

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20520060153267

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

酵母细胞的拉曼与微流控芯片研究方法探索

Investigation of Research Method for Raman Spectroscopy and Microfluidics on Yeast Cell

张 维

指导教师姓名: 周勇亮 教授级高工

田中群 教授

专业名称: 物 理 化 学

论文提交日期: 2015 年 8 月

论文答辩时间: 2015 年 9 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 8 月

Investigation of Research Method for Raman Spectroscopy and Microfluidics on Yeast Cell

A Dissertation Submitted for the Degree of
Doctor of Philosophy

By

Wei ZHANG

Supervised by

Prof. Yongliang Zhou

Prof. Zhongqun Tian

Department of Chemistry

Xiamen University

August, 2015

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要	V
英文摘要	VII
第一章 绪论	1
§1.1 拉曼光谱及在细胞研究中的应用	1
§1.2 微流控芯片技术及细胞研究应用	25
§1.3 酵母细胞的拉曼光谱及微流控芯片研究现状	35
§1.4 本论文的研究目的和主要内容	42
参考文献	44
第二章 实验	65
§2.1 实验材料与试剂	65
§2.2 实验仪器	68
§2.3 实验方法	69
参考文献	92
第三章 酵母细胞阵列芯片	93
§3.1 基于 PDMS 微柱制备酵母细胞阵列	93
§3.2 剥离法制备酵母细胞阵列	106
§3.3 本章小结	110
参考文献	111
第四章 基于 PDMS 薄层的酵母细胞拉曼光谱检测芯片	112
§4.1 芯片设计	112

§4.2 芯片加工.....	119
§4.3 酵母细胞的拉曼检测.....	124
§4.4 基于 MTT 反应的酵母细胞拉曼光谱检测.....	140
§4.5 酵母细胞的 SERS 检测.....	150
§4.6 本章小结.....	152
参考文献.....	153
第五章 SHINS 制备及应用	155
§5.1 Ag@Al ₂ O ₃ SHINs 的制备与表征.....	155
§5.2 其他 SHINs 的制备.....	169
§5.3 SHINs 应用.....	174
§5.4 本章小结.....	178
参考文献.....	179
总结与展望.....	181
附录.....	181
§S1 酵母细胞培养及生长情况考察.....	182
§S2 基于 MTT 反应的酵母细胞吸收光谱检测.....	190
缩略词列表.....	196
作者攻读博士学位期间发表的论文.....	198
致谢.....	200

Table of contents

ABSTRACT in Chinese.....	V
ABSTRACT in English.....	VIII
Chapter 1 Introduction.....	1
§ 1.1 Raman Spectroscopy and Its Application in Cell Research.....	1
§ 1.2 Mcirofluidics and Cells on Chip.....	25
§ 1.3 Yeast cell,Raman Spectroscopy and Microfluidics.....	35
§ 1.4 Objectives of This Thesis.....	42
References.....	44
Chapter 2 Experimental Section.....	65
§ 2.1 Materials and Agents.....	65
§ 2.2 Instruments.....	68
§ 2.3 Methods.....	69
References.....	92
Chapter 3 Yeast Array Chip.....	93
§ 3.1 Yeast Cell Array Based on PDMS micro Pillars.....	93
§ 3.2 Yeast Cell Array Based on Lift-off Method.....	106
§ 3.3 Conclusions.....	110
References.....	111
Chapter 4 Microfluidic Chip Based on PDMS Thin Films for Yeast Raman Detection.....	112
§ 4.1 Chip Design.....	112

§ 4.2 Chip Fabrication.....	119
§ 4.3 Raman Detection of Yeast Cell on Chip.....	124
§ 4.4 Raman Detection of Yeast Cell Based on MTT Reaction.....	140
§ 4.5 SERS Detection of Yeast Cell.....	150
§ 4.6 Conclusions.....	152
References.....	153
Chapter 5 Fabrication and Application of SHINs.....	155
§ 5.1 Preparation of Ag@Al ₂ O ₃ SHINs by ALD.....	155
§ 5.2 Preparation of Other Core-shell SHINs.....	169
§ 5.3 Application of SHINs.....	174
§ 5.4 Conclusions.....	178
References.....	179
Supplementary Material.....	181
§ S1 Yeast Cultivation.....	181
§ S2 UV-vis Detection of Yeast Cell Based on MTT Reaction.....	189
Abbreviations.....	195
Publications During Ph.D Study.....	197
Acknowledgements.....	199

摘要

酿酒酵母细胞是真核细胞研究的模式生物之一，本论文以酵母细胞为研究对象，开展适用于酵母细胞的微流控芯片及拉曼光谱方法研究，具体的研究内容如下：

1. 拉曼检测过程中要求酵母固定不动，而酵母细胞由于具有较硬的细胞壁，形状呈椭球形且不易变形，在芯片上固定是个难题。在初步摸索酵母细胞生长特性的基础上，提出两种在芯片上固定酵母并制备酵母细胞阵列的方法：其一，基于 PDMS 微柱制备酵母细胞阵列，在微柱表面捕获酵母细胞，通过调节微柱尺寸与间隔，可以很容易地控制微柱上酵母细胞的数量，当微柱尺寸足够小时，能够获得单细胞阵列；其二，基于光刻剥离法使酵母细胞图案化，结合使用聚赖氨酸使酵母固定。

2. 设计并加工用于酵母细胞拉曼检测的芯片，并对单个酵母细胞进行拉曼检测。针对芯片材料、结构及物镜进行了设计和优化，确定了适于酵母细胞检测的玻璃/镂空 PDMS 薄层/石英微流控芯片构型，并获得了良好的酵母单细胞拉曼信号。

3. MTT 试验是评估细胞活性的常规实验技术之一，通常采用紫外吸收法进行检测，获得的是统计的结果。提出并建立了 MTT 试验的单细胞拉曼检测方法，考察了 MTT 反应时间、激光强度、采谱时间等因素的影响，通过优化，获得单个酵母细胞内部的 Formazan 拉曼信号。

4. SHINs 具有干净表面，可避免杂峰信号及碳包，便于对酵母细胞表面进行检测。采用溶胶法合成 SHINs，并对酵母细胞进行拉曼检测。但溶胶法难以大批量生产。提出并建立了利用原子层沉积（ALD）技术大批量地制备 SHINs 的方法。通过探索并优化沉积模式、反应温度、净化时间及腔体气压等参数，在 Cu、Au、Ag 三种纳米粒子表面合成 Al_2O_3 、 TiO_2 和 SiO_2 三种壳层，壳层厚度从 1 nm 到 10 nm 可控，并且无针孔，单次实验合成的 SHINs 为克级（如 0.5 g 到 10 g）。并将其应用于合成色素和孔雀石绿的检测。

关键词：酿酒酵母；常规拉曼光谱；表面增强拉曼光谱；核壳隔绝增强拉曼光谱；细胞阵列；原子层沉积；

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is one of the model organisms in the study of eukaryotic cells. In this thesis, we investigate research methods on microfluidic chip and Raman spectroscopy for yeast cells. Specific contents are as follows:

1. Immobilization of yeast is needed in the process of Raman detection. It is still a problem for yeast immobilization on chips, as a result of yeast hard cell wall and the elliptical cell shape, and thus not easy to deform. On the basis of preliminary exploration of growth characteristics of yeast cells, two methods of preparing yeast cell array with immobilized yeast on chip were proposed. First, yeast cell array was prepared on micro pillar surface based on the PDMS micro pillar array. It was easily to control the number of yeast cells on the micro pillars by adjusting the size and spacing, and single cell array could be reached when the size of micro pillars was small enough. Second, yeast cells are patterned based on lift-off method and combination of the use of poly-L-lysine.

2. Yeast chip for Raman detection was designed and prepared. Single yeast cell Raman detection was achieved. A glass/hollow PDMS thin film/quartz microfluidic chip configuration was proposed. Fine results of single yeast cell Raman signal was obtained.

3. MTT test is one of the conventional experimental techniques to evaluate activity of cells. A MTT test method for single cell Raman detection was proposed and established. Several factors such as reaction time, laser power and collection time were investigated. Raman signal of formazan from individual yeast cell was obtained by optimizing collection conditions.

4. Shell-isolated nanoparticles (SHINs) can avoid miscellaneous peak and huge background signals due to its clean surface, and is convenient for the detection of yeast cell surface. SHINs was first synthesized by chemical method,

and SHINERS detection of yeast cell was made. However, it is not easy to produce large quantities SHINs by chemical method. A method of preparing SHINs by atomic layer deposition (ALD) technique is proposed and established. By exploring and optimizing reaction conditions such as deposition mode, reaction temperature, purge time and chamber pressure, three kinds of metal nanoparticles (Au, Ag and Cu) were covered with SiO₂, TiO₂ and Al₂O₃ three kinds of shell. The shell thickness is controllable from 1 nm to 10 nm, and pinhole-free. Single SHINs synthesis is gram level (such as 0.5 g to 10 g). The ALD synthesized SHINs were applied to detect pigment and malachite green.

Keywords: *S. cerevisiae*; Raman Spectroscopy; Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS); Shell-isolated Nanoparticle Enhanced Raman Spectroscopy (SHINERS); Cell Array; Atomic Layer Deposition (ALD).

第一章 绪论

细胞是生命活动的基本单位，单个细胞的活动与细胞状态紧密相关，因此，单细胞尤其是单个活细胞的研究和分析是当前的研究热点。酿酒酵母细胞具有易于培养和操作、增殖快等优点，是研究真核生物生命活动的首选模式生物，也是单细胞研究中常见的研究对象。

拉曼光谱可以直接探测到来自单个细胞内部的信息，是细胞研究尤其是细胞无损检测中的一种重要检测技术。微流控芯片的兴起，尤其是各种适用于细胞研究的芯片技术的建立与发展，为单细胞研究提供了便利条件。以下内容将分别对拉曼光谱技术、微流控芯片技术及酵母细胞进行介绍。

§1.1 拉曼光谱及在细胞研究中的应用

拉曼光谱技术于 1928 年提出[1,2]，而拉曼光谱用于细胞的研究则可以追溯到 20 世纪 70 年代[3]。本节简要介绍三种用于细胞研究的拉曼光谱技术及其在细胞研究中的应用，即常规拉曼光谱（Normal Raman Spectroscopy）、表面增强拉曼光谱（Surface Enhanced Raman Scattering, SERS）、壳层隔绝纳米粒子增强拉曼光谱（shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, SHINERS）。

1.1.1 拉曼散射与拉曼光谱

光束照射到物质表面，发生散射现象。英国物理学家瑞利（Lord Rayleigh）对光在介质中的散射现象进行了大量、系统的研究，并于 1871 年提出瑞利散射公式[4,5]，即散射光强度与入射光频率的四次方成正比，这种散射是弹性散射，即散射光频率与入射光相同，被称为瑞利散射。

进入 20 世纪，随着数学及物理理论的发展，不少物理学家开始重新研究光在介质中的散射现象。1910 年，爱因斯坦（A. Einstein）利用宏观波动理论准确

描述了各向同性透明介质中的光散射，但可惜的是并没有发现散射过程中光的波长发生改变的现象。1923年，美国物理学家康普顿（A.H. Compton）在研究 X 射线通过石墨等物质的散射时，发现散射光中存在两种波长的 X 射线，一种为原波长（ λ_0 ），另一种波长更长（ $\lambda_0 + \Delta\lambda$ ），这一现象可以用爱因斯坦的光量子理论解释，散射光波长的增加源于碰撞过程中的能量损失，被称为康普顿效应[6]。同年，奥地利量子物理学家斯梅卡尔（A. Smekal）从理论上预言，频率为 ν_0 光通过介质时发生散射时，散射光中存在频率为 $\nu_0 \pm \Delta\nu$ 非弹性散射[7]。

1928年，印度物理学家拉曼（C.V. Raman）和他的同事 K. S. Krishnan 在用水银灯照射液体苯时，发现了斯梅卡尔所预言的散射现象[1,2]：散射光中除了原入射光频率 ν_0 的谱线（瑞利散射），还存在频率分别为 $\nu_0 - \Delta\nu$ （斯托克斯线）和 $\nu_0 + \Delta\nu$ （反斯托克斯线）对称分布的谱线（图 1.1），这是一种新的分子辐射，被称为拉曼散射。同时，G. Landsberg（俄罗斯物理学家）和他的同事 L. Mandelstam 也在晶体体系独立发现这种散射现象[8,9]。

拉曼散射光强度很弱，仅占总散射光强度的 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 。拉曼位移（Raman shift, $\Delta\nu$ ）与物质的性质有关，来源于物质分子的振动与转动，因此从拉曼光谱中可以得到分子振动、转动能级结构的信息。

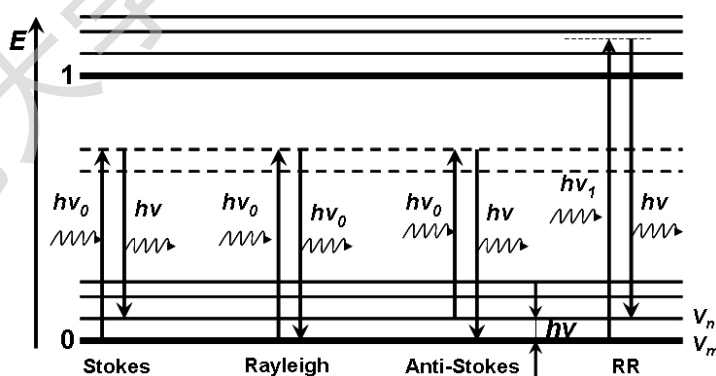


图 1.1 单色激光作用于样品的散射示意图

Fig. 1.1 Diagram of scattering during illumination of the sample with monochromatic light.

拉曼光谱的谱图具有如下几个特征：

(1) 在拉曼谱图上 $\Delta\nu$ 常以波数 (wavenumber, 单位 cm^{-1}) 表示, 仅与样品的振动、转动能级有关, 同种物质在不同波长激发光下的拉曼谱线波数相同, 不同物种在相同波长激发光下的拉曼谱线不同;

(2) 瑞利线强度最强, 斯托克斯线和反斯托克斯线在瑞利线两侧对称分布;

(3) 斯托克斯线的强度通常大于反斯托克斯线, 因此, 一般情况下拉曼光谱常用斯托克斯线;

(4) 拉曼信号强度 $I_{\text{Raman}} \propto 1/\lambda^4$, 激发光波长越长拉曼信号越弱。

拉曼光谱在应用中具有如下优势:

(1) 拉曼谱线与分子结构有关, 可以作为分子的指纹图谱, 在定性分析如物质鉴别、物质性质分析等场合具有巨大优势;

(2) 水的拉曼散射强度极弱, 在研究含水或水溶液中的样品, 特别是对生物样品进行无损检测时, 拉曼光谱是个理想工具;

(3) 随着激光等光学技术的发展, 以及商用拉曼光谱仪的改进, 拉曼光谱可以达到数个微米的空间分辨率, 便于痕量、微小面积样品、活细胞等生物样品及表面差异较大的样品的分析。

然而, 拉曼光谱技术依然存在不足之处, 如:

(1) 大部分分子的拉曼散射的强度都很弱;

(2) 拉曼散射的强度不仅与激发光强度及所研究物质的性质有关, 还受到光谱仪的光学系统参数的影响, 不利于定量分析;

(3) 激光照射到复杂体系或生物样品时, 拉曼过程常伴随有荧光过程, 因此经常会有荧光背景干扰。

1.1.2 拉曼光谱在细胞研究中的应用

随着技术的发展，拉曼光谱开始用于细胞的研究，这可以追溯到 1979 年，Abraham 等人[3]使用显微拉曼光谱对侵入淋巴结的硅酮橡胶进行识别。而后，Atalla 等人[10]证实拉曼光谱可以用于探测木材细胞壁中木质素的取向。1988 年，Beak 等人[11]利用紫外共振技术，获得了单个细胞的拉曼图谱。1990 年，Puppels 等人[12]使用共聚焦显微技术，得到单个活细胞和染色质的拉曼光谱。之后，激光共聚焦显微拉曼光谱成为细胞拉曼研究的热点[13,14]。目前，已有多篇综述文章[15-27]及专著[28-30]对拉曼方法在细胞研究中的应用进行了总结。

1.1.2.1 研究方法

拉曼光谱在以细胞为对象的应用研究中，研究方法主要有谱峰分析和拉曼成像两大类。

1. 谱峰分析

拉曼实验获得的直接结果为尖锐的谱峰，对谱峰位置的考察可获得细胞中物种定性的和结构方面的信息。由于细胞体系的拉曼信号往往在强度和信噪比上都比较弱，因此很多的应用中使用了统计学/化学计量学的方法[31-33]对所获得的数据进行处理，如最小二乘法（Classical Least Squares, CLS）用于数据平滑、背景拟合，基于高斯函数[34]或洛伦兹函数[35]对谱峰进行拟合，降维技术如主成分分析（Principal Component Analysis, PCA）[36]、线性鉴别分析（Linearity Distinction Analysis, LDA）[37,38]、层级聚类分析（Hierarchical Cluster Analysis, HCA）[39-41]等对谱峰进行归类与分析。

2. 成像分析

拉曼光谱是一种非侵入、无标记的技术，其成像分析在细胞研究中是个热点。依照成像的原理不同，可以分为拉曼扫描成像技术（Raman mapping）和拉曼影像技术（Raman imaging），二者在光学系统及信号的采集和收集方式上均有一定的差异[21,29,30]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.