉曼光谱信号

较强的菌落进行液体发酵培养, 最后进行菌体生物量和类胡萝卜素含量测定以确定高产菌株。

3 结果与分析

3.1 光谱校正结果

图 1(a) 是 β -胡萝卜素标准品的拉曼光谱图, 类胡萝卜素最强的三个特征峰是位于 1005、1155、1512 cm^{-1} 的谱峰, 分别代表 CH_3 键、 $\text{C}-\text{C}$ 键和 $\text{C}=\text{C}$ 键的伸缩振动, 其中 1512 cm^{-1} 峰附近没有其他物质信号干扰, 峰形尖锐, 适宜利用峰值进行类胡萝卜素的定量分析^[10]。图 1(b) 是平板培养基上红酵母菌落的原始光谱, 由于培养基的背景荧光较强, 菌落中类胡萝卜素的拉曼信号几乎被荧光覆盖。图 1(c) 和 (d) 分别是用常规背景扣除方式(即菌落和培养基的混合光谱减去相应培养基背景光谱平均值)

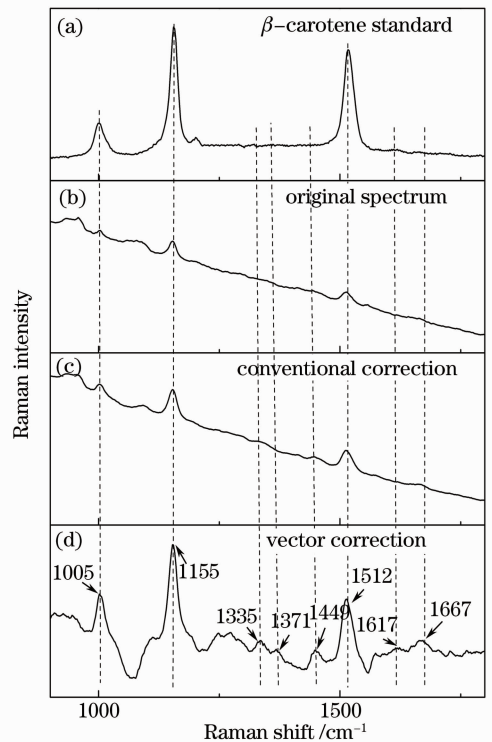


图 1 (a) β -胡萝卜素标准品的拉曼光谱; (b) 平板培养基上红酵母菌落的原始光谱; (c) 常规方法对原始光谱背景扣除后的拉曼光谱; (d) 矢量校正算法对原始光谱背景扣除后的拉曼光谱

Fig. 1 (a) Raman spectrum of β -carotene standard; (b) original spectrum of rhodotorula glutinis colonies growing on solid culture medium; (c) Raman spectrum after background subtraction for original spectrum by conventional correction; (d) Raman spectrum after background subtraction for original spectrum by vector correction

和矢量校正算法对原始光谱进行背景扣除后的拉曼光谱。常规方法背景扣除后,光谱信号较原始光谱改善效果十分有限,而用矢量算法进行背景扣除后的光谱,除类胡萝卜素的三个特征峰得到明显改善之外,还可观察到来自蛋白质或核酸的 1335 cm^{-1} 峰^[11],蛋白质或脂类的 1449 cm^{-1} 峰^[12],蛋白质的 1617 cm^{-1} 峰^[12] 和 1667 cm^{-1} 峰^[13],以及脂类的 1371 cm^{-1} 峰^[14]等,它们反映了红酵母菌落在生长过程中其他生物分子的动态变化。综上所述,矢量算法对改善光谱信号的效果十分明显,因此,本文中平板上菌落的拉曼光谱信号都采用矢量校正算法进行预处理。

3.2 光谱收集方式的确定

培养时间为 36 h 的红酵母菌落直径为 $100\sim 200\ \mu\text{m}$,而共焦显微拉曼光谱激发光斑直径为 $2\ \mu\text{m}$,二者面积相差上千倍,因此入射激光照射在菌落的局部区域所得的数据能否反映整个菌落的光谱信息是值得怀疑的。为解决上述问题,本文设计了一个验证实验,通过比较定点检测和区域扫描两种方式获得的 1512 cm^{-1} 谱峰峰值的变化情况确定

最终采取的光谱收集方式。上述两种方式均采集 5 个光谱,光谱收集的位置如图 2(a)所示,标号为 1~5 的各点是定点检测时的光斑照射位置,而扫描方式测定中,光斑扫描的范围是分别以上述各定点检测位置为中心的 5 个矩形区域(图中为了显示清晰,只标示了以定点检测位置 5 为中心的扫描区域)。两种光谱收集方式的对比结果如图 2(b)所示,其中曲线 a 和 b 分别是用区域扫描和定点检测获得的不同点或不同区域的红酵母菌落 1512 cm^{-1} 谱峰峰值。由图可知,定点检测各点获得的 1512 cm^{-1} 谱峰峰值差异较大,而区域扫描各区域获得的峰值的差异较小,原因在于定点收集到的光谱信号只能代表菌落极小部分的信号,易受培养基和测量环境等因素的干扰,因此各点类胡萝卜素拉曼信号差异比较大,而区域扫描获得的光谱数据代表较大面积扫描区域的平均值,因此获得的拉曼信号差异较小。为减少实验误差,本文最终采用区域扫描进行光谱收集,每个菌落扫描 5 个区域以覆盖 80% 以上的菌落信息。

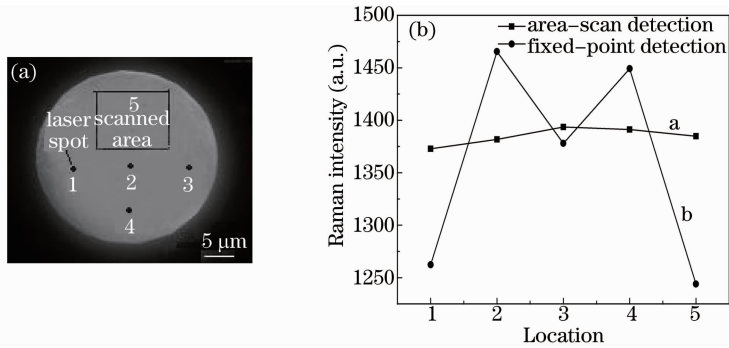


图 2 (a) 平板上的红酵母菌落;(b) 区域扫描和定点检测获得的 1512 cm^{-1} 特征峰峰值对比图

Fig. 2 (a) *Rhodotorula glutinis* colonies growing on solid culture medium; (b) Raman peak intensity contrast at 1512 cm^{-1} of area-scan and fixed-point detections

3.3 单菌落与单细胞中类胡萝卜素含量的相关性分析

图 3(a)是以区域扫描方式收集的在冰箱中放置不同时间的红酵母菌落拉曼光谱。生长在平板培养基上的红酵母菌落在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下可缓慢积累类胡萝卜素,从图 3(a)可知,随着在冰箱中放置时间的延长,类胡萝卜素 1005 、 1155 、 1512 cm^{-1} 的三个特征峰峰值强度均呈增加趋势,直观地显示出红酵母菌落中类胡萝卜素的积累情况。为了证明共焦显微拉曼光谱法对平板上菌落类胡萝卜素定量检测的准

确性,采用本课题组已建立的基于光镊拉曼光谱的单细胞类胡萝卜素定量检测方法^[6,10]进行验证,结果如图 3(b)所示,以不同培养时间平板上红酵母菌落的 1512 cm^{-1} 特征峰峰值作为纵坐标,以同一菌落中 50 个单细胞拉曼光谱 1512 cm^{-1} 峰值的平均值作为横坐标,进行线性拟合,二者呈现良好的线性关系,相关系数 R^2 为 0.9395,说明共焦显微拉曼技术可定量分析平板培养基上菌落的类胡萝卜素,为后续实验中高产类胡萝卜素突变株的筛选奠定了技术基础。

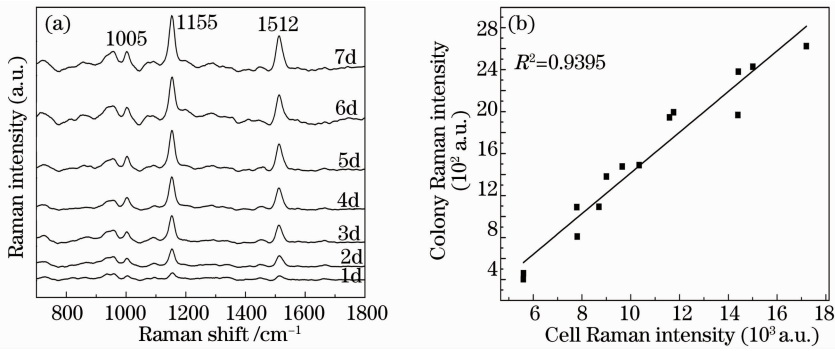


图3 (a) 在冰箱中放置不同时间的红酵母菌落拉曼光谱;(b) 各菌落与其单细胞 1512 cm^{-1} 谱峰峰值线性关系图
Fig. 3 (a) Raman spectra of *rhodotorula glutinis* colonies cultured in refrigerator for different time; (b) correlation relationship between the Raman peak intensities at 1512 cm^{-1} collected from colonies and single cells

3.4 菌种诱变和筛选结果

经紫外辐射后获得的致死率曲线如图4所示,当照射时间为4 min时,致死率在90%左右。一般认为紫外诱变的致死率在80%~90%时为最佳,故最佳诱变条件为紫外灯照射功率11 W,照射距离23 cm,照射时间4 min。按照上述条件对红酵母进行紫外诱变,诱变后的菌株经平板培养36 h后取出并进行原位拉曼光谱定量分析。最终从400株诱变菌落中筛选出5株拉曼信号较强的菌落进行发酵培养,统一编号为R01~R05,测定诱变菌和野生菌的生物量和类胡萝卜素的含量,结果如表1所示,所筛选出的5个诱变株的生物量和类胡萝卜素 1512 cm^{-1} 特征峰拉曼信号与野生菌株相比均有所提高,其中R01,R04提高幅度较大, 1512 cm^{-1} 特征峰峰值分别提高了1.6倍和1.3倍,生物量分别提高了15.8%和17%。上述实验结果说明共焦显微拉曼光谱技术可高效、快捷地筛选平板培养基上的高产类胡萝卜素菌株。与基于目测、非定量的传统

筛选方法相比,本文所建立的筛选方法对菌落的取舍标准不再是目测经验判断而是基于光谱测量结果,使筛选过程变得量化和客观,大大提高了获得高产菌株的概率,而且省去了后续的接种、培养、发酵过程,极大地缩短了筛选周期,有望成为一种高通量的突变株筛选方法,不仅适用于类胡萝卜素高产菌株的筛选,也适用于其他目标代谢产物有较强拉曼信号的菌株。

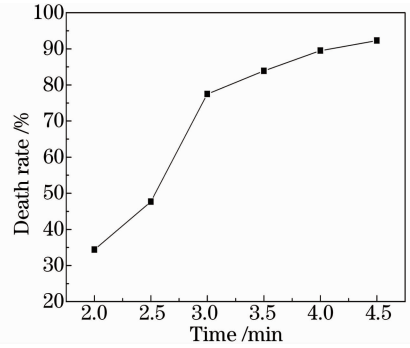


图4 紫外诱变致死率曲线

Fig. 4 Death rate curve of ultraviolet radiation mutagenesis

表1 类胡萝卜素高产菌株筛选结果

Table 1 Screening result of high-yield carotenoid strains

Number of strain	Wild strain	R01	R02	R03	R04	R05
Peak intensity at 1512 cm^{-1} of colonies on solid culture medium	783	1347	1011	898	1316	1218
Peak intensity at 1512 cm^{-1} of single cells after fermentation	5718	14931	6964	6637	13213	7881
Biomass of fermentation / (g/L)	13.53	15.67	15.83	15.43	15.30	14.4

4 结 论

采用共焦显微拉曼光谱法分析平板培养基上红酵母菌落中的类胡萝卜素,并用光镊拉曼光谱法测定同一菌落内50个红酵母单细胞胡萝卜素含量进行验证,发现两种方法所得拉曼光谱类胡萝卜素

1512 cm^{-1} 峰值呈现良好的线性关系,相关系数 R^2 达0.9395,说明共焦显微拉曼光谱技术可直接检测平板培养基上菌落的类胡萝卜素含量。用此方法对红酵母诱变菌进行筛选,最终筛选出了两株类胡萝卜素高产菌株,与野生菌相比,其类胡萝卜素含量分

别提高了 1.6 倍和 1.3 倍,生物量分别提高了 15.8% 和 17%,说明了用共焦显微拉曼技术筛选类胡萝卜素突变株的可行性,与传统筛选方式相比,该方法更高效、快捷。此外,利用矢量校正算法对光谱数据进行校正,得到了与目标浓度相关,不含培养基背景干扰的菌落净信号,减少了实验误差。

参 考 文 献

- 1 Raffaella C, Annalisa C, Fulvia R, *et al.*. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(6): 1009—1017.
- 2 Wang S L, Sun J S, Han B Z, *et al.*. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology[J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(8): 325—329.
- 3 Meng Lingjing, Ji Xiaolu, Li Zida, *et al.*. Mono-hepatocellular carcinoma by Raman mapping[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(2): 021703.
孟令晶, 纪晓露, 李自达, 等. 单个肝癌细胞的拉曼成像研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(2): 021703.
- 4 Chiu Y F, Huang C K, Shigeto S. *In vivo* probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy[J]. *Chem Bio Chem*, 2013, 14(8): 1001—1005.
- 5 Qin Zhaojun, Lai Junzhuo, Liu Bin, *et al.*. Raman spectroscopic analysis of ethanol fermentation at various initial pH levels[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(2): 0215001.
覃赵军, 赖钧灼, 刘 斌, 等. 初始不同 pH 值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析[J]. *中国激光*, 2013, 40(2): 0215001.
- 6 Yuan Yufeng, Tao Zhanhua, Liu Junxian, *et al.*. Raman

tweezers-based analysis of carotenoid synthesis in *rhodotorula glutinis*[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(4): 1001—1005.

袁玉峰, 陶站华, 刘军贤, 等. 拉曼镊子分析红酵母合成类胡萝卜素[J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(4): 1001—1005.

- 7 Maquelin K, Choo-Smith L P, van Vreeswijk T, *et al.*. Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(1): 12—19.
- 8 Xie C A, Li Y Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. *Appl Phys*, 2003, 93(5): 2982—2986.
- 9 Xie C A, Nguyen N, Zhu Y, *et al.*. Detection of the recombinant protrins in single transgenic microbial cell using laser tweezers and Raman spectroscopy[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(24): 9269—9275.
- 10 Tao Z H, Wang G W, Xu X D, *et al.*. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 314(1): 42—48.
- 11 Huang Z W, Annette M, Harvey L, *et al.*. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2003, 107(6): 1047—1052.
- 12 Notingher I, Verrier S, Haque S, *et al.*. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells[J]. *Biopolymers*, 2003, 72(4): 230—240.
- 13 Dukor R K. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer [J]. *Biomedical Applications*, 2002, 5: 3335—3359.
- 14 Xu Yiming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 128—129.
许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 128—129.

栏目编辑: 史 敏