

· 论 著 ·

# 应用拉曼光谱技术优选人类发育潜力胚胎研究

徐维海<sup>1</sup>, 张岭<sup>2</sup>, 张琳<sup>2</sup>, 李施施<sup>2</sup>, 舒静<sup>1</sup>

1. 浙江省人民医院生殖内分泌科, 浙江 杭州 310014; 2. 杭州医学院附属人民医院

**摘要:** **目的** 建立应用拉曼光谱技术优选具有发育潜力胚胎的实验方法。**方法** 选取 100 份用于囊胚培养的第 3 天卵裂期胚胎培养液 (D3 培养液), 确定合适的测定时间, 获得原始拉曼光谱, 通过滤波、基线校正和光谱归一化预处理, 获得真实拉曼光谱和用于分析比较的光谱模型。测定 173 份 D3 培养液拉曼光谱曲线, 评估其优选发育潜力胚胎的应用价值。**结果** 采用  $\geq 240$  s 的光谱仪积分时间可获得分辨率较好的原始拉曼光谱, 预处理后获得的真实拉曼光谱的特征性位移为 942、1 346、1 456 和 1 656  $\text{cm}^{-1}$ 。阳性曲线和阴性曲线模型的光谱差异位于 1 100 ~ 1 800  $\text{cm}^{-1}$ 。不同位移的真实拉曼光谱强度比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。173 份 D3 培养液获得阳性曲线 80 份, 阴性曲线 70 份, 中性曲线 23 份, 囊胚形成率依次为 85.00%、22.86% 和 65.22%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。拉曼光谱曲线预测囊胚形成效率的灵敏度为 83.8%, 特异度为 73.0%, Kappa 值为 0.572。**结论** 通过改良光谱收集条件, 并对原始拉曼光谱进行预处理, 可获得清晰、真实、可比性好的拉曼光谱模型, 采用本方法筛选的潜力胚胎与囊胚形成呈中度一致。

**关键词:** 体外受精; 胚胎; 拉曼光谱; 发育

中图分类号: R321 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2018) 02-0144-05

## Application of Raman spectroscopy in selecting potential cleavage embryos

XU Wei-hai\*, ZHANG Ling, ZHANG Lin, LI Shi-shi, SHU Jing

\*Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

**Abstract:** **Objective** To develop a method with Raman spectroscopy for selecting embryos with high developing potential. **Methods** A total of 100 samples of D3 spent cultural medium for embryos assigned to blastocyst culture were collected, and the Raman spectroscopy produced with optimal integration time. The original spectrums retrieved were processed by filtration, baseline correction and normalization methods to form characteristic spectral for the spent medium of cleavage embryo, suitable for analysis. A further 173 samples were collected to analyze the clinical relevance of Raman spectroscopy in selecting the potential embryos. **Results** Original Raman spectra with good resolution can be obtained with an integral time over 240 seconds. The characteristic spectral shift of embryo culture medium was 942, 1 346, 1 456 and 1 656  $\text{cm}^{-1}$  after processing. The spectral shift between the positive curve and the negative model was 1 100-1 800  $\text{cm}^{-1}$ . There was no significant difference in the intensity of real Raman spectral with different shifts ( $P > 0.05$ ). A total of 80 positive curves, 70 negative curves, 23 neutral curves were obtained from the 173 D3 samples, and the blastocyst formation rates were 85.00%, 22.86% and 65.22%, respectively, with statistically significant difference ( $P < 0.001$ ). The sensitivity, specificity and Kappa value for the Raman spectrum curve predicting the blastocyst formation were 83.8%, 73.0% and 0.572, respectively. **Conclusion** A clear, real and comparable Raman spectrum model could be obtained by improving the spectral collection conditions and preprocessing the original Raman spectrum. The potential embryo screened by this method is moderately consistent with that of blastocyst.

**Key words:** In vitro fertilization; Embryo; Raman spectroscopy; Development

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2018.02.009

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY219)

作者简介: 徐维海, 本科, 副主任技师, 主要从事人类辅助生殖技术工作

通信作者: 舒静, E-mail: shujingone@aliyun.com

移植具有发育潜力的胚胎是体外受精—胚胎移植技术 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 治疗不孕症成功的重要前提<sup>[1]</sup>。胚胎优选方法很多, 形态学评估迄今仍是选择胚胎最常用的方法<sup>[2-3]</sup>。但由于其预测胚胎发育潜力的准确性低, 治疗时往往选择移植多个胚胎以提高成功率, 从而增加了多胎妊娠机会和娩出极低出生体重儿风险<sup>[4]</sup>, 危及母婴健康和安

全。不同发育潜力胚胎的培养液接受激光照射后会产生不同的拉曼光谱位移和谱带强度。拉曼光谱技术利用这一特点无创、快速优选胚胎, 成为研究热点之一<sup>[5]</sup>。该技术尚处于摸索阶段, 有较多关键问题需要解决, 如测定参数不统一、样品特征峰位置不确定以及对原始光谱数据后期处理方法不一致等, 限制了其临床使用。为提高该技术的可操作性和临床应用价值, 本研究对第3天卵裂期胚胎培养液 (D3 培养液) 拉曼光谱检测方法进行优化, 确定样品的测定时间、胚胎培养液的特征峰拉曼位移, 以解决原始拉曼光谱复杂的背景信号对数据分析的干扰, 提高培养液微量成分改变的检出效率。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验样品 选择在浙江省人民医院生殖中心行 IVF-ET 治疗的 D3 培养液进行研究。实验样品的纳入标准为女方年龄 <35 岁、D3 胚胎形态学评分为 8 细胞 1 级胚胎并进行囊胚培养者。方法学研究阶段收集 100 份培养液, 包括 60 份形成囊胚的培养液 (阳性样品) 和 40 份未形成囊胚的培养液 (阴性样品); 未进行胚胎培养的培养液为空白对照。临床应用研究阶段包括 173 份用于囊胚培养的 D3 培养液。本研究通过浙江省人民医院生殖伦理委员会审查, 并获得治疗夫妇知情同意。

1.1.2 主要仪器与试剂 检测设备为 B&W TEK 温控半导体拉曼光谱分析仪 (美国必达泰克公司), 光谱检测范围 0 ~ 2 600  $\text{cm}^{-1}$ , 测定中心波长 786 nm, 激光功率 495 mW, 105 光纤直径, 50  $\mu\text{m}$  夹缝, 1 200 线光栅, CCD 分辨率 1 024 × 58。测定前仪器预平衡 15 min, 测定时控制工作环境室温在 25  $^{\circ}\text{C}$  左右, 避免强光照射, 选取 200 ~ 2 200  $\text{cm}^{-1}$  的有效拉曼光谱数据进行分析。

胚胎培养液为 Vitrolife G5 系列序贯培养液 (瑞典 Vitrolife 公司), 其中 D3 培养液为卵裂期培养液 G-1, 囊胚阶段为 G-2 培养液。

### 1.2 方法

1.2.1 样品收集 所有研究对象均按生殖中心常规方案行促排卵并取卵。获卵后经受精、胚胎培养, 并对胚胎进行形态评估<sup>[6]</sup>, 根据治疗需要将 D3 胚胎转移入囊胚培养液。移出胚胎后将剩余的 D3 培养液迅速转入已标记的 Eppendorf 管中, 立即投入液氮, 后移至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。空白对照组以相同方法处理保存。D3 胚胎继续培养至 D5, 观察囊胚的形成情况并进行评级<sup>[4]</sup>, 记录培养结果。

1.2.2 光谱仪积分时间的确定 同一样品分别按 60、90、120、180、240、300 和 360 s 的时间进行测定, 得到相应拉曼光谱。选择获得光谱特征峰明显, 位移丰富且稳定的光谱仪积分时间作为本研究测定时间。

1.2.3 拉曼光谱测定 测定前, 将冷冻样品于 25  $^{\circ}\text{C}$  室温解冻并平衡 30 min。拉曼光谱分析仪经平衡后用超纯水进行基线测定, 然后吸取 15  $\mu\text{L}$  胚胎培养液小心加入干燥的 50  $\mu\text{L}$  微量样品池中, 将样品池垂直置于仪器激光探头下方, 启动仪器进行测定。每测定一个样品均需清洗样品池, 避免交叉污染。

1.2.4 图像处理 对原始拉曼光谱图像采用滤波法<sup>[7]</sup>、基线校正法<sup>[8]</sup> 处理后, 获得真实拉曼光谱并进行特征峰位移和强度分析。然后采用归一化法<sup>[9]</sup> 对数据进一步处理, 即以空白试剂的拉曼光谱值为参照, 将经滤波和基线校正的拉曼曲线采用归一公式进行处理, 获得用于比较分析的光谱模型。归一化法的计算公式为:

$$S_i^1 = S_i / S_0^1 \quad (i=1, 2, \dots, N)$$

式中  $S_i^1$  为归一后的位移强度值,  $S_i$  为测定样品各位移原始位移强度值,  $S_0^1$  为空白试剂各位移原始位移强度值。

1.2.5 重复性观察 从 100 个 D3 培养液中随机抽取 10 份样品, 在双盲条件下, 每份样品先由一名实验员 (实验员 1) 重复检测 2 次, 再由另一名实验员 (实验员 2) 检测 1 次, 记录所有检测的拉曼光谱强度。经滤波和基线校正后获得真实的拉曼光谱强度, 用实验员 1 的 2 次检测结果分析组内变异度, 用实验员 1 的第 2 次检测结果和实验员 2 的检测结果分析组间变异度。

1.2.6 临床预测价值评估 测定用于临床研究阶段的 173 个 D3 胚胎培养液的拉曼光谱数据, 结合各胚胎对应的囊胚形成结果, 评估拉曼光谱技术预测胚胎发育潜力的临床价值。

1.3 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件统计分析。各特征峰强度值以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 组内和组

间变异度采用单因素方差分析 (LSD 法); 归一化处理后的光谱模型构成与囊胚形成的关系采用 $\chi^2$  检验, 两两比较采用 Bonferroni 法调整检验水准; 方法的灵敏度和特异度分析采用配对 $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 光谱仪积分时间的确定** 以 60、90、120 和 180 s 作为光谱仪积分时间所获得的拉曼光谱一致, 仅有一个位移  $1\ 656\text{ cm}^{-1}$  的特征峰, 见图 1。延长积分时间至 240、300、360 s, 获得 4 个特征性位移稳定一致、分散度较好的拉曼光谱, 位移分别为 982、1 342、1 449 和  $1\ 656\text{ cm}^{-1}$ , 见图 2。该时间段均可用于胚胎培养液拉曼光谱测定, 本研究选择 300 s 为测定时间。

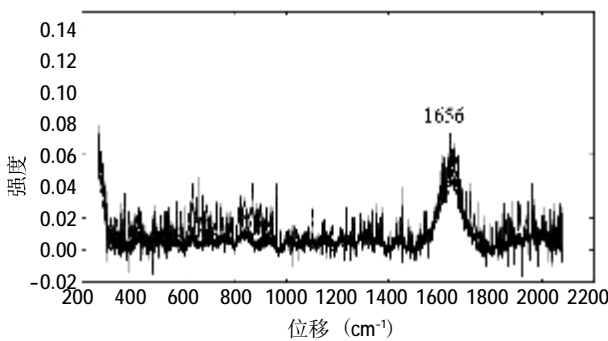


图 1 积分时间为 60、90 和 180 s 的原始拉曼光谱

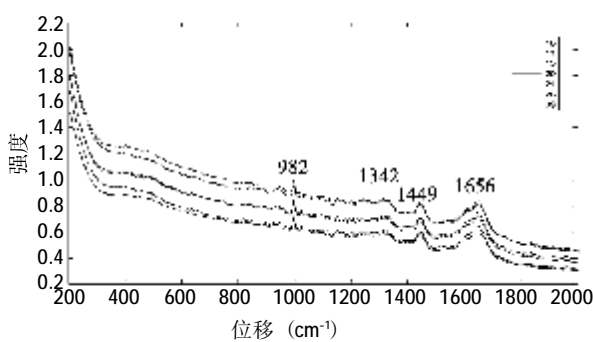


图 2 积分时间为 240、300 和 360 s 的原始拉曼光谱

**2.2 D3 胚胎培养液真实拉曼光谱** 将图 2 的原始拉曼光谱经滤波和基线校正处理, 获得真实的培养液拉曼光谱。处理后的 2 组样品的拉曼光谱 4 个主要特征峰位移不变, 出现的较多微弱辅峰的位移一致, 见图 3。

**2.3 光谱模型** 经归一化法处理后, 获得阴性样品和阳性样品的光谱模型, 将其中位于空白基线上方者

定义为阳性曲线, 位于空白基线下方者定义为阴性曲线, 光谱模型与空白基线相同者为中性曲线, 见图 4。60 份形成囊胚的培养液中有 47 份 (78.33%) 显示阳性曲线; 40 份未形成囊胚的培养液中有 35 份 (87.50%) 显示阴性曲线, 阳性曲线和阴性曲线的光谱差异位于  $1\ 100 \sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 。

**2.4 拉曼光谱各特征峰检测的变异度** 对由 2 名实验员随机测定的 10 个样品获得的真实拉曼光谱强度进行组内和组间变异度分析。不同位移的真实拉曼光谱强度比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.5 拉曼光谱预测胚胎发育潜力价值** 173 个胚胎经培养后共形成 99 个囊胚, 囊胚形成率为 57.23%。173 份培养液共获得阳性曲线 80 份, 其中形成囊胚 68 份, 形成率为 85.00%; 阴性曲线 70 份, 其中形成囊胚 16 份, 形成率为 22.86%; 中性曲线 23 份,

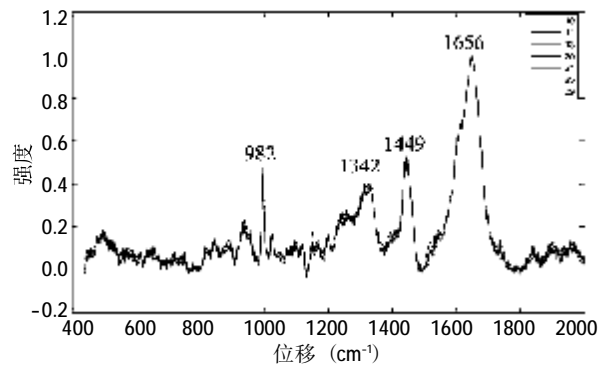
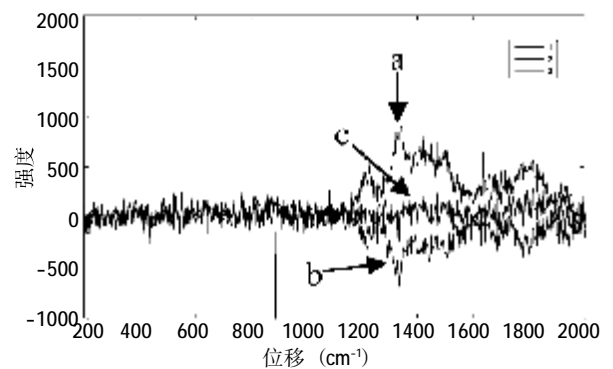


图 3 经滤波和基线校正的培养液真实拉曼光谱



注: a 为阳性曲线, b 为阴性曲线, c 为中性曲线。

图 4 经归一化处理的拉曼光谱曲线

其中形成囊胚 15 份, 形成率为 65.22%。比较三类曲线的囊胚形成率, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=32.127, P < 0.001$ )。其中阴性曲线组低于阳性曲线组 ( $\chi^2=13.979, P < 0.017$ ); 中性曲线组高于阴性曲线组 ( $\chi^2=58.511, P < 0.017$ ), 但与阳性曲线组差异无统计学意义 ( $\chi^2=4.468, P=0.068$ )。

表 1 不同位移获得真实光谱强度的组内和组间变异情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

位移 ( $\text{cm}^{-1}$ )	实验员 1 ( $n=10$ )	实验员 1 重复 ( $n=10$ )	实验员 2 ( $n=10$ )	组内变异		组间变异	
				t 值	P 值	t 值	P 值
982	0.465 ± 0.008	0.467 ± 0.012	0.466 ± 0.012	0.257	0.842	0.043	0.810
1 342	0.404 ± 0.006	0.402 ± 0.005	0.406 ± 0.005	0.745	0.137	0.731	0.439
1 449	0.533 ± 0.008	0.533 ± 0.008	0.538 ± 0.012	0.112	0.280	1.101	0.926
1 656	0.999 ± 0.008	1.000 ± 0.005	1.001 ± 0.007	0.238	0.662	0.622	0.814

注：组内变异为实验员 1 的 2 次测定结果分析；组间变异为实验员 1 重复结果与实验员 2 测定结果间分析。

将中性曲线并入阳性曲线，分析 D3 培养液的拉曼光谱曲线预测囊胚形成的效率，其灵敏度为 83.8%，特异度为 73.0%，Kappa 值为 0.572。

### 3 讨论

拉曼光谱技术具有灵敏度高、操作简单的特点，其结果根据被测定物质产生的光谱位移和光谱峰强度进行判定，其中光谱位移的变化与检测物质的性质相关，光谱峰强度大小反映被测定物质浓度差异<sup>[10]</sup>。胚胎生长发育伴随活跃的物质代谢过程，如消耗碳水化合物<sup>[11]</sup>、利用多种氨基酸<sup>[12]</sup>，以及分泌合成多种新产物，如脂肪酸<sup>[13]</sup>、人白细胞抗原 -G(HLA-G)<sup>[14]</sup> 和可溶性人绒毛膜促性腺激素 (HCG)<sup>[15]</sup>，均可导致培养液成分的改变，因此通过分析培养液拉曼光谱可以了解胚胎代谢情况，推测胚胎发育潜力。

人类胚胎通常采用微滴培养，其体积在 50  $\mu\text{L}$  左右，不能采用常量测定。本研究根据检测样品体积微小的特点，选择使用 50  $\mu\text{L}$  的样品池作为样品载体，增加了检测液层的厚度。研究以 60、90、120、180 s 作为检测时间，获得的拉曼光谱峰位单一；当检测时间延长至 240、300 和 360 s 时，培养液被检出的信号峰明显增多，表明拉曼光谱检出信号与采集时间相关<sup>[16]</sup>。从被检出的拉曼谱型分析，延长检测时间后的 3 个时间点检出的拉曼特征峰丰富，重复性好，均可作为本研究的检测时间。

本研究最大的困难在于获得真实的培养液拉曼光谱。尽管胚胎在生长过程中代谢极为活跃，但由于 D3 卵裂期胚胎细胞数通常为 8 个左右，其代谢产物造成培养液物质成分变化幅度较小；并且由于拉曼技术测定得到的原始光谱掺杂众多干扰信号，真正培养液拉曼光谱的微量改变难以直接获得，需要通过消除干扰光谱才能进行分析。干扰光谱的形成原因较多，如仪器固有的标准具效应<sup>[17]</sup> 和芳香族化合物等引起的荧光干扰<sup>[18]</sup>。本研究分别采用滤波法和基线校正法消除上述干扰，从而得到真实的培养液拉曼光谱。

培养液真实拉曼光谱的特征峰与原始光谱位移一致，但由于去除了相关干扰，真实拉曼光谱的各特征峰更清晰，其中 4 个主要特征峰的位移分别为 982、1 342、1 449 和 1 656  $\text{cm}^{-1}$ 。查阅相关化学基团产生拉曼峰的特性<sup>[19]</sup>：982  $\text{cm}^{-1}$  特征峰为蛋白质分子中的 C-C 键的  $\beta$ - 片层产生，1 342  $\text{cm}^{-1}$  特征峰由 DNA 分子中  $\text{PO}_4^{3-}$  产生，1 449  $\text{cm}^{-1}$  特征峰与蛋白质、脂肪和碳水化合物中的 -CH 键的碳链异构相关，1 656  $\text{cm}^{-1}$  特征峰体现的是蛋白质中的酰胺基 (-CONH-) 和脂类的 -C=C- 的伸展模式。

真实拉曼曲线的比较是目前国内外研究胚胎发育潜力的主要方法<sup>[5,20]</sup>，但由于胚胎培养前后培养液成分变化小，其测得的真实拉曼光谱信号差异微弱，分析难度较大。本研究引入空白培养基的拉曼光谱作为对照，将培养液的真实拉曼光谱进一步归一化处理，得到具有良好可比性的光谱模型，光谱差异区域为 1 100 ~ 2 000  $\text{cm}^{-1}$ ，并且检测方法具有较好的重复性，克服了微量拉曼光谱差异结果难以解读和比较的问题。

研究数据提示阳性曲线和中性曲线对应胚胎的囊胚形成率分别为 85.00% 和 65.22%，高于形态学评分选择胚胎的囊胚形成率，表明采用拉曼技术判定胚胎发育潜力具有一定的优势。对于形态学评分较好的阴性曲线胚胎，通过提前发现，可避免其用于优选移植，确保移植周期的治疗效率。然而，采用本方法筛选的潜力胚胎与囊胚形成仅呈中度一致，选择失败的概率较高，且无法预测后期囊胚质量，因此方法学存在改进空间。近年来培养液单一成分检测技术的涌现、胚胎发育动力学的兴起以及更高灵敏度拉曼光谱检测设备的问世，可为完善拉曼技术预测模型提供契机。

### 参考文献

[1] NIINIMAKI M, VELEVA Z, MARTIKAINEN H. Embryo quality is

- 分析 [J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20 (3): 20-23.
- [8] 简秋, 单炜力, 段丽芳, 等. 我国农产品及食品中农药最大残留限量制定指导原则 [J]. 农药科学与管理, 2012, 33 (6): 24-27.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部. 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [10] 陈君石. 食品安全风险评估概述 [J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23 (1): 4-7.
- [11] 王向未, 仇厚援, 张志恒, 等. 食品中膳食暴露评估模型研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2012, 24 (4): 733-738.
- [12] 魏颖. 山东省 2011—2013 年市售蔬菜农药残留及膳食暴露风险评估 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [13] 吴俊. 温州市蔬菜水果中有机磷农药残留调查与风险分析 [D]. 衡阳: 南华大学, 2010.
- [14] 段云, 钱程, 李建国, 等. 有机磷农药在海南菜心、苦瓜和豇豆中的残留分析及膳食风险评估 [J]. 南方农业学报, 2014, 45 (9): 1594-1598.
- [15] 孙玲, 黄健祥, 邓义才, 等. 广东省主要叶菜农药残留膳食暴露风险评估研究 [J]. 食品科学, 2017, 38 (17): 223-227.
- [16] 李安, 王北洪, 潘立刚, 等. 北京市蔬菜中农药残留现状及慢性膳食暴露评估 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (3): 1164-1169.
- [17] COT (UK Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment). Risk assessment of mixtures of pesticides and similar substances [EB/OL]. (2002-09-01) [2015-03-01]. <http://cot.food.gov.uk/pdfs/reportindexed>.

收稿日期: 2017-08-11 修回日期: 2017-11-06 本文编辑: 汪婷

### (上接第 147 页)

- the main factor affecting cumulative live birth rate after elective single embryo transfer in fresh stimulation cycles [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015, 194: 131-135.
- [2] 徐维海, 张琳, 李施施, 等. 再生育人群的辅助生殖实验技术应用 [J]. 预防医学, 2017, 29 (1): 49-52.
- [3] NASIRI N, EFTEKHARI-YAZDI P. An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization [J]. Cell J, 2015, 16 (4): 392-405.
- [4] 李海静, 金月琴, 高萍萍. 极低出生体重儿出生状况分析 [J]. 预防医学, 2017, 29 (5): 518-520, 523.
- [5] DING J, XU T, TAN X, et al. Raman spectrum: a potential biomarker for embryo assessment during in vitro fertilization [J]. Exp Ther Med, 2017, 13 (5): 1789-1792.
- [6] BRISON D, CALDERÓN G, CATT J, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting [J]. Hum Reprod, 2011, 26 (6): 1270-1283.
- [7] 许禄, 邵学广. 化学计量学方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 31-40.
- [8] 张万里, 朱键, 李剑君, 等. 基于自动线性拟合的快速拉曼基线校正算法 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37 (8): 2632-2637.
- [9] 王斌, 戴连奎. 基于拉曼光谱解析的对二甲苯装置吸附塔循环液成分分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35 (2): 399-403.
- [10] 韦娜, 冯叙桥, 张孝芳, 等. 拉曼光谱及其检测时样品前处理的研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33 (3): 694-698.
- [11] GARDNER D K, WALE P L, COLLINS R, et al. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome [J]. Hum Reprod, 2011, 26 (8): 1981-1986.
- [12] 邓彬, 李子, 王文军, 等. 胚胎培养液氨基酸浓度与体外受精 - 胚胎移植妊娠结局的关系 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2013, 34 (6): 900-905.
- [13] YAGI A, MIYANAGA S, SHRESTHA R, et al. A fatty acid profiling method using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for improvement of assisted reproductive technology [J]. Clin Chim Acta, 2016, 456: 100-106.
- [14] GUO X Y, JIANG F, CHENG X J, et al. Embryonic soluble human leukocyte antigen-G as a marker of embryo competency in assisted reproductive technology for Chinese women [J]. J Reprod Med, 2013, 58 (11-12): 477-84.
- [15] 王海英, 张仁礼, 韩冬, 等. 人胚胎源性人绒毛膜促性腺激素在胚胎培养液中的水平与早期胚胎发育的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34 (7): 1039-1041.
- [16] KUBELKA J. Multivariate analysis of spectral data with frequency shifts: application to temperature dependent infrared spectra of peptides and proteins [J]. Anal Chem, 2013, 85 (20): 9588-9595.
- [17] 徐龙, 罗永道. 光谱图像的标准具效应 [J]. 云南师范大学学报 (自然科学版), 2015, 35 (5): 44-47.
- [18] 王欢, 王永志, 赵瑜, 等. 拉曼光谱中荧光抑制技术的研究新进展综述 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37 (7): 2050-2056.
- [19] ISHIGAKI M, HASHIMOTO K, SATO H, et al. Non-destructive monitoring of mouse embryo development and its qualitative evaluation at the molecular level using Raman spectroscopy [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43942.
- [20] ZHAO Q, YIN T, PENG J, et al. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using a simple spectroscopy adjunct to morphology for embryo assessment in in vitro fertilization (IVF) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14 (4): 6556-6570.

收稿日期: 2017-08-09 修回日期: 2017-10-23 本文编辑: 徐文璐