

文章编号:1004-4213(2010)05-0907-6

# 喇曼光镊分析血红细胞的携氧能力\*

陈秀丽<sup>1,2</sup>, 刘军贤<sup>2</sup>, 申卫东<sup>3</sup>, 黎永青<sup>4</sup>, 王桂文<sup>1,†</sup>

(1 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530003)

(2 广西师范大学 物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)

(3 南宁中心血站, 南宁 530003)

(4 美国东卡罗莱纳大学 物理系, Greenville, NC 27858-4353, USA)

**摘要:**应用喇曼光镊系统结合气体循环供给装置,收集了不同氧合状态的单个红细胞的喇曼光谱,分析了激光功率对氧合状态分析的影响.选择氧合态和去氧态的对比及区分指标,并运用该指标分析了不同保存时间、不同健康状态红细胞的携氧能力.结果发现:较强功率的激光照射细胞会导致其亚铁血红素凝集特征峰  $1\ 248$ 、 $1\ 371\ \text{cm}^{-1}$  升高; $I_{1\ 638}/I_{1\ 547}$  比值是区分氧合态与去氧态的良好标志;经较长时间保存的红细胞氧合能力增强,但去氧能力没有显著变化;而  $\alpha$ -地中海贫血 HbH-CS 患者的红细胞氧合能力比正常对照的强,但其去氧能力较差.从而表明喇曼光镊可以快速灵敏地分析红细胞的氧合能力,评价其携氧功能.

**关键词:**喇曼光谱;红细胞;携氧能力;单细胞分析

中图分类号:Q632

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20103905.0907

## 0 引言

红细胞的携氧功能主要由胞内的血红蛋白完成,有氧时,血红蛋白血红素 Fe 的第 6 个配位键与氧结合形成氧合血红蛋白,为氧合态;无氧时,该配位键空缺,形成去氧血红蛋白,为去氧态.红细胞的储氧能力是疾病和机理不良的重要指示<sup>[1]</sup>.单个细胞的氧浓度与该细胞的健康或生长发育相关,而且来自单细胞的信息使人们更深入地了解个体差异性.快速检测由外部环境变化,如渗透压、药物处理、氧气或氮气分压等引起的红细胞内血红蛋白分子构象发生变化,有助于深入了解红细胞的携氧功能、红细胞的活性甚至血液疾病.

喇曼光谱是一种反映物质结构的分子振动光谱.血红蛋白和功能红细胞的喇曼研究表明,喇曼光谱技术可用于研究血红蛋白分子的变构效应<sup>[1-8]</sup>.而激光镊子和显微喇曼光谱相结合的喇曼光镊技术,克服了普通的显微喇曼光谱技术存在利用吸附物固定细胞的缺点,并获得信噪比更高的光谱<sup>[9-10]</sup>.该技术可在线分析单个功能细胞,并实时记录由于环境变化引起的细胞构象变化. Ramser 等<sup>[10]</sup>利用光镊喇曼系统与微流控技术相结合,监测单个红细胞的

氧循环过程和光化学反应. De Luca 等<sup>[11]</sup>利用双光镊技术研究  $\beta$ -地中海贫血红细胞抗氧化及形变能力.可见,光镊与喇曼光谱技术结合不仅可以模拟功能红细胞的输氧过程,还有望应用于血液疾病的诊断和病理研究.

因此,本文将喇曼光镊技术与气体控制装置相结合用于收集氧合和去氧红细胞的单细胞喇曼光谱,讨论了激光功率对红细胞的光损伤,通过对比各谱线强度的比值,选择区分氧合态和去氧态的指标,并以该指标分析比较不同保存时间、不同健康个体的红细胞氧合和去氧能力的差异性,以评价其携氧功能.

## 1 材料和方法

### 1.1 血液样品

抽取志愿捐助者的外周血 10 mL,采用 EDTA-K2 抗凝,于 4 °C 保存.血液样品经血常规分析、血红蛋白电泳及基因分析确诊为健康个体或者地中海贫血患者.其中,健康样本由南宁中心血站采集、检测, $\alpha$ -地中海贫血 HbH-CS 样本由中国人民解放军第 303 医院采集、检测.光谱实验时,从样本中取 2  $\mu\text{L}$  用 PBS 缓冲液 (PH=7.4, 28 °C) 稀释至 3 000 倍,取 100  $\mu\text{L}$  置于样品槽.

### 1.2 实验装置

参考文献<sup>[12]</sup>搭建的系统喇曼光镊,见图 1.该系统由二极管激光器(DL)、反射镜(M)、透镜(L)、陷

\*国家自然科学基金(30660063)和广西科学基金(0832022Z)资助

† Tel:0771-2503932

Email:wguiwen@gxas.cn

收稿日期:2009-06-08

修回日期:2009-10-16

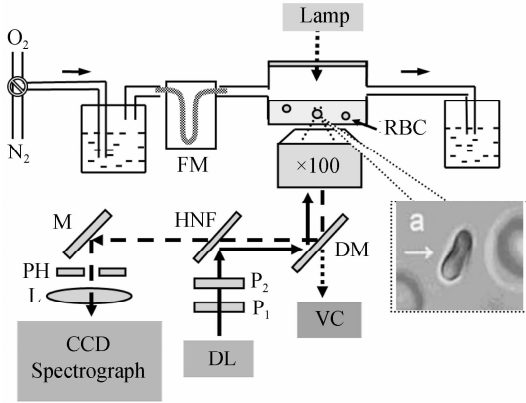


图1 实验装置

Fig. 1 Experimental setup of Raman tweezers combining with gas supplier

波滤波器 (HNF)、双色镜 (DM)、针孔 (PH)、光源 (Lamp)、摄像机 (VC) 和气体流量计 (FM) 等组成. 插图 a 为被光镊俘获的红细胞. 波长为 780 nm 二极管激光经过一系列的反射镜、透镜及干涉陷波滤波片等导入倒置显微镜 (TE2000U, Nikon), 并聚焦进入溶液样品槽, 样品槽底部为 100  $\mu\text{m}$  厚的石英片. 激光俘获并激发单个红细胞, 产生的喇曼散射沿着原光路进入光谱仪 (SpectraPro2300i, Acton). 光谱仪的分辨率为 6  $\text{cm}^{-1}$ , 光栅 600 Lines/mm, 650 nm Blaze, 耦合到电荷耦合器件 CCD (Spec-10, Princeton Instruments) 上, CCD 用液氮冷却到  $-120\text{ }^\circ\text{C}$ . 光谱收集过程, 通过摄像机实时监视囚禁的红细胞.

为实现红细胞的体外氧循环过程的观察, 测量样品槽与气体供给装置联用, 见图 1 上半部分:  $\text{O}_2$  和  $\text{N}_2$  均采用高纯度压缩气体, 通过多道减压阀和气体流量计 (普通玻璃转子流量计, 10~100 mL/min) 严格控制进入样品槽的气流.  $\text{O}_2$  和  $\text{N}_2$  的转换通过一个三通调节阀来实现. 样品槽采用涂抹硅油的盖玻片密封. 为避免干燥的气流带走血液样品的水分, 影响红细胞所处环境的渗透压, 气体先导入湿化瓶, 让气流充分湿润, 而后导入气体流量计. 导出端用水槽承接, 以便观察气密性. 此外, 导气管插入水面的深度 1 cm, 以保证每次实验样品槽内气压一致.

由于激光电流与激光功率之间不是线性关系, 因此通过调节激光电流来改变功率, 不仅难以保证调节的准确度, 还会造成波长严重漂移, 实验系统稳定性差. 为此, 本文在光路中添加了两个偏振片  $\text{P}_1$  和  $\text{P}_2$ , 先调节  $\text{P}_2$  使透光度最大, 保持激光的偏振方向不变; 再调节  $\text{P}_1$  改变激光功率, 从而有效地解决了这一问题.

### 1.3 光谱收集

光镊将红细胞囚禁于石英玻片上方约 8  $\mu\text{m}$  位置, 收集带背景的红细胞喇曼光谱  $S_0(\nu)$ ; 保持参量和光镊高度不变, 收集没有俘获细胞时的背景光谱  $S_1(\nu)$ . 将细胞光谱减去溶液背景光谱, 并经响应函数  $R(\nu)$  校正, 得到实际光谱  $S(\nu) = [S_0(\nu) - S_1(\nu)] * R(\nu)$ .

实验一: 激光功率分别调节为 1.15 mW、1.25 mW、1.54 mW, 光谱收集时间均为 10 s. 分别对同一个红细胞, 每隔 2 min 收集一次光谱, 共收集 44 个细胞光谱, 并收集 5 个溶液背景光谱. 为减少细胞的光损伤, 光谱收集间隙, 激光功率降至零.

实验二: 激光功率为 2.6 mW, 光谱采集时间 10 s. 氧合红细胞光谱的收集: 气体流速为 20 mL/min, 通  $\text{O}_2$  20 min 后开始收集; 去氧红细胞光谱: 给氧合红细胞通  $\text{N}_2$ , 流速 20 mL/min, 30 min 后开始测量. 各收集 200 (或 150) 个红细胞的光谱及 10 个溶液背景光谱.

### 1.4 数据处理

将光谱数据转换为 ASCII 数据后, 进行 5 点平滑去噪. 光谱基线校正通过选择主要信号峰的峰谷 727、1 025、1 192、1 491 和 1 725  $\text{cm}^{-1}$  等位点, 利用最小二乘多项式曲线拟合方法, 在 Matlab7.0 中自编程序实现. 光谱通过聚苯乙烯小球进行强度校正.

## 2 结果与分析

### 2.1 激光强度对氧合过程研究的影响

采用实验一的方法收集喇曼光谱. 图 2 给出了 1.15 mW、1.25 mW、1.54 mW 功率下, 第 0 min (实线) 和第 86 min (虚线) 时的光谱. 对比发现, 1.54 mW 功率下, 红细胞经激光 44 次俘获后, 1 248、1 371  $\text{cm}^{-1}$  的强度明显升高. 1.15 mW、

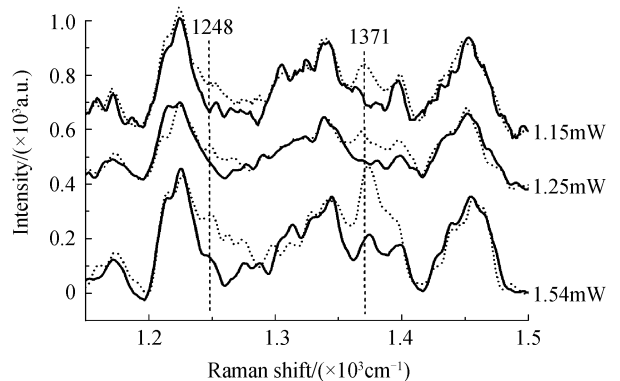


图2 不同激光功率下, 红细胞第1次俘获和经第44次俘获时的喇曼光谱

Fig. 2 Raman spectra of single trapped erythrocytes at 0 min for the first trapping and at 86 min for the 44th trapping under different laser powers

1.25 mW功率下,这两个峰也有一定程度的升高。1 396、1 371、1 248、972 及 662  $\text{cm}^{-1}$  的显著提高是亚铁血红素凝集的标志,意味着血红蛋白发生了变性<sup>[6]</sup>。说明 1.54 mW 的激光强度长时间俘获红细胞对血红蛋白的损伤较大,造成了血红蛋白变性、亚铁血红素凝集。

此外,随着激光功率的增加,将出现光解效应,低自旋的特征峰 1 636、1 562、1 224  $\text{cm}^{-1}$  消失<sup>[11]</sup>,不利于氧合态特征峰的记录。因此,综合考虑光损伤和光谱信噪比,确定长时间的监测同一个细胞采用激光功率 1.25 mW;而实验二中测细胞群体,因每个细胞仅俘获一次,激光功率可提高到 2.6 mW。

## 2.2 氧合与去氧态的喇曼光谱对比

健康个体红细胞在氧合态和去氧态下的平均喇曼光谱及差异光谱见图 3。光谱差异主要表现在次甲基变形振动带(1 200~1 250  $\text{cm}^{-1}$ )、吡咯半环呼吸振动带(1 300~1 500  $\text{cm}^{-1}$ )以及自旋标志谱带(1 500~1 650  $\text{cm}^{-1}$ )。与 Wood 等<sup>[6-7]</sup> 采用 632.8 nm 共振显微喇曼的结果基本吻合。但一些特征谱线的相对强度不同。文献<sup>[6]</sup>中,氧合态喇曼光谱 1 224~1 226、1 245~1 250、1 562~1 565 和 1 636  $\text{cm}^{-1}$  增强;去氧态的增强谱线则出现在 1 210~1 215、1 220~1 230、1 544~1 547、1 580~1 582 和 1 606~1 610  $\text{cm}^{-1}$ 。而图 3 显示,去氧态光谱谱线 1 210~1 215、1 544~1 547  $\text{cm}^{-1}$  增强,但 1 606~1 610、1 220~1 230  $\text{cm}^{-1}$  未发生明显变化;而在氧合态中,1 393~1 400、1 224~1 226、1 562~1 565、1 618~1 622 及 1 636~1 639  $\text{cm}^{-1}$  等增强。与文献<sup>[5]</sup>不同

的是,图 3 中氧合态光谱 1 580~1 582  $\text{cm}^{-1}$  也增强,而且没有出现 1 250~1 245  $\text{cm}^{-1}$  峰。可见,不同的激发波长,喇曼光谱的共振机制不同。

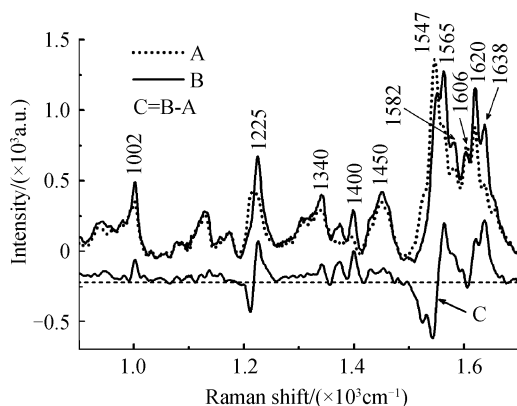
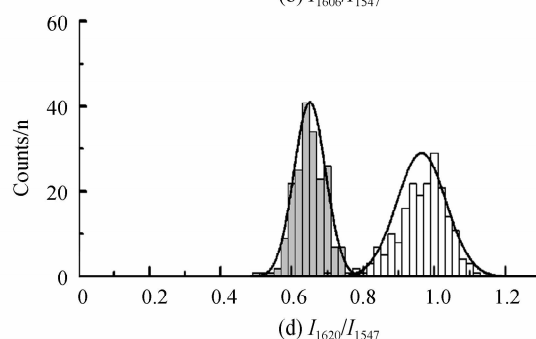
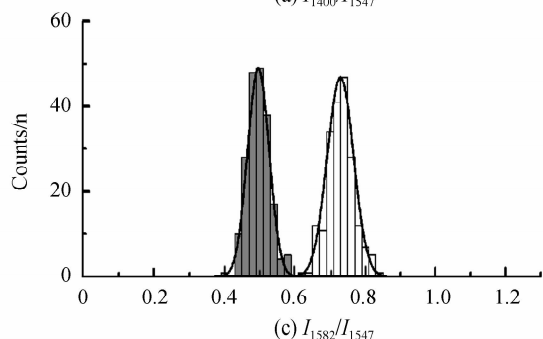
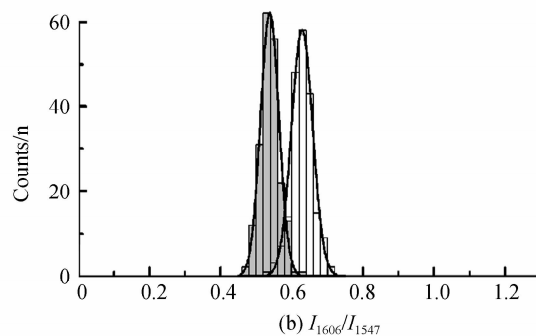
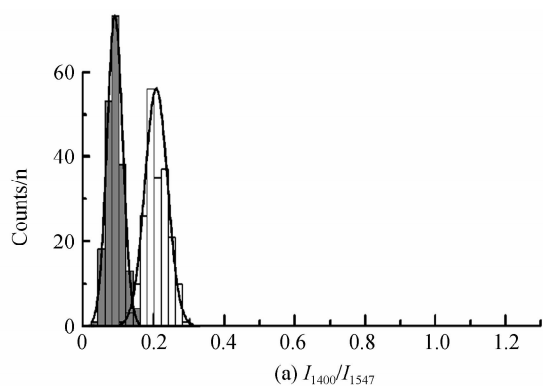


图 3 健康个体红细胞去氧态(A)和氧合态(B)的平均喇曼光谱,C为差异光谱

Fig. 3 Averaged Raman spectra of deoxygenated erythrocyte (A) and oxygenated erythrocyte (B) from normal controls, curve C is the subtraction between B and A

## 2.3 氧合态与去氧态区分指标的选择

为寻求区分红细胞氧合态及去氧态的指标,统计了 200 个氧合态和去氧态红细胞光谱 1 400、1 547、1 565、1 582、1 606、1 620、1 638  $\text{cm}^{-1}$  等谱线的绝对强度,但由于红细胞个体差异、系统噪音、系统强度的不稳定和测量误差等因素的存在,采用任一谱线强度作为指标,均不能很好的把氧合态及去氧态红细胞完全区分开。为此,统计了 1 400、1 582、1 565、1 606、1 620 和 1 638  $\text{cm}^{-1}$  等峰与 1 547  $\text{cm}^{-1}$  的强度比值(见图 4),所有直方分布图基本呈现正态分布, $I_{1400}/I_{1547}$ 、 $I_{1606}/I_{1547}$ 、 $I_{1620}/I_{1547}$  在两个态



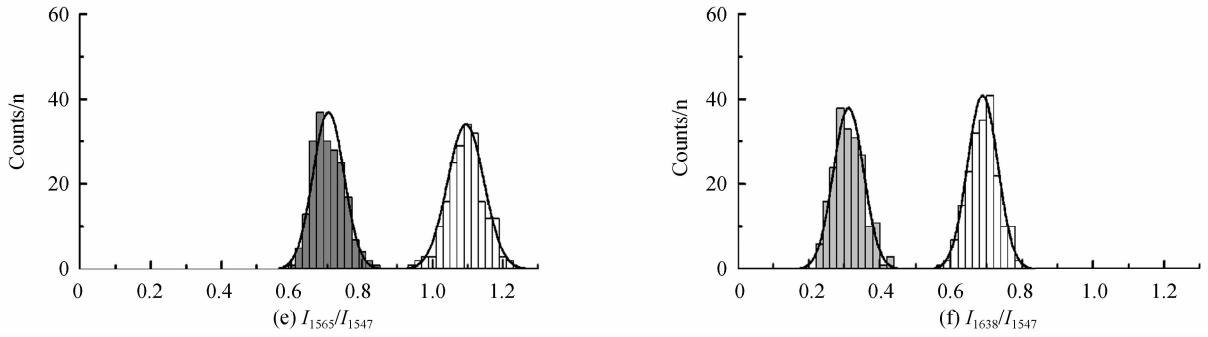


图4 氧合态和去氧态各特征谱线相对强度的直方分布图

Fig. 4 Histogram of intensity ratios of bands 1 400, 1 582, 1 565, 1 606, 1 620 and 1 638  $\text{cm}^{-1}$  to band 1 547  $\text{cm}^{-1}$

中有重叠,而  $I_{1582}/I_{1547}$ 、 $I_{1565}/I_{1547}$ 、 $I_{1638}/I_{1547}$  均能较明显区分地氧合态和去氧态,但以  $I_{1638}/I_{1547}$  的分布比较集中,区分效果最佳. 因此,将  $I_{1638}/I_{1547}$  作为区分红细胞氧合及去氧程度的指标.  $I_{1638}/I_{1547}$  值越大,表明氧合程度越高,氧合能力越强;反之,  $I_{1638}/I_{1547}$  值越小,去氧程度越高,去氧能力越强. 图4各小图中左侧灰色直方图为去氧态,右侧为氧合态.

#### 2.4 气体循环过程红细胞的喇曼光谱变化

采用实验二的方法,收集氧合及去氧态红细胞各150个细胞喇曼光谱. 按收集的先后顺序,以  $I_{1638}/I_{1547}$  为指标,每50个光谱做一个直方分布图,结果见图5. 图5显示随着通  $\text{N}_2$  时间的推移,去氧态的分布图不断左移,且分布图的宽度(即标准偏差,SD)也逐渐变小,表明去氧程度不断提高. 而随着通  $\text{O}_2$  时间推移,分布并没有表现出明显的变化,表明红细胞在通氧20 min后测量,细胞群体基本达到完全氧合态. 此后,随通氧时间的延长,氧合程度基本不变. 这些结果说明:1)红细胞在  $\text{O}_2$  环境中,氧合迅速,容易达到稳定的氧合态;2)去氧态分布存在左移的情况,通  $\text{N}_2$  30 min后,溶液中可能仍然存在着  $\text{O}_2$ ,一些细胞还结合着一定量的  $\text{O}_2$ . 但随着  $\text{N}_2$  的不断通入,  $\text{O}_2$  分压逐渐降低,迫使红细胞释放

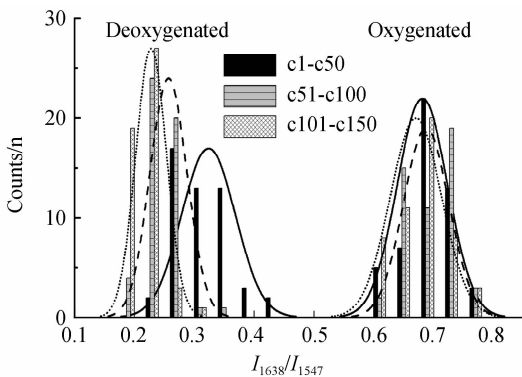


图5 随着光谱收集顺序,每50个红细胞光谱  $I_{1638}/I_{1547}$  的直方分布图

Fig. 5 Histogram of  $I_{1638}/I_{1547}$  of every fifty erythrocytes during the deoxygenated and oxygenated process

$\text{O}_2$ ,而再结合  $\text{O}_2$  的几率又不断下降,因此,去氧程度随之提高,分布图不断左移;3)随着去氧程度的提高,细胞分布图趋于集中,由于  $\text{N}_2$  迫使溶液中  $\text{O}_2$  的减少,更多的红细胞没有机会结合  $\text{O}_2$ . 这些结果表明喇曼系统可以灵敏监测红细胞氧合状态.

#### 2.5 不同血液样品的氧合能力对比

##### 2.5.1 不同保存时间

图6是同一本样本红细胞,置于冰箱中保存2 d、5 d和15 d后,其氧合态及去氧态的各150个细胞  $I_{1638}/I_{1547}$  的直方分布图. 其中去氧态  $I_{1638}/I_{1547}$  的平均值分别为0.269 52、0.228 13、0.215 89;氧合态的分别为0.679 59、0.672 61、0.840 59. 结果显示,不同保存时间红细胞的群体去氧态  $I_{1638}/I_{1547}$  没有显著性差异,而氧合态  $I_{1638}/I_{1547}$  在前5 d保存时间内没有显著性差异,但第15 d后,  $I_{1638}/I_{1547}$  却显著增大,与第一天相比增幅为23.7%. 表明在保存较长时间后,红细胞的群体结合氧的能力增强,但去氧能力没有显著性差异.

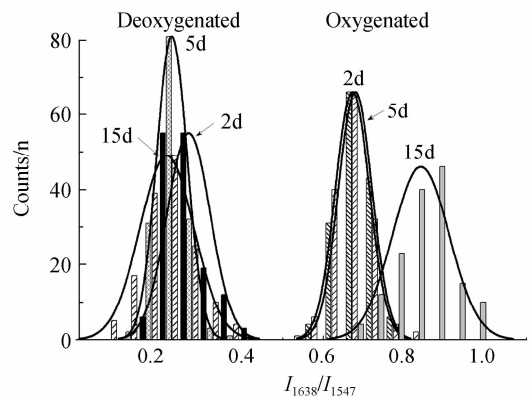


图6 红细胞4 °C保存2 d、5 d和15 d的氧合态及去氧态  $I_{1638}/I_{1547}$  的直方分布

Fig. 6 Histogram of  $I_{1638}/I_{1547}$  of oxygenated erythrocyte and deoxygenated erythrocyte after stored at 4 °C for 2 d, 5 d and 15 d

##### 2.5.2 不同健康个体

地中海贫血是一种由于珠蛋白基因缺失或缺陷使珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血.  $\alpha$ 地中海贫血非缺失型 HbH-CS

由于血红蛋白  $\alpha$  链合成障碍而造成过多的  $\beta$  链形成四聚体 Hb H, 研究表明 HbH-CS 的红细胞对氧的亲和力极高, 没有 Bohr 效应, 不利于氧的运输, 从而导致组织缺氧<sup>[13]</sup>。

本文对比了 HbH-CS 和正常对照红细胞氧合能力, 见图 7. 其中 HbH-CS 的氧合态红细胞的  $I_{1638}/I_{1547}$  平均值为 0.757 66, 大于正常对照 0.679 59, 二者的 SD 值为 0.055. HbH-CS 去氧态红细胞的  $I_{1638}/I_{1547}$  平均值为 0.341 64, 大于正常对照 0.269 52, 二者的 SD 值为 0.051. 表明, HbH-CS 红细胞具有较易结合氧, 但不易去氧的特点, 与文献[13]所述基本一致。

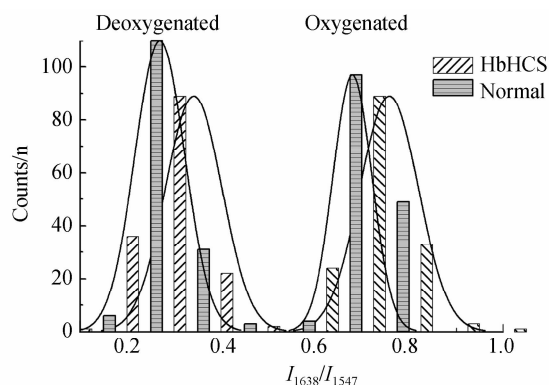


图 7 HbH-CS 和正常对照氧合态及去氧态各 150 个细胞光谱  $I_{1638}/I_{1547}$  的分布

Fig. 7 Histogram of the  $I_{1638}/I_{1547}$  of 150 erythrocytes from normal control and patients with HbH-CS

### 3 讨论

本文在喇曼光镊系统上, 构建了监测红细胞携氧过程的实验装置. 该装置首先严格控制气压. 血红蛋白的氧解离曲线表明<sup>[13]</sup>, 不同的氧气分压下, 红细胞的氧饱和度不同. 在人体内, 当  $O_2$  压强为 8~13.3 kPa 时, Hb 与  $O_2$  结合. 考虑到模拟环境与人体内环境仍有一定差异, 同时为了使红细胞达到完全氧合和去氧, 本实验将气压略高于大气压强. 其次, 需严格控制激光功率. 从图 2 可见, 强激光功率下多次俘获同一细胞会导致其喇曼谱线 1 248、1 371  $cm^{-1}$  的强度显著提高, 表明血红蛋白部分变性. 此外, 不同的激光功率 (1.25 和 2.6 mW) 下, 收集同一血样红细胞去氧态光谱各 100 个, 作出  $I_{1638}/I_{1547}$  的分布图显示, 功率越高, 其  $I_{1638}/I_{1547}$  越小, 表明功率越高, 去氧态特征峰的相对强度越大. 说明比较不同人红细胞氧合及去氧能力, 必须要保持激光功率一致. 可见通过严格控制气压和激光功率, 可保证实时持续地监测活红细胞在氧循环过程中发生的变化。

在严格控制的实验条件下收集喇曼光谱, 以

$I_{1638}/I_{1547}$  为指标, 分析了红细胞群体的携氧能力, 初步显示了该实验系统能在单细胞水平上快速灵敏地监测红细胞携氧能力. 首先, 比较分析不同保存时间血样的氧合及去氧能力, 发现血样在保存时间不长 (约一周) 的情况下, 红细胞的氧合能力没有显著变化, 但保存时间较长 (约两周), 其氧合能力明显提高, 说明胞内 Hb 对  $O_2$  的亲和力增加. 但细胞去氧能力的没有发生显著差异. 血液在保存过程中, 由于红细胞本身的代谢需要, 红细胞中的 ATP 和 2,3-二磷酸甘油酸 (2,3-diphosphoglycerate, DPG) 会逐渐下降. 研究发现<sup>[14]</sup>, 当 ATP 的浓度低于 1.5 mol/g Hb 时, 红细胞的存活率就会下降. 而 2,3-DPG 浓度下降, Hb 对  $O_2$  的亲和力增加, 氧解离曲线左移, 去氧能力下降. 但本实验中发现红细胞的群体去氧能力没有下降, 与前人的分析结果有所不同, 原因有待进一步探究. 红细胞氧合能力的差异与它的存活率有一定关系<sup>[14]</sup>, 若能检测细胞中 ATP、2,3-DPG 的浓度和细胞的携氧能力的关系, 则有望利用喇曼光镊技术对细胞活性做深入的研究, 应用于检测库存血的活性. 但对比地中海贫血 HbH-CS 患者和正常对照红细胞的携氧能力的差异性, 发现地中海贫血 HbH-CS 患者红细胞表现出强氧合弱去氧能力的特点, 与临床症状相吻合. 而且, 从单细胞动态氧合过程的记录结果 (另文发表) 也表现出这一特点. 表明喇曼光镊技术有望通过检测红细胞的携氧能力来深入了解血液疾病, 从而为疾病诊断提供新思路。

### 4 结论

应用光镊喇曼光谱技术与气体控制装置, 实现在单细胞水平上实时监测红细胞的携氧能力. 给出在 780 nm 的喇曼光镊系统下研究红细胞携氧能力的激光功率, 并提出  $I_{1638}/I_{1547}$  比值是区分红细胞氧合态与去氧态的标志. 以这一指标分析了不同保存时间、不同健康状态个体红细胞携氧能力的差异性. 为检测库存血存活率, 了解年龄与血液携氧能力的关系, 血液疾病的机能与诊断提供了有益探索。

**致谢:**感谢解放军第 303 医院尹晓林博士提供地中海贫血血液样本。

#### 参考文献

- [1] WOOD B R, HAMMER L, DAVIS L, *et al.* Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes[J]. *J Biomed Opt*, 2005, **10**(1):014005.
- [2] SPIRO T G, STREAKAS T C. Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state[J]. *J Am Chem Soc*, 1974, **96**(2):338-345.
- [3] ZHAO X, SPIRO T G. Ultraviolet resonance Raman Spectroscopy of hemoglobin with 200 and 212 nm excitation: H-bonds of tyrosines and pralines[J]. *J Raman Spectrosc*,

- 1998, **29**(1):49-55.
- [4] WOOD B R, HAMMER L, DAVIS L I, *et al.* Raman microspectroscopy and Imaging reveals insights into hemoglobin denaturation and aggregation within human erythrocytes[J]. *J Biomed Opt*, 2005, **10**(1):14005.
- [5] BALAKRISHNAN G, IBRAHIM M, MAK P J, *et al.* Linking conformation change to hemoglobin activation via chain-selective time-resolved resonance Raman spectroscopy of protoheme/meso-heme hybrids[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2009, **14**(5):741-50.
- [6] BALAKRISHNAN G, ZHAO X, PODSTAWSKA E, *et al.* Subunit-selective interrogation of CO recombination in carbonmonoxy hemoglobin by isotope-edited time-resolved resonance Raman spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2009, **48**(14):3120-3126.
- [7] WOOD B R, CASPERS P, PUPPELS G J, *et al.* Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**(5):1691-1703.
- [8] RAO S, BALINT S, COSSINS B, *et al.* Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers[J]. *Biophys J*, 2008, **96**(1):209-216.
- [9] RAMSER K, BJERNELD E J, FANT C, *et al.* Raman imaging and spectroscopy of single functional erythrocytes; a feasibility study[C]. *SPIE*, 2002, **4614**:20-27.
- [10] RAMSER K, LOGG K, ENGER J, *et al.* Resonance Raman study of the oxygenation cycle of optically trapped single red blood cells in a microfluidic system[C]. *SPIE*, 2004, **5514**:560-568.
- [11] de LUCA A C, RUSCIANO G, CIANCIA R, *et al.* Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman Tweezers [J]. *Opt Express*, 2008, **16**(11):7943-7957.
- [12] XIE C A, DINNO M A, LI Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Opt Lett*, 2002, **27**(4):249-251.
- [13] ZHANG Jun-wu, LONG Gui-fang. Hemoglobin & hemoglobinopathies [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing, House, 2003.  
张俊武, 龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2003.
- [14] ALMAC E, INCE C. The impact of storage on red cell function in blood transfusion[J]. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 2007, **21**(2):195-208

## Probing into the Oxygen Carrying Capacity of Red Blood Cells Using Raman Tweezers

CHEN Xiu-li<sup>1,2</sup>, LIU Jun-xian<sup>2</sup>, SHEN Wei-dong<sup>3</sup>, LI Yong-qing<sup>4</sup>, WANG Gui-wen<sup>1</sup>

(1 Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

(2 College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

(3 Nanning Central Blood Bank, Nanning 530003, China)

(4 Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858-4353, USA)

**Abstract:** Raman tweezers is used to probe the oxygen carrying capacity of erythrocytes. The effects of laser power on erythrocytes are compared. An indicator for distinguishing oxygenated and deoxygenated erythrocytes is chosen and utilized to analyze the oxygen carrying capacity of erythrocytes from different storage time and different health state. The result shows that strong power of laser led to the bands at 1 248, 1 371  $\text{cm}^{-1}$ , the markers of heme aggregation, increasing. The ratio  $I_{1\ 638}/I_{1\ 547}$ , a well indicator for distinguishing oxygenated state from deoxygenated state, reveals that the oxygen binding capacity of preserved erythrocytes increase as storage time extending, while the deoxidization capacity is not change significantly. Erythrocytes from HbH-CS, an alpha-thalassemia disease, are easier to oxygenate than normal controls, but difficult to deoxygenate. The findings demonstrate Raman tweezers can be a rapid, non-invasive, sensitive technique for analyzing and evaluating the oxygen carrying capacity of erythrocytes.

**Key words:** Raman spectroscopy; Erythrocyte; Oxygen carrying capacity; Single-cell analysis



**CHEN Xiu-li** born in 1983. She is pursuing the M. S. degree, and her research interests focus on the biomedical application of molecular vibration spectroscopy.