

拉曼光谱技术测量单个红细胞的血红蛋白浓度

徐 斌^{1,2} 林漫漫^{2,3} 姚辉璐² 刘军贤¹

¹广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004

²广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003

³武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072

摘要 单细胞光镊拉曼光谱技术测量单个红细胞的血红蛋白浓度, 配制不同浓度的血红蛋白溶液后利用拉曼光谱强度与血红蛋白浓度的关系, 测量单个红细胞的拉曼光谱, 根据公式计算单个红细胞内血红蛋白浓度。测量了70个红细胞的拉曼光谱, 结果显示单个红细胞的血红蛋白浓度为270~500 g/L, 其中血红蛋白浓度在350~450 g/L之间的是成熟的红细胞, 占红细胞总数的90%以上, 而浓度在300 g/L以下的可能是网织红细胞, 浓度在450 g/L以上的是老化了的红细胞。这与平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)310~370 g/L基本一致。表明利用该方法可以对单个红细胞内的血红蛋白浓度进行快速、无损、简单、精确的定量分析, 展现了拉曼光谱技术在单细胞分析上的优势。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 血红蛋白; 单个红细胞; 平均红细胞血红蛋白浓度

中图分类号 O657.37

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201643.0115003

Measurement of Hemoglobin Concentration of Single Red Blood Cell Using Raman Spectroscopy

Xu Bin^{1,2} Lin Manman^{2,3} Yao Huilu² Liu Junxian¹

¹College of Physical Science and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

²Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China

³College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China

Abstract Hemoglobin concentrations of single red blood cells are measured by single cell laser tweezers Raman spectroscopy. Hemoglobin solution with different concentrations is prepared and the linear relationship between Raman intensity and hemoglobin concentration is obtained. By detecting the Raman spectrum of a single red blood cell, the hemoglobin concentration of a single red blood cell is calculated according to the linear formula. Raman spectra of 70 red blood cells are measured. The calculated hemoglobin concentration of single red blood cells is from 270 g/L to 500 g/L. Mature erythrocytes account for more than 90% of the red blood cells and its hemoglobin concentration is 350~450 g/L. The hemoglobin concentration of reticulocyte is 300 g/L or less, and the hemoglobin concentration of old red blood cells is higher than 450 g/L. The conclusion conforms to the standard of mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) 310~370 g/L. Using this method to measure hemoglobin concentration of single red blood cells is quick, non-destructive, simple and accurate. This shows the advantages of Raman spectroscopy on single cell analysis.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; hemoglobin; single red blood cell; mean corpuscular hemoglobin concentration

OCIS codes 300.6360; 170.5660; 170.1530

收稿日期: 2015-07-27; 收到修改稿日期: 2015-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(81560300)、广西自然科学基金(2014GXNSFAA118362)

作者简介: 徐 斌(1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事红细胞血红蛋白以及拉曼数据分析等方面的研究。

E-mail: xbin168@163.com

导师简介: 姚辉璐(1972—), 男, 硕士, 研究员, 主要从事仪器开发和光谱分析等方面的研究。E-mail: huiluy@gmail.com

1 引言

血红蛋白(Hb)是存在于高等生物体内一种负责运载氧的蛋白质,红细胞的最主要成分是血红蛋白,约占其湿重的32%、干重的97%。人体内血红蛋白含量是评价人群贫血患病率和铁营养状况的重要指标,因此一种方便、有效的血红蛋白浓度检测方法,特别是在单个细胞水平上检测血红蛋白浓度的方法,对评价人体健康状况非常重要^[1]。

拉曼光谱技术具有快速、简单、破坏性小、灵敏度高等优点,现已成为生物学在诸多研究领域中的有力武器。血红蛋白的共振拉曼光谱研究从20世纪70年代开始就引起了广泛关注。其中Strekas等^[2-3]关于血红蛋白的研究报道开启了利用共振拉曼光谱技术进行生物化学研究之路。随后众多的文献报道了血红素、血晶素、高铁血红蛋白的拉曼特征谱线,对特征峰的归属进行了研究确定,并得到了广泛认可。之后,Wood等^[4-5]率先利用拉曼光谱技术对单个红细胞进行研究,主要报道了活态红细胞内R态(含氧)和T态(氧合)血红蛋白的拉曼光谱。最近几年拉曼光谱技术飞速发展,特别是在激光拉曼光谱、表面增强拉曼光谱、傅里叶变换拉曼光谱^[6-8]等技术出现以后,拉曼光谱在物质结构分析以及物质定性、定量^[9-16]分析方面的应用取得重大突破。

本文进一步利用拉曼光谱技术对不同浓度的血红蛋白进行测量,选取血红蛋白特征峰1546 cm⁻¹处的光谱强度与血红蛋白浓度建立线性关系,通过测量单个红细胞的拉曼光谱,计算出单个红细胞中血红蛋白浓度。

2 材料与方法

2.1 红细胞的分离与血红蛋白的提取

无菌抽取健康鸡的血液后加入肝素钠抗凝,即刻以1600 r/min转速离心10 min,去除上层的血浆和脂质体,然后加入3倍以上体积的磷酸盐缓冲溶液(PBS),1600 r/min转速离心5 min,去除上层清液,重复以上步骤,洗涤红细胞3次。

加入倍量蒸馏水,使红细胞低渗破裂,释放出血红蛋白,充分振荡后6000 r/min高速离心20 min,去除上层脂质体后提取出血蛋白溶液。

采用氰化高铁血红蛋白法将提取出的Hb溶液用PBS缓冲液配制成5个浓度梯度,即30,50,75,100,150 g/L。

2.2 实验仪器

实验装置如文献[17]所述,半导体激光器(Tiger Laser System, Saccher Lasertechnik, 德国)产生的波长为780 nm的激光经过干涉滤波片、针孔、二向色镜后进入倒置显微镜(TE2000U, Nikon, 日本),光束由物镜聚焦后在焦点处形成光势阱,样品经过激光照射后产生的拉曼散射光被聚焦进光谱仪(Spectra2 Pro2300i, Acton, 美国),最后信号被电荷耦合器(CCD, PIXIS 400BR, Princeton Instruments, 美国)接收形成光谱图。

2.3 实验方法

1) 将5个不同浓度的血红蛋白溶液置于载玻片上,采集拉曼光谱,激光入射功率为15 mW,积分时间为3 s。每个样品测量8次,所得光谱经去噪、背景扣除、基线校准后取其平均。

2) 利用光镊囚禁红细胞,随机测量70个红细胞的拉曼光谱,激光入射功率为15 mW,积分时间为3 s。

3 结果与分析

3.1 不同浓度的血红蛋白拉曼光谱

图1所示为不同浓度血红蛋白溶液的拉曼光谱,从图中可以看出血红蛋白的特征峰主要表现在753, 1003, 1216, 1337, 1451, 1546, 1608, 1617 cm⁻¹处,其中有苯丙氨酸(1001, 1216, 1608 cm⁻¹)、色氨酸(753, 1216, 1546, 1608, 1617 cm⁻¹)^[18], 1451 cm⁻¹归属于蛋白质主链中的CH₂变形振动;同样根据图1可以明显看出随着浓度升高,血红蛋白各个特征峰强度增强。血红蛋白在红细胞内可分为两种形态,T态(脱氧)和R态(氧合),然而这两种形态血红蛋白的拉曼光谱存在些许差异^[4],具体表现为某些官能团的特定拉曼峰值发生偏移,因此在后续研究中选取对氧合状态不敏感且峰值最明显的1546 cm⁻¹峰作为参照,图2为1546 cm⁻¹处的光谱强度与血红蛋白浓度的线性回归方程。

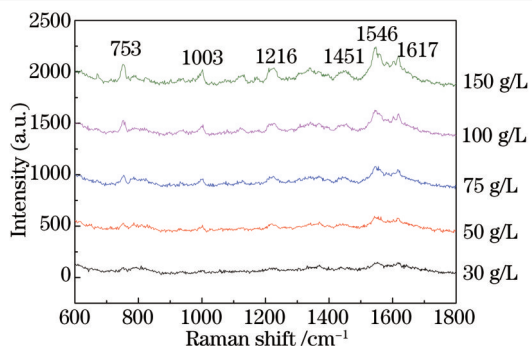


图1 不同浓度血红蛋白的拉曼光谱

Fig.1 Raman spectra of Hb solution with different concentrations

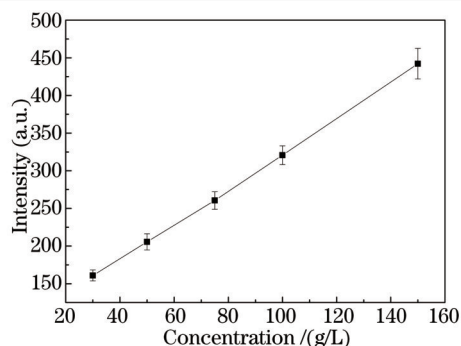


图2 1546 cm⁻¹处的光谱强度与血红蛋白浓度的线性回归方程

Fig.2 Linear regression equation of Hb concentration and spectral intensity at 1546 cm⁻¹

从图2可以看出浓度和谱强具有良好的线性相关性,利用此方程对血红蛋白浓度进行检验,误差如表1所示。

表1 光谱强度与血红蛋白浓度线性回归方程的线性相关及相对误差

Table 1 Linearity of Hb concentration and spectral intensity regression equation and relative error

Linear regression equation		Correlation coefficient	
$y = 2.3466x + 87.8878$		0.99924	
Hb concentration /(g/L)	Actual spectral intensity (a.u.)	Theoretical spectral intensity (a.u.)	Relative error
150	431.2368	439.8778	0.020
150	429.0813	439.8778	0.025

从表1可以看出相对误差在0.02左右,因此利用 1546 cm⁻¹处的光谱强度作血红蛋白浓度变化曲线是可行的。

3.2 单个红细胞的拉曼光谱图

图3为红细胞的拉曼光谱,通过光谱图可以观测到红细胞光谱的主要特征峰为 753,1000,1214,1546,1618 cm⁻¹,由于血红蛋白占红细胞干重的97%,所以红细胞和血红蛋白拉曼光谱的特征峰位置基本相同,其特征归属如表2所示^[9]。其中 753 cm⁻¹和 1546 cm⁻¹这两个峰都归属于卟啉呼吸振动模式,是血红蛋白的标志特征峰;1000 cm⁻¹ 归属于苯丙氨酸的对称呼吸振动模式;1214 cm⁻¹归属于色氨酸和苯丙氨酸的 $\nu(\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$ 模式;1337 cm⁻¹是吡咯半环对称振动模式,归属于去氧血红蛋白的特征谱线;1451 cm⁻¹表征 $-\text{CH}_2$ 的振动模式,对血红素的氧合状态同样不敏感;1608 cm⁻¹归属于 $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)$ 的不对称振动模式,是去氧血红蛋白的特征谱线;1617 cm⁻¹谱线是与卟啉环相连的原子团间的 $\text{C}=\text{C}$ 振动模式。

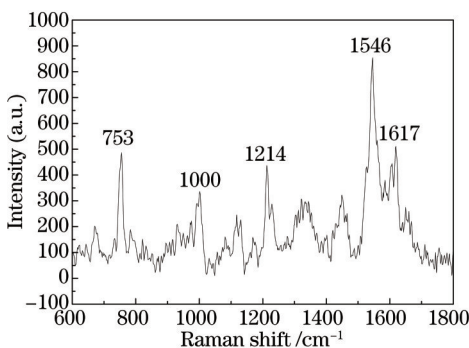


图3 单个红细胞的拉曼光谱

Fig.3 Raman spectra of a single red blood cell

测量70个红细胞的拉曼光谱,经数据处理后统计每个细胞的 1546 cm⁻¹峰的光谱强度,代入血红蛋白浓度与谱强的线性方程,得出70个红细胞单个细胞内的血红蛋白浓度,如图4所示。经过计算得出这70个红细胞的平均红细胞血红蛋白浓度为 369 g/L,符合已知平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)310~370 g/L。

表2 血红蛋白拉曼特征峰及其归属

Table 2 Raman band assignment and mode of Hb

Wavenumber /cm ⁻¹	Mode	Assignment	Wavenumber /cm ⁻¹	Mode	Assignment
753	v ₁₅	v (pyr breathing)	1451	-CH ₂	-CH ₂ (scissor)
1000	v ₄₇	v (C _β C ₁) _{asym}	1546	v ₁₁	v (C _β C _β)
1214	v ₁₅ +v ₁₈	δ (C _m H)	1608	v ₁₉	v (C _α C _m) _{asym}
1337	v ₄₁	v (pyrrole half-ring) _{asym}	1617	v (Ca = Cb)	v (Ca = Cb)

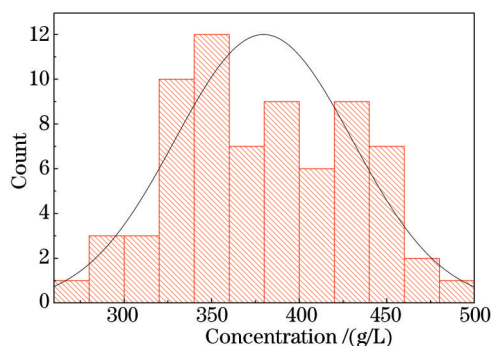


图4 70个红细胞的胞内血红蛋白浓度分布

Fig.4 Intracellular hemoglobin concentration profile of 70 red blood cells

从图4可以看出单个细胞内的血红蛋白浓度存在差异,大致分布在250~500 g/L之间,主要集中在350~450 g/L,大致可以推断,在350~450 g/L区间内的细胞基本上是成熟的红细胞,在血液中的数量也最多,占细胞总数的90%以上。血红蛋白浓度在300 g/L以下的可能为网织红细胞,与之前文献报道基本一致^[20]。它与成熟红细胞的差别在于细胞内存在多少不等的未完全退化的细胞核成分核糖核酸,核糖体的存在表明了网织红细胞仍有一些合成血红蛋白的功能。等到红细胞完全成熟时,核糖体消失,血红蛋白的含量就不再增加。单个网织红细胞平均血红蛋白浓度对缺铁性贫血研究有重要的诊断价值。血红蛋白浓度在450 g/L以上的很有可能是老化了的红细胞,因为红细胞在老化的过程中,细胞体积减小^[21],细胞内血红蛋白发生聚集交联,容易与细胞膜蛋白结合,在细胞内形成血红素高聚集区^[22],致使细胞内的血红蛋白浓度增大。网织红细胞和老化的红细胞数量大致相等,各占细胞总数的5.7%和4.2%,符合红细胞新生和衰亡的自然规律。

4 结 论

采用单细胞光镊拉曼光谱分析技术,得出确定单个血红细胞中血红蛋白浓度的新方法。该方法先测量不同浓度血红蛋白的拉曼光谱,然后将血红蛋白1546 cm⁻¹处特征峰的拉曼光谱强度与血红蛋白浓度进行线性拟合,再对70个血红细胞进行检测得到其拉曼光谱,代入线性方程进而得到每个血红细胞的血红蛋白浓度,结果显示单个红细胞的血红蛋白浓度在270~500 g/L之间,其中血红蛋白浓度为350~450 g/L的是成熟的红细胞,占红细胞总数的90%以上,而浓度在300 g/L以下的可能是网织红细胞,浓度在450 g/L以上的是老化了的红细胞。这70个红细胞的平均血红蛋白浓度369 g/L符合MCHC(310~370 g/L)。表明了利用该方法可以对离体单个红细胞内的血红蛋白进行快速、无损、简单、精确的定量分析,推动了拉曼光谱技术在生物医学领域的发展。

参 考 文 献

- 1 Cheng Jieke. Single-Cell Analysis[M]. Beijing: Science Press, 2005.
程介克. 单细胞分析[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- 2 Streckas T C, Spiro T G. Hemoglobin: Resonance Raman spectra[J]. Biochim Biophys Acta, 1972, 263(3): 830-833.
- 3 Brunner H, Sussner H. Resonance Raman scattering on hemoglobin[J]. Biochim Biophys Acta, 1973, 310(1): 20-31.
- 4 Wood B R, Caspers P, Puppels G J, *et al.*. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(5): 1691-1703.
- 5 Wood B R, Hammer L, Davis L, *et al.*. Raman microspectroscopy and imaging provides insights into hemeaggregation and denaturation

- within human erythrocytes[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2005, 10(1): 14005.
- 6 Yao H L, Tao Z H, Ai M, *et al.* Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 50(2): 193–197.
- 7 Permasiri W R, Lee J C, Ziegler L D. Surface-enhanced Raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: Cellular processes and bioanalytical sensing[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(31): 9376–9386.
- 8 Wu Jinguang. *Modern Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technology and Application*[M]. Beijing: Science Technology Literature Press, 1994: 251–288.
吴瑾光. 近代傅里叶变换红外光谱技术及应用[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994: 251–288.
- 9 Wu Xiaoqiong, Zheng Jianzhen, Liu Wenhan, *et al.* Quantitative determination of glucose by internal standard laser Raman spectra[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(7): 1344–1346.
吴小琼, 郑建珍, 刘文涵, 等. 激光拉曼光谱内标测定葡萄糖液浓度[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(7): 1344–1346.
- 10 Lin Manman, Niu Liyuan, Qin Zhaojun, *et al.* Semi-quantitative analysis of blood glucose using Raman spectroscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2012, 41(1): 112–115.
林漫漫, 牛丽媛, 覃赵军, 等. 拉曼光谱对血糖的半定量分析[J]. *光子学报*, 2012, 41(1): 112–115.
- 11 Tao Zhanhua, Yao Huilu, Wang Guiwen, *et al.* Using Raman spectroscopy to analyze apoptosis of gastric cancer cells induced by cisplatin [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29(9): 2442–2445.
陶站华, 姚辉璐, 王桂文, 等. 利用拉曼光谱分析顺铂诱导的胃癌细胞凋亡[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(9): 2442–2445.
- 12 Qin Zhaojun, Peng Lixin, Zhu Libo, *et al.* Raman spectral profiles of PHB synthesis by *Cupriavidus necator* H16 at different fructose levels[J]. *Chinese J Lasers*, 2015, 42(3): 0315003.
覃赵军, 彭立新, 竺利波, 等. 碳源浓度影响微生物 PHB 合成代谢的单细胞拉曼光谱分析[J]. *中国激光*, 2015, 42(3): 0315003.
- 13 Qin Zongding, Xu Xuetang, Zhang Zhizhi, *et al.* Real-time analysis of blood *in vivo* injected with nitroglycerin using Raman spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(1): 0130001.
覃宗定, 许雪棠, 张枝芝, 等. 基于拉曼光谱的硝酸甘油对活体血液作用的实时分析[J]. *光学学报*, 2014, 34(1): 0130001.
- 14 Huang Shushi, Lu Mingqian, Li Bing, *et al.* Real-time detection on the expression of soluble protein and inclusion body in the recombinant *Escherichia coli* with laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(12): 1215003.
黄庶识, 卢明倩, 李 冰, 等. 重组大肠杆菌表达可溶性蛋白和包涵体过程的拉曼光谱实时分析[J]. *中国激光*, 2014, 41(12): 1215003.
- 15 Li Jinjin, Lu Mingqian, Zhang Jingjing, *et al.* Cell apoptosis in yeast under aluminum stress analyzed by laser Raman spectroscopy[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(11): 1115002.
李金金, 卢明倩, 张晶晶, 等. 拉曼光谱技术研究铝胁迫下的土生隐球酵母细胞凋亡[J]. *中国激光*, 2014, 41(11): 1115002.
- 16 Jiang Yuling, Liu Junxian, Chen Yue, *et al.* Screening of carotenoid high-producing mutants from *Rhodotorula glutinis* using Raman spectroscopy *in situ* quantitative detection technology[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(2): 0215002.
蒋玉凌, 刘军贤, 陈 越, 等. 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[J]. *中国激光*, 2014, 41(2): 0215002.
- 17 Peng L, Chen D, Setlow P, *et al.* Elastic and inelastic light scattering from single bacterial spores in an optical trap allows the monitoring of spore germination dynamics[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(9): 4035–4042.
- 18 Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes in blood[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(4): 1043–1048.
艾 敏, 刘军贤, 姚辉璐. 外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱[J]. *光学学报*, 2009, 29(4): 1043–1048.
- 19 Meng Lingjing, Lin Manman, Niu Liyuan, *et al.* Raman spectroscopic analysis of single red blood cells *in vivo* rat[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 39(11): 1394–1399.
孟令晶, 林漫漫, 牛丽媛, 等. 活体小鼠中单个红细胞的拉曼光谱分析[J]. *分析化学*, 2011, 39(11): 1394–1399.
- 20 Yu Shouyi, Tian Huaqin, Chen Haisheng. The changes and clinical significance of reticulocyte indices in patients with iron deficiency anemia[J]. *Journal of Medical Forum*, 2006, 27(11): 17–19.
余寿义, 田华琴, 陈海生. 缺铁性贫血患者网织红细胞参数测定的临床意义[J]. *医药论坛杂志*, 2006, 27(11): 17–19.
- 21 Rao S, Balint S, Cossins B, *et al.* Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers [J]. *Biophysics*, 2009, 96(1): 209–216.
- 22 Kang L L, Hang Y X, Liu W X, *et al.* Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes[J]. *Biopolymers*, 2008, 89(11): 951–959.