

酿酒酵母孢子萌发的激光镊子拉曼光谱研究*

Study on *Saccharomyces cerevisiae* Spore Germination Using Laser Tweezers Raman Spectroscopy

孙美娟^{1,2}, 蒋玉凌², 陶站华^{2**}

SUN Mei-juan^{1,2}, JIANG Yu-ling², TAO Zhan-hua²

(1. 百色学院物理与电信工程系, 广西百色 533000; 2. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007)

(1. Department of Physics and Telecommunication Engineering of Baise University, Baise, Guangxi, 533000, China; 2. Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】在生理状态下利用激光镊子拉曼光谱系统对单个酿酒酵母孢子萌发过程进行实时监测, 探讨掩盖在群体平均信息下的个体生命信息。【方法】将葡萄糖溶液加入酿酒酵母孢子悬液中诱导孢子萌发, 在孢子萌发过程中每隔 30 min 取样并利用激光镊子拉曼光谱系统测定单个酵母孢子的拉曼光谱。【结果】单细胞实时平均拉曼光谱可显示孢子萌发过程中细胞内生物分子的变化: 萌发期内分别归属于 DNA、蛋白质的 722 cm^{-1} , 1006 cm^{-1} 峰的峰高基本不变, 随后在生长期上升明显, 说明生长期胞内开始大量复制 DNA, 并合成蛋白质; 归属脂类的 1751 cm^{-1} 峰的减弱趋势明显, 可能是胞内脂类物质消耗造成的。整个萌发生长过程中, 源自葡萄糖和海藻糖的 858 cm^{-1} , 908 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} 等峰强度先下降后上升, 表明在适宜的生长条件下, 海藻糖可能转化为单糖被细胞吸收利用, 当营养物质逐渐被消耗时, 细胞会再次累积海藻糖以抵抗外界不利条件。【结论】激光镊子拉曼光谱技术可反映胞内生物大分子的活动规律, 获知单个酵母孢子萌发过程中物质变化的丰富信息, 是探索单个活细胞实时生化变化的有效工具。

关键词: 激光镊子拉曼光谱 实时监测 孢子萌发

中图分类号: O657.37 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2015)02-0125-05

Abstract:【Objective】The germination process of *Saccharomyces cerevisiae* spores under physiological conditions is monitored real-time using laser tweezers Raman spectroscopy to obtain information on metabolic activity of individual spores which could be masked by bulk measurement.【Methods】The germination was initiated by addition of glucose solution to spore suspension and samples were harvested at a 30 min interval during germination process. Raman spectra of individual spores at different time points were recorded.【Results】The Raman spectra of the single spore reflected the change in bio-molecule content during the process of spore germination: The intensities of band at 722 cm^{-1} and 1006 cm^{-1} (assigned to DNA and protein, respectively) did not change significantly during germination period, whereas they increased dramatically during the outgrowth period. This indicated the DNA replication and protein biosynthesis occurred during outgrowth period. The intensities

收稿日期: 2014-11-10

修回日期: 2014-12-05

作者简介: 孙美娟(1988-), 女, 硕士, 主要从事光谱学和微生物培养方面的研究。

* 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118193)和百色学院一般项目(2013KB09)资助。

** 通讯作者: 陶站华(1971-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物光子学方面研究, E-mail: taozhanhua@163.com。

of 1751 cm^{-1} band (associated with lipids) decreased substantially, which might be as the result of consumption of lipids. During the whole germination and outgrowth process, the intensities of bands at 858 cm^{-1} , 908 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} and 1118 cm^{-1} originated from glucose and trehalose decreased at first and then increased. This phenomenon suggested that under the favorable growing conditions, trehalose may be converted into monosaccharide and then be utilized. When nutritional materials are gradually consumed, the cells would accumulate trehalose again in order to resist adverse condition. **【Conclusion】**The experimental results show that the LTRS technique can reveal the metabolic activity of bio-molecules and provides rich information on the change in compound content within single spores during the germination process. Therefore, the LTRS can serve as a valuable tool for the real time monitoring of dynamic changes in bio-molecules at single cell level.

Key words: laser tweezers Raman spectroscopy, real-time monitoring, spore germination
DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150126.012

0 引言

【研究意义】酿酒酵母孢子形成是指营养细胞经过减数分裂形成子囊孢子的过程,是酵母生活史的一个阶段,这时酵母由二倍体变成单倍体,从而完成有性繁殖的准备工作。酵母的生孢过程一般是在氮源和发酵碳源缺乏,同时又存在非发酵碳源(如乙酸盐)的条件下发生。休眠状态下的孢子在 4°C 的条件下可存活数月或数年。而一旦接触葡萄糖和其他必需营养成分,孢子会重新进入有丝分裂和营养细胞生长,这一过程就是孢子的萌发。酵母孢子的萌发过程会伴随一系列生物大分子的变化,揭示这些生物大分子的动态变化规律具有一定的学术意义。**【前人研究进展】**研究孢子萌发过程中生物分子变化的传统方法涉及细胞破碎、成分提取及核酸、蛋白质和脂类等的体外定量^[1~3]。这些常规方法工作量大,样品处理复杂,而且会破坏细胞和胞内大分子物质活性,无法实现对萌发过程的实时动态监测。**【本研究切入点】**光学技术具有快速、无损和高效的特点,在化学以及生物学分析领域得到广泛应用^[4,5]。激光镊子拉曼光谱技术是将光学操控与显微拉曼光谱相结合用于单细胞探测的新技术,可以在接近生理状态下获得单个活细胞或细胞器的拉曼光谱,而根据拉曼光谱特征峰的位置、线宽和强度可以分析样品的分子组成及结构信息,从而获知掩盖在群体平均信息下的个体生命信息^[6,7]。而且利用激光镊子拉曼光谱技术研究单个酿酒酵母孢子萌发过程未曾有报道。**【拟解决的关键问题】**用激光镊子拉曼光谱系统测酵母孢子萌发的光谱变化,探索萌发过程中生物大分子的活动规律,获取实时的生化变化信息。

1 材料与方法

1.1 激光镊子拉曼光谱系统

激光光镊拉曼光谱系统如文献[8,9]所述,把一束 780 nm 的半导体激光导入倒置生物显微镜(TE2000U, Nikon),经油浸物镜($100\times$, N. A. = 1.3)聚焦形成一个单光束势阱用以囚禁目标,同时用束光激发被俘获目标粒子的拉曼散射。再把拉曼散射光聚焦进光谱仪(SpectraPro2300i, Acton)的输入狭缝,然后用光谱仪耦合到电荷耦合器件 CCD(Spec-10, Princeton Instruments)上,并用液氮冷却 CCD 温度至 -120°C 。

1.2 孢子的培养与制备

实验对象为广西科学院生物中心筛选的 $6^{\#}$ 酵母菌株。将生长于 YM 斜面上的 $6^{\#}$ 酵母菌接种于 YM 液体培养基中,在 28°C , 200 r/min 摇床预培养 18 h ;再以 10% 接种量 2 次转接至 YM 液体培养基,在相同的条件下培养至对数生长期;培养物经离心、PB 漂洗,加入生孢培养基,在上述条件下培养 6 d 左右,直到生成孢子;将生孢培养物离心收集, PB 漂洗后,悬浮于蜗牛酶溶液中, 33°C 水浴处理 6 h ,加入终浓度为 1% 的 Tween 80,并装入 0.5 mm 玻璃珠低速振荡 2 h ,静置取上清液低速离心、漂洗,最后用含有 Tween 80 的 PB 重悬孢子,置 4°C 冰箱保存待用。

1.3 孢子萌发

现配 YM 培养基:酵母提取物+蛋白胨+麦芽糖 9 份体积,葡萄糖 1 份体积,分开配装。取 1.2 g 制备的孢子悬浮液,离心取沉积物即孢子,置于 YM 中,在镜下调整至适宜观察光谱的浓度, 30°C 孵育 30 min ,同时将葡萄糖溶液置于 30°C 培养箱,然后将葡萄糖加入,置于 28°C , 200 r/min 摇床培养,每 15 min 取样 2 mL ,其中 1 mL 样品立即 4°C 离心, PB 洗涤

去除培养基,重悬置于 4℃ 冰箱短暂保存用于拉曼光谱检测,另 1 mL 用于测量 OD₆₀₀ 值。

1.4 拉曼光谱测量与数据处理

用光镊捕获单个孢子,先提升到样品槽上方 10 μm 的焦点附近,以 15 mW 激发功率和 30 s 曝光时间采集拉曼光谱,每种样品各收集 40 个孢子的光谱,5 个背景溶液的光谱。原始光谱扣除背景,基线校正以后得到单个细胞的拉曼光谱,在此基础上,统计每组细胞样品的平均光谱,定性分析不同组间光谱差异,然后利用 Matlab 7.1 软件编写程序对孢子萌发过程物质变化做定量分析。

2 结果与分析

2.1 形态学确定

6[#] 酵母孢子的不同形态(萌发和生长)的分布通过折光率进行说明。一般孢子溶液中有 95% 孢子具有折光性,在含糖的培养基中孵育 30 min 后,仅 45% 的孢子仍然有折光性,其它孢子出现半折光或完全黑暗。而萌发率在 30 min 时达 55%,60 min 时已接近 85%,90 min 时达 95%,120 min 时达到 100%。由图 1 可知,孢子在萌发过程前期表面会变得粗糙不平,但是体积形态变化极其微小;在 90 min 后,体积略有增大,在 150 min 开始大量出芽。而且在 0~90 min,细胞群体的吸光度快速降低,接近 15%;在 120~240 min 吸光度持续增加(图 2)。结合图 1 与图 2 反映的信息,可将孢子萌发过程以 90 min 为分界点,分为萌发期和生长期两个过程,需结合具体情况分别处理其两个过程光谱,然后做进一步的研究和讨论。

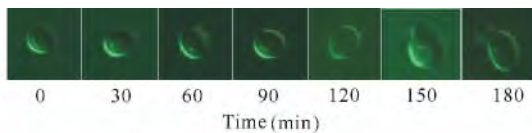


图 1 6[#] 酵母孢子萌发过程中形态变化

Fig. 1 Morphological change over the germination course of 6[#] yeast

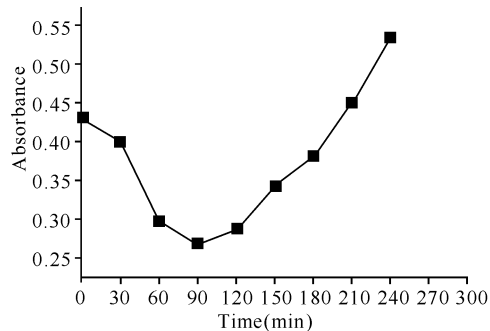


图 2 孢子萌发吸光度变化

Fig. 2 Changes in absorbance of suspension

2.2 不同萌发阶段孢子的拉曼光谱

从图 3 可以看出,源自蛋白质的 1006 cm⁻¹, 1264 cm⁻¹, 1608 cm⁻¹, 1657 cm⁻¹ 峰,源自脂类物质的 1304 cm⁻¹, 1751 cm⁻¹ 峰和代表核酸的 722 cm⁻¹ 峰的信号强度在孢子萌发过程中基本不变。其中各峰所代表物质的归属见表 1。

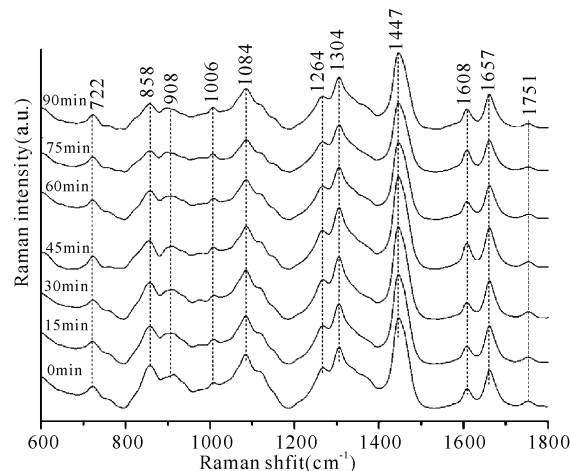


图 3 孢子萌发的平均拉曼光谱

Fig. 3 Raman spectra of germinating spores monitored every 15 min

表 1 酵母孢子及萌发后的主要拉曼谱峰归属

Table 1 Peak assignment of the Raman spectra of 6[#] yeast

峰位置 Peak positions(cm ⁻¹)	归属 Peak assignments
722	腺嘌呤 Adenine
783	DNA O-P-O 伸缩振动, U、C、T 环呼吸振动 DNA O-P-O str.; U、C、T ring br.
817	RNA O-P-O 伸缩振动 RNA O-P-O str.
852	葡萄糖 C-O, C-C, C-H 弯曲振动 Glucose C-O, C-C, C-H bend
1006	苯丙氨酸苯环呼吸峰 Phe ring br.
1050~1150	糖类、蛋白质及脂类 C-C 伸缩振动 Carbohydrate, protein, and lipid C-C str.
1301	脂类 CH ₂ 扭曲振动 Lipid CH ₂ twist
1608	酪氨酸和苯丙氨酸 C=C 键振动 Tyr, Trp C=C
1662	蛋白质酰胺 I 带 Protein Amide I
1751	脂类 Lipids

由于我们采集拉曼光谱的光斑大小固定不变,而生长阶段细胞体积增大明显,局部细胞内物质的浓度可能会降低,可能导致激光镊子拉曼系统检测结果不准确。文献[10,11]的研究表明 1447 cm⁻¹ 峰代表蛋白质、脂质、糖类的 CH 变形振动,其强度在细胞各种代谢条件下基本不变,因而采用该峰归一化可有效减小因细胞体积变化造成的影响。生长阶段 6[#] 酵母孢子的平均拉曼光谱以 1447 cm⁻¹ 归一化后的结果见图 4(a)。而从未经归一化处理的 0~165 min 的 1447 cm⁻¹ 峰高变化趋势(图 4b)可以看出,加入葡萄糖

糖 0~90 min 后 1447 cm^{-1} 峰高几乎没有变化, 90~165 min 逐渐降低。在生长阶段 1447 cm^{-1} 峰高降低是由于细胞体积变化引起的, 这进一步证实了进行光谱数据归一化处理的必要性。另外, 孢子的拉曼光谱在萌发 150 min 发生明显变化: 1264 cm^{-1} , 1304 cm^{-1} 峰变宽, 出现 785 cm^{-1} , 817 cm^{-1} 和 1581 cm^{-1} 峰, 产生上述现象的原因可能是孢子在出芽后, 细胞生长状态明显不同, 胞内累积某些物质的量有所差异所致。

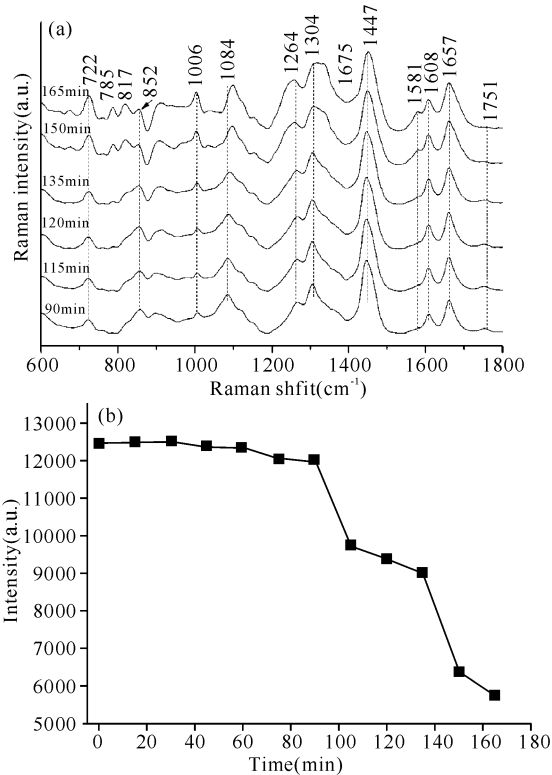


图 4 孢子萌发归一化的平均拉曼光谱(a)和孢子萌发原始光谱中 1447 cm^{-1} 峰的变化(b)

Fig. 4 (a) Normalized Raman spectra of germinating spores monitored every 15 min; (b) Change in 1447 cm^{-1} peak of raw Raman spectra of 6# cells

2.3 生物分子变化分析

结合图 3 和图 4 中孢子的平均拉曼光谱数据分别计算各物质的特征峰强度变化, 孢子萌发全过程生物大分子变化见图 5。由图 5a 可见, 722 cm^{-1} , 1006 cm^{-1} 峰变化曲线几乎平行, 在萌发前 2 h, DNA、蛋白质相关峰变化缓慢, 随后开始上升, 且变化明显, 说明在营养物质充足的条件下, 孢子开始萌发, 萌发期内生物大分子含量基本不变, 生长期胞内开始复制大量 DNA, 并合成蛋白质。再结合图 1 可发现, 785 cm^{-1} 峰是在出芽后开始出现, 说明 DNA 含量大幅增加。由图 5b 可见, 1751 cm^{-1} 峰的减弱趋势明显, 可能是

胞内脂类物质消耗造成的。

另外, 分析孢子萌发过程中糖类物质变化, 发现随着孢子的萌发, 856 cm^{-1} , 916 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} , 1121 cm^{-1} 信号缓慢减弱, 对比海藻糖的拉曼光谱峰位置(图 6)可知, 858 cm^{-1} , 908 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} 等峰与溶液状态的海藻糖的主要峰接近, 推断原因是海藻糖以糖颗粒或无定形状态存在于细胞中。而出芽生长之后这些信号开始不同程度增加(图 7), 说明在适宜的生长条件下, 海藻糖可能转化为葡萄糖被细胞吸收利用; 而当营养物质逐渐被消耗时, 细胞会再次累积海藻糖以抵抗外界不利条件。

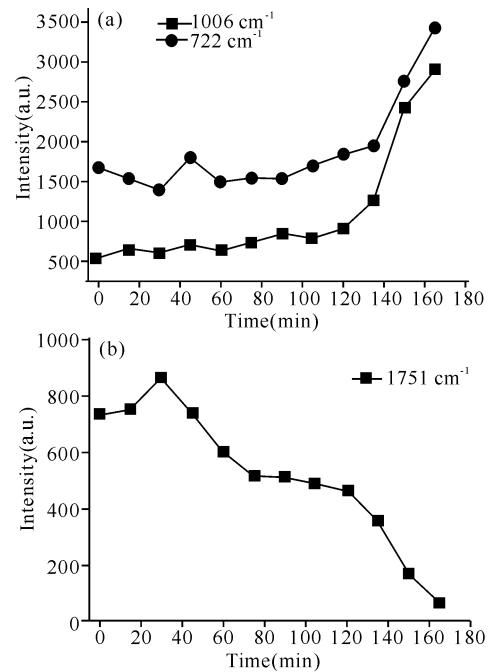


图 5 6# 孢子萌发过程拉曼光谱峰强度的变化
Fig. 5 Changes in intensities of the Raman peaks from spores over the course of germination

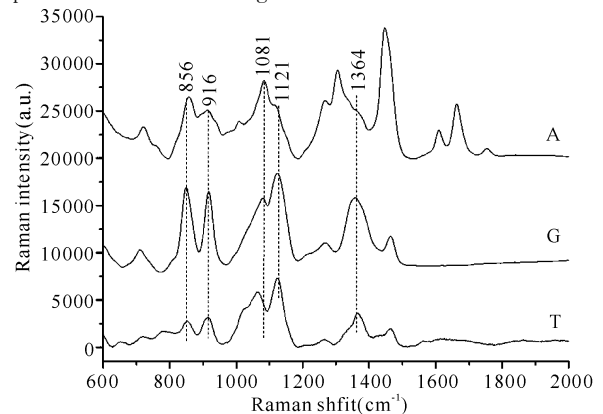


图 6 6# 酵母孢子(A)、葡萄糖(G)和海藻糖(T)溶液的拉曼光谱

Fig. 6 Raman peaks of spores(A), glucose(G) and trehalose(T) solution

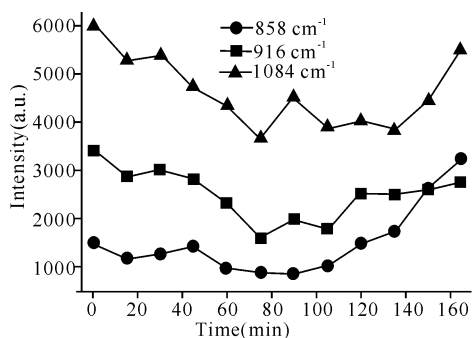


图7 孢子萌发过程中对应海藻糖拉曼峰值变化
Fig. 7 Changes in the trehalose Raman peaks

3 结论

与传统的化学分析手段相比,激光镊子拉曼光谱技术用于研究溶液中的单个细胞或细胞器具有明显的优势。本实验单细胞实时平均拉曼光谱结果显示孢子萌发过程中细胞内累积物质的变化:萌发期内归属于DNA、蛋白质的 722 cm^{-1} 和 1006 cm^{-1} 峰的峰高基本不变,随后生长期上升明显,说明生长期胞内细胞开始复制大量DNA,并合成蛋白质;归属于脂类的 1751 cm^{-1} 峰减弱趋势明显,可能是胞内脂类物质消耗造成的。整个萌发生长过程中,源自葡萄糖或海藻糖的 858 cm^{-1} , 908 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} 等峰强度先下降后上升,表明在适宜的生长条件下,海藻糖可能转化为葡萄糖被细胞吸收利用,当营养物质逐渐被消耗掉时,细胞会再次累积海藻糖以抵抗外界条件。研究结果显示,利用激光镊子拉曼光谱技术可实时跟踪酵母孢子萌发生化动力学过程,反映胞内生物大分子的活动规律,获知单个酵母孢子萌发过程中物质变化的丰富信息。说明此技术是探索单个活细胞实时生化变化的实用工具,为基础微生物学领域提供新的研究方法。

参考文献:

[1] Rousseau P, Halvorson H O, Bulla L A, et al. Germination and outgrowth of single spores of *Saccharomyces cerevisiae* viewed by scanning electron and phase-contrast microscopy[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 109 (3):1232-1238.
[2] Kono K, Matsunaga R, Hirata A, et al. Involvement of actin and polarisome in morphological change during spore germination of *Saccharomyces cerevisiae* yeast[J]. Yeast, 2005, 22:129-139.

[3] Rousseau P, Halvorson H O. Macromolecular synthesis during the germination of *Saccharomyces cerevisiae* spores[J]. Journal of Bacteriology, 1973, 113 (3): 1289-1295.
[4] 陶站华,姚辉璐,王桂文,等. 利用拉曼光谱分析顺铂诱导的胃癌细胞凋亡[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29 (9):2441-2445.
Tao Z H, Yao H L, Wang G W, et al. Using Raman spectroscopy to analyze apoptosis of gastric cancer cells induced by cisplatin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(9):2441-2445.
[5] Tao Z H, Wang G W, Xu X D, et al. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Fems Microbiol Lett, 2010, 314 (2011):42-48.
[6] 陈秀丽,王桂文,陶站华,等. 基于PCA和BP网络的地中海贫血红细胞拉曼光谱判别[J]. 中国激光, 2009, 10: 2448-2454.
Chen X L, Wang G W, Tao Z H, et al. Raman spectral discrimination of thalassemia erythrocytes based on PAC arithmetic and BP network model[J]. Chinese Journal of Lasers, 2009, 10:2448-2454.
[7] 程琴,董荣,黄大林,等. 枯草芽孢杆菌萌发后孢子响应甲醛胁迫过程的拉曼光谱研究[J]. 中国激光, 2012, 10: 236-242.
Chen Q, Dong R, Huang D L, et al. Raman spectrum of germinated spores of *Bacillus subtilis* in response to formaldehyde stress[J]. Chinese Journal of Lasers, 2012, 10:236-242.
[8] Xie C, Mace J, Dinno M A, et al. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Anal Chem, 2005, 77 (14):4390-4397.
[9] Xie C, Chen D, Li Y Q. Sorting and identification of single living micro-organisms with optical Raman tweezers[J]. Opt Lett, 2005, 30(14):1800-1802.
[10] Notingher I, Selvakumaran J, Larry L. Hensch new detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20:780-789.
[11] Verrier S, Notingher I, Polak J M. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy[J]. Biopolymers, 2004, 74:157-162.

(责任编辑:尹 闯)