文章编号:1000-6281(2015)02-0154-09

# 受激拉曼散射显微技术在生物科学中的应用

满 奕1,李 昂2,曹德昌1,林金星1,黄岩谊2,荆艳萍1\*

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院,北京100083;

2. 北京大学生物动态光学成像中心 北京大学工学院,北京 100871)

摘 要:受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)显微技术,可以通过探测分子的特定振动模式,实现对活 细胞的无标记和新型非荧光标记成像。由于 SRS 显微术具有较高的化学特异性,在生命科学成像领域具有极大的 应用潜力。本文简要介绍了 SRS 显微技术的原理,同时总结了其在脂类、核酸和蛋白质等生物分子,以及在组织结构、小分子药物和食品分析中的应用。

关键词:受激拉曼散射显微技术;生物学;非标记成像

中图分类号: Q336; 0657.37 文献标识码: A doi:10.3969/j.1000-6281.2015.02.014

光学显微技术,使人们能够以亚微米级的分辨 率观察微观世界的形态。了解特定化学组分的含量 与定位,可以帮助人们破译一些生命活动的细微机 制。因此,许多科学研究者都希望能够直接观察到 活体样本中的化学组分分布。为此,一个世纪以来, 研究者们开发了很多显色反应以及其他标记方法, 来明确指示特定的化学物质[1,2]。通过用荧光探针 标记兴趣分子[3],或者连接编码荧光蛋白的基 因[4~6],可以在单分子水平上研究复杂的系统活 动<sup>[7,8]</sup>.但这类方法有各自的缺陷。例如,染料的染 色过程常常会影响正常的生命活动<sup>[9]</sup>;荧光标记由 于会发生光漂白.难以对长时间的动态过程进行观 察<sup>[10~12]</sup>。最重要的是,对特定分子,尤其是小分子 如脂类进行标记,本身就是一件很困难的事,因为他 们的特异性不高<sup>[13,14]</sup>。所以活细胞的研究需要一 种理想的、无需标记(label-free)的、具有良好特异性 和灵敏度的化学成像技术。

二次谐波(second harmonic generation, SHG) 显微术<sup>[15]</sup>和三次谐波(third harmonic generation, THC)显微术<sup>[16,17]</sup>,分别是基于非线性光学中二次 谐波产生和三次谐波产生现象的显微成像方法,可 用于生物组织的非标记成像。二次谐波产生依赖于 物质微观结构上的非中心对称性,三次谐波产生则 依赖于物质的三阶非线性极化率,但这些性质都很 难与物质的化学成分形成特异性的直接对应关系。

红外显微术(infrared microscopy)是基于物质的红外 吸收光谱的显微技术,可以通过红外光谱中吸收峰 的特征分析物质的成分,但由于采用波长相对较长 的中红外光,空间分辨率比较低[18],且受水的吸收 影响比较大,导致其不适于活体成像;基于自发拉曼 散射光谱(spontaneous Raman scattering)的显微技术 同样可以得到物质成分的信息,通过使用可见至近 红外波长的激发光实现较高的空间分辨率,且不受 样品中水的影响,从而在生物样品成像上具有一定 的优势。但由于自发拉曼散射信号弱,获得拉曼光 谱的时间较长,采集到一幅图像的时间更长,在生物 成像的应用上受到很大限制<sup>[19]</sup>。相干反斯托克斯 拉曼散射 (coherent anti-stokes Raman scattering, CARS),通过两束能量差与所检测的拉曼散射能量 相匹配的激光,高效率地产生反斯托克斯拉曼散射 信号,可以获得比自发拉曼散射更高效的振动光谱 探测,但它具有非共振背景<sup>[20]</sup>,导致光谱扭 曲<sup>[21~24]</sup>,因此不具有定量分析的能力。

受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS),通过受激过程增强拉曼信号<sup>[13]</sup>,从而较基于 自发拉曼散射的方法相比,图像的采集时间大为缩 短,这就为捕获动态活动提供了可能<sup>[13,25]</sup>。

## SRS 的工作原理

自发拉曼散射是分子对光子的一种非弹性散射

收稿日期:2014-11-17;修订日期:2014-11-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31371348);长江学者和创新团队发展计划资助(No.IRT13047).

作者简介:满奕(1992 - ),女(回族),北京人,在读硕士. E-mail: manyi@bifu.edu.cn

<sup>\*</sup> 通讯作者:荆艳萍(1975 -),女(汉族),山西人,副教授. E-mail: ypjing@bjfu.edu.cn

现象,在这个现象中,散射光子的频率较入射光子相 比发生了改变,改变量对应分子内部振动模式的频 率,这一现象在1928年由印度物理学家 Raman C V 发现<sup>[26]</sup>。

激光出现后,1962 年 Woodbury E J 和 Ng W K 偶然发现,在激光器的激发下,使某些介质的散射过 程具有受激性质,这就是受激拉曼散射(stimulated Raman scattering,SRS)<sup>[27]</sup>。

如图1所示,采用两束满足共振条件的激光,即 泵浦光和斯托克斯光进行激发,SRS 过程可在生物 组织样品中发生。当泵浦光和斯托克斯光的频率 差,与特定分子化学键的振动频率( $\Omega_{vib}$ )相等而发 生共振耦合时,分子就会从基态跃迁到它的振动激 发态。光和分子之间发生能量交换,一个泵浦光子 借助分子振动能级的跃迁而转化成为了斯托克斯光 子。泵浦光发生了受激拉曼损失(stimulated Raman loss, SRL),导致强度降低,同时斯托克斯光发生了 受激拉曼增益(stimulated Raman gain, SRG),强度 升高。通过一定的技术手段来检测 SRL 或 SRG,即 可作为成像的衬度来源<sup>[28,29]</sup>。

### 2 SRS 在生物学中的应用

SRS 现象被发现后,直至 2008 年,才被 Freudiger C W 等首次应用于生物学成像<sup>[13]</sup>。2010 年,Saar B G 等进一步改进了信号收集方式,使 SRS 显微术可以应用于背散射信号的采集,并将成像速 率大幅提升至每秒 30 帧图像的帧率,为 SRS 显微 术带来了更广泛的应用前景<sup>[30]</sup>。

#### 2.1 生物分子成像

在复杂的细胞中研究特定种类分子的生物功能,一直都是一件极具挑战的事情。荧光基团的发现使生物分子成像技术向前迈进了一大步,利用实验室中常见的荧光显微镜,可以高精确度地定位并追踪荧光标记的兴趣分子。1994年,绿色荧光蛋白(GFP)的发现,又使荧光显微镜的应用变得更加流行<sup>[4,31]</sup>。然而,由于其在稳定性方面的缺陷和对所研究体系带来的不可回避的干扰,不能满足长时间对活体样本观察的需求<sup>[10,11]</sup>。作为高分辨率、高特异性的非荧光标记成像技术,SRS 显微术对生物样本损伤程度低,成像速度快,在生物分子成像中有着不可忽视的应用价值。

#### 2.1.1 脂质

脂类分子是重要的生命组成物质,但定量地观 察其空间分布一直是一个难题。长久以来,对脂类 分布的成像多依赖于传统的脂溶性染料,如尼罗红 (Nile Red)、油红 O(Oil Red O)、苏丹黑(Sudan Black)等,但在进行标记前,需要先固定细胞,无法 实现活体观察。氟化硼络合二吡咯甲川(BODIPY) 脂质探针可以对活细胞染色,但荧光信号不仅仅指 示脂类分子,带来错误的定位结果<sup>[32,33]</sup>。这些问题 的存在使我们无法实现对脂类分子的活体动态追 踪。SRS 显微术的出现,为脂质分子成像带来了新 的突破。

二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic Acid, EPA)属 于 Ω-3 系列多不饱和脂肪酸,是鱼油的主要成分。 它可以参与消除炎症、降低甘油三酯和胆固醇水平 以及诱导癌细胞凋亡等多种过程[34~36],维持人体的 健康,是人体自身不能合成但又不可缺少的重要营 养素。虽然 EPA 在人体内可以由亚麻酸转化而成, 但反应速率很慢且转化量很少,远远不能满足人体 的需要,因此必须从食物中直接摄取[37],被称为人 体必需脂肪酸。2008年, Freudiger CW等首次利用 SRS 显微术观察到了肺癌细胞对 EPA 的摄取<sup>[13]</sup>。 在拉曼光谱中,2 920 cm<sup>-1</sup>和2 850 cm<sup>-1</sup>分别为 C-H 的反对称和对称伸缩振动吸收峰,来源于所有饱和 及不饱和的脂肪酸。而不饱和脂肪酸具有 = C-H 以 及C=C的伸缩振动,在3015 cm<sup>-1</sup>呈现一个拉曼 带<sup>[38]</sup>,故3 015 cm<sup>-1</sup>的强度可以作为不饱和脂肪酸 的特征,与脂质分子中不饱和键的数量线性相关。 当细胞在含有 EPA 的培养基中培养后, SRS 图像显 示,脂滴(lipid droplets)外围细胞质在2 920 cm<sup>-1</sup>的 信号比3 015 cm<sup>-1</sup>更强,这说明细胞质中更多的脂 肪酸是饱和的。然而脂滴处的光谱在3 015 cm<sup>-1</sup>处 有一个显著的峰,这说明脂滴中的脂肪酸不饱和程 度较高。这些发现预示着 EPA 被细胞摄取后,多富 集在脂滴内,而非其他的细胞器。他们还利用 SRS 显微术,在2845 cm<sup>-1</sup>对小鼠耳部皮肤同一区域的 三个不同深度成像。在4 µm 深度的角质层由多角 细胞组成,作为身体的主要保护层,细胞间隙富集着 脂质:在42 μm 的真皮中可清晰看到富含脂质的皮 脂腺,而腺细胞核缺乏脂质,故呈现黑点状;在105 μm,可以观察到皮下脂肪层<sup>[13]</sup>。这些结果凸显了 SRS 的高分辨率以及优秀的三维分析能力。

肥胖是现代社会的一大病症,肥胖很可能会引 发多种慢性疾病,如Ⅱ型糖尿病,心血管疾病等。 为了更好地了解肥胖及其相关代谢问题,需要深入 分析脂肪在细胞水平和组织水平积累的调控机制, 目前已经绘制了几种单细胞及多细胞生物体的脂肪 储存调控因子的基因组文库<sup>[39~43]</sup>。2011年, Wang M C 等将 SRS 显微术与 Nile Red 和 BODIPY 的染色 结果对比,发现传统染色方法的特异性较差,非脂类 物质也可以产生较强的荧光信号。在对线虫脂滴的 观察中发现, Nile Red 的染色结果与 SRS 信号很大 程度不重叠,而 BODIPY 探针更强烈的信号产生于 肠道颗粒,而非脂滴,这些现象严重导致实验结果的 不准确。他们还将 SRS 显微术与 RNAi 筛选相结 合,在生理条件下寻找脂肪储存调控基因。经过实 验分析,最终从 272 个基因中找到了 9 个关键调控 因子<sup>[32]</sup>。

脂滴在细胞质中通过微管运动<sup>[44]</sup>。在果蝇胚 胎中,脂滴的运动与胚胎发育息息相关。2012年, 普渡大学 Dou W 等应用飞秒受激拉曼散射显微技 术,实时定量地观察了果蝇胚胎中脂滴的动态过程。 他们捕获了胚胎发育进程中的持续图像,并追踪了 单个脂滴的运动轨迹,最终进一步揭示了果蝇胚胎 发育早期周质区域脂滴的运动模式<sup>[25]</sup>。

SRS 显微术使追踪脂类分子的动态活动成为可 能,为解释与脂质相关的生理现象与机制提供了新 的方法。而 SRS 在脂类分子成像领域的优势,也使 其在生物燃料的研究中具有潜在的应用价值。植物 油是生产生物燃料的主要原料,作为营养贮存物质, 以油体(oil bodies)的形式贮藏于油料种子中。种子 萌发时,油体逐渐被降解,为种子供应持续的能量。 最近,作者以油料植物麻疯树(Jatropha carcas L.) 的种子为材料,分别获取了培养24h和48h后种子 胚乳细胞的 SRS 图像。在培养 24 h 的种子中,可见 球形的油体,大小均一而排布紧密,几乎充斥于整个 胚乳细胞(图 2a),而在培养 48 h 以后,油体大小出 现明显的个体差异,排布较为稀疏,不再充满整个细 胞(图 2b)。这些结果印证了前人的实验结论<sup>[45]</sup>, 油体为种子的萌发提供营养,在萌发过程中逐渐 降解。

#### 2.1.2 核酸

核酸是重要的生物大分子化合物,它在细胞内的分布是研究细胞分裂、凋亡等生命活动的重要着眼点。核酸的振动特征峰在指纹区内,这个区域的 谱峰多邻近或交叠。2012年3月,ZhangX等应用 SRS显微技术,对活细胞中的核酸分布进行成像。 在核酸分子中,对称的磷酸二酯键的伸缩振动和嘧 啶碱基的环形呼吸模式叠加,在785 cm<sup>-1</sup>产生谱 峰,而磷酸骨架对称的二氧基团伸缩振动产生1090 cm<sup>-1</sup>的谱峰<sup>[46]</sup>。因此,在785 cm<sup>-1</sup>和1090 cm<sup>-1</sup>, 可以清晰观察到果蝇唾液腺细胞核中多线染色体的 特殊结构。这个方法还可用于鉴定哺乳动物细胞正 处于细胞周期的哪个阶段。以乳腺癌细胞(MCF-7) 为材料观察发现,有些细胞在细胞核区域显示更强 的信号,这很可能是因为他们正处于 DNA 凝集的前 期;有些细胞核区的信号线性排列于一条轴线,这预 示着细胞正处于中期,染色体整齐排列于细胞中央, 为分离到子代细胞中做准备<sup>[47]</sup>。

#### 2.1.3 蛋白质

蛋白质的合成,是分子生物学中心法则的关键 环节,也是细胞应答环境变化的重要手段,它涉及到 大量的生化反应过程,因此受到广泛关注。利用 GFP 只能实现特定蛋白的标记,不能标记整个蛋白 质组:生物正交非规范性氨基酸标记(BONCAT),通 过整合带有反应性化学基团的氨基酸,可以实现在 蛋白质组水平上鉴别新合成的蛋白,但这一方法需 要固定样本及染色后复杂的洗脱步骤;射线自显迹 法以放射性同位素标记氨基酸,但样本需要固定及 曝光;细胞培养氨基酸稳定同位素标记 – 质谱技术 (SILAC-MS)不能提供亚细胞水平空间分布的信息, 而且只能得到某个特定时间点的信息,无法观察动 态过程<sup>[48]</sup>。2013年,美国哥伦比亚大学 Wei L 等利 用 SRS 显微术,结合氘代氨基酸,首次示范了一种 无需固定及染色,就可以使初生蛋白质可视化的成 像技术,并在 HeLa 细胞、HEK293T 细胞以及 N2A 三种细胞中验证了可行性[28]。在 20 种天然氨基酸 中,亮氨酸是一个必不可少的成员,在蛋白质中往往 有着很高的丰度(在哺乳动物细胞中约为9%),有 很多可以被 C-D 替换的 C-H 侧链<sup>[49]</sup>。在 HeLa 细 胞利用经过氘代亮氨酸 - duo合成蛋白质后,拉曼光 谱在2 100 cm<sup>-1</sup>附近出现多个新的谱峰,来源于对 称及非对称的 C-D 伸缩振动。作者选取 C-D 振动 谱峰的中心2133 cm<sup>-1</sup>扫描样品,即可获取到新生 蛋白质组的 SRS 成像。氘标记氨基酸的结合,既可 以把对活细胞的损伤程度降低,同时也保证了 SRS 成像的特异性。此外,将新生蛋白质组图像与由 2940 cm<sup>-1</sup>获得的总蛋白图像对比,还可用于研究 新合成蛋白与总蛋白的定量比例关系<sup>[28]</sup>。

#### 2.1.4 木质素

近几年,有关生物燃料可作为替代能源的研究 与日俱增。生物燃料泛指由生物体组成或萃取的固 体、液体或气体燃料,可以替代由石油制取的汽油和 柴油,是可再生能源开发利用的重要方向。但对于 生物燃料的开发还面临着很多困难,主要原因就是



图 1 SRS 显微术的原理<sup>[28]</sup>。

当泵浦光和斯托克斯光的频率差,与特定分子化学键的振动频率(**Ω**<sub>vib</sub>)相等时,分子从振动基态跃迁至激发态。一个泵浦 光子损失并产生一个斯托克斯光子,作为 SRS 显微术的衬度。

Fig. 1 The principle of SRS microscopy<sup>[28]</sup>.

When the energy difference between the pump beam photon and the Stokes beam photon matches a vibrational frequency  $(\Omega_{vib})$  of a specific functional group, a molecule is efficiently driven from the vibrational ground state to its vibrational excited state, passing through a virtual state. A quanta of such vibrational activation results in a photon in the pump beam being absorpted and a photon in the Stokes beam being emitted, which serves as the contrast for SRS microscopy.



图 2 SRS 图像显示胚乳细胞油体。Bar = 10 μm a:麻疯树种子培养 24 h 后胚乳细胞内油体分布,图像由 CH<sub>2</sub> 特征峰 2 852 cm<sup>-1</sup>获取; b:麻疯树种子培养 48 h 后胚乳细胞内油体分布,图像由 CH<sub>2</sub> 特征峰 2 852 cm<sup>-1</sup>获取。Ob:油体;Pb:蛋白质体 Fig. 2 SRS images of oil bodies in endosperm cells.

a: Embryonic cells from Jatropha carcas L. seed at 24 h after inoculation imaged at 2 852 cm<sup>-1</sup> highlighting oil bodies rich in CH<sub>2</sub>;
 b: SRS CH<sub>2</sub> image of oil bodies in embryonic cells at 48h after inoculation. Ob: Oil body; Pb: Protein body

生物质(biomass)具有"顽抗性"(recalcitrance),不 易被酶解糖化,转化为可用燃料的效率低下<sup>[50]</sup>。木 质素(lignin)结构复杂,性质稳定,不易被酶或微生 物降解,一定程度上导致了生物质的顽抗性<sup>[51]</sup>,然 而纤维素(cellulose)却可以分解为单糖,用于发酵 生产乙醇<sup>[52]</sup>。工业生产中通常要通过一个热化学 预处理,来消除或修改木质素和半纤维素,从而提高 纤维素酶的工作效率<sup>[51~53]</sup>。故此,为了提高整体的 转换效率,人们需要更清晰地了解木质素的水解动 力学特征。2010年 Saar B G 等与美国可再生能源 实验室合作,用现阶段在造纸和木材工业中广泛应 用的亚氯酸钠法去除木质素,并用 SRS 显微术观察 到了这个脱木质素的过程。他们以玉米秸秆的切片 为材料,在获取到初始图像后,以亚氯酸钠试剂处 理。在 1h 的反应过程中,每 8s 就可获取一幅 SRS 显微图像。通过对比反应前后的图像,验证了脱木 质素反应的特异性,木质素的含量有了明显地下降, 而纤维素的含量基本稳定<sup>[54]</sup>。

#### 2.2 组织结构的三维成像

文昌鱼是一种外形像小鱼,长约5cm的脊索动 物。它是低级无脊椎动物进化到高等脊椎动物的中 间过渡动物,有着非常重要的进化地位。脊索存在 于脊索动物中,是动物体中首次出现的中轴骨,但脊 索不同于骨质化的脊椎,它是由富含液泡的脊索细 胞组成,外面围有脊索细胞分泌形成的结缔组织鞘, 即脊索鞘。在脊椎动物中,脊索仅存在于胚胎时期。 2012年,YuZL等应用无标记SRS显微术,对头索 动物文昌鱼(Branchiostroma belcheri)和脊椎动物斑 马鱼(Danio rerio)进行了活体三维成像。SRS 图像 可清晰地辨识到脊索结构在形态上以及化学组分上 的差异。三维重构的脊索图像可以清晰观察到活体 内脊索的精细结构,帮助人们理解其生理功能,这些 是通过切片无法直观获得的结果。作者还利用光谱 拆分的方法,发现从2950 cm<sup>-1</sup>获得的 SRS 信号强 于从2845 cm<sup>-1</sup>捕获的信号,这说明脊索结构最丰 富的组分是蛋白质,而非脂类<sup>[55]</sup>。

尽管 SRS 显微镜有着高化学特异性的三维实 时成像能力,但组织中的不同成分常具有交叠的光 谱特性,所以想要一一辨识他们仍然是不易之事。 为了克服这一困难,2012 年 11 月 Ozeki Y 等应用具 有逐帧波长可调谐性(frame-by-frame wavelength tunability)的 30 帧每秒的 SRS 显微镜,对几种组织 进行无标记成像。以大鼠的肝脏组织、小鼠的小肠 绒毛以及耳部皮肤为材料,作者获取了多个独立成 分(independent components, ICs)图像,再经过独立 成分分析,捕捉到光谱特性中细微的差异,最终融合 得到可以区分多种组分的彩色图像<sup>[56]</sup>。

在植物与农药学的研究中,一直以来面临的主 要挑战就是如何在亚细胞水平上,检测化学组分的 异质性。因此,我们急需一种分析技术,能帮助定量 分析植物组织活体的细胞结构与化学组分,同时还 具有高分辨率以及无损伤性,这必将推动植物科学、 作物科学、生物技术、农药学以及燃料学领域的研究 进展。为了例举 SRS 在这方面的应用价值,2013 年, Mansfield J C 等利用 SRS 显微术分析了角质层 蜡及细胞壁的结构。以玉米和棉花为材料,通过自 发拉曼光谱可以发现,对称的 CH<sub>2</sub> 伸缩振动使得角 质层蜡在 2 840 cm<sup>-1</sup>有一个谱峰。在 2 930 cm<sup>-1</sup>, 则只能观察到细胞壁。所以,如果将从 2 840 cm<sup>-1</sup> 和 2 930 cm<sup>-1</sup>获取到的两张不同信号颜色的图像融 合,就可以得到细胞壁和角质层蜡的综合成像。由 于具有苯基的伸缩振动,木质素在 1 600 cm<sup>-1</sup>有一 个强的谱峰。同理,如果融合分别从 1 600 cm<sup>-1</sup>和 2 930 cm<sup>-1</sup>获取的两张图像,就可以得到细胞壁与 木质素的综合成像,这有利于人们观察维管组织的 结构<sup>[57]</sup>。

#### 2.3 小分子药物成像

在医药学中,药物的运输是学者们关注的重点 之一,准确地运输过程及定位,是药物分子能实现特 定生理功能的重要保障。制作小分子药物的荧光标 签并非容易之事,常用的荧光标签往往比药物分子 大很多,这会影响他们的运输特性,因此,利用传统 荧光标记方法追踪小分子药物面临很多挑战。

2008 年, Freudiger C W 等以二甲基亚砜 (DMSO)和视黄酸(retinoic acid)为例,为我们展示 了 SRS 显微术在追踪非标记药物运输过程中的应 用价值<sup>[13]</sup>。DMSO 是一种皮肤渗透增强剂,在 670 cm<sup>-1</sup>有独立的谱峰。视黄酸是维生素 A 的代谢中 间产物,脊椎动物细胞间信号传导的重要组分之 一<sup>[58]</sup>,在1 570 cm<sup>-1</sup>有明显的谱峰。作为亲水分 子,DMSO 是通过蛋白相穿透皮肤,所以 DMSO 成像 中信号富集于角质层,与脂质呈现互补的定位。相 反,视黄酸作为亲脂分子,通过有着丰富脂质的细胞 间隙来渗透,所以视黄酸成像中信号富集于细胞间 隙<sup>[13]</sup>。

在农业生产中,药物残留问题是随着药物的大量生产和广泛使用而产生的。到目前为止,世界上 化学药物年产量近200万吨,约有1000多种人工合成的化合物被用作杀虫剂、杀菌剂、杀藻剂、除虫剂 和落叶剂等。药物,尤其是有机药物的大量施用,已 经造成了严重的药物污染问题,成为对人体健康的 严重威胁。农药残留,是指施用农药后一部分农药 直接或间接残存于谷物、蔬菜、果品、畜产品、水产 品中以及土壤和水体中的现象。为了证明SRS 在 农药安全检测中的应用潜力,2013年,Mansfield J C 等以 SRS 显微术为分析工具,检测了两种常用杀菌 剂 - 嘧菌酯(azoxystrobin)和百菌清(chlorothalonil) 的积累与吸收情况。和很多农药一样,这两种药物

159

都含有 C=N 基团,因此他们的光谱在静默区(细胞 中天然生物分子在1800 cm<sup>-1</sup>~2800 cm<sup>-1</sup>区间没 有拉曼信号)有一个很强的拉曼谱带,这有利于在 生物组织中检测它们。由于分子组成上的差异, 嘧 菌酯和百菌清分别在 2 225 cm<sup>-1</sup>和 2 234 cm<sup>-1</sup>有显 著谱峰。利用这一差异,作者轻松地在两种药物的 混合 SRS 图像中将他们分辨开来。如果再融合从 2 930 cm<sup>-1</sup>捕捉到的细胞壁成像,就可以观察到叶 表面农药结晶沉积的分布。另外,很多农药在静默 区并不具有拉曼振动,例如草甘膦(Glyphosate)。为 了实现这类药物的化学成像,作者采用了氘标记技 术。以 CD, 替换草甘膦中的 CH,, 使其光谱获得 C-D 振动的特征谱峰,约在 2 200 cm<sup>-1</sup>。由此获得的 氘标记的草甘膦图像,与2930 cm<sup>-1</sup>捕获的细胞壁 图像叠加,可清晰呈现草甘膦在玉米叶片上的残留 分布[57]。

#### 2.4 食品检测

光学显微镜是揭示复杂的组织和生物材料的重要工具。在目前食品科学研究中,荧光显微镜的应 用最为广泛,因其具有高灵敏度和分子特异性。但 是,荧光技术不能脱离染色过程或荧光反应物的使 用,故此,它的可行性以及对检测系统的干扰性还存 在问题。随着非标记显微技术的发展,拉曼散射显 微镜的出现为食品科学的研究提供了新的视野,而 在这其中,与 CARS 显微镜相比,SRS 显微术高灵敏 度、无失真性以及非共振背景低的优势格外突出。 2011年,Roeffaers M B J 等利用 SRS 显微术,对蛋黄 酱、乳酪及豆奶等市售食品中的特定生物分子,如脂 质及蛋白质的分布,进行了高分辨率的成像,向人们 例举了 SRS 在食品成分鉴定中的应用价值<sup>[59]</sup>。

#### 3 展望

相干拉曼散射显微技术的飞速发展,为生命科 学的研究提供了既灵敏又方便的无标记成像手段。 与 CARS 相比,SRS 扬长避短,在灵敏度、化学选择 性、定量分析能力等方面均表现出极大的优势。不 可否认,SRS 是相干拉曼散射显微技术发展的最前 沿,应用 SRS 技术于生物分子、组织结构以及药物 分子和食品的成像中,必将为相关领域的研究打开 新的思路。

虽然 SRS 技术具有上述优势,单一地使用 SRS 仍旧有一定的局限性,与其他技术结合或许可以为 我们解决更多的问题。譬如,与氘标记技术结合,可 以解决在静默区没有特征峰的分子成像问题。2014 年3月,Wei L 等及 Hong S 等先后在 Nature Methods<sup>[60]</sup>和 Angewandte Chemie<sup>[61]</sup>上发表了同一项新技术,即将 SRS 与炔基标记结合,实现对多种生物分子,如核酸、氨基酸、脂类及聚糖的非标记成像,进而确定它们的亚细胞定位。炔基,即 C = C,它具有独特的伸缩振动频率。上述两篇论文阐述技术的突出优势在于,它很好地利用了炔基所具有的理想的化学特性。比起荧光标记,炔基是非常小的标签,只含有两个原子,可以将对生物分子的干扰降至最低。而且,炔基具有生物正交性,不会与其他内源性生物分子发生化学反应<sup>[62]</sup>。这两种技术的结合,为活细胞生物分子成像技术开辟了新途径。相信在不远的未来,SRS 成像能够广泛应用于生命科学的研究,推动相关学科的迅速发展。

#### 参考文献:

- Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250[J]. Anal Biochem, 1977, 79(1): 544 - 552.
- [2] 吴洪娟,周力,李桂芝,等.肥大细胞电镜半薄切片 染色方法[J].电子显微学报,2012,31(5):452-454.
- [3] Haugland R P, Spence M T Z, Johnson I D. Handbook of fluorescent probes and research chemicals [M]. 6<sup>th</sup> ed., Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA. 1996.
- [4] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802 - 805.
- [5] Tsien R Y. The green fluorescent protein [J]. Ann Rev Biochem, 1998, 67(1): 509-544.
- [6] Zhang J, Campbell R E, Ting A Y, et al. Creating new fluorescent probes for cell biology[J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2002, 3(12): 906 918.
- [7] Xie X S, Trautman J K. Optical studies of single molecules at room temperature [J]. Annu Rev Phys Chem, 1998, 49(1): 441-480.
- [8] Moerner W E, Orrit M. Illuminating single molecules in condensed matter [J]. Science, 1999, 283 (5408): 1670-1676.
- [9] Fukumoto S, Fujimoto T. Deformation of lipid droplets in fixed samples [J]. Histochem Cell Biol, 2002, 118 (5): 423-428.
- [10] Sinnecker D, Voigt P, Hellwig N, et al. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins
  [J]. Biochem, 2005, 44(18): 7085 7094.
- [11] Shaner N C, Lin M Z, McKeown M R, et al. Improving

the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins [J]. Nat Methods, 2008, 5(6): 545-551.

- [12] Yen K, Le T T, Bansal A, et al. A comparative study of fat storage quantitation in nematode Caenorhabditis elegans using label and label-free methods [J]. PloS One, 2010, 5(9): e12810.
- [13] Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. Science, 2008, 322 (5909): 1857 - 1861.
- [14] Wright A J, Poland S P, Girkin J M, et al. Adaptive optics for enhanced signal in CARS microscopy[J]. Opt Express, 2007, 15(26): 18209 - 18219.
- [15] Gauderon R, Lukins P B, Sheppard C J R. Threedimensional second-harmonic generation imaging with femtosecond laser pulses[J]. Opt Lett, 1998, 23(15): 1209 - 1211.
- Barad Y, Eisenberg H, Horowitz M, et al. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation
  [J]. Appl Phys Lett, 1997, 70(8): 922 924.
- [17] Yelin D, Silberberg Y. Laser scanning third-harmonicgeneration microscopy in biology [J]. Opt Express, 1999, 5(8): 169-175.
- [18] Miller L M, Smith G D, Carr G L. Synchrotron-based biological microspectroscopy: From the mid-infrared through the far-infrared regimes [J]. J Biol Phys, 2003, 29(2-3): 219-230.
- [19] Shafer-Peltier K E, Haka A S, Fitzmaurice M, et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: Implications for breast cancer diagnosis in vivo [J]. J Raman Spectrosc, 2002, 33(7): 552 - 563.
- [20] Cheng J X, Xie X S. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications[J]. J Phy Chem B, 2004, 108(3): 827 - 840.
- [21] Ganikhanov F, Evans C L, Saar B G, et al. Highsensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy[J]. Opt Lett, 2006, 31 (12): 1872 – 1874.
- [22] Evans C L, Xie X S. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Chemical imaging for biology and medicine[J]. Annu Rev Phys Chem, 2008, 1: 883 – 909.
- [23] Shen Y R. The Principles of Nonlinear Optics [M]. New York: Wiley-Interscience, 1984:575.
- [24] Evans C L, Potma E O, Xie X S. Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: Determination

of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility  $\chi^{(3)}$  for vibrational microscopy [J]. Opt Lett, 2004, 29(24): 2923 – 2925.

- [25] Dou W, Zhang D, Jung Y, et al. Label-free imaging of lipid-droplet intracellular motion in early Drosophila embryos using femtosecond-stimulated Raman loss microscopy[J]. Biophys J, 2012, 102(7): 1666 – 1675.
- [26] Raman C V. A change of wave-length in light scattering
  [J]. Nature, 1928, 121(3051): 619 619.
- [27] Woodbury E J, Ng W K. Ruby laser operation in the near IR[J]. Proc IRE, 1962, 50: 2367.
- [28] Wei L, Yu Y, Shen Y, et al. Vibrational imaging of newly synthesized proteins in live cells by stimulated Raman scattering microscopy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(28): 11226 - 11231.
- [29] 陈涛, 虞之龙, 张先念, 等. 相干拉曼散射显微术 [J]. 中国科学: 化学, 2012, 42(1): 1-16.
- [30] Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Videorate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering [J]. Science, 2010, 330 (6009): 1368 – 1370.
- [31] 范路生,薛轶群,王晓华,等.隐失波荧光显微镜及 其在植物细胞生物学中的应用[J].电子显微学报, 2011,30(1):48-56.
- [32] Wang M C, Min W, Freudiger C W, et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy [J]. Nat Methods, 2011, 8(2): 135 - 138.
- [33] Ohsaki Y, Shinohara Y, Suzuki M, et al. A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for fluorescence microscopy [J]. Histochem Cell Biol, 2010, 133(4): 477-480.
- [34] Camuesco D, Gálvez J, Nieto A, et al. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis [J]. J Nutr, 2005, 135(4): 687-694.
- [35] Rustan A C, Nossen J O, Osmundsen H, et al. Eicosapentaenoic acid inhibits cholesterol esterification in cultured parenchymal cells and isolated microsomes from rat liver[J]. J Biol Chem, 1988, 263(17): 8126 -8132.
- [36] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, et al. Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP - 470 on human breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Tr, 1999, 55(2): 147 - 158.
- [37] Kang J X. From fat to fat-1: A tale of omega-3 fatty acids[J]. J Membrane Biol, 2005, 206(2): 165 – 172.

- [38] Heinrich C, Hofer A, Ritsch A, et al. Selective imaging of saturated and unsaturated lipids by wide-field CARS-microscopy [J]. Opt Express, 2008, 16(4): 2699-2708.
- [39] Fei W, Shui G, Gaeta B, et al. Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast[J]. J Cell Biol, 2008, 180(3): 473 -482.
- [40] Guo Y, Walther T C, Rao M, et al. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization[J]. Nature, 2008, 453(7195): 657 – 661.
- [41] Pospisilik J A, Schramek D, Schnidar H, et al. Drosophila genome-wide obesity screen reveals Hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate [J]. Cell, 2010, 140(1): 148 - 160.
- [42] Szymanski K M, Binns D, Bartz R, et al. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(52): 20890 - 20895.
- [43] Ashrafi K, Chang F Y, Watts J L, et al. Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes[J]. Nature, 2003, 421(6920): 268 – 272.
- [44] Martin S, Parton R G. Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle[J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2006, 7(5): 373-378.
- [45] Thompson J E, Froese C D, Madey E, et al. Lipid metabolism during plant senescence [J]. Prog Lipid Res, 1998, 37(2-3): 119-141.
- [46] Goodwin D C, Brahms J. Form of DNA and the nature of interactions with proteins in chromatin [J]. Nucleic Acids Res, 1978, 5(3): 835-850.
- [47] Zhang X, Roeffaers M B J, Basu S, et al. Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy [J]. ChemPhysChem, 2012, 13(4): 1054 - 1059.
- [48] Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics[J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(5): 376 - 386.
- [49] Okayasu T, Ikeda M, Akimoto K, et al. The amino acid composition of mammalian and bacterial cells [J]. Amino Acids, 1997, 13(3-4): 379-391.
- [50] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of

promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Tech, 2005, 96(6): 673 – 686.

- [51] Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production [J]. Science, 2007, 315 (5813): 804 - 807.
- [52] Mousdale D M. Biofuels: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development[M]. CRC press, 2008.
- [53] Kumar P, Barrett D M, Delwiche M J, et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production [J]. Ind Eng Chem Res, 2009, 48(8): 3713 - 3729.
- [54] Saar B G, Zeng Y, Freudiger C W, et al. Label-free, real-time monitoring of biomass processing with stimulated Raman scattering microscopy [J]. Angew Chem Int Edit, 2010, 49(32): 5476 - 5479.
- [55] Yu Z L, Chen T, Zhang X N, et al. Label-free chemical imaging in vivo: Three-dimensional noninvasive microscopic observation of amphioxus notochord through stimulated Raman scattering (SRS) [J]. Chem Sci, 2012, 3(8): 2646 - 2654.
- [56] Ozeki Y, Umemura W, Otsuka Y, et al. High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering [J]. Nat Photonics, 2012, 6(12): 845-851.
- [57] Mansfield J C, Littlejohn G R, Seymour M P, et al. Label-free chemically specific imaging in planta with stimulated Raman scattering microscopy [J]. Anal Chem, 2013, 85(10): 5055-5063.
- [58] Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis [J]. Cell, 2008, 134(6): 921 – 931.
- [59] Roeffaers M B J, Zhang X, Freudiger C W, et al. Label-free imaging of biomolecules in food products using stimulated Raman microscopy[J]. J Biomed Opt, 2011, 16(2): 1-6.
- [60] Wei L, Hu F, Shen Y, et al. Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering[J]. Nat Methods, 2014, 11(4): 410-412.
- [61] Hong S, Chen T, Zhu Y, et al. Live-cell stimulated Raman scattering imaging of alkyne-tagged biomolecules
   [J]. Angew Chem Int Ed, 2014, 126(23): 5937 – 5941.
- [62] Prescher J A, Bertozzi C R. Chemistry in living systems[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(1): 13 21.

## Stimulated Raman scattering microscopy and its application in biological sciences

MAN Yi<sup>1</sup>, LI Ang<sup>2</sup>, CAO De-chang<sup>1</sup>, LIN Jin-xing<sup>1</sup>, HUANG Yan-yi<sup>2</sup>, JING Yan-ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

2. Biodynamic Optical Imaging Center and College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract**: Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy offers a label-free live cell imaging via detecting specific vibration of chemical bonds within particular molecules. Because of its high specificity, SRS is a promising imaging method for *in vivo* studies. This review mainly focuses on the principle of SRS Microscopy and its application in biological sciences, especially in the imaging of biological molecules such as lipids, nucleic acids and proteins, as well as tissues, agricultural chemicals and foods. **Keywords**: stimulated Raman scattering microscopy; biology; label-free imaging



## 受激拉曼散射显微技术在生物科学中的应用

作者:	满奕, 李昂, 曹德昌, 林金星, 黄岩谊, 荆艳萍, <u>MAN Yi</u> , <u>LI Ang</u> , <u>CAO Dechang</u>
	, LIN Jinxing, HUANG Yanyi, JING Yanping
作者单位:	满奕,曹德昌,林金星,荆艳萍,MAN Yi,CAO Dechang,LIN Jinxing,JING Yanping(北京林业大
	学生物科学与技术学院,北京,100083), 李昂,黄岩谊,LI Ang,HUANG Yanyi(北京大学生物
	动态光学成像中心 北京大学工学院,北京,100871)
刊名:	电子显微学报 <mark>ISTIC PKU</mark>
英文刊名:	Journal of Chinese Electron Microscopy Society
年,卷(期):	2015 (2)

引用本文格式: <u>满奕</u>.<u>李昂</u>.<u>曹德昌</u>.<u>林金星</u>.黄岩谊.<u>荆艳萍</u>.<u>MAN Yi</u>.<u>LI Ang</u>.<u>CAO Dechang</u>.<u>LIN Jinxing</u>.<u>HUANG</u> Yanyi, JING Yanping</u> 受激拉曼散射显微技术在生物科学中的应用[期刊论文]-电子显微学报 2015(2)