

核酸的激光喇曼光谱

林 星

(电气技术系)

摘要 本文研究了核酸的激光喇曼光谱与它的结构及生化功能的关系。确认应用激光喇曼光谱研究核酸是具有信息量大、高灵敏度及高分辨本领的。

关键词 喇曼位移, DNA 双螺旋, 氢键, 碱基配对, 氢氘交换

0 序言

利用喇曼效应来研究分子结构是一种极有效的方法。复杂分子的振动转动在红外吸收及喇曼散射中通常是灵敏的, 但在水溶液中生物大分子不出现吸收光谱, 因为水溶液的吸收光谱波长中有和生物大分子中 CN, NH 及其它键等较为重要的吸收波长一致。而水溶液中生物大分子的振动转动等信息可以从喇曼光谱中得到。同时喇曼效应的信息量很大, 所以喇曼光谱对生物大分子测定是十分灵敏和有效的。但是喇曼散射的方法本身具有严重的缺点, 如自发非弹性散射的截面很小, 而喇曼散射截面与入射辐射频率 ω 的四次方成比例, 振动转动的红外波段光强就很小了, 所以其方法本身造成测定上的困难。当激光出现后, 尤其可调谐激光器大大改进了光源, 可以克服上述缺点, 极大地促进喇曼散射应用的发展。

核酸是活细胞中极重要分子, 是生物遗传的主要物质, 它由很多核苷酸连接形成, 每个核苷酸有三个部分即一个碱基、一个脱氧核糖或核糖和一个磷酸基团组成。碱基又有四种, 即腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶及胸腺嘧啶或尿嘧啶。其中糖-磷酸骨架在分子的外侧沿螺旋轨道运行, 碱基在中央成螺旋状排列。其中一条链上的一个碱基总是与另一条链的一个碱基配对, 链间氢键决定螺旋结构。如果 DNA 或 RNA 的周围环境变化, 在某些条件下如升温、加入试剂、光的辐照等, 这些核酸就会变性。如果调整某些条件, 又能复性。所有这些反映了分子中振动转动机构以及它们功能的变化可以从它们的激光喇曼光谱表示出来, 下面进行阐明。

1 核酸的激光喇曼散射公式^[1]

• 本文 1991-01-28 收到。

核酸是天然非线性电介质,通过测量可确定 DNA 分子具有一个沿着双螺旋轴方向的大偶极矩,这可以认为 DNA 在中性水溶液中有一个负电荷,围绕它有相反方向的正离子气,当在外电场作用下,这正离子沿着大分子表面位移,产生了偶极矩,就是在外电场作用下, DNA 的极化率发生了变化。那么根据一般的喇曼散射理论可以求得沿立体角 4π , 斯托克喇曼散射的总强度

$$I = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} v_{sc}^4 I_0 |(\alpha_{ps})_f|^2, \quad (1)$$

其中 $v_{sc} = v_{sc} - v$, v_{sc} 为激发激光的频率, v 为物质因受激光激励而散射的光谱频率, v_{sc} 称为喇曼位移。同一物质受不同波长的激光激励产生不同的喇曼光谱,但各条喇曼谱线对于激发谱线的位移是相同的。要是对不同的散射物质时,其 v_{sc} 喇曼位移是不同的,所以喇曼位移可以反映该物质的特性。也就是说在激光喇曼实验中所观察到喇曼位移提供了散射物质中分子振动的信息。公式中

$$(\alpha_{ps})_f = \frac{1}{hc} \sum_{\sigma} \left\{ \frac{[M_p]_{f1, \sigma} [M_p]_{\sigma f, p}}{v_{\sigma} - v_p - v_{sc}} + \frac{[M_p]_{f1, \sigma} [M_p]_{\sigma f, p}}{v_{\sigma} - v_p + v_{sc}} \right\}, \quad (2)$$

这个喇曼效应的张量元公式,从半经典理论或量子力学处理,其 $(\alpha_{ps})_f$ 表示式相类似。式中 v_{sc} 是激发激光的(入射辐射)频率, f 及 i 是终态和始态,都是在分子的基态下,不过其振动态不同。 $[M_p]_{f1, \sigma}$ 及 $[M_p]_{\sigma f, p}$ 是介在激发态与基态间 ρ, σ 电偶极矩算符的矩阵元, \sum_{σ} 展开为散射分子所有激发态之总和。

当激光激发频率与分子吸收光谱符合时,产生了共振喇曼效应,那么喇曼散射张量为

$$(\alpha_{ps})_{f1, f0} = \frac{1}{hc} \sum_{\sigma} \frac{[M_p]_{f1, \sigma} [M_p]_{\sigma f, p}}{v_{\sigma} - v_p - v_{sc}}. \quad (3)$$

如果激发频率 v_{sc} 接近于吸收带 $v_{\sigma} - v_p$ 而其频率差 $v_{\sigma} - v_p - v_{sc}$ 比激发态的振动频率 v_k 大,其中 $v_k = v_{\sigma} - v_p$; v_{σ} 为激发态的最低级, v_{σ} 中的 $k=1, 2, 3, \dots, n$ 即激发态中较高的各级。这时 $v_{\sigma} - v_p - v_{sc} > v_k$ 称为近共振条件。

当核酸受到激光激励时,由于内部各基团的结构有许多不相同,对应的振动频率亦不相同。所以对一个核酸大分子来说,同一波长激励时,不同的基团由于它们的吸收谱各不相同,有的属共振,另一些则属于近共振或远离共振的激光喇曼光谱,其频率可用不尽相同的公式计算。采用可见紫外调谐激光可以满足共振、近共振喇曼效应的需要,成为研究生物大分子结构无损检测、灵敏度很高的工具。

2 核酸的激光喇曼光谱

2.1 核酸的喇曼位移与结构^[1]

DNA 的碱基是成对存在的,如图 1 中 [A] 与 [T], [G] 与 [C] 配对,它们之间主要是依靠氢键结合的。碱基、脱氧核糖及磷酸间的联接如图 2。DNA 螺旋中两个链的键链方式如图 3。

上述各基团及链键等都有相应的振动元,因此其喇曼光谱可由它们振动形成。当我们观察碱基时,发现尿嘧啶环与苯环很相似,于是对比苯环的结构与喇曼位移的关系,可以推导出尿嘧啶环的结构与喇曼位移的关系。苯分子结构是化学家经过几十年潜心研究的一个问题,先有凯库勒模型、分子应属于 D_{6h} 点群,以后提出点群 D_{3h} 模型有十二个不同的对称型,通过它的简

正振动求出其对应的振动频率.由此得到一些粗略概念如C—H键与C—C键的伸长振动和弯曲振动等.同样在尿嘧啶环中也可以通过简正振动频率得到.然后从尿嘧啶再推广至其它碱基等.

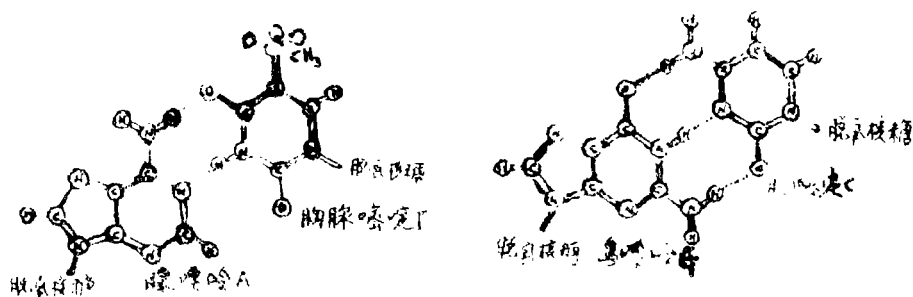


图1 两个常见的DNA碱基配对(虚线表示氢键)

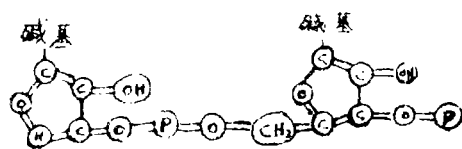


图2 碱基、核糖、磷酸间的联接

一般在远离共振的波长激励下,每一个纯核酸在光谱 $300-1700\text{cm}^{-1}$ 范围内有30—40个喇曼带.他们大部分是碱基振动引起的.例如对尿嘧啶的 $1750, 1650\text{cm}^{-1}$ 二个强的喇曼带是由它的C=O及C=C伸缩振动引起的;胞嘧啶和鸟嘌呤在这里仅仅是非常弱的喇曼带.然而接近 1100 及 810cm^{-1} 两个强带是由磷酸-核糖主链引起的,即 1100cm^{-1} 喇曼带是 $\text{O}-\text{P}-\text{O}^{-1}$ 对称伸缩振动产生的, 810cm^{-1} 喇曼带则是聚核苷的A型构象引起的.如果是其它型,这个喇曼带就移位至 $807-814\text{cm}^{-1}$ 范围,同时变得很弱.

近共振、共振的激光喇曼光谱亦有它的对应关系. $[\text{PO}_3]^{2-}$ 离子对称伸展产生 980cm^{-1} 喇曼谱,尿嘧啶(U)有二个吸收带,它们是 $260\text{nm}(\bar{A} \leftarrow \bar{X})$ 及 $210\text{nm}(\bar{B} \leftarrow \bar{X})$.用激光 257.3nm 激励,对应 260nm 吸收带的共振喇曼效应有六个喇曼带,即 1689cm^{-1} (用U, I表示), 1636cm^{-1} (U, II), 1482cm^{-1} (U, III), 1402cm^{-1} (U, IV), 1233cm^{-1} (U, V)及 787cm^{-1} (U, VI).上述(U, I)……(U, VI)表示尿嘧啶I型……VI型.如果是近共振的激光激励,对应 260nm 吸收带也有六个喇曼带,

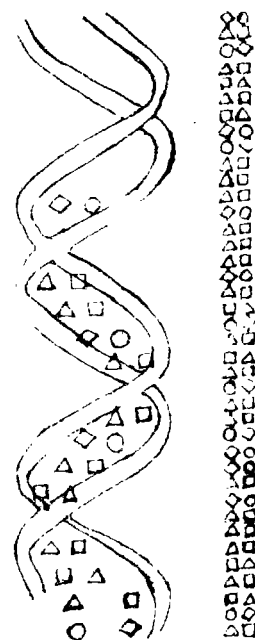


图3 DNA的碱基配对

- 胞嘧啶(C);
- ◇—鸟嘌呤(G);
- 胸腺嘧啶(T);
- △—腺嘌呤(A)

它们是 1689cm^{-1} , ($1636\text{cm}^{-1} \rightarrow 1629\text{cm}^{-1}$), 1600cm^{-1} , ($1482\text{cm}^{-1} \rightarrow 1497\text{cm}^{-1}$), ($1402\text{cm}^{-1} \rightarrow$
 $\left\{ \begin{array}{l} 1380 \\ 1360 \end{array} \right. \text{cm}^{-1}$), ($1233\text{cm}^{-1} \rightarrow 1290\text{cm}^{-1}$). 上述各条喇曼光谱对应: 1689cm^{-1} 表示 $\text{C}^4=\text{O}$ 伸展与骨
 干的伸展振动, 它类似于苯环 $S_{15}(e_{2g})$ 振动. 1636cm^{-1} 表示 $\text{C}^4=\text{O}$ 伸展振动类似苯环 $S_{15}(e_{2g})$ 环
 运动, 它们有 180° 位相差. 1482cm^{-1} , 表示 $\text{C}^2=\text{O}$ 伸展运动及振动, 类似于苯环 $S_{15}(e_{2g})$ 振动. 胞
 嘧啶(c)有二个吸收带: $268\text{nm}(\bar{A} \leftarrow \bar{X})$ 及 $230\text{nm}(\bar{B} \leftarrow \bar{X})$ 用远离共振激光 647.1nm 激励产生
 1533cm^{-1} , 1296cm^{-1} , 1243cm^{-1} , 980cm^{-1} , 783cm^{-1} 等的频率振动. 用 257.3 激励产生激光喇曼
 位移为 1650cm^{-1} , 1533cm^{-1} (强), 1400cm^{-1} (弱), 1296cm^{-1} (强), 1243cm^{-1} 及 783cm^{-1} . 这些激
 光喇曼位移中, 部分是由吸收带 268nm 引起的强度, 另外由吸收带 230nm 近共振引起的.
 1400cm^{-1} 对应于尿嘧啶(U,V)及(U,N)的振动. 1533cm^{-1} 是出现在类似于苯 $S_{15}(e_{2g})$ 类伸展振动
 的尿嘧啶(U, ■) 1482cm^{-1} 较高的频率. 因为胞嘧啶无 $\text{C}^4=\text{O}$ 伸展, 所以也没有 $\text{C}^4=\text{O}$ 与 $\text{C}^5=\text{C}^6$
 间的振动偶合. 腺嘌呤(A)的吸收带为(276nm), (260nm)及(210nm), 通过近共振激光喇曼光
 谱的研究, 可以认为吸收带(276nm)引起的振动带为 1580cm^{-1} 及 1484cm^{-1} . 由吸收带(210nm)
 引起的振动带为 730cm^{-1} .

综上所述, 应用激光喇曼效应, 可以识别腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶及胸腺嘧啶或尿嘧啶以及
 核糖-磷酸主干的振动.

2.2 激光喇曼光谱能够提供核苷酸系统中碱基配对存在的信息^[2].

按照 Watson 及 Crick 提出的 B-DNA 模型^[3], 二个聚核苷酸串形成双螺旋, 由氢键联结在
 一起. 当螺旋一无规线团变换情况下, 通过焓变化的测定, 认为螺旋的结合能不全是氢键来的,
 应考虑附加在氢键的, 还有偶极子-偶极子相互作用, 偶极子-感应-偶极子相互作用, 互补碱基
 配对中两个碱基间的色散相互作用等. 然而, 起主要作用还是氢键. 所以从图 1 看出, 碱基配对
 的存在还是在于氢键. 如果氢键断裂碱基配对也就破坏. 这也与羰基伸展振动($1600-1700\text{cm}^{-1}$)
 关系甚大. 因此从氢键的激光喇曼光谱或羰基伸展振动的喇曼光谱, 可以确定碱基
 配对的存在. 碱基配对是 DNA 结构最重要的特性之一, 表示两条的碱基顺序是互补的. 如果一
 条链的碱基顺序是 AATGCT, 另一条链的碱基顺序则为 TTACGA, 其中腺嘌呤(A)=胸腺嘧啶
 (T)、鸟嘌呤(G)=胞嘧啶(C). (嘌呤)=(嘧啶). 不同的生物大分子, 它的 DNA 碱基组成是不
 同的. 如 $([G]+[C])/([A]+[T])$ 的比值对不同生物大分子是不同的. 从激光喇曼光谱中可
 以判断 $\frac{[G]}{[A]}$ 或 $\frac{[T]}{[C]}$ 的比值, 从而辨别了不同生物的 DNA, 对 RNA 来说, 其中用尿嘧啶(U)代替
 了胸腺嘧啶. 尿嘧啶有十分强的带, 它处于 1695cm^{-1} 和 1662cm^{-1} , 它们是由 2.4 位置的双羰的
 $\text{C}=\text{O}$ 伸展振动引起的. 在 polyA, polyU 中, 腺嘌呤(A)与单带尿嘧啶(U)间氢键, 它的伸展模处
 于 1681cm^{-1} , 氢键因受热而断开时, 则导出 $\text{C}=\text{O}$ 的 1695cm^{-1} 及 1660cm^{-1} 带和 1680cm^{-1} 及
 1660cm^{-1} 两个喇曼带, 其中相对强度可以用来测定配对与非配对间尿嘧啶数目比.

2.3 减色、增色与碱基堆集

在 DNA 或 RNA 的双螺旋构象中, 碱基排列平面垂直于螺旋轴, 即这些平面是彼此平行,
 由于疏水性作用堆集相隔. 相邻二个碱基平面间的距离大约 3.4\AA . 这些碱基平面的堆集引起
 在 260nm 这紫外吸收强度降低. 这种效应称为减色效应. 相反, 如果除去 Watson-Crick 结构, 紫
 外吸收就增加, 称为增色效应. 因此通过激光喇曼散射一样可以观察到喇曼减色与喇曼增色.

喇曼减色最早在聚腺嘌呤核苷酸中观察到,它依赖于碱基顺序的加强,说明它是垂直碱基堆积间电子相互作用引起的,可影响到每个喇曼带的强度,就是说假如这个堆积引起吸收带强度的减弱,这时发生的共振喇曼效应,由于堆积同样引起喇曼带强度的减弱,这里喇曼带强度的减弱比吸收带减弱更明显,这是因为吸收强度与跃迁矩的平方成正比,而喇曼强度与跃迁矩四方成正比。总之,增加序会引起核酸的某些喇曼带强度减弱。如果升高温度,就会减弱聚核苷酸二级结构序的总数,这时喇曼带强度增加,即增色。

2.4 用激光喇曼光谱研究 DNA 变性及复制⁽⁴⁾

对中性 DNA 溶液加热,当两条链之间的结合力受到破坏,两条链就分离,这时 DNA 变性,它形成消光跃升,消光值上升到最大消光值一半的温度称为融解温度 T_m ,因此用 T_m 表示 DNA 变性的一个参数,DNA 变性前后激光喇曼光谱,显然不相同,和上节中碱基堆积的变化一样,可在喇曼光谱减色或增色上反映。DNA 除加热产生变性外,还可受紫外光辐照,在 DNA 内导致胸腺嘧啶二聚体的产生,这就引起 DNA 结构上的变化。一定的试剂作用能使氢键断裂或疏水性作用减弱;以及在一定强度的离子下或且有较大的 PH 值一样都会影响 DNA 的结构而产生许多变性的,这些都可以通过是否出现 85cm^{-1} 的激光喇曼光谱来鉴别⁽⁵⁾。

双链 DNA 复制的研究是重要,因为生物所有的结构处于不断的新陈代谢之中,细胞不断分裂,自我繁殖、自我修复,主要是研究 DNA 的复制,它是非常复杂的过程,至今还没有完全弄清楚,例如它如何迅速从外界吸取物质建立碱基配对,DNA 复制如何与细胞分裂周期协调一致,DNA 分子的三级四级结构的复杂系统受到几何学上如何的约束,它们如何建立防护措施,既能避免复制误差,又能消除难免出现的差错,这些问题有希望通过激光喇曼效应来探知。

2.5 应用激光喇曼光谱可以辨别 B-DNA 与 Z-DNA

DNA 的 Watson-Crick 结构为 B-DNA 和 A 型 DNA 都是右手螺旋,如果 DNA 是高离子强度溶液,用 X 射线衍射,观察到它们是左手螺旋,这种左手螺旋结构称为 Z-DNA,随后确实证明细胞内 DNA 存在左手螺旋区,可以用荧光技术来检测 Z-DNA 的存在,应用激光喇曼光谱技术分析了 $d(\text{CP}, \text{GP}, \text{CP}, \text{GP}, \text{C}, \text{PG})$ 结构,测得三条谱线,可以用来辨别 B-DNA 与 Z-DNA,当浓度低时,其喇曼光谱与 B-DNA 相似;当浓度高时,其喇曼光谱则与 Z-DNA 相似,这些说明溶液的浓度改变了 $\text{poly}(dG-dC)$ 的结构影响了光谱的波型。

2.6 通过共振激光喇曼光谱检测核酸中氢-氘交换⁽⁶⁾

核酸的远离共振的喇曼光谱中,碱基振动频率对周围分子所处环境是不敏感的,例如尿嘧啶的喇曼带 1233cm^{-1} ,它的许多碱基的振动都分布在同一喇曼带中,这样不容易了解某个碱基的分子环境,如果 RNA 水溶液中 $^1\text{H}_2\text{O}$ 与 $^2\text{H}_2\text{O}$ 快速混合,尿嘧啶的 NH_2 位置可用 N^2H_2 替代,用远离共振的喇曼实验是测不出来的,这时应用激光共振喇曼实验,则可观察到 1233cm^{-1} 喇曼带强度随时间变化而减小,因此共振喇曼效应检验碱基振动频率与周围分子所处环境是非常敏感的。

这种氢-氘交换的测定,证实了 DNA 双螺旋中开放态的存在,近年来进一步研究得出 DNA 双螺旋中存在着孤子激励,这个是因为运动方程是非线性薛定谔方程式,它的解自然得出孤子的存在,同时还得出 DNA、RNA 中能量依靠着孤子的传播,这些理论的发展对 RNA 转录,能量必须从周围流向 RNA 聚合酶复合物等机构得到较深入的了解。

3 结论与讨论

核酸激光喇曼光谱不但能识辨核糖、磷酸及碱基中的嘌呤与嘧啶,即碱基中腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶都有强的特征喇曼谱.应用共振喇曼效应对碱基中各残基也能标识.这些碱基在不同 PH 中,以及各种碱基的衍生物都能显示出特征的喇曼光谱.对 DNA 双螺旋的碱基配对,堆集、变性、复性及用激光控制 DNA 复制过程等都能够应用喇曼效应来检测.它具有极高的灵敏度又有大量的信息.所以它是研究核酸的结构和生化功能很好的无损分析工具.

测定 DNA 等生物大分子的技术,已有 X 射线的衍射.它能够准确测量固体、晶体于 1—100 Å 范围内的结构.但对液态则无能为力.近年来发展了二维相关核磁及自旋交换的核磁共振方法,能对液态生物大分子的空间结构准确测量.电子显微镜要求精心准备样品得到结构 20 Å 分辨率清晰图象.但是它们只在微秒-秒时域的测量.而遗传信息的表达,分子识别,能量转移等的时域范围很广,极需纳秒、皮秒、飞秒等高空间、高时间分辨率的光谱学研究技术.因此脉冲喇曼光谱技术(时域 fs—μs),时间分辨喇曼光谱测量技术等将成为近代对生物大分子的无损检测起着重要的作用.由于生物大分子的自旋性质,应用激光喇曼偏振技术来测定时,可以得到更详细的信息.尤其应用喇曼偏振多孔道技术更是优异的方法.

参 考 文 献

- [1] Clark, R. J. H. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, 5, (1986).
- [2] Homma, S., *Phys. Rev. A*, 72, 4 (1984).
- [3] Szekly, M., *From DNA to Protein*, (1980).
- [4] Harbers, E., *Nucleinsuren Biochemie und Funktionen*, (1975).
- [5] Urabe, H., *Phys. Rev. Lett.*, 53 (1984).
- [6] Saenger, W., *Principles of Nucleic Acid Structure*, (1984).

Laser Raman Spectrum of Nucleic Acid

Lin Xing

(Department of Electric Technique)

Abstract In this paper, the relation between laser Raman spectrum of nucleic acid and its structure and biochemical function was investigated. For the determination of nucleic acid, laser Raman spectrum is firmly believed by the author to be a high sensitive and high resolution method with which large amount of information can be generated.

Key words Raman displacement, DNA double helix, hydrogen bond, base-pair, hydrogen-deuterium exchange