

DOI: 10.3969/j.issn.1673-6141.2020.01.006

## 面向微藻单细胞检测的小型共焦拉曼系统研制

卢渊<sup>1</sup>, 李远东<sup>1,2</sup>, 郭飞<sup>1</sup>, 任立辉<sup>2</sup>, 郑荣儿<sup>1</sup>

(1 中国海洋大学信息科学与工程学院, 山东 青岛 266100;

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心, 山东 青岛 266100)

**摘要:** 海洋微藻研究对海洋环境监测以及生物资源利用有着重要意义, 显微共焦拉曼光谱作为一种非标记、快速检测技术已在生命领域获得广泛应用。现阶段, 商业化显微共焦拉曼仪器在微生物研究领域占据主导, 但由于体积庞大、工作环境要求严格等因素, 很难开展微藻细胞的现场检测与分析。因此, 将微型光纤光谱仪引入微藻“单细胞”的检测, 自主研发了一套小型显微共焦拉曼系统, 尝试低成本开发微生物分析设备。整个系统基于微型光纤光谱仪实现了硬件的一体化小型设计 (L750 mm×W350 mm×H410 mm), 具备光谱探测、显微成像、光镊捕获功能。通过四种典型微藻 (中肋骨条藻、微拟球藻、东海原甲藻及小藻) 的检测验证, 成功识别了“单个活体细胞”内的蛋白质、脂类、糖原、核酸等多种细胞组分, 相应的结果经过主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 后, 很好地实现了四种微藻的种类归属, 证明了光纤光谱仪应用于单细胞量级海洋微生物分析的可行性, 并有望在将来发展成为船基设备, 用于微藻的甲板在线检测。

**关键词:** 共焦拉曼; 光纤光谱仪; 小型化系统; 海洋微藻; 单细胞分析

中图分类号: O433

文献标识码: A

文章编号: 1673-6141(2020)01-0055-07

## Development of Compact Confocal Raman System for Algae Single-Cell Detection

LU Yuan<sup>1</sup>, LI Yuandong<sup>1,2</sup>, GUO Fei<sup>1</sup>, REN Lihui<sup>2</sup>, ZHENG Ronger<sup>1</sup>

(1 College of Information Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

2 Single-Cell Center, Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266100, China)

**Abstract:** The study of algae is significant for monitoring marine environment and exploring biological resources. Confocal Raman spectroscopy has been widely used in biology as a label-free and rapid detection technique. Currently, the commercial micro-Raman is dominated in this field, while it is not applicable to field measurements for the instrumental size and the operation condition. Hence, a fiber optic spectrometer is introduced to develop a low-cost compact confocal-Raman system for algae detection at “single-cell” level. The

**基金项目:** Supported by National Key Research and Development Program of China (国家重点研发计划, 2018YFC0309904, 2016YFC0302101), National Natural Science Foundation of China (国家自然科学基金, 41506113)

**作者简介:** 卢渊 (1984 -), 男, 陕西安康人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事激光光谱海洋应用研究。

**E-mail:** luyuan@ouc.edu.cn

**收稿日期:** 2019-12-03; **修改日期:** 2019-12-09

developed system is all-in-one designed for the compactness, and is well functioned with the capacities of Raman detection, microscopic imaging and optical tweezers capture. Four typical kinds of single-cells (*Skeletonema costatum*, *N.oceanica IMET-1*, *Prorocentrum donghaiense Lu* and *Chlorella*) were used to evaluate the system detectability, and the components such as proteins, lipids, glycogen and nucleic acids were recognized. Based on that, the algae cells were successfully classified into 4 species after using principal component analysis (PCA) method, which indicates that it is feasible to apply the fiber optic spectrometer for single cell analysis of marine microbes. It is expected that the developed system will be deployed as field instrument for the deck measurements in sea trials in the future.

Key words: confocal Raman; fiber optic spectrometer; compact system; marine algae; single-cell analysis

## 1 引言

微藻是一类形态微小的藻类种群,分布广泛,常见于江河湖海和池塘沟渠。在全球已知的3万余种藻类中,微藻类群约占70%<sup>[1]</sup>。海洋微藻通过光合作用把太阳能转化为油脂、蛋白质等新生有机物,利用养料传递信息、释放生物量,进而启动海洋中的食物链,在某些海域的初级生产力贡献值甚至可以达到80%以上,是海洋生态系统中最主要的初级生产者和能量转换者<sup>[2-3]</sup>,监测微藻细胞组分和状态的变化将有助于深入了解海洋环境与生态之间的联系<sup>[4-5]</sup>。因此,海藻微生物的方法学研究至关重要<sup>[6]</sup>。拉曼光谱技术作为一种被广泛用于生命领域的检测手段<sup>[7]</sup>,可在非标记状态下完成细胞的活体分析,尤其近年来火热的显微共焦拉曼光谱技术,在空间分辨率和层析解析方面有特别优势,被视为单细胞检测的理想手段<sup>[8]</sup>。

现阶段,商业化显微共焦拉曼仪器均是由现成的金相光学显微镜改装而来,仪器整体呈不规则外形,尽管进行了一体化封装,但体积和重量较大,且无隔震效果。同时,商业化仪器的探测部分采用的是科研级探测器(CCD、EMCCD)和长焦光栅光谱仪,除造价昂贵外,对工作环境也有较高的要求,难以开展海上甲板作业,进行海洋微生物的高通量现场测量。因此,为实现海洋微生物细胞的原位活体分析<sup>[8]</sup>,满足微生物(如海洋微藻)现场快速检测的需要<sup>[9-10]</sup>,亟待发展一种小体积、机动性好的共焦显微拉曼快速分析设备。微型光纤光谱仪作为面向现场的工业级光谱探测设备,将分光与探测合为一体,具有体积小巧、便于携带、功耗低、造价低廉等优点。虽然在探测灵敏度方面低于商业化系统的探测系统(科研级探测器和光栅光谱仪),但是非常适合原位、在线的连续工作<sup>[11]</sup>。因此,本文尝试将光纤光谱仪引入海洋微生物研究,据文献调研,这也是第一次将小型光纤光谱仪应用于海藻单细胞探测,期望为未来船基设备的发展奠定基础。

## 2 实验方案与装置

### 2.1 实验系统

图1是单细胞显微共焦拉曼系统的结构示意图和实物图,其中图1(a)的M1、M2为532 nm激光反射镜;M3、M4是长通滤波片;L1、L4为双胶合消色差透镜;L2、L3为透镜;PH为针孔,DM为二向色镜。图1(b)是实物图,为一体化设计(L750 mm×W350 mm×H410 mm),包含了激光器、光谱仪、位移台在内的所有器件。该系统采用笼式组件(Thorlabs)完成搭建,自搭成像模块取代商业化显微镜,以低功耗、小体积的光纤光谱仪(Ocean optics, QEPro)进行光谱探测,系统整体具有较好的紧凑性和稳定性。其中,激发光源为532 nm的固体连续激光器(CNI, MGL-III-532),最大功率可达200 mW。输出激光

通过 2.5 倍扩束器后, 经长通滤波片 M4 和二向色镜 DM 反射, 垂直入射到显微物镜进行聚焦激发。实验中采用 60 倍水浸物镜 (Leica, NA=1) 完成微藻单细胞的拉曼探测。单细胞拉曼信号经显微物镜收集后, 通过 M3 和 M4 组合滤波片消除 532 nm 激光的瑞利散射, 并由微米量级针孔实现拉曼信号的共焦采集, 相应的信号经透镜耦合进光纤后, 再导入光纤光谱仪完成最终的光谱探测。系统中所采用的光纤光谱仪为折叠式 C-T 型硬件结构, 一体式紧凑设计, 包含 CCD 探测器, 体积小巧 (110 mm×182 mm×47 mm), 探测光谱范围为 500~3000  $\text{cm}^{-1}$ , 光谱分辨率为 9  $\text{cm}^{-1}$ , 可覆盖大部分生物细胞拉曼特征峰位。所研制系统的成像单元由白光 LED 和 CMOS 摄像头组成, 用于监测激光聚焦位置与细胞光镊捕获, 相应结果如图 2 所示, 均可较为清晰地呈现细胞形态。

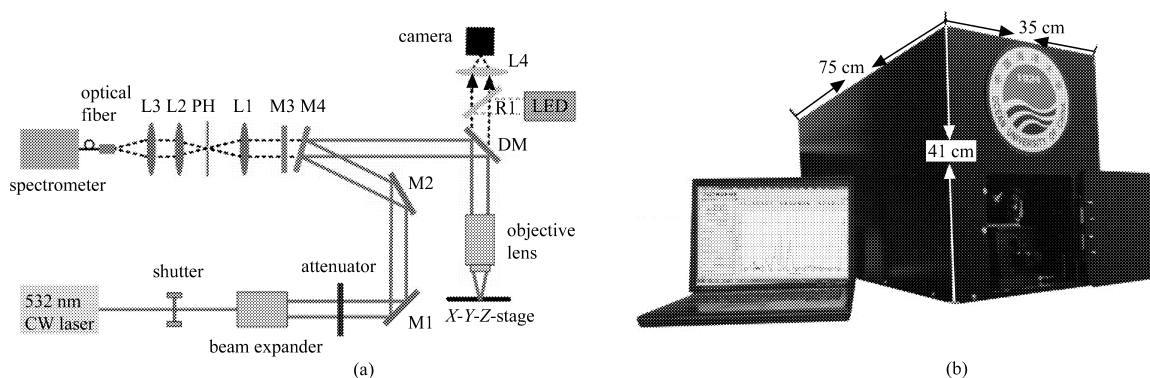


图 1 显微共焦拉曼系统结构示意图 (a) 和实物图 (b)

Fig.1 Schematic diagram (a) and picture (b) of the confocal micro-Raman system (b)

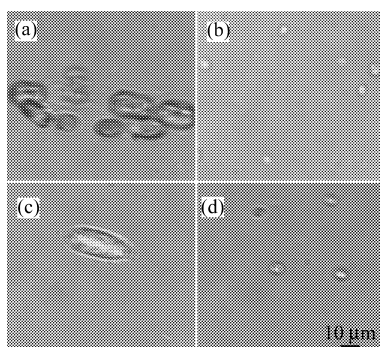


图 2 系统所获得的海藻细胞成像。(a) 中肋骨条藻; (b) 微拟球藻; (c) 东海原甲藻; (d) 小球藻

Fig.2 Different single cell images obtained by the confocal micro-Raman system. (a) *Skeletonema costatum*; (b) *N. oceanica IMET-1*; (c) *Prorocentrum donghaiense Lu*; (d) *Chlorella*

## 2.2 样品

细胞样品由中国科学院海洋研究所和青岛生物能源与过程研究所单细胞中心提供。实验中选用的中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense Lu*) 培养基为 L1 培养液。小球藻 (*Chlorella*) 的培养基为专用培养液, 其成分包含  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、柠檬酸铁、蒸馏水和灭菌海水。微藻 (*N. oceanica IMET-1*) 的培养基为 f/2 (Guillard, 1962) 改良配方 (海水)。实验中, 所有藻样均置于灭菌水中进行拉曼探测。

### 3 实验结果

为验证显微共焦拉曼系统的探测性能, 选用同一批次培养的酵母菌细胞, 分别使用所研制系统与商业化显微共焦拉曼光谱仪 (HR800, Horiba) 进行了单细胞酵母菌的检测对比, 具体结果如图 3 所示。结果对

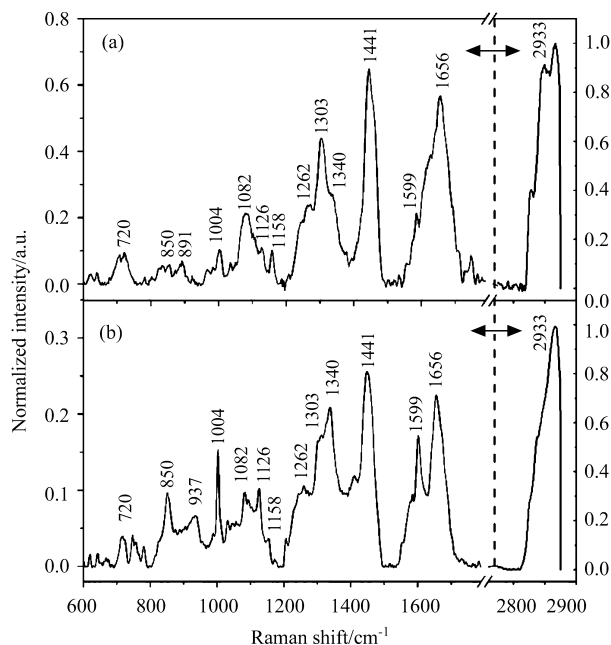


图 3 酵母菌单细胞拉曼光谱比较。(a) 本文研制系统, 探测时间为 30 s; (b) 商业化系统 (Horiba), 探测时间为 5 s

Fig.3 Comparison of Raman detection result of yeast single cell. (a) Developed system under the detection time of 30 s; (b) commercial system (Horiba) under the detection time of 5 s

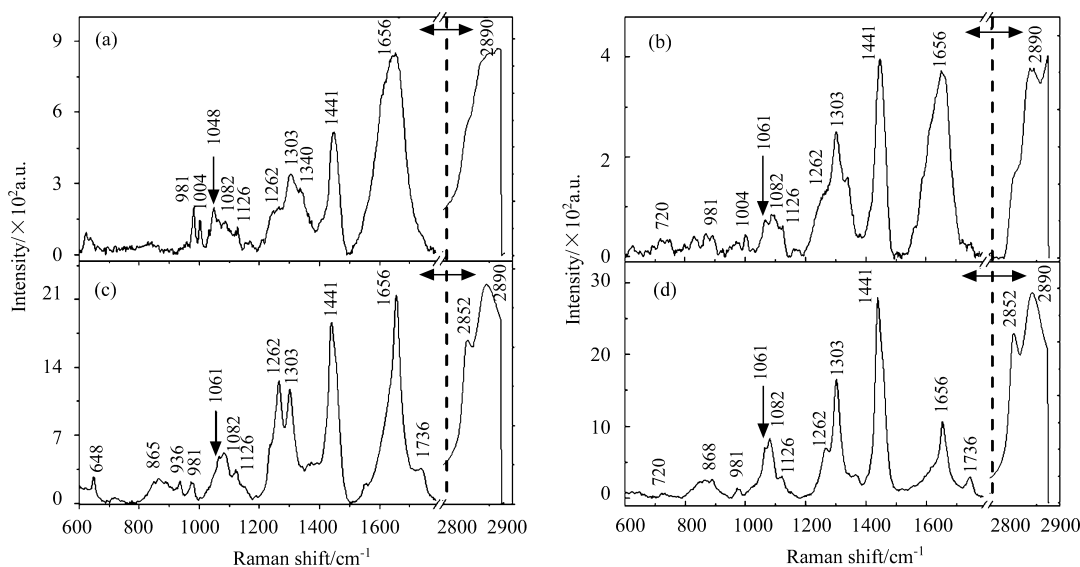


图 4 四种微藻单细胞的拉曼光谱探测结果。(a) 中肋骨条藻; (b) 微拟球藻; (c) 东海原甲藻; (d) 小球藻

Fig.4 Typical Raman results of 4 kinds of algae single-cell under the detection time of 30 s and the laser power of 30 mW. (a) *Skeletonema costatum*; (b) *N. oceanica IMET-1*; (c) *Prorocentrum donghaiense*; (d) *Chlorella*

比发现, 所研制系统获得的酵母菌探测结果与商业化系统探测结果保持一致, 包含了生物细胞的主要典型

组分: 蛋白质 ( $973\text{ cm}^{-1}$ 、 $1004\text{ cm}^{-1}$ 、 $1582/1599\text{ cm}^{-1}$ )、脂类 ( $1262\text{ cm}^{-1}$ 、 $1303\text{ cm}^{-1}$ 、 $1656\text{ cm}^{-1}$ 、 $2850\sim 2933\text{ cm}^{-1}$ )、糖原 ( $891\text{ cm}^{-1}$ 、 $973\text{ cm}^{-1}$ 、 $1082\text{ cm}^{-1}$ 、 $1126\text{ cm}^{-1}$ 、 $2850\sim 2933\text{ cm}^{-1}$ ) 和核酸 ( $720\text{ cm}^{-1}$ 、 $868\text{ cm}^{-1}$ 、 $1054\text{ cm}^{-1}$ 、 $1175\text{ cm}^{-1}$ 、 $1303\text{ cm}^{-1}$ 、 $1441\text{ cm}^{-1}$ 、 $1736\text{ cm}^{-1}$ ) 等。因此, 所研制系统在能够完成生物细胞主要成分探测的同时, 探测结果与商业化系统基本保持一致, 能够胜任微生物“单细胞”成分表征。

在此基础上, 为进一步评估所研制系统用于海洋微生物研究的可行性, 选用四种典型海洋微藻分别进行了探测测试, 具体包括: 中肋骨条藻、微拟球藻、东海原甲藻和小球藻, 相应的单细胞拉曼探测结果如图 4 所示。探测时间为 30 s, 激光能量为 30 mW, 每个光谱为 10 个单次光谱探测的平均值。从图中可以看出, 四种微藻均能够获得较为明显的拉曼谱峰, 可识别出的相同组分包括: 核酸、碳水化合物、蛋白质以及脂类等, 对应的拉曼光谱峰位信息详见表 1。但同时发现, 四种海藻相同组分的拉曼光谱强度存在一定

表 1 拉曼特征峰位及成分信息表<sup>[12-15]</sup>Table 1 Raman bands and the assignments<sup>[12-15]</sup>

Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )	<i>Skeletonema</i> <i>costatum</i>	<i>N.oceanica</i> <i>IMET-1</i>	<i>Prorocentrum</i> <i>donghaiense</i>	<i>Chlorella</i> <i>Lu</i>	Composition
648	×	×	✓	✓	Unknown
720	×	✓	×	✓	Adenine
868	×	×	✓	✓	Phospholipid, $\text{C}_4\text{N}^+$ and O-C-C-N symmetric stretches
891	✓	×	✓	✓	C-O-C str
936	×	×	✓		Unknown
981	×	×	✓	✓	C-H
1004	✓	×	×	✓	Phenylalanine ring breath
1048	✓	×	×	×	Unknown
1061	×	×	×	✓	Nucleic acids, CO str; protein, C-N str
1082	✓	✓	✓	✓	Carbohydrate C-O-H bending
1126	✓	✓	✓	✓	Carbohydrate, C-O-H deformation, C-O and C-C stretches
1262	✓	✓	✓	✓	Amide III; Lipid, Alkyl =C-H cis stretches
1303	✓	✓	✓	✓	Adenine, amide III, Lipid Alkyl C-H <sub>2</sub> twist
1336-1339	✓	✓	✓	×	Adenine, Guanine, tyrosine, tryptophan
1200-1350	✓	✓	✓	✓	Protein, Amide III
1441	✓	✓	✓	✓	Lipids, Alkyl C-H <sub>2</sub> bend
1656	✓	✓	✓	✓	Amide I, Unsaturated lipids, Tyrosine
1736	✓	✓	✓	×	Lipid, Ester CO stretches
2850-2933	✓	✓	✓	✓	Lipid, carbohydrate; C-H <sub>2</sub> , C-H <sub>3</sub> asymmetric and symmetric stretches

差异, 可解释为胞内组分含量的不同。

经统计后不难发现,表 1 所显示结果中四种微藻细胞在组分上也明显不同,如:磷脂 ( $865\text{ cm}^{-1}$ )、丙氨酸 ( $1004\text{ cm}^{-1}$ )、核酸 ( $1061\text{ cm}^{-1}$ )、色氨酸 ( $1340\text{ cm}^{-1}$ )、脂类 ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ) 等,侧面证明了四个藻种在细胞组分确实存在差异。尽管四种微藻均为近海典型的相近藻种,但在细胞组分的拉曼探测方面,可通过谱峰强度和峰位对藻种作以区分,这也是目前细胞拉曼表征的常用方法。

基于以上结论,还运用主成分分析方法 (Principal component analysis, PCA) 又对微藻进行了细分测试。测试中,分别从每个藻种的单细胞探测结果中随机抽取了 10 组原始光谱数据,形成 40 个原始光谱数据,经 PCA 分析后提取主成分后,选取贡献率排名前三的主成分 (累计贡献率为 99.23%),进行藻种类别分析,所获得的结果如图 5 所示。很明显地看出,四个藻种较好地实现了归属。而且,图 5 与表 1 结果也形成了很好的对应关系,如:甲藻和微拟球藻在图 5 中相邻位置最为接近,在表 1 中成分差别也是最小的。因此,所获得的结果证明了基于光纤光谱仪研制小型系统能够实现微藻单细胞的表型分析,而且所获得光谱结果确认可胜任藻种的分类,后期若与微藻细胞高通量传输对接后,将有可能实现微藻群落的种群分析和功能化分类。

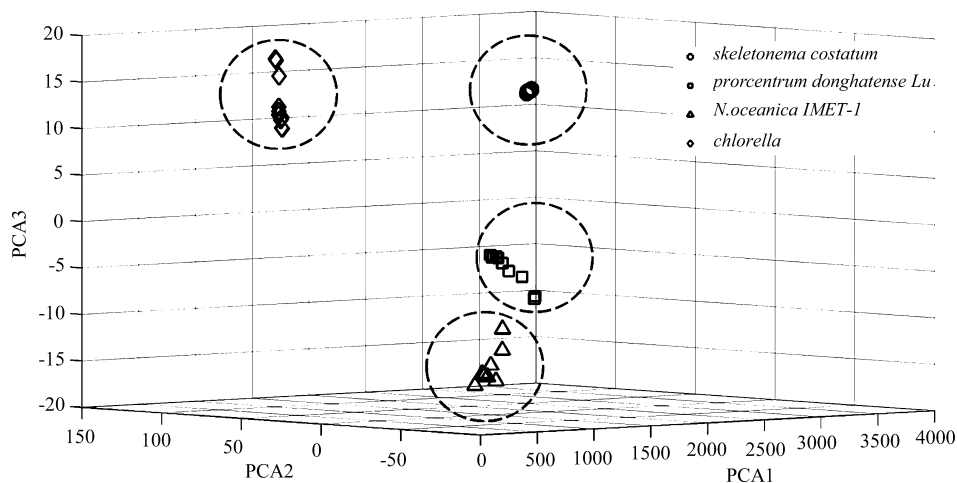


图 5 基于拉曼检测结果的四种微藻 PCA 分类结果

Fig.5 PCA classification of 4 algae species using the Raman detection results

## 4 结 论

为发展面向海洋微生物的原位探测,将光纤光谱仪引入共焦显微拉曼光谱技术,自主设计搭建了一套一体式的小型共焦显微拉曼系统,该系统能够胜任微藻单细胞的检测,成功获得了四种典型微藻:中肋骨条藻、微拟球藻、东海原甲藻和小球藻的探测结果,识别出包括蛋白质、脂类、糖原、核酸等多种细胞组分,以及四种微藻细胞在组分上的差异,并成功实现了通过主成分分析 (PCA) 完成微藻藻种的分类。打破了生物单细胞检测必须使用高端商业化仪器的传统思路,证明了自行搭建系统结合价格较低但性价比较高的光纤光谱仪,在低成本下同样可以实现单细胞的高精度拉曼检测。据了解,这是第一次将光纤光谱仪成功应用于“活体单细胞”分析领域。所研制的系统可望在海洋现场分析方面发挥优势,在线完成真光层浮游微生物种群的快速分析,为海洋微生物研究提供一套方法学新思路。

## 参考文献:

- [1] Chen Feng, Jiang Yue. *Microalgae Biotechnology* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese).  
陈 峰, 姜 悦. 微藻生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [2] Anderson D M. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABS) [J]. *Ocean & Coastal Management*, 2009, **52**(7): 342-347.
- [3] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton [J]. *Nature*, 1990, **345**: 60-63.
- [4] Mills G, Fones G. A review of in situ methods and sensors for monitoring the marine environment [J]. *Sensor Review*, 2012, **32**(1): 17-28.
- [5] Jing Xiaoyan, Gou Honglei, Gong Yanhai, et al. Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, **20**(6): 2241-2255.
- [6] Xu Jian, Ma Bo, Su Xiaolu, et al. Emerging trends for microbiome analysis: from single-cell functional imaging to microbiome big data [J]. *Engineering*, 2017, **3**(1): 66-70.
- [7] Ma Bo, Xu Jian. Phenotyping and sorting of synthetic cells: building bridge from spectroscopy to genetics [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, **33**(11): 1193-1204 (in Chinese).  
马 波, 徐 健. 人工细胞的表型测试与分选: 构建从光谱学到遗传学的桥梁 [J]. 中国科学院院刊, 2018, **33**(11): 1193-1204.
- [8] DeLong E F. The microbial ocean from genomes to biomes [J]. *Nature*, 2009, **459**(7244): 200-206.
- [9] Prüss A, Kay D, Fewtrell L, et al. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, **110**(5): 537-542.
- [10] Yang Shuqing, Liu Panwei. Strategy of water pollution prevention in Taihu Lake and its effects analysis [J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2010, **36**(1): 150-158.
- [11] Bergholt M S, Albro M B, Stevens M M. Online quantitative monitoring of live cell engineered cartilage growth using diffuse fiber-optic Raman spectroscopy [J]. *Biomaterials*, 2017, **140**: 128-137.
- [12] Puppels G, De Mul F, Otto C, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy [J]. *Nature*, 1990, **347**(6290): 301-303.
- [13] Wang Tingting, Ji Yuetong, Wang Yun, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy [J]. *Biotechnology for biofuels*, 2014, **7**(1): 58.
- [14] Wu Huawen, Volponi J V, Oliver A E, et al. In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, **108**(9): 3809-3814.
- [15] Huang W E, Li M Q, Jarvis R M, et al. Chapter 5-Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2010, **70**: 153-186.