

# 光学技术的创新应用:细菌芽孢萌发机理研究

陈越<sup>1,2</sup> 王璐玮<sup>1</sup> 陶站华<sup>2</sup> 刘军贤<sup>1</sup> 王桂文<sup>2</sup>

<sup>1</sup>广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004

<sup>2</sup>广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007

**摘要** 了解细胞生命活动途径并阐释其功能和分子机制是当前生命科学与物理科学交叉领域面临的重要科学挑战之一,而光学技术的创新与应用,能够通过监测单个细胞生理变化的细节来实现上述目标。细菌芽孢是一种特殊的休眠体,从休眠态转向营养生长的萌发过程是一种特别的细胞生理过程。光学技术和单细胞分析在芽孢萌发研究中的应用与发展,对认识芽孢萌发机理及其异质性发挥了极其重要的作用。就拉曼光谱、微分干涉差显微术、荧光成像和拉曼成像等技术的基本原理及其在细菌芽孢萌发中的应用与进展,前景与存在问题进行了简要述评。

**关键词** 生物光学;芽孢萌发机制;拉曼光谱;微分干涉差显微术;单细胞分析

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP52.100002

## Novel Application of Optical Techniques: Revealing the Mechanism of Germination of Bacterial Spores

Chen Yue<sup>1,2</sup> Wang Luwei<sup>1</sup> Tao Zhanhua<sup>2</sup> Liu Junxian<sup>1</sup> Wang Guiwen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Physics Sciences & Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

<sup>2</sup>Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

**Abstract** To define the biophysical pathways of cellular life and to elucidate the molecular mechanisms that carry out cellular and biological functions is one of the current significant scientific challenges in the intersection field of life and physical sciences. The novel application of optical techniques, sensing physiological changes in the details of individual cells, can help to meet these requirements. Bacterial spores belong to a cell type responding to adverse growing conditions, and the germination of spores from dormant to vegetative state is a special process of physiology. The application and development of optical techniques and single-cell analysis has played an extremely important role in understanding the mechanism of spore germination and heterogeneity. Raman spectroscopy, differential interference contrast microscopy, fluorescence imaging and Raman imaging are reviewed, and major unanswered questions are also discussed.

**Key words** biotechnology; spore germination mechanism; Raman spectroscopy; differential interference contrast microscopy; single-cell analysis

**OCIS codes** 170.0110; 170.5660; 170.1530; 170.1420

### 1 前言

细菌芽孢是细菌细胞为应对不良生长条件而在细胞内形成的休眠体。芽孢内核通常含有和营养细胞的原生质基本相同的物质,但由于含水量很低,均处于休眠状态。最重要的一类小分子物质是2,6-吡啶二羧酸(DPA)与钙离子(Ca<sup>2+</sup>)的络合物CaDPA,约占芽孢干重的10%,对芽孢的各种抗性起着关键的作用<sup>[1-2]</sup>。芽孢对辐射、热、干燥、极端pH值、静水压和一些有毒化学物品等有很强的抵抗能力,在一定条件下,芽孢在休眠状态下可以保持活力数年至数十年之久<sup>[3]</sup>。但芽孢对外界环境又极为敏感,一旦感受到外部存在适宜萌发的条件,即开始萌发,恢复到营养细胞状态。芽孢萌发早期是芽孢膜透性的变化;其次是CaDPA的释

收稿日期: 2015-03-12; 收到修改稿日期: 2015-04-29; 网络出版日期: 2015-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(11264004,31460035)

作者简介: 陈越(1988—),女,硕士研究生,主要从事生物医学光学方面的研究。E-mail: 673252749@qq.com

导师简介: 王桂文(1969—),男,研究员,主要从事生物医学光学与应用微生物等方面的研究。

E-mail: wguiwen@gxas.cn(通信联系人)

放,折光性逐渐消失,芽孢核内CaDPA被水置换,含水量增加,导致芽孢抵抗热能力降低;随后,芽孢皮层内肽聚糖水解,芽孢核进一步摄取水分膨胀,胞壁也随之肿胀,芽孢核内蛋白质恢复流动性,酶的活性也得到恢复;最后,大分子物质(核糖核酸、脱氧核糖核酸、蛋白质)开始合成,芽孢转到细胞的生长阶段,逐渐生长成一个新的营养细胞<sup>[2,4-5]</sup>。

芽孢萌发是芽孢转向营养生长的关键第一步,芽孢一旦萌发,就丧失了原有的抵抗力,是杀灭芽孢类细菌的良机<sup>[6]</sup>。了解芽孢萌发的机制,寻找抑制芽孢萌发或者杀灭芽孢的新方法,防止食物变坏和疾病的产生,在食品工业和临床上有极其重要的价值;其次,在一些产芽孢细菌中,某些菌株可以使动植物致病,研究芽孢萌发可以分析其生理功能的变化和致病原因。因此,研究芽孢的萌发机制具有特别重要的意义。

对芽孢的萌发机制已经进行了大量的研究<sup>[4-5,7-8]</sup>,但还有很多未知的领域有待深入研究<sup>[2,4]</sup>,而创新的技术方法在该领域的应用将进一步加速这一研究进程。特别是近年来拉曼光谱、微分干涉差(DIC)显微术、荧光成像和拉曼成像等技术结合单细胞分析在芽孢萌发研究中的应用与发展,对认识芽孢萌发机理及其异质性发挥了极其重要的作用。这些新技术在芽孢萌发研究中可提供对细胞无侵害且动态实时的监测,而且可以通过几种技术的联合应用实时监测萌发过程中不同细胞成分的空间分布信息,以及单细胞萌发过程中的动态变化信息,与传统方法相比能够获知更多的萌发信息,更为高效和准确。本文就上述方法的基本原理及其在细菌芽孢萌发中的应用与进展、前景与存在问题做简要述评。

## 2 监测细菌芽孢萌发进程的常规方法

胞内CaDPA的释放过程是芽孢萌发的标志性事件,常规的研究方法是以光学手段为主,通过监测DPA释放、折光率的改变或者蛋白质的降解来获知萌发状态,包括光学显微镜<sup>[9]</sup>、紫外-可见光谱<sup>[10]</sup>、红外光谱<sup>[11]</sup>、荧光光谱<sup>[6,12]</sup>和放射性标记<sup>[13]</sup>等方法。

光学显微镜是一种非定量测量方法,基于孢子折光率或者孢子大小的变化。紫外-可见光谱是基于芽孢萌发过程折光率的变化而引起的可见光谱范围的吸光度值降低,最常用的是测量群体芽孢萌发过程600 nm处的光密度(OD<sub>600</sub>)的变化,当其强度下降了60%意味着DPA的完全释放<sup>[14]</sup>,这是监测芽孢萌发最常用的方法;或者监测萌发过程游离的吡啶二羧酸引起的270 nm处的吸光度升高。但紫外-可见光谱法灵敏度低、特异性差,并且需要高浓度的孢子。衰减全反射红外光谱法(IR-ATR)反映的是萌发过程DPA和芽孢蛋白的降解,是一种非动态的监测手段,测量过程也需要大量的高浓度孢子。荧光光谱通过监测特殊的荧光染料和芽孢胞内的核酸或者DPA结合后荧光强度的增加从而监测芽孢的萌发动态,但游离的染料和胞内其他物质与染料结合会增强背景信号,进而降低灵敏度,或者对萌发进程有所干扰<sup>[15]</sup>。放射性标记则是在芽孢形成过程引入放射性标记的<sup>45</sup>Ca,尽管这种方法非常敏感,但不能提供快速实时监测<sup>[13]</sup>。

常规的研究方法对认识芽孢萌发机理有很大贡献,但不能对单细胞萌发变化进行实时分析,存在局限性。然而,随着光学技术的进步,不再受到以往物质浓度较低的影响,不只反映群体芽孢的萌发情况,可以获得灵敏的检测信号,为其在生命科学领域的应用开启了新的机遇。

## 3 光学技术在细菌芽孢萌发机理研究中的创新应用

### 3.1 拉曼光谱

拉曼光谱是一种散射光谱,是对与入射光频率不同的散射光谱进行分析得到分子振动、转动方面的信息,并应用于结构研究的一种分析方法。拉曼光谱谱峰清晰尖锐,样品无需特别处理,且由于水的拉曼散射很微弱,是研究生物样品的理想工具<sup>[16-19]</sup>。细菌芽孢所富含的CaDPA,具有很强的特征性拉曼光谱1573, 1450, 1397, 1017, 825及661 cm<sup>-1</sup>等峰(图1),而CaDPA从芽孢内核向胞外的释放是芽孢萌发的核心事件<sup>[20]</sup>,因此可通过监测CaDPA的释放过程来实时观察芽孢的萌发过程。特别是结合了激光镊子的单细胞光镊拉曼光谱(LTRS)技术<sup>[21-22]</sup>,利用聚焦的光束捕获细胞实现非接触的细胞操控,操控过程中细胞的生存环境几乎不变,可以实时动态地监测细胞变化,准确有效地反映样品内部特征。

Chen等<sup>[23-24]</sup>应用LTRS技术实时监测苏云金芽孢杆菌(*B. thuringenses*)的萌发过程,当以1017 cm<sup>-1</sup>峰强度计算胞内DPA含量时,发现芽孢萌发过程中CaDPA的释放分为明显的两个阶段:缓慢释放的迟滞阶段( $T_{lag}$ )和快速释放阶段( $T_{release}$ )[图1(b)]。Zhang等<sup>[25]</sup>用拉曼光谱研究细菌芽孢的热失活过程,得到CaDPA

和蛋白质的拉曼光谱有明显变化,表示芽孢在热失活过程中核心部位的变化和部分蛋白质变性。单个监测芽孢萌发的效率明显不高,随后发展了阵列式多光镊拉曼光谱,可以同步实时分析多个芽孢的萌发过程,观察CaDPA的释放动态<sup>[26-27]</sup>。

此外,Chumanov小组<sup>[28]</sup>将表面增强拉曼光谱(SERS)应用于芽孢萌发,发展了镜式夹心SERS衬底,可实时观测微量芽孢甚至单个芽孢的萌发过程<sup>[29]</sup>。但是,与LTRS的直接观测相比,这种方法存在操作复杂、干扰因子多等不足,随着新技术的发展,这种方法并没有大量应用在芽孢萌发研究中。

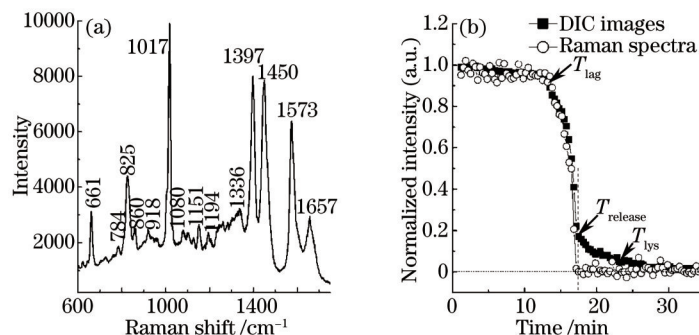


图1 (a) 单个芽孢的拉曼光谱;(b) 拉曼光谱与DIC成像同时监测同一单芽孢萌发的动态过程<sup>[30]</sup>。灰色圆点曲线是芽孢DPA特征拉曼峰 $1017\text{ cm}^{-1}$ 的峰强随时间的变化动态(反映芽孢DPA含量变化),黑色方块曲线是DIC图像强度变化动态。显示DIC图像强度变化与芽孢内CaDPA含量变化一致。图中 $T_{\text{lag}}$ 定义为芽孢萌发的起点, $T_{\text{release}}$ 是DPA完全释放的时间点, $T_{\text{lys}}$ 是芽孢皮层完全水解的时间

Fig.1 (a) Raman spectrum of a single bacterial spore; (b) typical kinetics of germination of individual wild-type *B. subtilis* spore measured by Raman spectroscopy and DIC images simultaneously. Normalized intensity of DIC images and height of the Raman band at  $1017\text{ cm}^{-1}$  of individual *B. subtilis* spore were followed by DIC microscopy (square symbol) and Raman spectroscopy (circle symbol) respectively, indicating that the curve of the DIC image intensity is coincident with the curve of the CaDPA level.  $T_{\text{lag}}$  is the the initiation of most CaDPA release,  $T_{\text{release}}$  is the time of completion of spore CaDPA release, and  $T_{\text{lys}}$  is the time when spore cortex hydrolysis is completed

### 3.2 微分干涉差显微镜术

1952年,Nomarski在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉差显微镜,也叫Nomarski干涉差(NIC)显微镜,是用于提高未染色透明样品中的对比度的光学显微镜照明技术<sup>[31]</sup>。DIC显微镜以平面偏振光为光源,经Nomarski棱镜折射后分成两束,在不同时间经过样品的相邻部位,然后经另一Nomarski棱镜使这两束光汇合,将样品中厚度上的微小差别转化成明暗区别,增加了样品反差,得到类似浮雕效果的三维立体像。观察活的或者未经染色的生物细胞或者组织时,具有特别的优势。细菌芽孢由于其孢内含有大量的CaDPA,折射率高,在DIC显微镜下形成高亮图像,其亮度与孢内DPA的含量线性相关<sup>[32]</sup>,萌发过程DIC亮度与DPA的拉曼光谱特征峰 $1017\text{ cm}^{-1}$ 的强度动态变化一致,而且可以观察到拉曼光谱无法观察到的芽孢皮层水解过程[图1(b)]<sup>[30]</sup>。

DIC显微成像方法的优势是可实时高通量监测数百个芽孢的萌发过程,得到大量单个芽孢萌发过程DPA快速释放、芽孢皮层溶解的信息<sup>[32]</sup>,极大地便利了对芽孢萌发机制的探究,在芽孢萌发领域有大量的应用<sup>[33-41]</sup>。其中包括:定量区分芽孢湿热处理和营养生长过程孢内CaDPA完全释放的不同<sup>[32]</sup>,长时间观察超级休眠孢子的缓慢萌发进程,提高对休眠芽孢的认识<sup>[37]</sup>,以及获知湿热处理对芽孢及芽孢萌发的影响机制<sup>[30]</sup>等。还应用在芽孢杆菌属外的其他芽孢细菌上,包括*Clostridium perfringens*<sup>[34,36]</sup>,*Geobacillus stearothermophilus*<sup>[42]</sup>。

### 3.3 相差显微镜术

相差显微镜术是20世纪30年代Zernike在研究衍射光栅的时候发明的。利用物体不同结构成分之间的折射率和厚度的差别,将通过物体不同部分的光程差转变为振幅差,经过相差物镜实现观测<sup>[43]</sup>。相差显微镜可以简单有效地将细胞内各种结构对光产生的不同折射作用转换为光密度差异,使镜下结构明显,影像清楚,也是观察活的或者未经染色的生物细胞或者组织的优秀工具。与DIC成像类似,细菌芽孢富含的CaDPA造成强折射,在相差环境形成高亮图像,Hashimoto等<sup>[44]</sup>最早将其应用于观测单个芽孢的萌发过程,发现其萌发曲线有两个阶段:1) 曲线快速降低阶段,推测可能是DPA快速释放阶段;2) 缓慢降低阶段,认为



是芽孢皮层水解与内核吸水所致。与拉曼光谱同步监测其萌发过程,  $1017\text{ cm}^{-1}$  峰的强度变化动态与相亮度变化动态一致, 其芽孢亮度与孢内 DPA 的含量线性相关<sup>[45-46]</sup>。

与 DIC 成像类似, 相差显微成像同样可实时高通量监测大量单个芽孢的萌发过程, Kong 等<sup>[45-46]</sup>运用相差显微镜监控芽孢萌发率以及在不同压强下芽孢萌发的异质性<sup>[47]</sup>, 精确测量萌发过程芽孢个体大小的变化<sup>[48]</sup>。

### 3.4 荧光显微术

荧光显微镜是利用一定波长的光激发样品内部的荧光物质, 发射出各种不同颜色的荧光, 观察标本的荧光图像。荧光显微镜对样品辨识度高且十分敏感, 可对细胞内分子进行定性定位分析, 主要应用于细胞结构和功能及化学成分研究。

与应用荧光方法检测来监测芽孢萌发<sup>[6,12]</sup>不同, Kong 等<sup>[49-50]</sup>将荧光显微镜应用于监测芽孢萌发过程核酸的变化, 根据核酸染色绑定待测量的萌发芽孢, 在芽孢开始萌发时吸收核酸染料 SYTO 16 并与核酸结合, 主要是脱氧核糖核酸(DNA), 在芽孢核心产生很强的荧光反应, 获得高荧光信号。由于 SYTO 16 不能渗透到休眠孢子核, 只有在内核 CaDPA 完全释放后才能通过内膜通道进入芽孢内和核酸结合, 可区分休眠孢子和正在萌发的孢子。Zhang 等<sup>[50]</sup>在观察湿热处理芽孢的动态过程实验中发现, 湿热处理过程中荧光强度增加, 但仍比营养萌发的强度低, 表明湿热处理的休眠芽孢内部膜渗透性低且核酸受到损伤。

荧光显微术为观测芽孢内膜通道变化和孢内核酸动态分析提供一种新的手段<sup>[45,50]</sup>, 操作简单, 视场均匀。

### 3.5 拉曼成像

拉曼成像原理是根据生物分子中化学键或官能团是否存在判断物质, 在单位面积内抽取特征峰进行峰面积计算判定物质的含量, 根据归一化结果进行图像重构<sup>[51]</sup>。拉曼成像具有对组织无损伤、非侵袭、分辨率高等特点, 而且在拉曼光谱基础上揭示了细胞的空间分布及结构变化。对于分析芽孢萌发过程胞内不同分子的变化更具优势。Kong 等<sup>[52]</sup>进行拉曼成像发现, CaDPA 只分布在核心而蛋白质则贯穿整个芽孢, 但是在核心的浓度是最大的; 细胞膜到核心的距离为 300 nm; 在 CaDPA 释放过程中蛋白质也在变化, 只是变化的幅度很小; 无论是休眠还是萌发芽孢, CaDPA 一直在核心。拉曼成像技术揭示芽孢内部分子分布信息, 萌发过程中内部物质的空间分布和动态变化过程, 为研究芽孢萌发提供新的信息<sup>[53]</sup>。

拉曼成像使高速扫描成为可能, 利用光束来扫描, 具有无振动、无漂移的特点, 使图像更加清晰, 为细胞分析实验添加了有效的工具。

### 3.6 多种技术方法的综合应用

一种技术方法的应用获知的仅是单方面的信息, 多种技术方法的交叉、整合, 可以更好、更全面深入地了解芽孢的萌发进程。图 2 所示为显微拉曼、DIC 显微镜和荧光显微镜的结合<sup>[50]</sup>, 同步分析同一个芽孢的萌

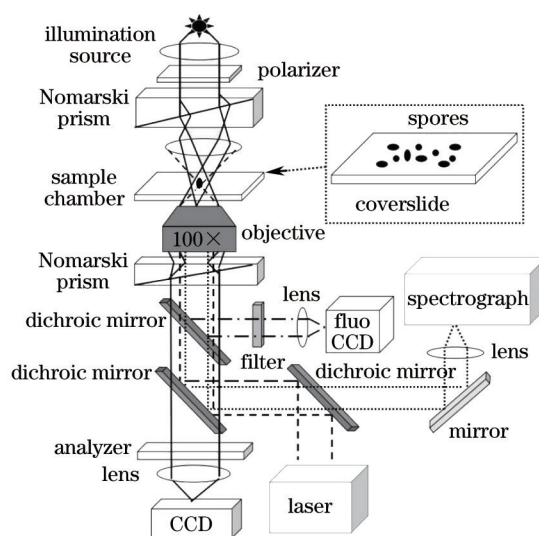


图 2 显微拉曼、DIC 成像和荧光成像实验系统<sup>[50]</sup>

Fig.2 Experimental setup combining Raman micro-spectroscopy, differential interference contrast microscopy and fluorescence microscopy

发过程,拉曼光谱收集的是CaPDA的信息,DIC显微镜显示芽孢亮度和大小变化,而荧光显微镜采集的是荧光物质与核酸结合,得到的是核酸变化的信息。实际上,目前多是应用两种或者三种光学手段来分析芽孢萌发,比如相差显微镜,荧光显微镜和光镊拉曼光谱结合<sup>[45]</sup>,拉曼光谱与DIC结合<sup>[30,32]</sup>,对认识芽孢的萌发机制和异质性起到了极大的促进作用。

#### 4 结束语

芽孢萌发是芽孢从休眠态向营养生长转变的关键起点,是认识芽孢抗性和寻找杀灭芽孢细菌的关键节点。创新的光学技术大大促进了对芽孢萌发机制的认识,但也还有很多未知领域<sup>[4]</sup>,包括营养萌发剂如何透过芽孢内膜与受体结合,结合后与芽孢开始萌发往往有一段很长的滞后期,期间芽孢内部发生了哪些变化;萌发剂受体和GerD蛋白的作用是什么,它们之间如何相互作用;SpoVA通道的结构是什么,如何控制胞内成分的释放;芽孢内膜精确状态;皮层水解酶如何调控,使得这些酶仅在芽孢萌发已经启动后才发挥作用。

新的光学技术与单细胞分析方法,能够以高分辨率来实时、同步分析多个单一芽孢萌发过程中芽孢的折光率变化和分子成分的变化,能够通过单个芽孢的萌发细节发现生命活动的规律,但作为新兴技术,其技术局限性是显而易见的,暂时还无法追踪萌发过程中小分子物质和蛋白结构的实时变化。随着物理理论技术的日益发展,这一技术将会愈加成熟。同时,不同优势的技术手段互补将会完善原有的实验技术并拓展研究的范围,从而使其应用更为广泛,具备了分析生命活动途径并阐释其功能和分子机制的能力,满足生命科学与物理科学交叉学科研究中对阐释细胞基本生命活动途径的研究要求,是进行单细胞分析的优秀工具。提高灵敏度、提升效率,探索发展新的光学技术也是未来的发展方向。

#### 参考文献

- 1 Setlow P, Johnson E A. Spores and their significance[M]. //Doyle M P, Buchanan R (Eds.). Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers (4<sup>th</sup> Edition). Washington DC: ASM Press, 2012: 45-79.
- 2 Setlow P. Summer meeting 2013 - when the sleepers wake: The germination of spores of *Bacillus* species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(6): 1251-1268.
- 3 Driks A. Overview: Development in bacteria: Spore formation in *Bacillus subtilis*[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59(3): 389-391.
- 4 Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(7): 1297-1305.
- 5 Setlow P. Spore germination[J]. Current Opinion Microbiology, 2003, 6(6): 550-556.
- 6 Hindle A A, Hall E A H. Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection[J]. Analyst, 1999, 124(11): 1599-1604.
- 7 Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker M R. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: Mechanisms and proteins involved[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(2): 85-94.
- 8 Moir A. How do spores germinate[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 526-530.
- 9 Rossignol D P, Vary J C. A unique method for studying the initiation of *Bacillus megaterium* spore germination[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1977, 79(4): 1098-1103.
- 10 Clements M O, Moir A. Role of the gerI operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(24): 6729-6735.
- 11 Cheung H Y, Cui J, Sun S. Real-time monitoring of *Bacillus subtilis* endospore components by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy during germination[J]. Microbiology, 1999, 145 (5): 1043-1048.
- 12 Pellegrino P M, Fell N F, Rosen D L, et al.. Bacterial endospore detection using terbium dipicolinate photoluminescence in the presence of chemical and biological materials[J]. Analytical Chemistry, 1998, 70(9): 1755-1760.
- 13 Ireland J A W, Hanna P C. Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires gerS[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(10): 5870-5872.
- 14 Ghosh S, Zhang P, Li Y, et al.. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(18): 5584-5591.
- 15 Fell N F, Pellegrino P M, Gillespie J B. Mitigating phosphate interference in bacterial endospore detection by Tb dipicolinate photoluminescence [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 426(1): 43-50.

- 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 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.
- 18 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. 不同初始pH值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析[J]. 中国激光, 2013, 40(2): 0215001.
- 19 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.
- 20 Kong L, Setlow P, Li Y Q. Analysis of the Raman spectra of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments[J]. Analyst, 2012, 137(16): 3683-3689.
- 21 Xie C, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
- 22 Chen D, Shelenkova L, Li Y Q, *et al.*. Laser tweezers Raman spectroscopy potential for studies of complex dynamic cellular processes: Single cell bacterial lysis[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(9): 3227-3238.
- 23 Chen D, Huang S S, Li Y Q. Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single *Bacillus* spores by laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(19): 6936-6941.
- 24 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(10): 4035-4042.
- 25 Zhang P, Setlow P, Li Y. Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. Optics Express, 2009, 17(19): 16480-16491.
- 26 Zhang P, Kong L, Setlow P, *et al.*. Characterization of wet-heat inactivation of single spores of *Bacillus* species by dual-trap Raman spectroscopy and elastic light scattering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1796-1805.
- 27 Zhang P, Kong L, Setlow P, *et al.*. Multiple-trap laser tweezers Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of the biological dynamics of multiple individual cells[J]. Optics Letters, 2010, 35(20): 3321-3323.
- 28 Daniels J K, Caldwell T P, Christensen K A, *et al.*. Monitoring the kinetics of *Bacillus subtilis* endospore germination via surface-enhanced Raman scattering spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(5): 1724-1729.
- 29 Evanoff D D, Heckel J, Caldwell T P, *et al.*. Monitoring DPA release from a single germinating *Bacillus subtilis* endospore via surface-enhanced Raman scattering microscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(39): 12618-12619.
- 30 Wang G, Zhang P, Setlow P, *et al.*. Kinetics of germination of wet-heat-treated individual spores of *Bacillus* species, monitored by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3368-3379.
- 31 Murphy D B, Davidson M W. Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy and Modulation Contrast Microscopy [M]. //Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging. New York: John Wiley & Sons, 2001: 153-168
- 32 Zhang P, Kong L, Wang G, *et al.*. Combination of Raman tweezers and quantitative differential interference contrast microscopy for measurement of dynamics and heterogeneity during the germination of individual bacterial spores[J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(5): 056010.
- 33 Wang G, Yi X, Li Y Q, *et al.*. Germination of individual *Bacillus subtilis* spores with alterations in the GerD and SpoVA proteins, which are important in spore germination[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(9): 2301-2311.
- 34 Wang G, Zhang P, Paredes-Sabja D, *et al.*. Analysis of the germination of individual *Clostridium perfringens* spores and its heterogeneity[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(5): 1212-1223.
- 35 Zhang P, Thomas S, Li Y Q, *et al.*. Effects of cortex peptidoglycan structure and cortex hydrolysis on the kinetics of Ca(2+)-dipicolinic acid release during *Bacillus subtilis* spore germination[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(3): 646-652.

- 36 Wang G, Paredes-Sabja D, Sarker M R, *et al.*. Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 824–836.
- 37 Zhang P, Kong L, Wang G, *et al.*. Analysis of the slow germination of multiple individual superdormant *Bacillus subtilis* spores using multifocus Raman microspectroscopy and differential interference contrast microscopy[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(3): 526–536.
- 38 Setlow B, Yu J, Li Y Q, *et al.*. Analysis of the germination kinetics of individual *Bacillus subtilis* spores treated with hydrogen peroxide or sodium hypochlorite[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2013, 57(4): 259–265.
- 39 Setlow B, Parish S, Zhang P, *et al.*. Mechanism of killing of spores of *Bacillus anthracis* in a high-temperature gas environment, and analysis of DNA damage generated by various decontamination treatments of spores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(4): 805–814.
- 40 Zhang P, Liang J, Yi X, *et al.*. Monitoring of commitment, blocking, and continuation of nutrient germination of individual *Bacillus subtilis* spores[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(13): 2443–2454.
- 41 Wang S, Setlow P, Li Y Q. Slow leakage of Ca-dipicolinic acid from individual *Bacillus* spores during initiation of spore germination[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(6): 1095–1103.
- 42 Zhou T, Dong Z, Setlow P, *et al.*. Kinetics of germination of individual spores of *Geobacillus stearothermophilus* as measured by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74987.
- 43 Goodman J W. *Introduction to Fourier Optics*[M]. Greenwood Village, CO: Roberts & Company Publishers, 2004.
- 44 Hashimoto T, Frieben W R, Conti S F. Germination of single bacterial spores[J]. *Journal of Bacteriology*, 1969, 98(3): 1011–1020.
- 45 Kong L, Zhang P, Wang G, *et al.*. Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(5): 625–639.
- 46 Kong L, Zhang P, Setlow P, *et al.*. Characterization of bacterial spore germination using integrated phase contrast microscopy, Raman spectroscopy, and optical tweezers[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9): 3840–3847.
- 47 Kong L, Doona C J, Setlow P, *et al.*. Monitoring rates and heterogeneity of high-pressure germination of *Bacillus* spores by phase-contrast microscopy of individual spores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 345–353.
- 48 Liang J, Zhang P, Setlow P, *et al.*. High-precision fitting measurements of the kinetics of size changes during germination of individual *Bacillus* spores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4606–4615.
- 49 Ragkousi K, Cowan A E, Ross M A, *et al.*. Analysis of nucleoid morphology during germination and outgrowth of spores of *Bacillus* species[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(19): 5556–5562.
- 50 Zhang P, Kong L, Wang G, *et al.*. Monitoring the wet-heat inactivation dynamics of single spores of *Bacillus* species by using Raman tweezers, differential interference contrast microscopy, and nucleic acid dye fluorescence microscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4754–4769.
- 51 Li Xue, Gao Guoming, Niu Liyuan, *et al.*. *In vivo* Raman imaging of mice ear[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(10): 1494–1499.  
李 雪, 高国明, 牛丽媛, 等. 活体小鼠耳朵的拉曼成像方法研究[J]. *分析化学*, 2012, 40(10): 1494–1499.
- 52 Kong L, Setlow P, Li Y Q. Observation of the dynamic germination of single bacterial spores using rapid Raman imaging [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 011003.
- 53 Kong L, Setlow P, Li Y Q. Direct analysis of water content and movement in single dormant bacterial spores using confocal Raman microspectroscopy and Raman imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(15): 7094–7101.

栏目编辑: 吴秀娟