

文章编号: 0253-2239(2010)02-0491-07

# 一种与光镊结合的显微拉曼光谱技术

张 勇<sup>1</sup> 叶安培<sup>1,2,3</sup> 闻 丞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 北京大学信息科学与技术学院, 北京 100871; <sup>2</sup> 北京大学纳米器件物理与化学教育部重点实验室, 北京 100871)

<sup>3</sup> 北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871

**摘要** 论述了一种与光镊结合的显微拉曼光谱即“光镊-显微拉曼光谱”系统的构建方案。给出了利用该系统测得的活细胞(大白鼠血细胞, 酵母细胞)的显微拉曼光谱, 并将红外光镊束缚下的 Ar<sup>+</sup> 激光激发的血细胞的拉曼光谱, 与用单一 Ar<sup>+</sup> 激光光镊束缚并同时激发的血细胞拉曼光谱, 以及血细胞直接贴在基底上的拉曼光谱进行了分析对比。实验表明, 前者比后两种实验方案的血细胞拉曼光谱信号有显著提高。分析了红外 1064 nm 光镊激光和可见 514.5 nm Ar<sup>+</sup> 激光对活细胞的损伤效应, 发现高功率的红外激光对细胞的损伤作用远小于低功率的 Ar<sup>+</sup> 激光。并将该系统应用于碳纳米管材料分析, 获得了单壁碳纳米管的拉曼光谱。

**关键词** 显微拉曼光谱; 激光光镊; 光镊-拉曼光谱系统; 活细胞拉曼光谱; 单壁碳纳米管拉曼光谱

**中图分类号** O437.3 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS20103002.0491

## A Micro-Raman Spectroscopy Combining with Optical Tweezers

Zhang Yong<sup>1</sup> Ye Anpei<sup>1,2,3</sup> Wen Cheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Electronics Engineering and Computer Science, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>2</sup> Key Laboratory for the Physics and Chemistry of Nanodevices, Ministry of Education, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>3</sup> Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract** A hybrid "optical tweezers-micro Raman spectroscopy" technique is introduced in this letter. Applying this system, the micro-Raman spectrums of rat erythrocyte and saccharomyces cerevisiae in vivo were obtained. The results show that this technique can obviously improve signal-to-noise ratio compared with conventional approaches. Besides, the damage from lasers on the cells were analyzed. It was revealed that the damage of cell from intense IR laser were much lower than that from the weak Ar<sup>+</sup> laser. Finally, the system was also applied in carbon nano-tube (CNT) analysis and Raman spectra from CNT were obtained.

**Key words** micro-Raman spectrum; optical tweezers; optical tweezers-Raman spectroscopy system; Raman spectra of single living cell; single wall carbon-nanotube Raman spectrum

## 1 引 言

显微拉曼光谱可以获得微米尺度的物质结构和化学组成信息, 甚至单个细胞的组分和分布图像<sup>[1~4]</sup>。然而, 对悬浮在液体中的微小粒子或活细胞进行测量时, 由于热运动以致很难对样品进行准确激发, 通常的做法是将被测样品固定到基片上。而基片对样品的拉曼散射信号有明显影响<sup>[5]</sup>。光镊

能稳定地束缚和操纵中性原子<sup>[6]</sup>、细胞、细菌和病毒<sup>[7,8]</sup>等生物粒子。激光光镊与显微拉曼光谱仪二者都是利用显微镜物镜形成高度会聚的激光光束, 所不同的是光镊是利用会聚光束形成的梯度势阱来束缚样品粒子, 而拉曼光谱是利用会聚光束对样品进行显微拉曼激发。本文将二者结合, 搭建了“激光光镊-显微拉曼光谱系统”, 有效地解决悬浮样品不

收稿日期: 2009-04-09; 收到修改稿日期: 2009-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(10674008)资助课题。

作者简介: 张 勇(1982—), 男, 硕士研究生, 主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: zhangyong2006@pku.edu.cn

导师简介: 叶安培(1961—), 男, 博士, 副教授, 主要从事激光生物、生物光子学、原子结构与光谱等方面的研究。

E-mail: yap@pku.edu.cn(通信联系人)

易准确激发和基片对样品信号干扰的问题。实验表明,用该系统可以测量单个活细胞表面或内部的微区拉曼光谱,同时显著提高拉曼信号强度。有人曾利用单一激光束同时作为光镊光源和拉曼激发光源,获得了束缚状态下活细胞的拉曼光谱<sup>[5,9,10]</sup>。但这种结构的不利之处在于光镊焦点和拉曼光谱激发点是同光点,无法实现激光在样品任意部位的精确定位,不能采集细胞特定部位的微区光谱。此外,由于生物蛋白的拉曼共振峰多处于可见光波段,为了获得较强的共振拉曼信号,常采用可见光激发,而束缚细胞所需的高功率的可见激光会对活细胞产生严重的损伤作用<sup>[11]</sup>。本文利用对细胞损伤极小的红外激光作为光镊,对细胞进行悬浮固定,用另一束功率很低的可见光波段的 Ar<sup>+</sup> 激光作为拉曼激发光,使其准确聚焦到细胞的任意感兴趣区(表面,细胞质,细胞核),实现了单个活细胞的无损微区拉曼光

谱的精确测量,并获得了细胞特定区域成分的动态变化信息。进一步利用光镊对细胞的精确动态操控技术,还可望实现细胞三维拉曼光谱和拉曼成像。由于商品化光镊系统和拉曼光谱系统价格均很昂贵,且功能单一,无法满足上述研究需要。因此,在实验室自行构建具有精确操纵和测量功能的光镊—显微拉曼光谱系统,不仅可以实现活细胞无标记、无损和原位拉曼光谱检测,而且可以大大节约开支,具有很强的实用价值。

## 2 系统构建

系统构成如图 1 所示,其中实线表示光镊光路,虚线表示拉曼光谱激发光光路,点线表示拉曼散射光光路或被囚禁样品的成像光光路。下面按照从激光器到显微镜物镜的顺序介绍整个系统。

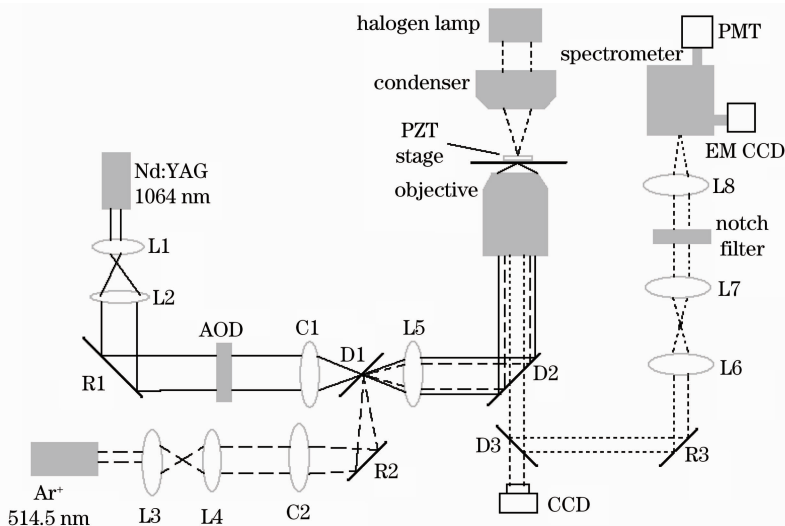


图 1 光镊-显微拉曼光谱系统

Fig. 1 Scheme of optical tweezers-micro Raman spectroscopy system

光镊使用波长为 1064 nm 的半导体抽运 Nd:YAG 激光器(Coherent 公司的 compass 1064-2000N 型),选用红外激光器作为光镊光源可以有效避开蛋白质和水的吸收峰,从而减少热效应对细胞的损伤。红外激光输出后经望远镜系统 L1, L2 扩束,使得光斑大小刚好覆盖显微镜后瞳以便在样品焦面上形成最小的聚焦光束。在与显微镜后瞳共轭的位置放置声光偏转控制器(AOD)(AA 公司的 DTS, XY400-1064 型),从而使得偏转后的激光仍然能够全部进入物镜,保持光镊功率的稳定。AOD 能够按照直接频率合成器件(DDS)产生的高频信号快速精确地操控光束的偏转方向,DDS 由现场可编程逻辑阵列(FPGA)控制,通过自行开发的操控软件

实现光镊焦点在样品台上按任意轨迹运动<sup>[12]</sup>。红外激光由耦合镜 C1 进入倒置荧光显微镜(Zeiss 公司的 Axiovert 200 型),经管镜 L5 后平行进入显微镜物镜(objective),最终聚焦到显微镜样品台上。

拉曼光谱的激发光采用波长为 514.5 nm 的 Ar<sup>+</sup> 离子激光器,因为一些生物分子的共振带也接近这个波长,在该激光作用下可得到较强的信号,有利于活细胞拉曼光谱的研究。然而一些蛋白的吸收峰也处于这个波长附近,容易引起活细胞的热损伤<sup>[13]</sup>。因此,应尽可能减小该激光功率。514.5 nm 激光经望远镜系统 L3, L4 扩束后,由透镜 C2 耦合入显微镜。拉曼光谱激发光和光镊激光由二向色镜 D1 合束,样品由卤素灯照明。拉曼散射光和样品的

成像光走相同的光路,因为在物镜下方的一段光路,光镊激光、拉曼激发光、成像光和拉曼散射光相重合,因此,分光镜 D2 起着重要作用。D2 要满足 1064 nm 和 514.5 nm 的激光有较高的反射率,而处于 514.5~1064 nm 之间的光有较高的透射率,也就是满足 514.5~1064 nm 的带通滤波器,可以采用单一镀膜镜或复合镜的方法实现。分光镜 D3 将 20% 的照明光分到监控 CCD 上,拉曼散射光由反射镜 R3 引出显微镜,经透镜 L6 聚焦,再由透镜 L7 和 L8 进入光谱仪 (Acton 2300i),其中 514.5 nm 的 Notch Filter 的作用是滤除通过 D2 的瑞利散射光。光谱仪有两个出光孔,一个出光孔作单色仪,可以探测某一频率点的光的强度随时间的变化,该出光孔与光电倍增管 (PMT) 相连,当谱仪中的光栅旋转时,不同波长的光强信息依次被记录下来形成光谱。另一个出光孔作为光谱仪出口,可以同时测量一段频率范围的拉曼光谱,该出光孔与荧光成像的高灵敏 CCD (EMCCD) 相连。由于拉曼光谱信号极其微弱,因此对光电检测设备的要求非常高。通常需要使用超低温的低噪声探测器。由于条件限制,实验

中采用的是通常应用的 EMCCD (Roper Scientific 公司的 Cascade512B 型),该设备虽然只能冷却到  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,由于具有电子倍增功能,可有效提高信号强度。PMT 具有单光子计数功能,管芯从日本滨松光电公司 (Hamamatsu) 购置,驱动和采集分析电路为自行设计制作。

### 3 实验与结果

由于 1064 nm 红外激光能有效避开水和多数蛋白质的吸收峰,因此使用它做为光镊光源对细胞几乎无损伤。将较大的生物粒子,如生物活细胞束缚在光场中一般需要较大的功率,所以光镊的有效工作功率一般在 20 mW 以上,514.5 nm 的绿色激光往往处于蛋白质的共振带,作为拉曼激发光能够得到较强的拉曼散射信号,从而大大增强拉曼光谱的信噪比,为了避免对活细胞的损伤,应尽量减小其功率,实验中 514.5 nm 激光的有效功率均在 0.5 mW 以下。两束光在 100 倍油镜下的照片如图 2(a) 所示,图 2(b) 是在明场下用 1064 nm 激光捕获 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯小球,并用 514.5 nm 激光激发时的照片。

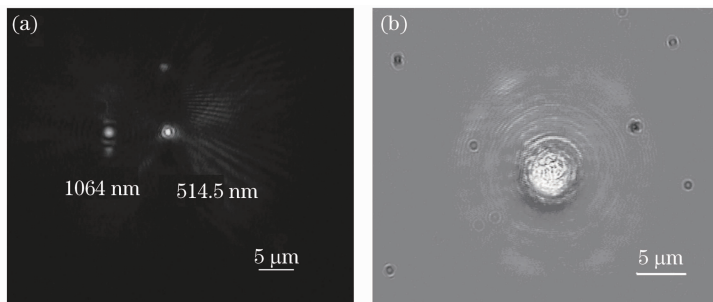


图 2 光镊和拉曼激发光在显微镜下的图像

Fig. 2 Photographs of optical tweezers and Raman exciting beam

#### 3.1 大白鼠血红细胞拉曼光谱

红细胞在生物体新陈代谢和氧气运输方面起着非常重要的作用。研究血红蛋白的结构以及在不同氧合状态下结构的变化,对于了解血红细胞工作机制,分析血液疾病有着重要的意义。红细胞属于  $\nu_4$  谱带的信号,在 514.5 nm 附近处于明显的共振模式,此谱带可提供血红素卟啉环  $\pi$  轨道和  $\pi^*$  轨道的电子数量方面的信息,被称为血红素的氧化标记带<sup>[14]</sup>。但 514.5 nm 的激光会导致光解离,致使氧合血红蛋白向去氧态转化,而且对蛋白有较强的杀伤作用。因此实验中使用很低功率的拉曼激发光以尽可能减少对细胞的损伤。

将新鲜大白鼠血细胞稀释 500 倍溶于阿氏液中 (保持血细胞最佳生存环境),使用 100 倍油浸物镜

(NA 为 1.25),1064 nm 红外激光通过物镜前功率 40 mW (聚焦在样品上的功率约为 20 mW),514.5 nm 拉曼激发光在物镜前的功率约 0.8 mW (聚焦在样品上的功率约为 0.4 mW),设置光谱仪前狭缝宽度为 25  $\mu\text{m}$ ,衍射光栅参数为闪耀波长 500 nm,1200 l/mm。在显微镜下使用 1064 nm 光镊捕获单个血细胞,提高载玻片上表面约 5  $\mu\text{m}$ ,之后引入拉曼激发光,同时开始采集拉曼光谱,积分时间 20 s。所获得的 1200~1750  $\text{cm}^{-1}$  的拉曼光谱如图 3 中 a 谱线所示。图 3 中 b 谱线为使用 514.5 nm 激光同时作为光镊和拉曼光谱激发光,将血细胞束缚时得到的拉曼光谱。(积分时间仍为 20 s,但激光功率约为 20 mW),图 3 中 c 谱线为 514.5 nm 激发光激发贴在载玻片表面的血细胞获得的拉曼光谱。对比 a, b 两谱线看出,

虽然 b 谱线使用的激光功率比 a 谱线高 50 倍,但其信号强度和谱线精细度均比谱线 a 差。对比 3 条谱线可以看出,当细胞贴在基底上时取得的拉曼信号最

差,而使用光镊捕获血细胞条件下所获得的信号都有显著的提高。

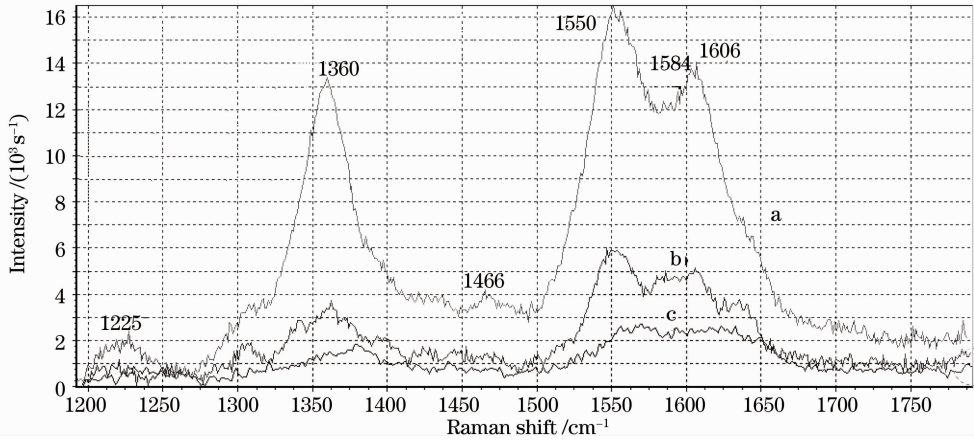


图 3 大白鼠血细胞拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectra of single living rat erythrocyte

位于  $1500\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  的区域被称为血细胞的核振动区(core size band region)<sup>[2]</sup>,该区域的  $1550, 1584$  和  $1606\text{ cm}^{-1}$  的信号峰反应了血红蛋白 C=C 骨架的伸缩振动。位于  $1300\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  的区域被称为吡咯环伸缩振动区(pyrrole ring stretching region),位于此区域的  $1360\text{ cm}^{-1}$  的信号峰表征了吡咯环的半环对称[(half-ring)<sub>sym</sub>]振动。 $1200\sim 1300\text{ cm}^{-1}$  的区域被称为次甲基 C-H 变形振动区(methine C-H deformation region),位于此区域的  $1225\text{ cm}^{-1}$  的信号峰表征了  $C_mH_n$  结构的振动,实际上,由于存在较多的振动方式,此区域为一个较为密集的振动带。位于

$600\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  的区域被称为低波数区(low-wave number region),发现激光对与咯环相关的  $671\text{ cm}^{-1}$  和  $752\text{ cm}^{-1}$  两个峰影响特别明显,其中  $752\text{ cm}^{-1}$  的峰表征血红蛋白吡咯环的呼吸振动(breathing),  $671\text{ cm}^{-1}$  表征吡咯环的变形振动(deformation),为了分析  $1064\text{ nm}$  和  $514.5\text{ nm}$  两种波长激光对其的影响,分别在  $1064\text{ nm}$  激光囚禁单个血红细胞的情况下,连续和间断使用  $514.5\text{ nm}$  激光激发拉曼光谱,图 4(a)是光镊束缚下连续采集的血细胞的拉曼光谱图,每次积分时间  $20\text{ s}$ 。图 4(b)是保持血细胞一直被  $1064\text{ nm}$  红外光囚禁,每隔  $1\text{ min}$  使用  $514.5\text{ nm}$  拉曼

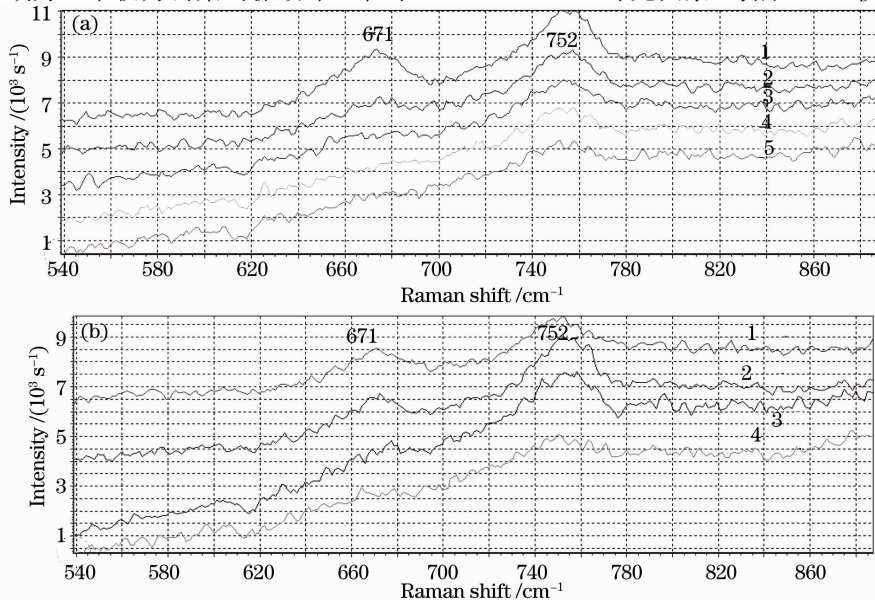


图 4 红外激光和拉曼激发光对血细胞的影响

Fig. 4 Influence of optical tweezers laser and Raman exciting beam



激发光,采集 20 s 拉曼信号。图中谱线从上到下表示采集的先后顺序。

从图 4(a)中可以看到,  $671\text{ cm}^{-1}$  的峰快速下降,在第二次采集时已经变得微弱。 $752\text{ cm}^{-1}$  的峰也在随后的采集过程中变得平坦,但比前者衰减得慢得多。图 4(b)总体效果接近于图 4(a),但其  $1064\text{ nm}$  激光保持一直作用,血细胞始终被束缚在光镊中,每条谱线是在间隔 1 min 后利用  $514.5\text{ nm}$  激发光激发获得。由此可以推断出, $514.5\text{ nm}$  激光虽然光强很弱,但仍然对细胞有着较强的损伤作用。

而  $1064\text{ nm}$  的红外激光尽管较强,但对血细胞的损伤作用十分微小。

### 3.2 啤酒酵母细胞拉曼光谱

将啤酒酵母细胞溶于水溶液中,使用与血细胞相同的拉曼光激发条件,用红外光镊束缚单个活酵母细胞,捕获后提离载玻片上表面约  $5\text{ }\mu\text{m}$  后,用  $514.5\text{ nm}$  激发光照射 20 s,所得到的拉曼光谱如图 5 所示。

经分析指认,其拉曼光谱所对应生物大分子(基团)如表 1 所示<sup>[16~18]</sup>。

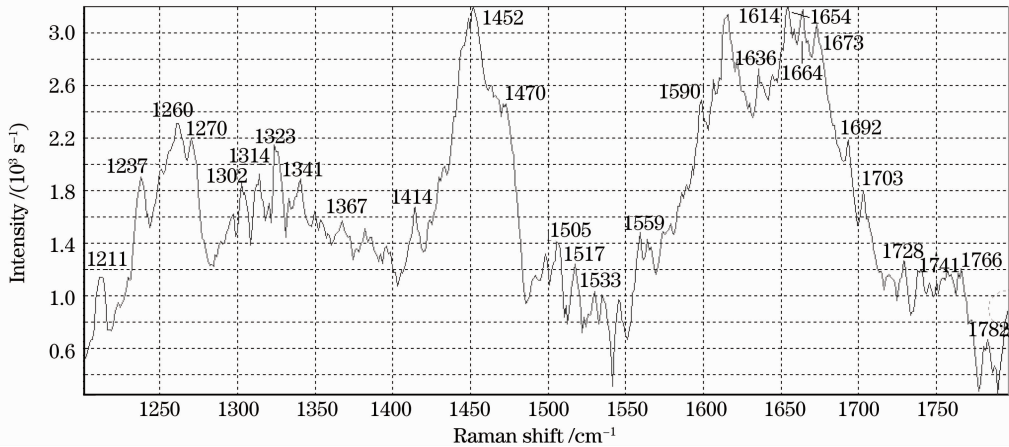


图 5 啤酒酵母拉曼光谱图

Fig. 5 Raman spectra of cerevisiae fermentum

表 1 啤酒酵母拉曼光谱初步指认

Table 1 Peak position and tentative assignment of Raman spectra of cerevisiae fermentum

Peaks for yeast / $\text{cm}^{-1}$		Assigned peaks for the molecules		
This work	Reference	Protein	Lipid	DNA
1211	1209 <sup>[15]</sup>	$\text{C}=\text{C}_5\text{H}_6$ , Phe, Trp		
1237	1237 <sup>[15]</sup>	Amide III		
1260	1258 <sup>[15]</sup>	$\beta$ -sheet, Amide III	$=\text{CH}$ def	
1270	1277 <sup>[15]</sup>	Amide III		
1302	1301 <sup>[15]</sup>		$\text{CH}_2$ twist	
1314, 1323, 1341	1320, 1341 <sup>[15]</sup>	Ring str, twist ( $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$ )		
1367	1367 <sup>[15]</sup>		Sym str $\text{CH}_3$	
1414	1421 <sup>[16]</sup>	$\text{C}-\text{H}$ def		
1452	1455 <sup>[17]</sup>	$\text{CH}_2$ def	$\text{CH}_2$ def	
1470	1465 <sup>[18]</sup>			R
1505	1502 <sup>[18]</sup>			A
1517	1521 <sup>[18]</sup>			A
1533	1533 <sup>[18]</sup>			G, C
1559	1260 <sup>[16]</sup>	Amide II		
1590	1584 <sup>[16]</sup>	Phe, Tyr		
1614	1616 <sup>[18]</sup>	Tyr, Phe, Trp		
1654, 1664	1654 <sup>[17]</sup>	Amide I str $\text{C}=\text{O}$	Str $\text{C}=\text{C}$	
1673	1667 <sup>[18]</sup>	Amide I		T
1741	1742 <sup>[17]</sup>	Str( $\text{C}=\text{O}$ ) in $-\text{CH}_2-\text{COOR}$		

Note: Str indicate stretching vibration, def indicate deformation vibration and R indicate ribodeseose

其中  $1636\text{ cm}^{-1}$  和  $1703\text{ cm}^{-1}$  的信号峰分别表征碳水化合物中 GlcNac 和 GluA,  $1692, 1728, 1766$  和  $1782\text{ cm}^{-1}$  的信号峰有待进一步指认。酵母细胞由于结构比较复杂, 所包含的化学物质和结构繁多, 获得非常锐利的拉曼信号并不容易。从图 5 和表 1 中可以看出, 虽然使用低功率的激发光和非光谱 CCD 即成像 CCD, 依然获得了较为精细的单个活啤酒酵母的拉曼光谱。酵母细胞的主要成分均被测量得到。

### 3.3 单壁碳纳米管拉曼光谱

为了测试系统对固体材料的显微拉曼光谱的测量性能, 还测量和分析了单壁碳纳米管的拉曼光谱。单壁碳纳米管的拉曼光谱有三个主要波段, 在  $1570\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  的切向伸缩模(G-band), 反应了

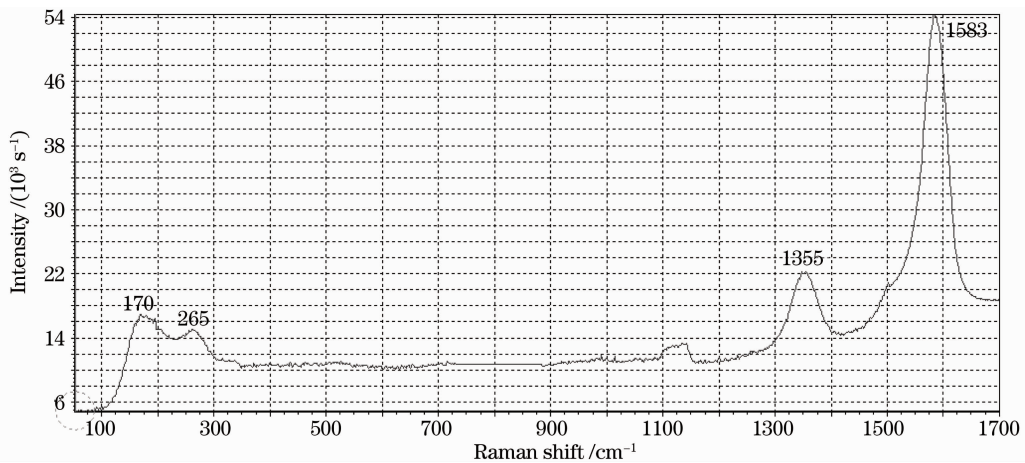


图 6 单壁碳纳米管曼光谱图

Fig. 6 Raman spectra of single wall carbon nanotubes

从图 6 中可以看到, G-band 最强峰位于  $1583\text{ cm}^{-1}$  处, D-band 最强峰位于  $1355\text{ cm}^{-1}$  处, 而 R-band 明显分裂为两个小峰, 分别为  $265\text{ cm}^{-1}$  和  $170\text{ cm}^{-1}$ 。位于  $1100\text{ cm}^{-1}$  的峰值是由于激光器本身噪声所引起。理论分析知单壁碳纳米管的 R-band 频移  $\nu$  与其管径  $d$  成下面关系<sup>[19]</sup>:

$$\nu = 6.5 + 232/d.$$

由此可知被测的单壁碳纳米管的管径主要分布在  $0.90\text{ nm}$  和  $1.42\text{ nm}$  附近。

## 4 结 论

光镊-显微拉曼光谱系统能够在精确操纵被囚禁粒子的情况下, 采集指定微区内的拉曼光谱。在单个悬浮活细胞拉曼光谱测量中有着突出的优势。通过采用对细胞损伤小的红外激光作为光镊光源, 可实现细胞有效定位和消除基底对被测细胞拉曼光

碳纳米管的有序度。位于  $1340\sim 1360\text{ cm}^{-1}$  附近的 D-band, 是碳纳米管管中的缺陷和无序度的反应, 通过这两个波段峰强的比较, 可以定性给出样品中单壁碳纳米管的纯度。位于  $300\text{ cm}^{-1}$  以下的区域称作径向呼吸峰(R-band), 位于此区域的小峰可以反应出单壁碳纳米管的直径<sup>[19]</sup>。

实验中所使用的单壁碳纳米管由北京大学化学学院制备。将碳纳米管溶于适量水中, 用超声振荡  $30\text{ min}$ , 由于碳纳米管呈粉末状, 光镊无法囚禁, 故将其沉积在玻璃基底。使用  $100$  倍油浸物镜(购于 Zeiss 公司,  $NA$  为  $1.3$ ), 拉曼激发光在物镜前的功率约为  $5\text{ mW}$ , 积分时间  $20\text{ s}$ , 得到的拉曼光谱图如图 6 所示。

谱的影响, 使用低功率可见光作为拉曼光谱激发光, 可在减少对活细胞的损伤的同时获得较强的单个活细胞的拉曼光谱信号。实验证明, “光镊-显微拉曼光谱”系统, 不仅能够获得细胞上任意感兴趣区的局部拉曼光谱, 而且能有效提高拉曼信号的强度。

**致谢** 感谢北京大学化学系李彦教授提供的单壁碳纳米管, 北京大学分子医学研究所刘滔博士提供的大白鼠血液样品。

## 参 考 文 献

- 1 K. C. Schuster, E. Urlaub, J. R. Gapes. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture [J]. *J. Microbiological Methods*, 2000, **42**(1): 29~38
- 2 Bayden R. Wood, Don McNaughton. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo[J]. *J. Raman Spectroscopy*, 2002, **33**(7): 517~523
- 3 J. X. Cheng, Y. K. Jia, G. Zheng et al.. Laser-scanning

- coherent anti-stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology [J]. *Biophysical Journal*, 2002, **83**(1): 502~509
- 4 Zhang Guangshui, Chen Changqing, Qi Jian *et al.*. Raman spectroscopic study on EC9706 cells irradiated by X-ray with different dose [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(2): 509~512  
张广水, 陈长青, 齐 健 等. EC9706 细胞经不同剂量 X 射线辐照后的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2009, **36**(2): 509~512
- 5 C. A. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(4): 249~251
- 6 S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin *et al.*. Experimental observation of optically trapped atoms [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1986, **57**(3): 314~317
- 7 A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams [J]. *Nature(London)*, 1987, **330**(6150): 769~771
- 8 A. Ashkin, J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria [J]. *Science*, 1987, **235**(4795): 1517~1520
- 9 C. A. Xie, Y. Q. Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cell using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, **93**(5): 2982~2987
- 10 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
- 11 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Liu Junxian *et al.*. Technique and advance of Raman spectroscopy on functional erythrocyte study [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2008, **17**(6): 845~850  
陈秀丽, 王桂文, 刘军贤 等. 功能红细胞研究的拉曼光谱技术进展[J]. *激光生物学报*, 2008, **17**(6): 845~850
- 12 Qingbao Song, Cheng Wen, Yan Zhang *et al.*. Calibration of optical tweezers based on acousto-optic deflector and field programmable gate array [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(8): 600~602
- 13 Kerstin Ramser, Katarina Logg, Mattias Goksor *et al.*. Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes [J]. *J. Biomedical Optics*, 2004, **9**(3): 593~600
- 14 Kang Lili, Huang Yaoxiong, Luo Man. Technique of confocal Raman microscopy on erythrocytes [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, **28**(10): 2343~2347  
康立丽, 黄耀熊, 罗 曼. 红细胞显微激光共焦拉曼散射光谱扫描技术研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, **28**(10): 2343~2347
- 15 T. K. Bhowmick, G. Pyrgiotakis, K. Finton *et al.*. A study of the effect of JB particles on *sacharomomyces cerevisiae* (yeast) cells by Raman spectroscopy [J]. *J. Raman Spectroscopy*, 2008, **39**(12): 1859~1868
- 16 Athiyathil Sujith, Tamitake Itoh, Hiroko Abe *et al.*. Surface enhanced Raman scattering analyses of individual silver nanoaggregates on living single yeast cell wall [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2008, **92**(10): 103901~103903
- 17 J. W. Chan, D. Motton, J. C. Rutledge *et al.*. Raman spectroscopic analysis of biochemical changes in individual triglyceride-rich lipoproteins in the pre-and postprandial state [J]. *Anal. Chem.*, 2005, **77**(18): 5870~5876
- 18 Xu Yimin. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 125~130  
许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 化学工业出版社, 2005. 125~130
- 19 Laurent Alvarez, Ariete Righi, Tony Guillard *et al.*. Resonant Raman study of the structure and electronic properties of single-wall carbon nanotubes [J]. *Chemical Physics Letters*, 2000, **316**(3): 186~190