

单个活态细胞显微激光拉曼散射光谱处理方法研究

康立丽¹, 黄耀熊^{2*}, 吴正洁²

1. 南方医科大学生物医学工程学院医学工程系, 广东 广州 510515
2. 暨南大学生物医学工程研究所, 广东 广州 510632

摘要 单细胞激光共焦拉曼散射光谱由于受扫描条件、样品自身浓度以及样品分子组成等因素的影响, 其谱线信噪比较低、荧光背景有时较明显从而导致谱线质量较差。本文主要针对活态单细胞的拉曼光谱进行谱线预处理技术研究用以提高谱线的信噪比、灵敏度及降低荧光背景干扰。首先是宇宙射线的去除, 之后进行谱线的归类, 这是提高谱线灵敏度的关键步骤; 其次是进行滤波及样品平均提高谱线的信噪比; 最后是比较谱线本底降低荧光背景对定量分析的干扰。经过上述系列处理后单细胞拉曼谱线可使一些变化小、但灵敏的谱线表现出来, 使其能更好地反映细胞内分子及结构信息等的变化。

关键词 显微激光共焦拉曼光谱; 单细胞; 归类; 信噪比; 滤波

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)02-0408-04

引言

拉曼光谱提供了样品分子伸缩振动、弯曲振动模式的信息, 从而可测定被测样品的分子结构及含量等信息^[1-6]。共焦激光拉曼散射显微技术可对单个活细胞进行基本无扰、原位的测定, 且可避开水背景干扰, 故相比起荧光光谱与红外光谱等技术, 在研究测定活细胞尤其是连续监测单个活细胞上有无可比拟的突出优点。

大多细胞内常有着大量丰富的生物大分子, 这些生物大分子不仅成份复杂而且构型复杂。如何通过拉曼光谱反映和提取有效的信息用于反映细胞内生物大分子的构型含量及其变化是利用拉曼光谱技术进行活态单细胞研究的主要工作之一。但在测定提取单细胞拉曼光谱时, 由于细胞内有关物质分子的浓度、分子类型等因素, 常会碰到的问题是测得的拉曼光谱信噪比不高, 难以从中获得有关物质分子明显的谱峰。要改善这种情况须提高拉曼光谱的信噪比, 惯用方法是提高激光功率、增加曝光扫描时间、增加平均次数等方法。可这些方法对于活态单细胞并非都适用, 因为这些方法会增加细胞受扰以至受损的风险。为了解决这一问题, 本文工作研究发展了关于活态细胞拉曼光谱进行谱线预处理的技术, 针对单细胞拉曼光谱进行系列处理, 提取敏感、微弱信息用在分子水平活态、原位、无扰地研究单细胞。

1 方法

1.1 宇宙射线的消除

扫描过程中, 由于宇宙射线的干扰常常会在一些位置出现强度异常高的、锐利的谱线^[1,7]。利用设备提供的消除功能或者简单的点替换功能即可消除宇宙射线。

由于宇宙射线的出现没有明显规律, 所以在使用大积分曝光时间设置时, 偶然出现的宇宙射线很可能在长时间接收散射光子的过程中被弱化, 甚至不易辨认。为了减少宇宙射线对谱线的干扰, 在小曝光积分时间条件下采集大量的样品数据对获得的谱线进行宇宙射线的剔除是一个好的选择。

1.2 谱线的分析、分类

由于生物样品不仅分子种类信息丰富, 而且分子构型的信息也很丰富。当拉曼谱线对某些基团的分子构型敏感时, 直接进行谱线的平均处理, 会掩盖谱线的精细结构, 即不能很好地反映精细的分子构型变化的动态信息, 不能体现拉曼光谱指纹谱的特点。因此对每次扫描得到的拉曼谱线进行单独分析之后的分类工作非常关键。

1.3 平均处理

为了提高谱线质量, 可对大量的谱线采取平均处理的方法提高谱线的信噪比。多数研究者都会基于统计考虑和高信号的要求采用平均的方法。对拉曼谱线的平均处理必须是在

收稿日期: 2010-04-23, 修订日期: 2010-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30940019, 60377043)资助

作者简介: 康立丽, 女, 1971年生, 南方医科大学生物医学工程学院

e-mail: kllysz@fimmu.com

* 通讯联系人 e-mail: tyxhuang@jnu.edu.cn

分类后的基础上进行, 这样信噪比的提高才有意义。

1.4 平滑处理

在谱线的信噪比较低时, 谱线的外形也比较毛糙, 因此对平均后的拉曼光谱可以采用平滑的处理手段对谱线进行处理。平滑处理方法有移动窗口平均法、移动窗口拟合多项式平滑(Savitzky-Golay 平滑)等多种方法。

移动窗口平均方法利用窗口内目标点(s_i)的邻域数据计算均值后将目标点替换为 s'_i , 参见式(1)。

$$s'_i = \frac{1}{2m+1} \sum_{j=i-m}^{i+m} s_{i+j} \quad (i = 1, \dots, n) \quad (1)$$

式(1)表示对第 i 个数据点进行平滑处理, 需要利用其前后各 m 个数据, 即共需利用 $2m+1$ 个数据(窗口宽度)计算平均值。通过移动窗口逐步替换掉目标点。该方法是最简单的平滑方法, 但是可能使目标点的贡献被弱化。

Savitzky-Golay 平滑与移动窗口平均方法的差异是利用了最小二乘拟合方法将窗口内的数据进行加权处理, 突出中心点的贡献, 即将信号做了平滑处理又最大地利用了目标点的信息。Savitzky-Golay 滤波方法通过对 s_i 附近 $nl+nr+1$ 个点的数据进行多项式拟合[参见式(2)]。构建 m 阶多项式 $p_i(x)$ 为

$$p_i(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + \dots + a_mx^m \quad (2)$$

利用式(3)使式(2)的拟合系数最优, 从而求得式(2)中的各个系数, 进而得到平滑后的数据。依次移动该窗口实现对谱线的平滑。

$$\min \sum_{j=i-nl}^{i+nr} [p_i(x_j) - s_j]^2 \quad (3)$$

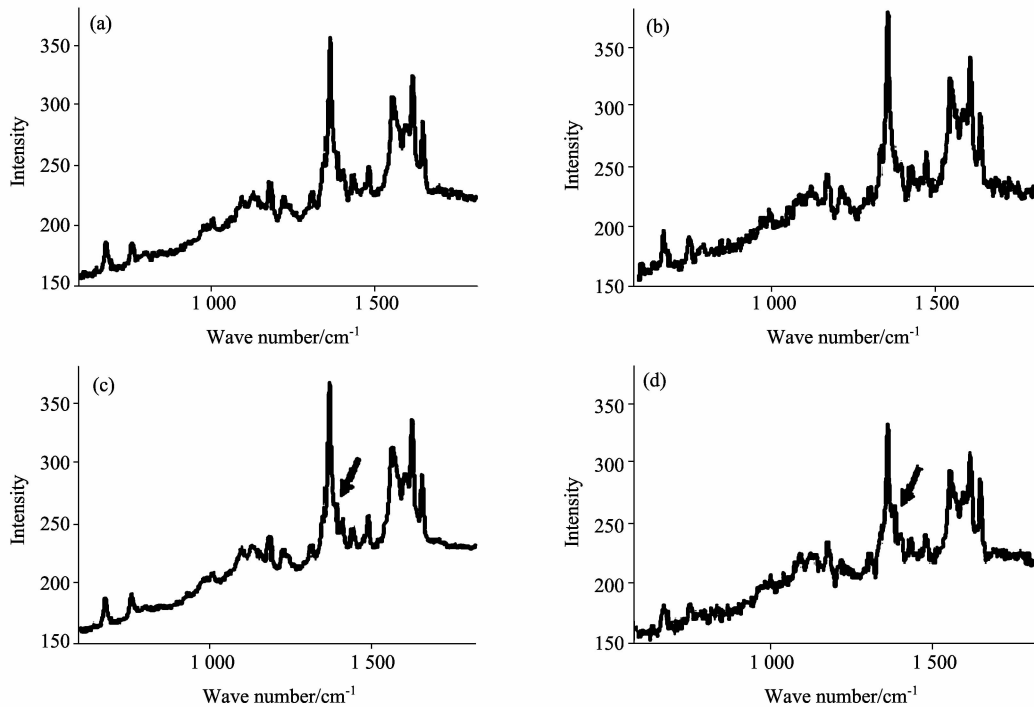


Fig 2 The comparison of direct average method and the average method with classified process of the Raman spectra of erythrocytes

(a): Result with direct average and Savitsky-Golay filter;
(b)–(d): Average result with 3 types and Savitsky-Golay filter

1.5 荧光背景的处理

应用拉曼散射技术进行样品分析的一个主要问题是荧光背景信号的干扰。对于固体样品来说, 荧光可通过光漂白降低^[7]。但是对于液体样品, 由于分子的扩散作用使得它们随机进出焦平面, 因而荧光背景的处理效果较差。为了减少荧光的干扰, 也可使用不同的激发波长。但是对于只配备了一种激发波长的设备来说, 改变激发波长的方法难以实现。当然适当地增加激光功率密度也可降低荧光背景的影响, 但是一定要注意其对细胞造成的损伤问题及会否诱发更明显的荧光。

2 结果

图 1 是宇宙射线对拉曼谱线的干扰。图 1 中曲线 1 是对每个谱线进行单独获取及宇宙射线消除, 然后进行平均得到的结果。图 1 中曲线 2 是采用 1.1 方法模拟直接进行长时间

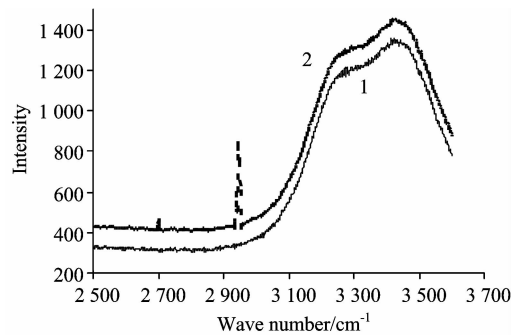


Fig. 1 The interference of cosmic ray

曝光采集的结果(为了便于比较将其幅度提高)。图 1 中出现在谱线 2 位于 2700cm^{-1} 附近的谱峰实际是宇宙射线干扰,在多次平均下强度被弱化可造成干扰;但是该谱峰在曲线 1 上是没有的。

图 2(a) 是红细胞拉曼光谱经直接平均并进行了 Savitsky-Golay 滤波的结果,图 2(b)–(d) 是红细胞拉曼光谱分为三类后进行平均及 Savitsky-Golay 滤波的结果。由该结果可知谱线的主要特征谱线一致,但是在图中箭头所指谱线位置出现差异,该位置谱线对血红蛋白分子构型非常敏感,是血红蛋白的氧化标记带^[1]。这证明了,采用先分类的方法有助于保留与揭示谱线的精细结构,从而能反映出有关分子的构型。

图 3 是扫描单个红细胞获得的拉曼谱线 (Ori) 与 Savitsky-Golay 滤波处理后的曲线 (SG) 和移动平均方法处理后的曲线 (MA)。实验中还利用了其他平滑方法,例如 Lowess 方法和 Loess 方法等(图中未给出)。移动平均方法处理的谱线光滑,高强度谱线有很好的显示,如 1358 , 1585 和 1604cm^{-1} 附近的谱线; Savitsky-Golay 方法处理的谱线相对粗糙一些,但是些微弱敏感谱线有了较好的显示,如 1374 和 1640cm^{-1} 附近的谱线。Lowess 方法和 Loess 方法得到的结果谱线比较粗糙,而且微弱精细谱带显示不明显。

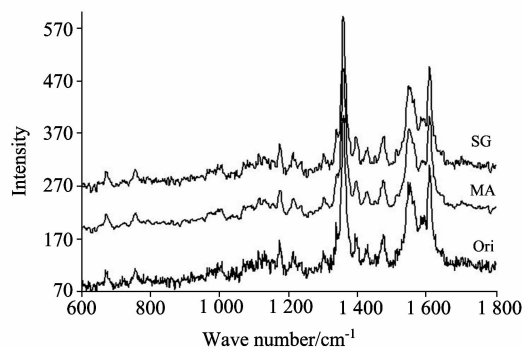


Fig. 3 The original spectrum (Ori) and the smooth result with moving averaged method (MA) and Savitsky-Golay (SG) method

图 4 显示同一细胞第一次扫描获得的拉曼谱线(实线)和第二次重复扫描得到的拉曼谱线(虚线),在特征谱线位置上没有明显差异,但是虚线显示有明显的荧光背景增加。第二

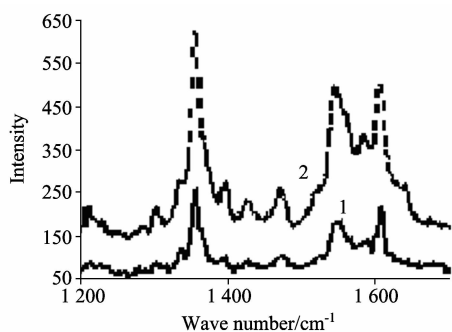


Fig. 4 The Erythrocyte's Raman spectra of first scanning (solid line) and second repeat scanning (dashed line)

次扫描是在细胞有损伤的情形下进行,提示荧光背景的增加与细胞损伤有关。

3 讨论

由图 1 可以看出在 2700cm^{-1} 附近出现的谱线很难区分是否是宇宙射线造成的。当对生物样品进行拉曼光谱测试时,由于生物样品的拉曼光谱更加复杂,因而该问题会更加突出,会导致有些谱线不知是来源于生物样品,还是来源于宇宙射线。当宇宙射线出现的位置与一些样品的特征拉曼谱线重合时,更容易造成对谱线的错误分析。因此为了降低宇宙射线的干扰,扫描细胞时应采用短积分时间、多次扫描的方式,通过多次扫描结果进行比较剔除宇宙射线然后再利用其他谱线处理技术进行处理。

图 2 显示了直接平均方法获得的谱线[图 2(a)]无法体现图 2(d)中箭头所指示谱线($1370\sim 1378\text{cm}^{-1}$)的变化情形,而该位置谱线是对血红素状态非常敏感的一个谱带^[4-6],由此可以看出直接平均方法难以反映出一些强度小、但对分子构型非常敏感的谱线变化。所以应对谱线进行分类后再滤波与平均,这对于获得精确、灵敏的拉曼光谱是非常重要的。这在生物样品精细谱线分析中也得到了验证和应用^[8-10]。

图 3 显示 Savitsky-Golay 滤波和移动窗口平均方法均使原始谱线有了改善。移动窗口平均方法的结果显示曲线更平滑、信噪比高,该方法使一些高强度谱线有很好的显示,但是对一些强度弱但对分子构型敏感的谱线显示并不明显,谱线弱化甚至消失。Savitsky-Golay 滤波技术是利用 n 阶多项式最小二乘法作用于移动窗口内的数据点进行平滑处理。相对于一些常用滤波函数,该技术的优点是不仅使谱线得到较好的平滑效果,而且没有明显改变一些强共振谱线的特征。虽然速度慢些,但是其对于谱线强度和精确位置的影响很小,对一些强度不大的谱带也能较好地保留。但是如果矩阵奇异或存在异常点,最小二乘的误差会加大甚至有崩溃的危险。因此在谱线粗糙、信噪比较低的情形下适当地选择多种滤波函数进行处理对于提高谱线质量、反映精细谱线是较好的选择。用于拉曼谱线平滑处理时, Savitsky-Golay 滤波和移动窗口平均方法相对于其他滤波方法是比较好的处理工具,可根据谱分析的要求选择滤波函数。

进行生物样品实验时,一般荧光干扰并不是很严重,但是在一些情况下出现了明显的荧光背景增强。这种荧光背景的增加虽然在一定程度上降低了谱线质量,但是从中也可得到一些信息。许多文献报道的方法是进行基线校正消除荧光背景,但研究显示这种处理方法虽然表面上看似降低了样品的荧光背景,但是也忽略了一些有用的信息。例如图 4 显示第一次和第二次扫描的拉曼光谱的差异主要体现在荧光背景的差异,如果对谱线进行基线校正后再进行分析,则看不出两个谱线的差异。实际情况是,第二次扫描已经显示出细胞出现损伤的情形。因此对荧光背景的处理可以采取在分析过程中将其影响因素考虑而不采取其他手段消除或降低荧光背景。如果确实需要消除荧光背景,也可以利用以拉曼谱中谱

强最高点作为谱线所有数据归一化参照的基线校正方法等, 减弱荧光干扰。

由以上讨论可知对于扫描获得的系列谱线需要进行系列

合适的处理, 例如宇宙射线消除、谱线分类、平均、滤波、荧光背景抑制等。恰当的谱线处理过程对于提高谱线信噪比、突出精细谱线是必要的, 尤其是活细胞的拉曼谱线。

References

- [1] Graselli J G, Bulkin B. Analytical Raman Spectroscopy. New York: Wiley and Sons, 1991.
- [2] Puppels G J, Garritsen H S P, Seger-Nolten G M J, et al. J. Biophys., 1991, 60(5): 1046.
- [3] Puppels G J, Bakker Schut T C, Sijtsema N M, et al. J. Mol. Struct., 1995, 347: 477.
- [4] Wood B R, McNaughton D. J. Raman Spectrosc., 2002, 33: 517.
- [5] Wood B R, McNaughton D. Biospectroscopy, 2002, 67: 259.
- [6] Wood B R, Hammer L, Davis L, et al. Biomed. Opt., 2005, 10(1): 014005.
- [7] Cary P R. Biochemical Application of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. New York: Academic Press, 1982.
- [8] KANG Li-li, HUANG Yao-xiong, LUO Man, et al(康立丽, 黄耀熊, 罗曼, 等). Journal of Fourth Military Medical University(第四军医大学学报), 2007, 28(20): 1862.
- [9] Kang Li-li, Huang Yao-xiong, Liu Wen-jing, et al. Biopolymers, 2008, 89(11): 951.
- [10] Wu Yue, Huang Yao-xiong, Kang Li-li, et al. Biopolymers, 2009, pressed on web.

Study of Spectrum Processing Method for Raman Microscopy on Single Living Cell

KANG Li-li¹, HUANG Yao-xiong^{2*}, WU Zheng-jie²

1. Department of Biomedical Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2. Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract To study the spectrum processing methods for Raman microscopy on single living cell and develop the pre-process techniques for Raman spectrum of single living cell to enhance the signal to noise ratio, sensitivity, and decrease the fluorescence influence, wiping off the cosmic rays was used to improve the spectrum. The spectra classification, spectra average and filtration were applied to enhance signal to noise ratio. The fluorescence was depressed for quantity analysis or utilized for analysis by comparing the background and the spectra. Results show that (1) comparing the spectra with short exposure time and more scans can wipe off the cosmic rays effectively. (2) the spectra classification, spectra average and filtration can improve the quality of spectra and can show some weak and sensitive bands. (3) sometimes the fluorescence has useful information. It is concluded that the proposed techniques for Raman spectrum of single cell in this paper can show the sensitive and weak intensity peaks and reflect the information of molecules structures very well.

Keywords Laser confocal Raman spectroscopy; Single living cell; Classification; Signal to noise ratio; Filter

(Received Apr. 23, 2010; accepted Sep. 8, 2010)

* Corresponding author