

外周血中单个网织红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱

艾 敏^{1, 2} 刘军贤² 姚辉璐¹

(¹ 广西科学院生物物理实验室, 广西, 南宁 541004
² 广西师范大学物理与电子工程学院, 广西, 桂林 541004)

摘要 为了在外周血中准确区分大小相近的网织红细胞和小淋巴细胞, 采用光镊与拉曼光谱结合的单细胞技术。研究发现大鼠血液中单个网织红细胞和小淋巴细胞的光谱形态相差很大, 主要体现在以下位置: 1212, 1548, 1607, 1616, 1001, 1661 cm^{-1} (以上与蛋白质相关), 1584 cm^{-1} (与核酸相关)。通过分析部分特征峰, 证明小淋巴细胞相对于网织红细胞而言, 所含有的核酸含量高, 蛋白质含量少。通过主成分分析和判别分析两种统计方法进行分析, 均可完全区分这两种细胞。通过上述分析, 得到了一种光谱学上快速、准确地区分外周血中网织红细胞和小淋巴细胞的方法, 同时也为在现代生物医学研究血细胞提供一种识别依据和手段。

关键词 光谱学; 区分网织红细胞与白细胞; 拉曼光谱分析; 光镊; 单细胞

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092904.1043

Raman Spectra of Single Reticulocytes and Small Lymphocytes in Blood

Ai Min^{1,2} Liu Junxian² Yao Huilu¹

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

Abstract The single-cell-molecular technique based on optical tweezers and Raman spectroscopy is employed to study single reticulocytes and small lymphocytes of Sprague Dawley (S. D.) rat in nearly physiological solution. The spectra of single reticulocytes and small lymphocytes are obviously different due to their components. The main differences show that characteristic Raman bands of the protein are 1212, 1548, 1607 and 1616 cm^{-1} for reticulocytes, 1001 and 1661 cm^{-1} for small lymphocytes, and that of nucleic acid is 1584 cm^{-1} for both of them. The content of nucleic acid of small lymphocytes is more than that of reticulocytes, but for protein it is reverse by the histogram analysis of part characteristic Raman bands. Furthermore, the reticulocytes and small lymphocytes can be distinguished completely by principal component analysis and discriminant function analysis. The way of distinguishing quickly and accurately of single reticulocytes and small lymphocytes by the Raman spectra cannot be realized by optical microscope. It also provides a new method to distinguish two kinds of cells in blood for modern biomedicine study.

Key words spectroscopy; reticulocyte and leukocyte identification; Raman spectrum analysis; optical tweezers; single cell

1 引 言

拉曼光谱是一种产生于分子或晶格振动能级的光子非弹性散射光谱。分子中不同化学键的振动方式对应着拉曼光谱特征峰位置、强度和线宽, 从不

同物质的拉曼光谱可以推断出所含分子的组成与结构^[1~6]。激光镊子与拉曼光谱结合技术突破了传统的拉曼光谱群体信息的研究。这种单细胞技术兼具光镊与拉曼光谱的优势, 可在接近生理状态下研

收稿日期: 2008-08-22; 收到修改稿日期: 2008-09-22

基金项目: 国家自然科学基金(60868002)和广西科学基金(0575027, 0718007b-30)项目资助。

作者简介: 艾 敏(1984—), 女, 硕士研究生, 主要从事激光光镊技术与拉曼光谱分析等方面的研究。

E-mail: aimin841@hotmail.com

导师简介: 姚辉璐(1972—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事光谱分析等方面的研究。E-mail: yaohl@163.net

究单个活体,如细胞、细胞器或生物大分子,对研究对象的生理生化过程进行实时跟踪^[7~14]。目前,在血液学研究的范围包括不同物种的红细胞、血小板的拉曼光谱^[5~7],正常人与患有白血病的病人 T 细胞与 B 细胞的拉曼光谱^[15],人类 T 细胞的活化过程^[16]等。这些单细胞的研究已取得一定的进展,然而没有涉及到大鼠的小淋巴细胞和网织红细胞相比较的拉曼光谱分析。

大鼠是人类疾病的动物模型(Animal model of human diseases)的常用材料之一,即生物医学科学研究中所建立的具有人类疾病模拟性表现的动物实验常用对象和材料。在光学显微镜下,大鼠血液中的网织红细胞与小淋巴细胞的形态与大小基本一样,不容易区分。若采用染色的方法,则容易对细胞产生损伤,使细胞丧失活性,并且速度慢,不适合在体内或体外对细胞功能进行跟踪研究。

选择常见的动物模型 Sprague Dawley (S. D.) 大鼠,运用光镊与拉曼光谱结合的单细胞技术,在悬浮液中研究单个细胞网织红细胞和小淋巴细胞的拉曼光谱。并通过主成分分析方法(Principal components analysis, PCA)和判别分析方法(Discriminant function analysis, DFA)两种统计分析方法对不同细胞加以区分,探索了一种在光谱学上快速、准确区分细胞的方法,同时也为动物模型在现代生物医学研究中提供一种手段。

2 实 验

2.1 血样的采集与保存

动物 S. D. 大鼠,体重 180~200 g,雄性,由广西医科大学实验动物中心提供。合格证号:SCXK 桂 2003-003。以全价颗粒饲料饲喂,自由采食,自由饮水。断尾采血,所采血样与 10% EDTA (PH 8.0)按体积比 4:1 比例混合抗凝。抗凝血取出 100 μl 用 0.9% 的生理盐水稀释至 0.5 ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,作为细胞拉曼光谱的测试样品。

2.2 实验装置

实验装置如图 1 所示。一束二极管激光(780 nm, 15 mW)经过滤波后被导入一台倒置生物显微镜(Nikon TE2000-U),激光束经显微镜物镜(油浸, NA 1.30, 100 \times),聚焦后在焦点附近形成光镊^[17],同时构成光镊的激光束也用来激发被俘获细胞的拉曼散射光谱,拉曼散射信号被聚焦进光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, 600 g/mm blazed at 870 nm)狭缝入口处,通过 CCD 探测器接受拉曼

信号,并传输到计算机形成拉曼光谱图^[5, 6, 18]。

TC: temperature controller; DL: diode laser; OP: optical partition;
IF: interference filter; M: mirror; L: lens; PH: pinhole; NHF: holographic notch filter
CCD: charged-coupled detector; DM: dichroic mirror;
BS: beam splitter; Obj: objective lens; EP: eyepiece;
VC: video camera;
lamp: green-filtered xenon illumination light

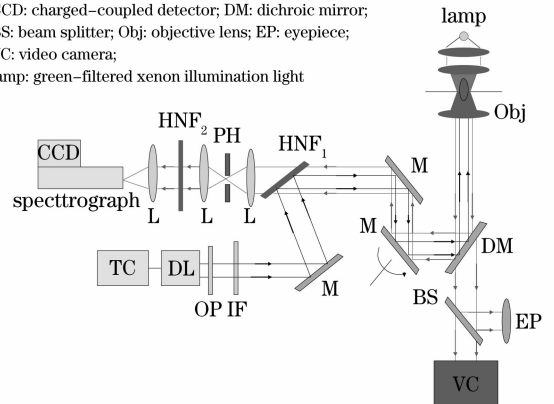


图 1 实验装置图

Fig. 1 Schematic of the Experimental arrangement

2.3 光谱数据的收集与处理

细胞被俘获在样品池石英片上方约 8 μm 位置,调整激光束在会聚点的功率约 15 mW,拉曼信号收集时间为 15 s,得到单个细胞的拉曼光谱 $S_{\text{acq}}(\nu)$ (含有背景拉曼光谱);光镊释放细胞,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 $S_{\text{bg}}(\nu)$ 。每次俘获并收集 25 个细胞的拉曼光谱,光谱数据转换为 ASC II 数据,输入软件 Micro Origin 6.0 进行处理,选取特征峰集中的 600~1800 cm^{-1} 的指纹区域做光谱分析。

每组细胞随机选择 25 个细胞光谱和 3 个背景光谱,应用 Matlab 7.0 软件包,将每个细胞测得的光谱先减去来自溶液、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 $R(\nu)$ 校正得到单个细胞的实际光谱: $S_{\text{act}}(\nu) = [S_{\text{acq}}(\nu) - S_{\text{bg}}(\nu)] R(\nu)$ 。然后,应用 PyChem 3.0.4 Beta 软件做 PCA 与 DFA,输出结果。

3 结果与讨论

3.1 显微镜下图像分析

大鼠血液中的细胞在悬浮液中的图像如图 2 所示。在光学显微镜下,无光镊作用时,成熟红细胞呈圆盘状,中间略显凹面;网织红细胞(直径约 5 μm)呈圆形;小淋巴细胞(直径 4~6 μm)成圆球形。有光镊作用时,成熟红细胞凹面发生形变,使得两端似哑铃状^[5]。而图 2 中间的细胞形态变化小。

结合图 3,可以推断出在光镊作用下形态变化小的细胞为网织红细胞。如图 3 所示,从曲线(a)

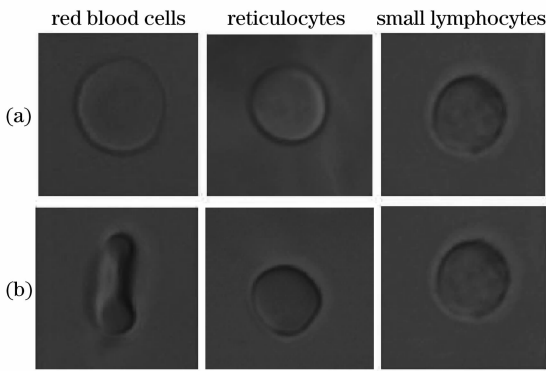


图 2 成熟红细胞、网织红细胞与小淋巴细胞的图像(放大 100 倍)。(a) 无光镊作用；(b) 有光镊作用

Fig. 2 Images of mature red blood cells, reticulocytes and small lymphocytes (100 \times). (a) without optical tweezers; (b) with optical tweezers

和(b)中可以看出该细胞与成熟红细胞的拉曼光谱的峰形与特征峰完全相同，而曲线(c)中，它们的差谱曲线几乎成一条直线，说明两者的物质丰度也基本一致。这说明，在光镊作用下，变化微小的细胞属于红细胞的一种，而不属于成熟红细胞。

然而，由于网织红细胞是未完全成熟的红细胞，从骨髓进入血液中，内含丰富的血红蛋白。不过它的细胞浆内仍存有多少不等的未完全退化的细胞核成分核糖核酸(RNA)。它支撑着细胞，数天后会消失，血红蛋白不再增加时，变成成熟红细胞。故在光镊的作用下，细胞膜会收缩，略微变小，形状基本不变，而不会像成熟红细胞的变形程度很大。因此，可以确认在光镊作用下形态变化微小的红细胞为网织红细胞。

小淋巴细胞含有细胞核，有光镊作用时，形状大小基本不变，如图 2 所示。在显微镜下，成熟红细胞的特征都很明显，尤其在光镊的作用下，成熟红细胞的形态特殊，极易辨认。因此仅凭光镊的作用足以在外周血中区分成熟红细胞。然而，在显微

镜下，网织红细胞与小淋巴细胞的形态与大小基本一样，不容易区分，只是在光镊作用下，略有区别。显然，这种区别作为准确区分网织红细胞与小淋巴细胞区分的依据是不够充分的。

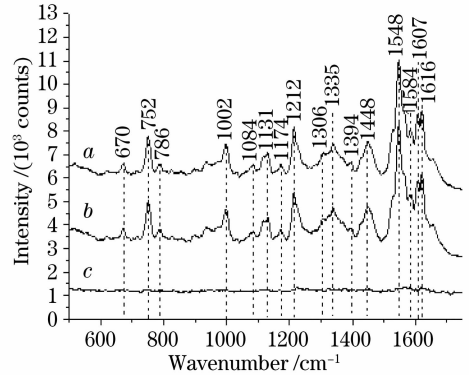


图 3 单个网织红细胞 a 与成熟红细胞 b 的拉曼光谱图。曲线 c 是曲线 b 与曲线 a 的差谱。激光波长 780 nm，功率 15 mW，光谱采集时间 15 s

Fig. 3 Raman spectra of single reticulocytes a and red blood cell b of S.D. rat. Curve c is the subtraction of curve b from curve a. For all measurements, the laser power is 15 mW at 780 nm and the data acquisition time is 15 s

3.2 细胞光谱图

大鼠网织红细胞的直径大约为 5 μm ，其拉曼光谱图如图 4 所示。从图 4 曲线 a 可知，主要特征峰对应的均是蛋白质(氨基酸)、脂类和核酸的基团，如芳香族氨基酸(苯丙氨酸 1001, 1212, 1607 cm^{-1} ，酪氨酸 1607, 1616 cm^{-1})，杂环族氨基酸(色氨酸 752, 1212, 1548, 1607, 1616 cm^{-1})，蛋白质(1338, 1449, 1661 cm^{-1})，核酸类(786, 1584 cm^{-1})，脂类(1306, 1449 cm^{-1})，如表 1 所示^[16, 19]。通过以上分析可知，网织红细胞以氨基酸为代表的蛋白质(主要是血红蛋白)所占含量最多，还有少量脂类和核糖核酸 RNA^[20]。

表 1 细胞拉曼光谱特征峰归属^[16, 19, 21~25]

Table 1 Raman bands observed in the spectra of the cells and their tentative assignments^[16, 19, 21~25]

Peak position/ cm^{-1}	Tentative peak assignments for Raman tissue spectra
752	Symmetric breathing of tryptophan
786	DNA; O-P-O, cytosine, uracil, thymine
895~899	DNA backbone / deoxyribose
1001~1002	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1094	C-C stretch, O-P-O stretch(nucleic acids)
1212	Tryptophan and phenylalanine ($\nu_{\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5}$)
1257	Amide III:/adenine/cytosine
1306	CH_2 deformation(lipid)/adenine, cytosine

(续表)

Peak position/cm ⁻¹	Tentative peak assignments for Raman tissue spectra
1335~1345	CH ₃ CH ₂ wagging mode of collagen
1336~1338	Polynucleotide chain(DNA-purine bases)
1449	Protein/lipid
1548	Tryptophan
1584	Nucleic acid purine bases (guanine, adenine)
1607	Tryptophan (ν_{8a})/ phenylalanine / tyrosine
1616	C=C stretching mode of tyrosine and tryptophan
1661	Amide I; α -helix

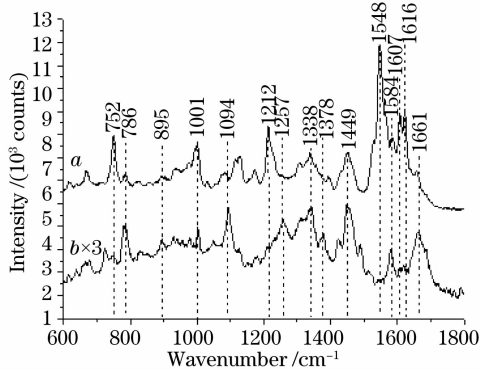


图4 单个网织红细胞 *a* 与小淋巴细胞 *b* 的拉曼光谱。 $b \times 3$ 表示光谱强度增加到原来的三倍。激光波长 780 nm, 功率 15 mW, 光谱采集时间 15 s

Fig. 4 Raman spectra of single reticulocytes *a* and small lymphocytes *b* of S. D. rat. The note $b \times 3$ shows the intensity of the spectra of small lymphocytes magnified three times. For all measurements, the laser power is 15 mW at 780 nm and the data acquisition time is 15 s

小淋巴细胞是无核白细胞中淋巴细胞的一种, 直径较小, 因此得名。淋巴细胞内含丰富的游离核糖体, 少量线粒体和粗面内质网^[16]。外周血淋巴细胞中小淋巴细胞的数量最多, 直径为 4~6 μm 。从图 4 曲线 *b* 上看, 主要特征峰对应的是蛋白质(1338, 1378, 1449, 1661 cm^{-1}), 芳香族氨基酸(苯丙氨酸 1001 cm^{-1}), 核酸(嘌呤嘧啶类 1094, 1257, 1338, 1378, 1584 cm^{-1} ; DNA 786, 895, 1094 cm^{-1}), 杂环族氨基酸(色氨酸 752 cm^{-1}), 脂类(1094, 1449, 1378 cm^{-1}), 核糖体(去氧核糖 895 cm^{-1})^[19, 21~25]。通过光谱图的强度分布可得, 小淋巴细胞的核酸, 蛋白质(氨基酸)两者含量相当。

因此, 从光谱图上的强度分析, 可获知网织红细胞与小淋巴细胞的光谱峰形, 以及特征峰对应的内部成分存在很大差异, 其中主要的差别是: 网织红细胞(1212, 1548, 1607, 1616 cm^{-1})与小淋巴细胞(1001, 1661 cm^{-1})不同种类的蛋白质, 以及相

同种类的核酸(1584 cm^{-1})。如图 4 所示, 可直接从峰形区分这两种细胞。

3.3 部分特征峰的柱状图分析

以 786, 1001, 1584 cm^{-1} 为例, 这三个特征峰是网织红细胞与小淋巴细胞共含有的, 但是两者的强度却大不一样, 在 786 cm^{-1} 处, 小淋巴细胞的强度略微高于网织红细胞的, 而 1001 cm^{-1} 处, 网织红细胞的强度明显高于小淋巴细胞的, 在 1584 cm^{-1} 处, 小淋巴细胞的强度与网织红细胞的接近, 如下图 5 所示。小淋巴细胞所特有的特征峰 1094 cm^{-1} (核酸) 在网织红细胞中没有; 而网织红细胞所特有的特征峰 1548 cm^{-1} (蛋白质) 在小淋巴细胞中没有。从某种程度上, 这说明小淋巴细胞相对于网织红细胞而言, 在 786, 1094 cm^{-1} 对应的核酸含量高, 1584 cm^{-1} 对应的含量相当; 而 1001, 1548 cm^{-1} 对应的蛋白质含量少或没有。

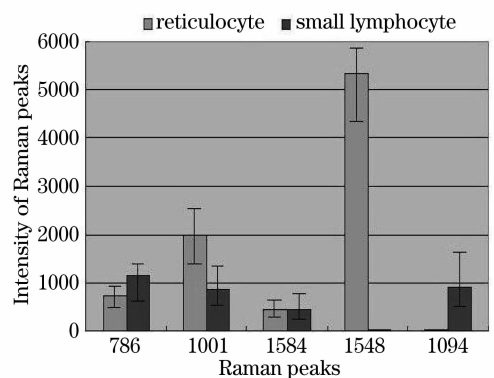


图5 网织红细胞与小淋巴细胞的部分特征峰强度的柱状图

Fig. 5 Intensity histogram of some Raman peaks of reticulocytes and small lymphocytes

3.4 网织红细胞与小淋巴细胞的 PCA 与 DFA

将网织红细胞与小淋巴细胞的光谱数据分别取 25 个, 共 50 个数据分别做 PCA 和 DFA (如图 6)。在图中, *l* 代表小淋巴细胞, *r* 代表网织红细胞, 其后的数字是所对应的标号 1~25。在图 6(a) 中可以

清楚地看到, PCA 能清楚地把小淋巴细胞与网织红细胞区别开来, 测试的数据相对集中, 区分率可达 100%。在图 6(b)中, DFA 可以清楚地区分网织红细胞与小淋巴细胞, 区分率达 100%。

总体来讲, 网织红细胞与小淋巴细胞在内部结

构的差异性很大。因此, 无论是 PCA 还是 DFA, 都可以将网织红细胞与小淋巴细胞清楚地区别开, 区分程度可达 100%。而且在图 6, 网织红细胞分布比较密集, 而小淋巴细胞则分布比较散落, 这说明网织红细胞内部的均匀性比小淋巴细胞的好。

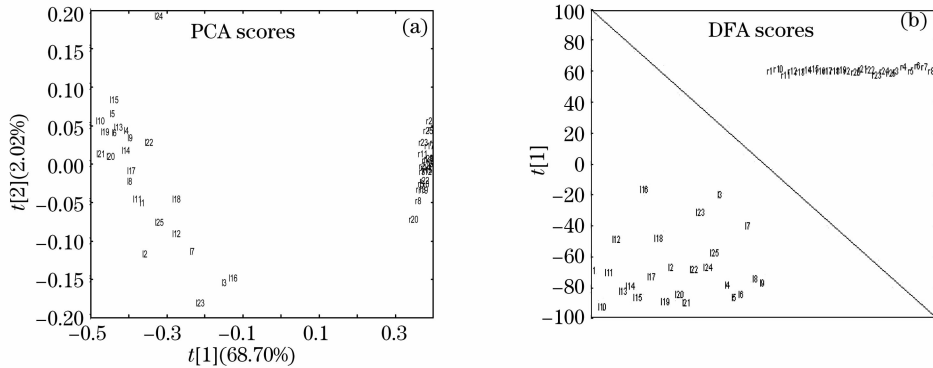


图 6 单细胞的 PCA 分析 (a); DFA (b) 分析

Fig. 6 Analysis of single cells spectra based on PCA (a); DFA (b)

4 结 论

利用光镊与拉曼光谱结合的单细胞技术, 测量了单个红细胞、网织红细胞以及小淋巴细胞的拉曼光谱。通过光谱分析, 可得光谱的差异主要体现在网织红细胞(1212, 1548, 1607, 1616 cm^{-1} 对应蛋白质)与小淋巴细胞(1001, 1661 cm^{-1} 对应蛋白质)所含的不同种类蛋白质, 以及同种类核酸(1584 cm^{-1})。利用光谱特征峰、PCA 和 DFA 等方法, 都可迅速且准确地在外周血中区分网织红细胞与小淋巴细胞, 区分率可达 100%。这种区分能力在光学显微镜下仅凭肉眼观察是不能实现的。这为生物医学中的血细胞检测, 提供了一个迅速的光谱技术手段, 也为动物模型在现代生物医学研究中提供了一种参考手段。

参 考 文 献

- Liang Er'jun, Liang Huiqin. Study on the properties and phase transition in laser quenching and cladding layers by Raman spectroscopy[J]. *Chin. J. Lasers*, 2006, **33**(1): 120~123
- 梁二军, 梁会琴. 激光淬火及熔覆层性能与物相变化的拉曼光谱研究[J]. *中国激光*, 2006, **33**(1): 120~123
- Li Yu, Geng Zaibin, Fang Jianhui *et al.*. Raman spectroscopic study of $x\text{KPO}_3 \cdot (1-x)\text{MoO}_3$ Crystals[J]. *Chin. J. Lasers*, 1998, **25**(2): 149~152
- 李 郁, 耿在斌, 方建慧 等. $x\text{KPO}_3 \cdot (1-x)\text{MoO}_3$ 晶体的拉曼光谱特征研究[J]. *中国激光*, 1998, **25**(2): 149~152
- Liu Gang, Xing Da, Wang Haimin *et al.*. Study of protein in human gallstones by fourier transform infrared spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(4): 441~446
- 刘 刚, 邢 达, 王海珉 等. 胆结石中蛋白质的傅里叶变换红外

- 光谱和表面增强拉曼光谱研究[J]. *光学学报*, 2002, **22**(4): 441~446
- Liu Songhao, Meng Yaoyong. Photodynamic damages of DNA with HMME probed by Raman spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2000, **20**(4): 529~532
- 刘颂豪, 孟耀勇. 血卟啉单甲醚对 DNA 损伤的拉曼光谱研究 [J]. *光学学报*, 2000, **20**(4): 529~532
- Yao Huilu, Wang Guiwen, He Bijuan *et al.*. Raman spectra of single blood cells [J]. *Journal of Jinan University (Sci. & Tech.)*, 2005, **19**(4): 328~330
- 姚辉璐, 王桂文, 何碧娟 等. 单个红细胞的拉曼光谱研究 [J]. *济南大学学报(自然科学版)*, 2005, **19**(4): 328~330
- Wang Guiwen, Yao Huilu, He Bijuan *et al.*. Raman microspectroscopy of single blood platelets [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(7): 1347~1350
- 王桂文, 姚辉璐, 何碧娟 等. 单个血小板的拉曼光谱分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(7): 1347~1350
- C. A. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biology cells [J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(4): 249~251
- K. Ajito, K. Torimitsu. Laser trapping and Raman spectroscopy of single cellular organelles in the nanometric range [J]. *Lab. Chip.*, 2002, **2**(1): 11~14
- J. M. Sanderson, A. D. Ward. Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers [J]. *Chem. Commun.*, 2004, **9**: 1120~1121
- D. Chen, S. S. Huang, Y. Q. Li. Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single bacillus spores by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Anal. Chem.*, 2006, **78**(19): 6936~6941
- S. S. Huang, D. Chen, P. L. Pelczar *et al.*. Levels of Ca^{2+} -dipicolinic acid in individual bacillus spores determined using microfluidic Raman tweezers [J]. *J. Bacteriol.*, 2007, **189**(13): 4681~4687
- H. Y. Tang, H. L. Yao, G. W. Wang *et al.*. NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers [J]. *Opt. Express.*, 2007, **15**(20): 12708~12716
- P. R. T. Jess, V. Garcés-Chávez, D. Smith *et al.*. Dual beam

- fibre trap for Raman micro-spectroscopy of single cells[J]. *Opt. Express.*, 2006, **14**(12): 5779~5791
- 14 J. W. Chan, H. Winhold, M. H. Corzett *et al.*. Monitoring dynamic protein expression in living *E. coli* bacterial cells by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Cytometry A*, 2007, **71**(7): 468~474
- 15 J. W. Chan, D. S. Taylor, S. M. Lane *et al.*. Nondestructive identification of individual leukemia cells by laser trapping Raman spectroscopy[J]. *Anal. Chem.*, 2008, **80**(6): 2180~2187
- 16 M. D. Mannie, T. J. McConnell, C. Xie *et al.*. Activation-dependent phases of T cells distinguished by use of optical tweezers and near infrared Raman spectroscopy[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, **297**(1-2): 53~60
- 17 G. D. Wright, J. Arlt, W. C. K. Poon *et al.*. Experimentally manipulating fungi with optical tweezers[J]. *Mycoscience*, 2007, **48**(1): 15~19
- 18 Yao Huilu, Zhu Miao, Wang Guiwen *et al.*. Study of Raman spectra of single carcinoma of nasopharynx cell[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(9): 1761~1764
姚辉璐, 朱 淼, 王桂文等. 单个鼻咽癌细胞的拉曼光谱分析的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(9): 1761~1764
- 19 N. Stone, C. Kendall, J. Smith *et al.*. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers[J]. *Faraday Discuss.*, 2004, **126**: 141~157
- 20 Huang Zaijie, Zhang Bin. The clinical value of immature reticulocyte fraction in monitoring the recovery of bone marrowfunction after radiotherapy[J]. *J. Clin. Intern. Med.*, 2003, **20**(6): 312~313
黄再捷, 张 兵. 采用未成熟网织红细胞指数监测恶性肿瘤患者放疗前、后骨髓功能恢复的临床价值[J]. *临床内科杂志*, 2003, **20**(6): 312~313
- 21 C. A. Xie, Y. Q. Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques[J]. *Journal of Applied Physics*, 2003, **93**(5): 2982~2986
- 22 K. E. Hamden, B. A. Bryan, P. W. Ford *et al.*. Spectroscopic analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infected cells by Raman tweezers[J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, **129**(2): 145~151
- 23 C. A. Xie, J. Mace, M. A. Dinno *et al.*. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Anal. Chem.*, 2005, **77**(14): 4390~4397
- 24 C. A. Xie, Y. Q. Li, W. Tang *et al.*. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy [J]. *Journal of Applied Physics*, 2003, **94**(9): 6138~6142
- 25 P. R. T. Jess, D. D. W. Smith, M. Mazilu *et al.*. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy[J]. *Int. J. Cancer*, 2007, **121**(12): 2723~2728