

doi: 10.3788/gzxb20144306.0630005

## 乙醇胁迫酵母凋亡过程的单细胞喇曼光谱

王巧贞<sup>1,2</sup>, 卢明倩<sup>1</sup>, 李冰<sup>1,2</sup>, 廖威<sup>3</sup>, 石贵玉<sup>2</sup>, 黄庶识<sup>1,2</sup>

(1 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530007)

(2 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

(3 广西职业技术学院, 南宁 530226)

**摘 要:**在群体细胞水平和单个酵母细胞水平上,应用光镊喇曼光谱技术对高浓度乙醇胁迫过程中细胞内生物大分子物质的动态变化进行实时监测.基于两种水平上的研究结果显示:在高浓度乙醇胁迫下,归属于核酸的喇曼峰( $721, 1\ 083, 1\ 301\ \text{cm}^{-1}$ )、归属于蛋白质的喇曼峰( $721, 858, 1\ 001, 1\ 301, 1\ 445, 1\ 608, 1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ )和归属于脂类( $1\ 083, 1\ 301, 1\ 445\ \text{cm}^{-1}$ )喇曼峰的峰强度都随处理时间的延长而显著降低,说明了高浓度乙醇诱导酵母凋亡过程中核酸、蛋白质、脂类等物质的含量是逐渐降低的.结合单因素分析法与重复测量分析法发现,群体细胞与单个细胞光谱的变化有明显差异性,反映基于群体细胞的研究,个体细胞的信息被平均光谱信息所掩盖,无法体现个体间所存在的差异.应用激光镊子喇曼光谱技术基于单个细胞水平上的研究能更直接、真实地反映高浓度乙醇胁迫下细胞内生物大分子变化的动态信息.

**关键词:**光谱学;喇曼光谱;酵母;乙醇胁迫;凋亡;单细胞分析;激光光镊

中图分类号:O657.37

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2014)06-0630005-9

## Apoptosis Process under High Concentrations of Ethanol Stress at a Single Cell Level with Raman Spectroscopy

WANG Qiao-zhen<sup>1,2</sup>, LU Ming-qian<sup>1</sup>, LI Bing<sup>1,2</sup>, LIAO Wei<sup>3</sup>, SHI Gui-yu<sup>2</sup>, HUANG Shu-shi<sup>1,2</sup>

(1 *Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China*)

(2 *College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China*)

(3 *Guangxi vocational and technical college, Nanning 530226, China*)

**Abstract:** At group cells level and a single yeast level, laser tweezers Raman spectroscopy was used to monitor the dynamic of the intracellular biological macromolecular in real-time during the apoptosis process of yeast cells stressed with high concentrations of ethanol. The results show that the intensities of Raman peaks of nucleic acids ( $721, 1\ 083, 1\ 301\ \text{cm}^{-1}$ ), proteins ( $721, 858, 1\ 001, 1\ 301, 1\ 445, 1\ 608, 1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ ) and lipids ( $1\ 083, 1\ 301, 1\ 445\ \text{cm}^{-1}$ ) decreased significantly along with the extension of treatment time, indicates that the contents of nucleic acids, proteins and lipids are reduced gradually while the yeast cells are undergoing apoptosis induced by high concentrations of ethanol. However, the results of single factor analysis and repeated measures analysis show that the changes of the intensities of Raman peaks between the group cells and the single cells are difference significantly, implies that the heterogeneities of the single cells are covered by the average spectroscopy of the population cells. The results display that laser tweezer Raman spectroscopy can be used to directly and truthfully detect the kinetic apoptosis process under high concentrations of ethanol stress at the single cell level and probe cellular heterogeneity.

**Key words:** Spectroscopy; Raman spectrum; Yeast; Ethanol stress; Apoptosis; Single-cell analysis; Laser tweezer

**OCIS Codes:** 300.6360; 350.4855; 170.5660; 170.1530

基金项目:国家自然科学基金(No. 31160018)资助

第一作者:王巧贞(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向为微生物与分子光谱. Email:wqzh-333@163.com

导师(通讯作者):黄庶识(1964-),男,研究员,硕士,主要研究方向为微生物与分子光谱. Email:hshushi@gxas.cn

收稿日期:2013-09-24;录用日期:2013-11-28

<http://www.photon.ac.cn>

## 0 引言

乙醇是一种极为重要的发酵产物,在人类生活中被应用于许多方面,包括用作燃料、医疗消毒灭菌及各种酒精饮料等.工业上主要通过酵母发酵生产乙醇,但发酵过程中,浓度不断增加的乙醇会对酵母细胞生长造成胁迫.在相对低的乙醇浓度下,酵母细胞分裂受到一定的抑制,细胞的生长受到影响,细胞体积减小及生长率显著降低;在高浓度乙醇条件下,酵母的生存能力明显减弱,死亡率增加<sup>[1]</sup>.乙醇的胁迫导致酵母细胞线粒体 DNA 损伤<sup>[2]</sup>,蛋白质变性和相关酶活性降低或者失活,如使己糖激酶<sup>[3]</sup>、脱氢酶的钝化<sup>[4]</sup>,以及诱导膜流动性改变<sup>[5]</sup>;乙醇通过减少热休克类蛋白质的生成量影响细胞的新陈代谢和生物大分子的合成,同时 RNA 和蛋白质的累积率下降,矮小突变频率增强,新陈代谢改变<sup>[6]</sup>.研究表明:乙醇胁迫酵母细胞的主要靶位是细胞质膜,在受乙醇胁迫过程中细胞膜的流动性发生改变,这种改变导致膜对离子的通透性改变,尤其是对质子的通透性<sup>[7]</sup>,透过细胞膜质子流的增加导致膜间电学梯度的快速耗损从而导致细胞内酸化.应对乙醇胁迫,酵母细胞发展了一套胁迫应答(短时)与适应机理(长期响应)来应对乙醇的毒害作用,如在乙醇胁迫中合成热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSPs)<sup>[8]</sup>,使膜及蛋白质稳定,同时抑制蛋白质凝集<sup>[9]</sup>. Hiroshi Kitagaki 等<sup>[10]</sup>报道了高浓度乙醇(21%及 23%)诱导的酵母细胞死亡具有细胞凋亡的特征,包括染色质固缩及片段化, DNA 裂解,需求蛋白质从头合成,在乙醇诱导过程中是由线粒体的裂变途径来介导酵母细胞的凋亡.

目前对于乙醇胁迫酵母细胞内生理变化的研究是基于群体细胞水平上的,在乙醇胁迫过程中个体细胞的生理生化变化具有其独特性的特征,基于群体细胞水平上的研究是平均后得到的结果,单个细胞所表现出的差异性特征被群体信息所掩盖,往往不能真实地反映出其个体性的特征.激光镊子喇曼光谱(Laser Tweezers Raman Spectroscopy, LTRS)可以研究溶液中单个活细胞生化性质、化学组成及生命周期变化<sup>[11-13]</sup>,能够实现乙醇胁迫下对单个酵母细胞生理生化变化过程的实时监测.

本文应用 LTRS 对单个酵母细胞在高浓度乙醇胁迫过程进行实时光谱记录,获得乙醇诱导单个酵母细胞发生凋亡的过程中细胞内核酸、蛋白质、脂类等物质含量变化的实时信息,并采用重复测量方差分析方法,研究单个酵母细胞在乙醇诱导凋亡的过程中细胞内含物质含量变化的规律.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株培养与收集

菌种为购自安琪酵母股份有限公司的安琪酿酒高

活性干酵母.所用培养基为 YPD 培养基:1% 酵母提取物、2% 葡萄糖、2% 蛋白胨.取少量安琪酿酒高活性干酵母于 YPD 液体培养基中,29 ℃,150 rpm 培养过夜,活化菌株.将酵母培养液稀释至一定浓度,取 100  $\mu$ L 稀释液涂板,30 ℃ 恒温培养箱中培养 36 h.挑取单菌落于新鲜的 YPD 液体培养基中培养过夜,按 1% 的接种量接种于新鲜的 YPD 液体培养基中,29 ℃、150 rpm 培养 7 天.离心收集培养完成酵母细胞.并用 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液洗涤三次,再用一定量的 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液悬浮,4 ℃ 保存备用.

### 1.2 酵母同步细胞分离

酵母同步细胞分离介质的配制:应用 Percoll 连续密度梯度分离法分离酵母同步细胞,参照 Allen 等<sup>[14]</sup>和赖钧灼等<sup>[15]</sup>的改良 Percoll 连续密度梯度分离方法进行分离.同步细胞用 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液悬浮,4 ℃ 保存备用.

### 1.3 乙醇胁迫酵母细胞

#### 1.3.1 不同浓度乙醇处理酵母细胞

分别取 0.5 mL 酵母同步细胞悬浮液与等体积乙醇均匀混合,注入 1.5 mL 离心管中,在乙醇终浓度分别为 0.5%、10%、15%、19%、20%、22%、23%、24% 的条件下处理酵母细胞,离心管于 30 ℃ 水浴锅中处理 4 h,每隔一段时间摇晃离心管一次,保证酵母细胞悬浮于处理液中.随后离心收集酵母细胞,分别用 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液洗涤三次,保留沉淀用 0.5 mL 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液悬浮细胞.将酵母悬浮液稀释为每毫升  $10^4$  细胞,分别取 100  $\mu$ L 菌液涂布于 YPD 固体培养基中,每种处理做三个涂板重复,29 ℃ 培养两三天,使平板上不再长出新菌落为止,分别统计菌落数,计算存活率,确定致死乙醇浓度.

#### 1.3.2 致死浓度下乙醇处理酵母细胞

分别取 0.5 mL 酵母同步细胞悬浮液与乙醇等体积混合,注入 10 个 1.5 mL 离心管中,使乙醇终浓度为 20%,混合均匀,于 30 ℃ 水浴处理,每隔一段时间摇晃离心管一次,保证酵母细胞悬浮于处理液中.分别在乙醇处理 0、0.5、1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 时取出离心管,离心收集酵母细胞,50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液洗涤三次,最后用 0.5 mL 50 mM pH 7.5 的 Tris 缓冲液悬浮酵母细胞.余下步骤同 1.2.1,计算存活率.余下酵母细胞于 4 ℃ 保存,用于细胞凋亡检测.

### 1.4 酵母细胞凋亡检测

#### 1.4.1 4, 6-二氨基-2-苯基吡啶(4, 6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色

将 DAPI 染液用甲醇稀释 10 倍,制备成 1-2  $\mu$ g/mL 的 DAPI 工作液,按 DAPI 试剂盒说明进行染色操作,最后用 Buffer A 重悬细胞.荧光显微镜以 340/

380 nm紫外光激发,镜检、拍照。

#### 1.4.2 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)透膜率

收集经致死浓度下乙醇处理过的细胞,按照 PI 试剂盒说明对经处理后的细胞进行 PI 染色检测。荧光显微镜,氩离子激光激发荧光,激发和发射波长分别为 536 nm 和 617 nm,绿光 \* BG12 滤光镜观察,拍照、计数,整理数据作 PI 透膜率图。

### 1.5 酵母细胞光谱收集及处理

#### 1.5.1 致死浓度下乙醇处理酵母细胞的群体喇曼光谱测定

分别取 20%乙醇处理不同时间的酵母细胞悬浮液置于样品池内,设定激光强度为 16.8 mW,激发波长为 778.42 nm,积分 20 s,100×油镜下,光镊子随机捕获酵母细胞记录其光谱,共测定 30 个细胞。

#### 1.5.2 致死浓度下乙醇处理单个酵母细胞的喇曼光谱测定

将酵母细胞悬浮液与 40%乙醇等体积混合,混匀后取 300  $\mu$ L 混合悬浮液置于样品池中,盖上盖玻片,用于 20%乙醇胁迫下单个酵母细胞的喇曼光谱实时测定。设定激光强度为 3.5 mW,激发波长为 778.42 nm,积分 60 s,100×油镜下,光镊子捕获单个酵母细胞,于 0,30,60,90,120,150,180,210 和 240 min 时间点分别记录光谱,连续测定 4 h,重复测定 10 个细胞。以蒸馏水为对照,对照组按同样方法重复测定 10 个细胞。

#### 1.5.3 光谱数据处理

光谱数据用自编软件进行去背景平滑,导入 Origin8.1 软件处理后,应用 Raman Baseline 软件进行基线校正,应用 Origin8.1 软件截取 600~1 800  $\text{cm}^{-1}$  信号峰集中的指纹区作图分析。同时应用单因素方差分析方法及重复测量方差分析方法分析群体细胞和单个细胞在乙酸胁迫过程中各个喇曼峰强度变化的差异性, $P < 0.05$  视为显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醇胁迫酵母细胞后存活率

图 1 是酵母细胞经乙醇胁迫,涂板计算存活率曲线图。不同浓度的乙醇处理酵母 4 h 之后,酵母细胞的存活率随乙醇浓度的不断增加而不断降低,当乙醇浓度达到 20%时,酵母细胞的存活率接近于 0,由图 1(a)可知 20%是酵母细胞的致死浓度,说明酵母存活率与乙醇浓度存在依赖关系。分别用 20%乙醇处理酵母细胞 0、0.5、1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 之后,酵母细胞的存活率随处理时间的延长而逐渐降低,见图 1(b)。当处理时间达到 5 h 时,酵母细胞的存活率接近于 0,说明酵母存活率不仅与乙醇浓度存在依赖关系,还与处理时间存在依赖关系。

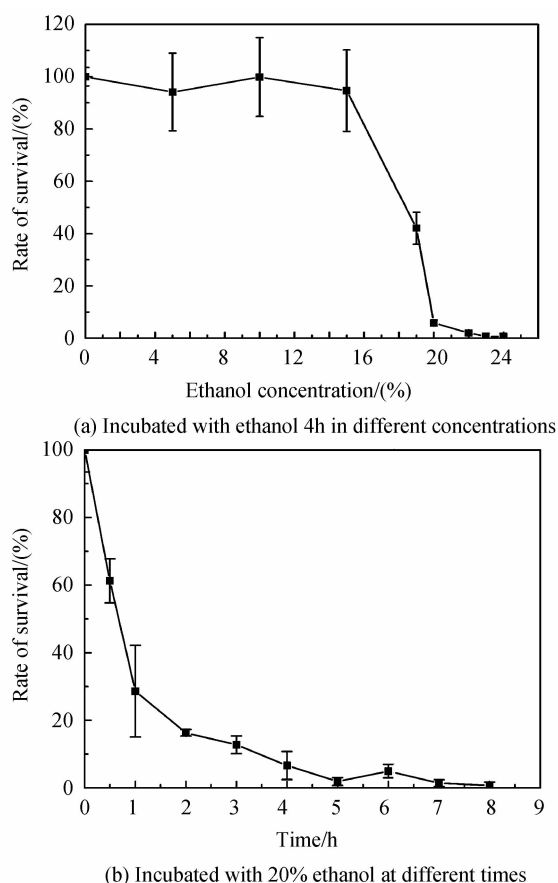


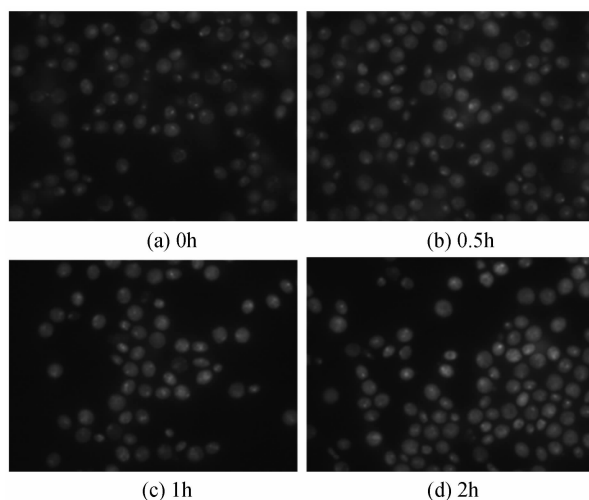
图 1 乙醇胁迫酵母存活率

Fig. 1 Survival rate of yeast after ethanol stress

### 2.2 酵母细胞凋亡检测

DAPI 染料对细胞膜有半通透性,可透过正常活细胞与 DNA 产生非嵌入式结合,发出蓝色荧光。凋亡细胞的膜通透性增加,对其摄取能力增强,产生很强蓝光染色。可从荧光强度及核形态变化鉴别出细胞发生凋亡的典型特征。

由图 2 可知,未经 20%乙醇处理的酵母细胞经 DAPI 染色后,酵母细胞发出较弱的蓝色荧光,且染色均匀,核完整,说明大部分细胞为正常的活细胞。酵母



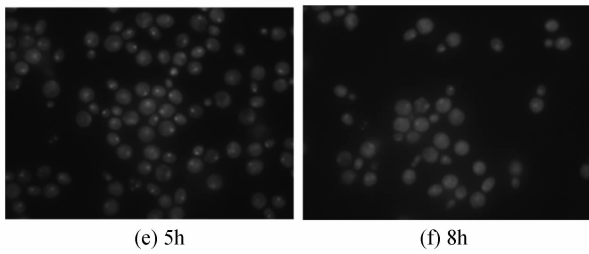


图 2 20%乙醇处理后酵母细胞经 DAPI 染色的荧光图  
Fig. 2 Photofluorograms of yeast cells dyed with DAPI after incubated with 20% ethanol

细胞经 20%乙醇处理后,细胞发出的蓝色荧光强度随着处理时间的延长而逐渐增强,说明随着处理时间的延长,细胞膜对 DAPI 染料的通透性增强,细胞对该染料的摄取量逐渐增加,染色逐渐加重.当处理时间为 2 h 时,大部分酵母细胞发出较强的蓝色荧光,说明此时大部分的酵母细胞已处于凋亡阶段,细胞对 DAPI 染料具有强的通透性,细胞表现出凋亡的典型特征,即细胞核固缩,着色较重,并可见细胞核边缘不规则,核碎片化.

荧光染料碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,嵌入双链 DNA 后释放红色荧光. PI 染料不能进入细胞膜完整的正常细胞和凋亡细胞中,而坏死细胞由于膜完整性破损,PI 染料染色可透过膜进入细胞内,对 DNA 染色.

用不同时间对在 20%乙醇胁迫下处理酵母,并对处理过的酵母细胞进行 PI 染色,获得的不同处理条件下酵母细胞的 PI 透膜率变化图.图 3 表明,随着 20%乙醇处理的时间延长 PI 透膜率逐渐升高,当处理时间为 6 h 时,PI 的透膜率接近于 20%,当处理时间为 8 h 时 PI 的透膜率接近于 40%.说明在 20%乙醇的胁迫下,坏死的酵母细胞随处理时间的延长而逐渐增多.

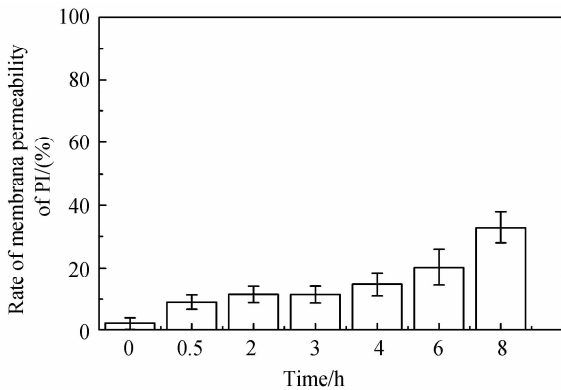


图 3 20%乙醇处理酵母不同时间的 PI 透膜率图  
Fig. 3 Transmission rate of PI after yeast cells are incubated with 20% ethanol at different times

### 2.3 高浓度乙醇处理酵母细胞群体喇曼光谱

群体酵母细胞的平均喇曼光谱随 20%乙醇处理的时间延长而发生规律性的变化,如图 4,各喇曼特征

峰的归属见表 1<sup>[16-17]</sup>.结果显示,随着乙醇处理时间的延长酵母细胞的喇曼光谱强度在逐渐降低,图 4 中所标记的特征峰的强度可以反应出细胞内生物大分子物质,如核酸、蛋白质、脂类的含量的多少.与核酸相关的谱峰,包括归属于核酸中腺嘌呤的 721  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于腺嘌呤、胞嘧啶的 1 301  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于核酸 O=P-O 伸缩振动的 1 083  $\text{cm}^{-1}$ ,其强度随着乙醇处理时间的延长而呈下降趋势;与蛋白质相关的谱峰,包括归属于蛋白质中 C-S 的反式构象的 721  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于酪氨酸的对羟基苯环呼吸振动的 858  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于 CH<sub>2</sub> 弯曲振动的 1 445  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于酪氨酸和苯丙氨酸的 1 608  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于酰胺 I  $\alpha$ -螺旋的 1 657  $\text{cm}^{-1}$ ,其强度随着乙醇处理时间的延长而呈不同程度的降低,但是归属于苯丙氨酸的 1 001  $\text{cm}^{-1}$  峰强度变化不明显;与脂类相关的谱峰,包括归属于 C-C 扭曲旋转的 1 083  $\text{cm}^{-1}$ ,归属于 CH<sub>2</sub> 扭曲 1 301  $\text{cm}^{-1}$  和 1 445  $\text{cm}^{-1}$ ,

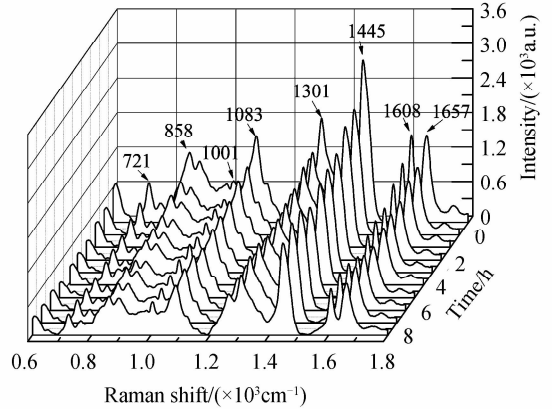


图 4 20%乙醇处理群体酵母细胞不同时间后平均喇曼光谱图,积分 20 s

Fig. 4 Averaged Raman spectrums of group cells after incubated with 20% ethanol at different times, integration time is 20 s

表 1 酵母细胞喇曼谱峰归属表

Raman bands/ $\text{cm}^{-1}$	Assignments
721	Adenine(DNA); anti conformation of C—S (protein)
858	Tyr (protein)
1 001	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine (protein)
1 083	O=P-O symmetrical stretch (nucleic acid); C—C twisting(lipid)
1 301	Adenine, cytosine (nucleic acid); CH <sub>2</sub> twisting (lipid)
14 45	CH <sub>2</sub> bending mode (protein & lipid)
1 608	Tyr, Phe(protein)
1 657	Amide I ; $\alpha$ -helix(protein)

强度也随着乙醇处理时间呈现不同程度的下降.结果显示,在乙醇诱导酵母细胞凋亡的过程中,细胞内的核酸、蛋白质、脂类物质的含量随着乙醇处理时间延长呈下降趋势,表明凋亡的酵母细胞中这些生物大分子的含量降低与乙醇处理时间呈现一定的相关性.

应用单因素方差分析方法对分别归属于核酸、蛋白质、脂类的8个喇曼谱峰进行两两比较分析,结果显

示见图5.由图5可知,这8个谱峰的峰强随乙醇处理时间延长的变化规律有所差异.858,1 083,1 657  $\text{cm}^{-1}$ 峰在乙醇处理0.5 h后与对照相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),而721,1 308,1 445,1 608  $\text{cm}^{-1}$ 峰在乙醇处理1 h后才与对照相比有显著性差异,1 001  $\text{cm}^{-1}$ 峰在6 h前峰强变化不规律,而6 h后,其强度变化表现出规律性,并与对照组的差异性显著.

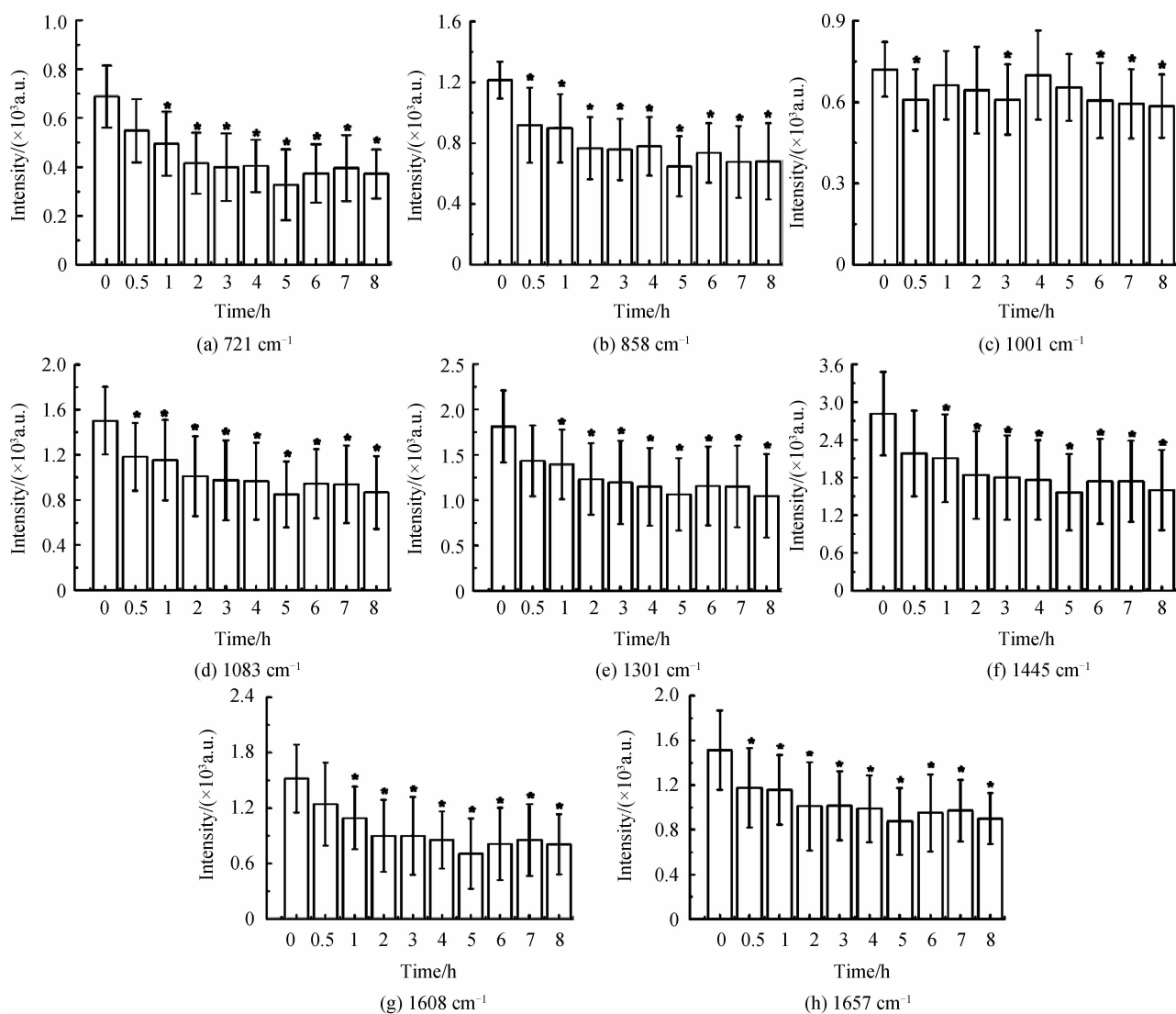


图5 20%乙醇处理群体酵母细胞其8个喇曼峰强度随处理时间变化

Fig.5 Tendency chart of 8 Raman peaks of group yeast cells that under 20% ethanol stress

## 2.4 高浓度乙醇处理单个酵母细胞过程的喇曼光谱研究

单个酵母细胞在20%乙醇胁迫下,在0、30、60、90、120、150、180、210和240 min时间点上的光谱强度随处理时间的变化呈现出逐渐下降的趋势(激光强度3.5 mW,积分60 s),结果见图6,与基于群体细胞水平上喇曼光谱测定的结果类似.

应用SPSS软件对记录的光谱数据进行重复测量方差分析,见表2.结果显示,721,1 083,1 301,1 445,1 608和1 657  $\text{cm}^{-1}$ 峰在组内效应(Within-Subjects

Effects)的时间检验方法中 $p$ 值均小于0.05,表明在组内因素,即在同一处理方法条件下不同时间点上721、858,1 083,1 301,1 445,1 608和1 657  $\text{cm}^{-1}$ 峰的强度差异都具有统计学意义,亦即在不同时间点上这7个喇曼峰强度变化与对照组的不同,且这7个特征峰在因素Time与Group的交互效应检验中 $p$ 值均小于0.05,表明处理条件与时间有交互作用,即不同的处理条件时间趋势不同,说明在20%乙醇处理的条件下这7个喇曼峰强度随时间变化的趋势与对照组的不同,即细胞内核酸、蛋白质、脂类的含量随时间变化减少的

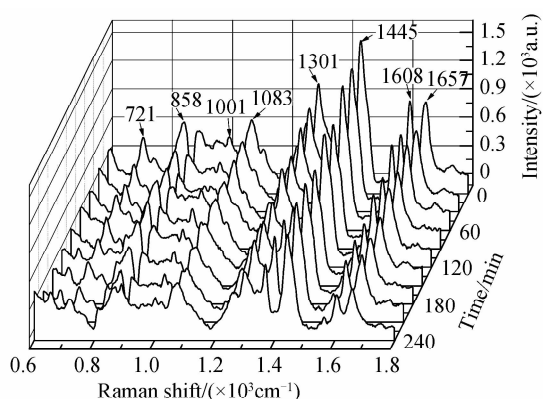


图6 典型的单个酵母同步细胞经乙醇胁迫随时间变化的喇曼光谱图

Fig. 6 Typical changes of Raman spectrums of a single synchronous yeast cell with time-varying after incubated with ethanol

趋势与对照组的不同. 1 001  $\text{cm}^{-1}$  峰在组内效应检验中, 其强度在不同时间点上的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 且处理条件与时间无交互作用, 即其强度随时间变化的趋势与对照组相比并无差异 ( $P > 0.05$ ). 在组间效应检验中, 不同处理条件对 721、1 083、1 301、1 445、1 608 和 1 657  $\text{cm}^{-1}$  峰的强度变化的影响有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而不同处理条件对 1 083  $\text{cm}^{-1}$  和 1 001  $\text{cm}^{-1}$  峰强度变化的影响无统计学意义 ( $P > 0.05$ ).

表2 重复测量方差的各喇曼峰的检测

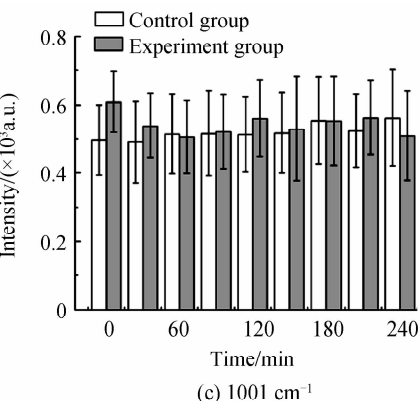
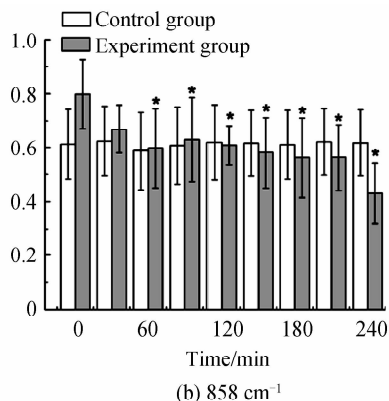
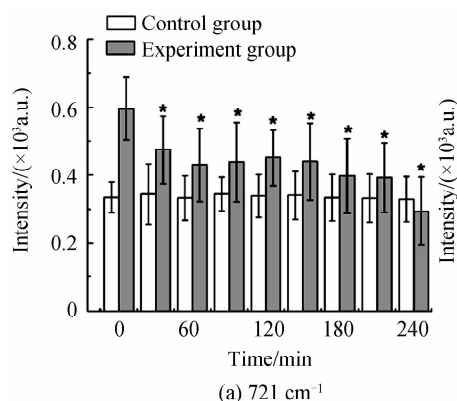
Table 2 Repeated measures analysis of variance of Raman peaks detection

Peak position/ $\text{cm}^{-1}$	Within-Subjects Effects		Between-Subjects effects
	Time	Interaction of time and group	Group
721	0.000 *	0.000 *	0.006 *
858	0.000 *	0.000 *	0.945
1 001	0.381	0.061	0.635
1 083	0.000 *	0.000 *	0.001 *
1 301	0.000 *	0.001 *	0.002 *
1 445	0.001 *	0.000 *	0.000 *
1 608	0.000 *	0.000 *	0.006 *
1 657	0.000 *	0.000 *	0.029 *

为比较单个酵母细胞和群体细胞在高浓度乙醇处理过程主要特征峰随时间变化的特征, 应用重复测量方差分析与核酸、蛋白质、脂类相关的 721, 858, 1 001, 1 083, 1 301, 1 445, 1 608 和 1 657  $\text{cm}^{-1}$  峰强度变化, 结果见图 7. 对照组 (10 个细胞) 未经乙醇处理, 其 8 个特征峰的峰强度随着处理时间的变化并未表现出显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 即对照组的酵母细胞在 240 min 内其细胞内的核酸、蛋白质、脂类等大分子物质的含量没有发生显著性变化, 表明对照组的酵母细胞在这段时间内其生理生化活动是稳定的. 实验组 (10 个细胞) 的喇曼光谱强度随着时间的变化呈现出下降的趋势, 并且不同的谱峰的强度的下降趋势有所差异. 其中, 721  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(a)) 在 30 min 时就表现出与对照组的呈显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 858  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(b))、1 445  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(f)) 在 60 min 时表现出与对照组的呈显著性差异, 1 083  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(d))、1 301  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(e)) 在 90 min 时表现出与对照组的呈显著性差异, 1 608  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(g))、1 657  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(d)) 在 150 min 时才表现出与对照组的呈显著性差异, 而 1 001  $\text{cm}^{-1}$  (图 7(c)) 在 240 min 内并没有表现出和对照组的有显著性差异 ( $P > 0.05$ ). 结果显示, 在高浓度乙醇诱导酵母细胞凋亡的过程中, 单个细胞的喇曼光谱变化趋势与基于群体细胞水平上的平均光谱变化趋势明显不同, 即表现为与对照组呈显著性的差异的时间点有所不同 (表 3).

表3 群体细胞和单个细胞喇曼强度呈显著差异的时间点  
Table 3 Time points of the intensity of Raman peaks which show differences significantly

Peak position/ $\text{cm}^{-1}$	Time points/min	
	Group cells	Single cell
721	60	30
858	30	60
1 001	>360	>240
1 083	30	90
1 301	60	90
1 445	60	60
1 608	60	150
1 657	30	150



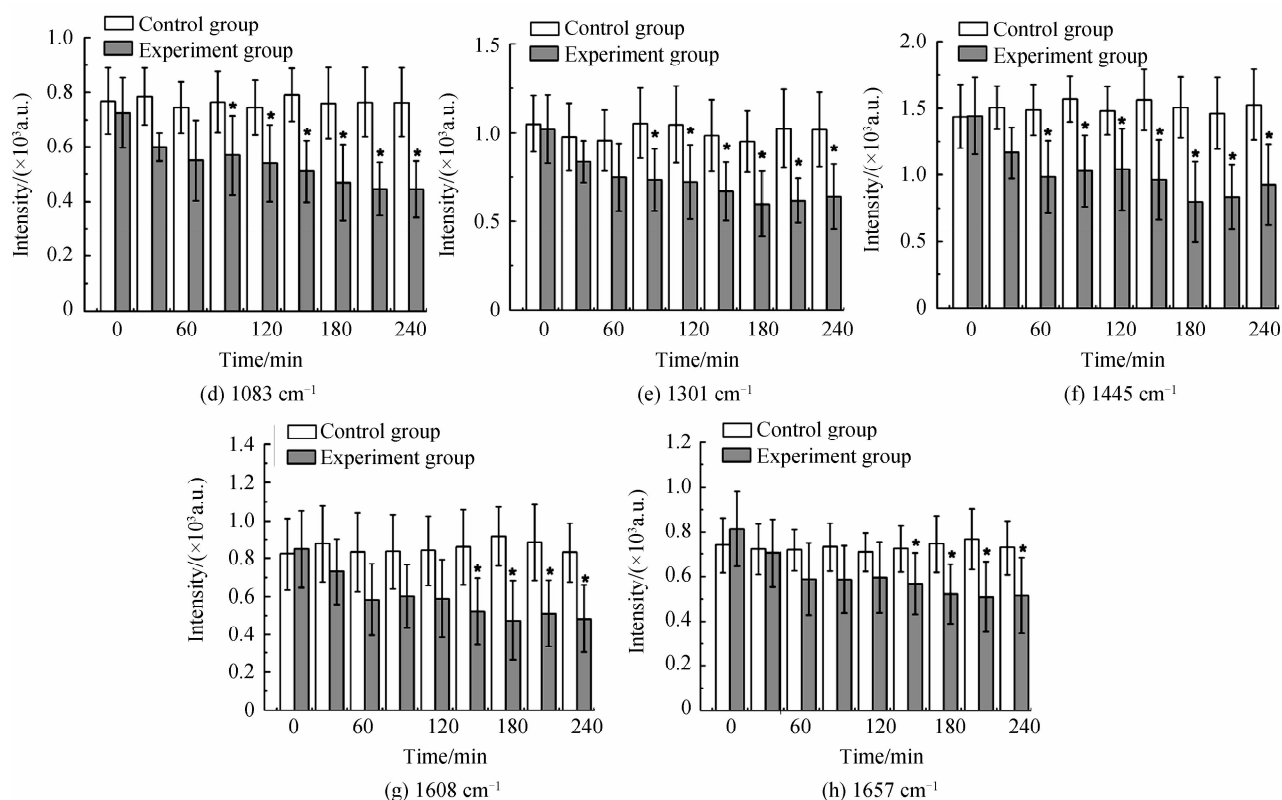


图7 20%乙醇处理单个酵母细胞8个喇曼峰强度的变化趋势图

Fig. 7 Tendency chart of the 8 Raman peaks of a single yeast cell that under 20% ethanol stress

### 3 讨论

高浓度乙醇对酵母细胞的影响包括细胞膜的完整性,破坏或改变膜的通透性,破坏蛋白质构象,影响糖和氨基酸等的吸收,引起核苷酸、氨基酸、蛋白质以及K<sup>+</sup>离子渗漏等.细胞膜具有选择透过性,对有害物质起到屏障的作用,主要由磷脂、糖脂等脂类和膜蛋白构成.酵母细胞的乙醇耐受性与膜的成分存在一定关系,长链脂肪酸含量高的酿酒酵母可以耐受的乙醇浓度较高;脂肪酸不饱和性也影响酵母乙醇耐受性,培养基的乙醇增加使酿酒酵母膜单不饱和和长链脂肪酸(例如油酸)增多,饱和脂肪酸(例如棕榈酸)的数量降低<sup>[18]</sup>.在乙醇胁迫中,酵母细胞膜是最先暴露于乙醇中的,是乙醇胁迫的主要靶位,乙醇胁迫造成膜的流动性的改变,乃至造成膜的通透性的改变.同时在乙醇胁迫后,与乙醇耐受性相关的膜蛋白,如膜蛋白H<sup>+</sup>-ATPase的活性受到影响,乙醇胁迫降低H<sup>+</sup>-ATPase活性,造成质子跨膜梯度的质子驱动力下降,从而使电化学梯度消减,造成膜通透性增加.

高浓度乙醇胁迫酵母细胞,与脂类物质相关的谱峰1 083、1 301和1 445  $\text{cm}^{-1}$ 随乙醇处理时间的延长呈下降的趋势,提示高浓度乙醇诱导酵母细胞凋亡的过程中,酵母膜脂成分和结构受到损伤,脂类物质含量

减少,膜通透性增加,影响细胞内环境的稳定性,胞内蛋白质、核酸从细胞膜漏出,细胞内蛋白质、核酸含量的降低就可以通过光谱降低体现出来.细胞凋亡过程中,涉及核酸内切酶G的凋亡过程与乙醇胁迫密切相关<sup>[10]</sup>,该内源性核酸内切酶被激活,参与水解DNA分子链内部磷酸二酯键生成寡核苷酸,这些核苷酸透过细胞膜使细胞内核酸物质流失,凋亡晚期DNA降解加剧,膜通透性更高,被降解的核酸就会通过细胞膜扩散到细胞外面,因此核酸碱基的含量也会下降,体现归属于核酸喇曼峰721、1 083和1 301  $\text{cm}^{-1}$ 峰强的降低.细胞内蛋白质含量的降低,推测与蛋白质合成减少和水解增多的综合结果有关,高浓度乙醇胁迫酵母细胞,热激蛋白(Heat Shock Protein, HSP)以及与海藻糖合成相关酶表达增加<sup>[9,19]</sup>,促凋亡蛋白Bax的表达明显增强<sup>[20]</sup>,Bax的异源表达引起酿酒酵母的快速死亡<sup>[21]</sup>,但同时和细胞增殖相关的一些蛋白的表达降低,蛋白质合成代谢减弱;在另一方面,凋亡过程还有伴随着某些蛋白的水解,如半胱氨酸蛋白酶家族(Caspases)成员被水解激活,然后催化其他蛋白质水解,最终,伴随着细胞凋亡过程中膜通透性增高,胞内蛋白质从胞膜内释放到胞外,总体上造成细胞内蛋白质含量的降低.所以,表现出归属于蛋白质的721、858、1 301、1 445、1 608和1 657  $\text{cm}^{-1}$ 的峰强度随乙醇胁迫延

长而逐渐下降,具体哪些核酸和蛋白质发生对上述喇曼光谱变化的贡献,还需借助分子生物学和分析化学分析手段做进一步研究。

高浓度乙醇胁迫酵母凋亡过程中,凋亡细胞 ATP 比正常细胞低,ATP 由腺嘌呤和磷酸分子组成,归属腺嘌呤的 721 和 1 301  $\text{cm}^{-1}$  峰强随着凋亡率的增加而降低,推测高浓度乙醇可能干扰细胞内的腺嘌呤核苷酸代谢,使得 ATP 合成减少,影响细胞的能量代谢。酵母细胞能量代谢与乙醇的耐受性相关<sup>[22]</sup>,值得关注的是 1 608  $\text{cm}^{-1}$  谱峰强度变化,其强度的变化表征酵母线粒体的呼吸水平<sup>[23]</sup>。在高浓度乙醇胁迫下,1 608  $\text{cm}^{-1}$  谱峰强度随时间变化而呈下降趋势,表明在乙醇诱导的凋亡过程中,酵母线粒体呼吸产能的活力下降,造成细胞的能量代谢受阻,推测 721 和 1 301  $\text{cm}^{-1}$  峰强变化和 1 608  $\text{cm}^{-1}$  谱峰强度变化可能有关联性。

高浓度乙醇胁迫下,基于群体细胞和单个细胞水平上的研究结果显示,与核酸、蛋白质和脂质相关的谱峰强度都是随处理时间延长而逐渐降低,但是,721、858、1 001、1 083、1 301、1 445、1 608 和 1 657  $\text{cm}^{-1}$  等 8 个谱峰的变化趋势并不完全一致(详见图 5、图 7、表 3),乙醇胁迫单个酵母细胞的过程中,发现 721  $\text{cm}^{-1}$  谱峰强度降低程度与对照组出显著性差异( $P < 0.05$ )时间点,较群体细胞提前 30 min,而 858、1 083、1 301、1 608 和 1 657  $\text{cm}^{-1}$  这 5 个谱峰的强度变化却滞后了。群体细胞与单个细胞的光谱变化的这种差异性,主要是由于群体细胞的喇曼光谱变化信息是经平均后得到的,是平均喇曼光谱信息,个体信息被这种平均信息所掩盖,因此群体细胞的平均信息可能并不能真实反映出高浓度乙醇胁迫下单个细胞生理生化变化规律,无法体现其个体间所存在的差异。而基于单个细胞水平上的研究,能够反映出个体细胞在乙醇胁迫过程中所表现出真实的个性特征,LTRS 技术能够实现对单个细胞在高浓度乙醇胁迫过程中的生理变化过程实时记录下来,可以真实反映出单个细胞在胁迫过程中的生理变化特性。

## 4 结论

高浓度乙醇能够诱导酵母细胞发生凋亡,应用 LTRS 技术对酵母细胞在酵母细胞凋亡的过程中生物大分子含量变化结果显示,归属于核酸喇曼峰 721、1 083 和 1 301  $\text{cm}^{-1}$ 、蛋白质的喇曼峰 721、858、1 301、1 445、1 608 和 1 657  $\text{cm}^{-1}$  和脂类喇曼峰 1 301  $\text{cm}^{-1}$  和 1 445  $\text{cm}^{-1}$  峰强度都随处理时间的延长而显著降低,反映酵母细胞在凋亡过程中,细胞内核酸、蛋白质、脂质等大分子物质的含量随时间变化显著减少。LTRS 能够有效监测单个细胞凋亡的过程生物大分子变化的

实时信息,这些基于单个细胞水平上的信息能够有效地反映出该过程中细胞生理变化的真实情况,能够克服群体细胞平均后的数据信息对个体的某些信息掩盖的缺点。

## 参考文献

- [1] BIRCH R M, WALKER G M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26** (9-10): 678-687.
- [2] TAKEMURA R, INOUE Y, IZAWA S. Stress response in yeast mRNA export factor; reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, **117**(Pt18): 4189-4197.
- [3] GÓMEZ-PASTOR R, PÉREZ-TORRADO R, MATA LLANA E. Modification of the TRX2 gene dose in *Saccharomyces cerevisiae* affects hexokinase 2 gene regulation during wine yeast biomass production [J]. *Applied Microbiol and Cell Physiology*, 2012, **94**(3): 773-87.
- [4] HONG M E, LEE K S, YU B J, *et al.* Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, **149**(1-2): 52-59.
- [5] YOU K M, ROSENFELD C L, KNIPPLE D C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, **69**(3): 1499-1503.
- [6] HU X H, WANG M H, TAN T, *et al.* Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2007, **175**(3): 1479-1487.
- [7] MADEIRA A, LEITÃO L, SOVERAL G, *et al.* Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2010, **10**(3): 252-258.
- [8] SALES K, BRADT W, RUMBAC E, *et al.* The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, **1463**(2): 267-278.
- [9] ALEXANDRE H, ANSANAY-GALEOTE V, DEQUIN S, *et al.* Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Letters*, 2001, **498**(1): 98-103.
- [10] KITAGAKI H, ARAKI Y, FUNATO K, *et al.* Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway [J]. *FEBS Letters*, 2007, **581**: 2935-2942.
- [11] LU Ming-qian, DONG Rong, WEN Shun-hua, *et al.* Detection of recombinant protein expression of formate dehydrogenase in single living *Escherichia coli* cell by laser tweezers raman spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, **40**(12): 1845-1851.  
卢明倩,董蓉,温顺华,等. 单细胞激光喇曼光谱检测重组大肠杆菌细胞表达甲酸脱氢酶 [J]. 分析化学, 2012, **40**(12): 1845-1851.
- [12] LI Zi-da, TAO Zhan-hua, MENG Jing-ling, *et al.* Sorting economic microorganisms by using optical manipulation and raman microspectroscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(5): 722-728.  
李自达,陶站华,孟令晶等. 分选特殊产物微生物的喇曼光谱法 [J]. 光子学报, 2011, **40**(5): 722-728.
- [13] LIN Man-man, NIU Li-yuan, QIN Zhao-jun, *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. 喇曼光谱对血糖的半定量分析[J]. *光子学报*, 2012, **41**(1): 112-115.
- [14] ALLEN C, BÜTTNER S, ARAGON A D, *et al.* Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, **174**(1): 89-100.
- [15] LAI Jun-zhuo, LIU Bin, WANG Gui-wen, *et al.* Analysis of components difference of yeast strains based on laser tweezers raman spectroscopy combined[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, **31**(2): 412-417.
- 赖钧灼, 刘斌, 王桂文, 等. 单细胞喇曼光谱结合多元统计方法分析不同酿酒酵母菌株的成分差异[J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, **31**(2): 412-417.
- [16] 许以明. 喇曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 10-141.
- [17] NOTINGHER L. Raman spectroscopy cell-based biosensors[J]. *Sensors*, 2007, **7**(8): 1343-1358.
- [18] AGUILERA F, PEINADO R A, MILLAN C, *et al.* Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, **110**(1): 34-42.
- [19] CHANDLER M, STANLEY GA, ROGERS P, *et al.* A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Annals of Microbiology*, 2004, **54**(4): 427-454.
- [20] YU Xiang-min, JIANG Min. Effect of alcohol on apoptosis and expression of bcl-2 and bax genes of myocardial cell of mice[J]. *Journal of Environment and Health*, 2005, **22**(6): 470-472.
- 于向民, 姜敏. 乙醇对心肌细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2005, **22**(6): 470-472.
- [21] PRIAULT M, CAMOUGRAND N, KATHLEEN W, *et al.* Yeast as a tool to study Bax/mitochondrial interactions in cell death [J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, **4**(1): 15-27.
- [22] GUIMARAES P M, LONDESBOROUGH J. The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeasts fermenting high- and very high-gravity worts [J]. *Yeast*, 2008, **25**(1): 47-58.
- [23] PULLY VV, OTTO C. The Intensity of the 1602 cm<sup>-1</sup>-band in human cells is related to mitochondrial activity[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009, **40**(5): 473-475.