

# 生物分子激光光谱的发展与展望

李 焕 玲

(中山大学物理系)

用激光光谱研究生物大分子成为最近十多年非常活跃的一个领域.这是因为:(1)生物学与化学、物理学结合,已经发展到分子生物学、量子生物学的水平.本世纪五十年代、六十年代、生物化学家利用生物化学分析和X射线结构分析方法,弄清楚了许多重要的生物分子的化学结构以及它们的空间构象.科学的发展,必然要研究这些分子的结构与功能的关系,这就提出了寻找各种探测手段和方法的要求.(2)激光技术在六十年代、七十年代迅速发展,使传统的光谱学出现了一场革命.这两门新生的学科分支在时间上同时出现,在发展中相互结合,便做出了许多有意义的成果.

作为生命物质的基础,蛋白质分子与简单的(化学的)分子比较,除了它的分子量非常大(从几千到几千万)之外,还有许多独特的性质,如(1)蛋白质存在一级、二级、三级以至四级结构;(2)外界环境变化,会引起蛋白质变性<sup>1)</sup>;(3)生物分子的某些特有的功能,往往与分子中活性部位的化学结构、空间构象及其变化有关;(4)在某些生物大分子体系中,存在能量转移,研究这些转移过程,对于从分子水平上了解某些生命现象是极其重要的.用生化分析,不可避免地要破坏分子的结构,由于水分子在红外波段有强烈的吸收,所以红外光谱只能研究无水的样品,而生物分子却往往只有处于溶液状态或凝聚态才呈现它的功能.因此,寻求一种能够在活体或接近生理环境进行实验的方法就显得十分重要.电子吸收光谱、荧光谱和喇曼光谱正好可以在溶液状态进行实验.

虽然早在三十年代就有人尝试用喇曼光谱的方法研究生物分子,但是由于当时的激发光源太弱,实验无甚进展,只有在以激光为激发光

源之后,情况才发生了根本性的变化.激光常规喇曼光谱可以作为研究生物大分子的结构变化的有力工具;激光共振喇曼光谱(包括准共振喇曼光谱)是研究生物大分子功能的有力工具;瞬态激光光谱技术的发展,对生物分子反应动力学的研究提供了极其重要的手段.

从生物化学系统来看,生物分子大体上分为四类:蛋白质、核酸、脂肪与膜、碳水化合物(碳水化合物由于光散射性不好以及样品处理困难,目前研究得较少),我们在举例的时候,将适当注意各种类型生物分子的激光光谱研究情况.

## 一、生物分子的激光常规喇曼光谱

早期的喇曼光谱工作集中于弄清楚属于蛋白质一级结构的氨基酸残基、侧链和多肽链骨架的振动模式和谱线归属.同时也研究了反映蛋白质二级结构(例如 $\alpha$ -螺旋, $\beta$ -片状折叠和无规卷曲)的 Amide I (C=O 键伸缩振动)和 Amide III (C-N 伸缩振动和 N-H 平面内弯曲)振动模式和谱带. Amide I, Amide III. 谱带波长的移动以及反映蛋白质中 C<sub>α</sub>-C-N 伸缩振动, S-S 和 C-S 键的谱带变化,对蛋白质变性过程的研究往往起着探针的作用.

用常规喇曼光谱方法,已经认证了许多种类的蛋白质的谱线和振动模式,并且进而研究了它们的结构变化和变性过程,也研究了酶的活性部位以及失活之后二级结构的变化等等.有关这些内容已有一些文献综合报道<sup>[1,2]</sup>. 这

1) 变性是指分子的化学成分不变,但空间构象起了变化,例如鸡蛋清加热变成了鸡蛋白.

里我们仅介绍一个有趣的例子：用喇曼光谱技术，在不动手术的情况下研究动物眼球的水晶体结构，N. T. Yu 等<sup>[3,4]</sup>把激光束聚焦到直径为  $100\mu\text{m}$ ，照射在水晶体上，通过喇曼光谱测量，确定了鸟类和爬虫类的眼睛  $\delta$  晶体为  $\alpha$ -螺旋结构，牛和角鲨鱼<sup>[5]</sup>的眼睛晶体则为  $\beta$ -片状折叠和无规卷曲结构。R. A. Schachar 和 Solin<sup>[6]</sup>通过退偏测量，认为牛眼晶体反平行  $\beta$ -片状折叠的氢键线型基团 CONH 优先地在与光轴垂直的方向取向。E. J. East<sup>[7]</sup>还观察到不同月龄(28天和7个月)的老鼠眼晶核的喇曼光谱(图1)表明：随着月龄不同，归属于-SH ( $2580\text{cm}^{-1}$ )的谱带减弱，而归属于 S-S (在  $500\text{cm}^{-1}$  附近)的谱带则加强。这个实验使人联想到年龄增加，会引起眼睛的晶核蛋白质发生变化。

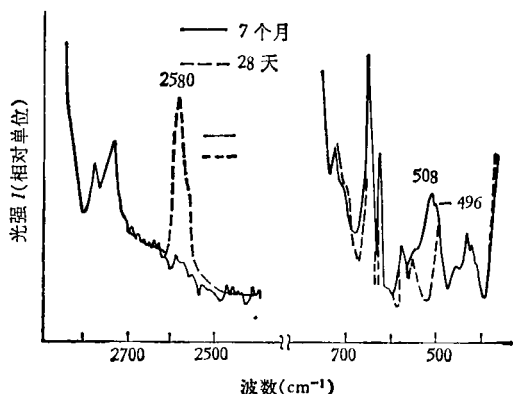


图1 正常老鼠眼晶核的喇曼光谱

## 二、生物分子的激光共振喇曼光谱

生物分子某些特定的功能往往与分子中一定活性部位上功能团的结构有关，而这些功能团又都有自己特有的电子振动吸收光谱。如果激发光波长选定在这一吸收谱带内，那么表征功能团的喇曼光谱就会增强，称为共振喇曼光谱；如果激发光波长接近(而不是进入)吸收带，也有增强效应，称为准共振喇曼光谱。研究这些被增强的谱带行为，有助于了解生物大分子的某种特定功能以及结构变化对功能的影响。下面举一个用激光共振喇曼光谱研究血红蛋白

物理

的例子。

我们知道血红蛋白具有铁-卟啉环结构，卟啉环中心铁离子作为呼吸运动的活性中心，一端与多肽链连接，另一端与第六配位体  $\text{O}_2$ ，CO 等连接(图2)。A. E. Sidwell 等<sup>[8,9]</sup>曾发现在紫外和可见光区有三个吸收谱带(图3)，称为 Soret 带， $\alpha$  带和  $\beta$  带。如果激发光波长落在这些谱带内，表征 Fe 与  $\text{O}_2$  结合以及 Fe-卟啉分子振动的谱带就得到增强。Brunner 等<sup>[10]</sup>曾经研究了血红蛋白共振喇曼光谱各条谱线对分子结构振动模式的归属。

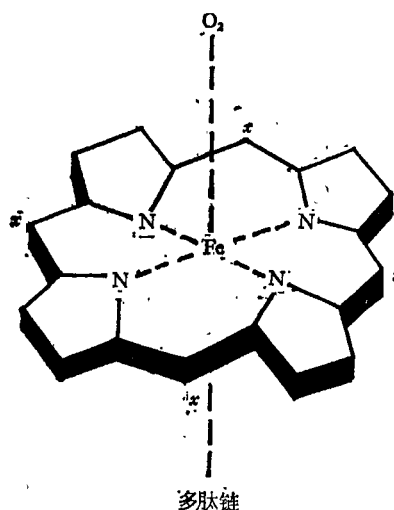


图2 Fe-卟啉环结构图

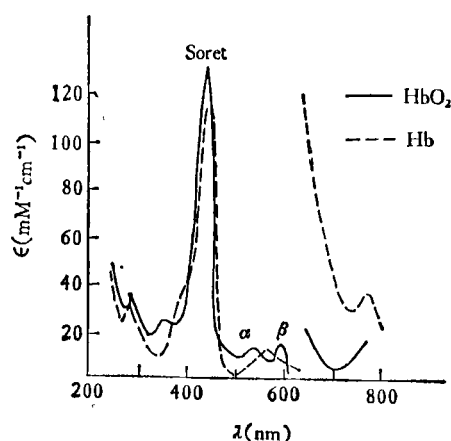


图3 血红蛋白的电子吸收光谱

我们用氩离子激光器作激发光源，激发光源波长  $4880\text{\AA}$ ，对正常人和一种  $\alpha$  型、两种  $\beta$  型

地中海贫血病患者血液中八种单一组份的血红蛋白作了激光共振喇曼光谱研究<sup>[11]</sup>，观察到表征 Fe-O<sub>2</sub> 伸缩振动的谱带  $\nu(\text{Fe-O}_2) = 572\text{cm}^{-1}$  在氧合血红蛋白 (Oxy-Hb) 中出现，在脱氧血红蛋白 (Deoxy-Hb) 中则消失；表征卟啉环中心 Fe<sup>++</sup> 与吡咯氮间伸缩振动的谱带  $\nu(=\text{C-N})$  在氧合血红蛋白中为  $\nu = 1392\text{cm}^{-1}$ ，而在脱氧血红蛋白中为  $\nu = 1387\text{cm}^{-1}$  (谱带发生

了位移)，详见 (图 4)。因此这两组谱带可以作为探针去研究不同血红蛋白与 O<sub>2</sub> 结合和释放的行为，亦即去研究血红蛋白结构变化对携氧功能的影响。在我们的实验中看到：两种  $\beta$  型地中海贫血病患者血液中的 Hb-F 和 Hb-A<sub>2</sub> 对氧具有较高的亲和力、不易释放氧，而  $\alpha$  型地中海贫血病患者血液中的 Hb-H 却很难与氧结合。这是两种不同的产生缺氧症状的原因。

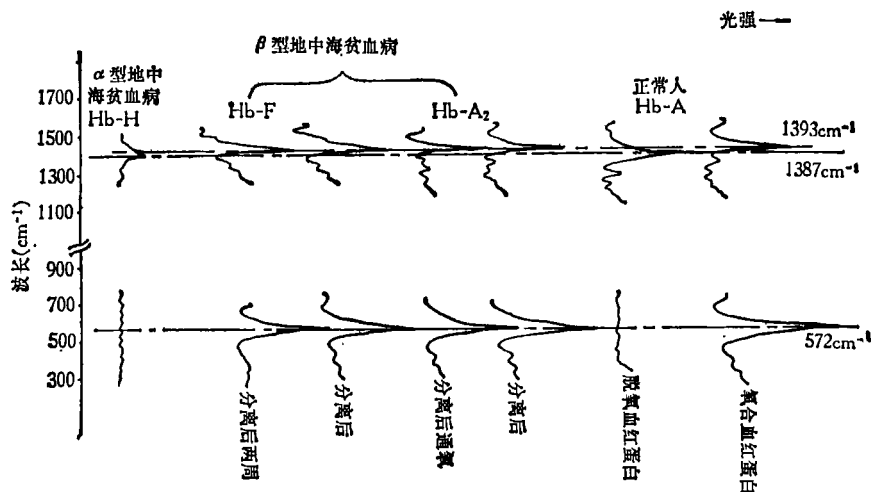


图 4 正常人和一种  $\alpha$  型, 两种  $\beta$  型地中海贫血病患者血液中 Hb-A, Hb-A<sub>2</sub>, Hb-F, Hb-H 的激光共振喇曼光谱

这些实验结果与临床现象符合，为激光光谱应用于医学临床病理研究作了有益的尝试。

核酸(包括 RNA 和 DNA)和蛋白质一样是生命的重要物质基础，在生物遗传基因的基本研究中担负着极其重要的角色。因此，用激光光谱研究核酸的工作也普遍受到重视。

由于构成核酸的硷基[腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶 (RNA) 或胸嘧啶 (DNA)] 的电子吸收光谱落在紫外光区(200—280nm)，因此用紫外激光激发的共振喇曼光谱和准共振喇曼光谱可以得到很多重要的信息。各种硷基、核苷酸、聚核苷酸、双螺旋骨架、醌-磷酸骨架等的喇曼光谱已被普遍深入地研究了。例如 (图 5)<sup>[12]</sup> 是 5' 磷酸  $\beta$ -尿苷的准共振喇曼光谱，由于共振增强效应，测定灵敏度可以达到  $10^{-4}\text{mol/l}$ ，与紫外吸收光谱的测量下限相当，而喇曼光谱所提供的信息则更加详尽，更具有选择性，而

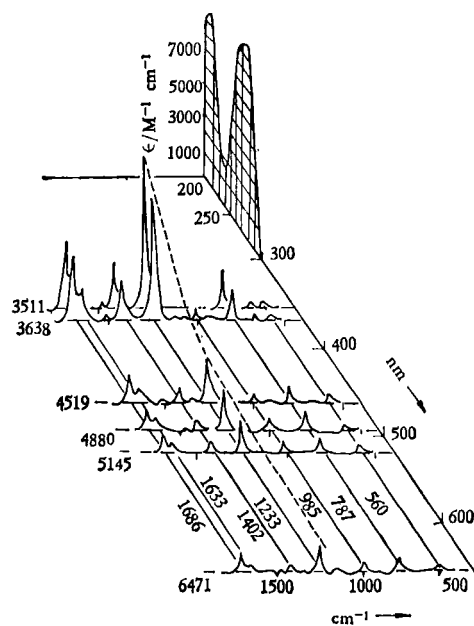


图 5 5' 磷酸  $\beta$ -尿苷的准共振喇曼光谱

且光谱方法是一种无结构破坏的方法，可以获得核酸分子在生物环境下的信息。因此，研究诸如病毒<sup>[13]</sup>等这一类的核酸-蛋白质复合系统的二级和三级结构，研究三磷酸腺苷(ATP)的光化学过程<sup>[14]</sup>，以及核酸分子激发态和双螺旋分解过程的关系等，成为最近用激光光谱方法研究核酸的活跃课题。

### 三、生物分子的瞬态激光光谱

#### 1. 高时间分辨激光共振喇曼光谱

吸收光谱和荧光光谱方法是研究生物分子的重要手段，用高时间分辨(ns 到 ps 量级)的激光诱发吸收光谱和荧光光谱，在研究含有卟啉环的生物分子(如血红素、叶绿素等)的反应过程，RNA, DNA 和生物膜等方面都做了大量工作，这里不赘述。应当指出，无论吸收光谱或荧光光谱，它们的谱带都比较宽，对于复杂分子，各个特征谱带容易重叠，难以辨认和分析，因而给样品制备、预分离等提出较多要求。另一方面，如果某一种生物分子过程属于不引起化学成份或价键的变化而只引起分子结构排列的异构化(例如视紫质分子吸收光子之后，引起分子的顺式和逆式变化)，这时吸收光谱不灵

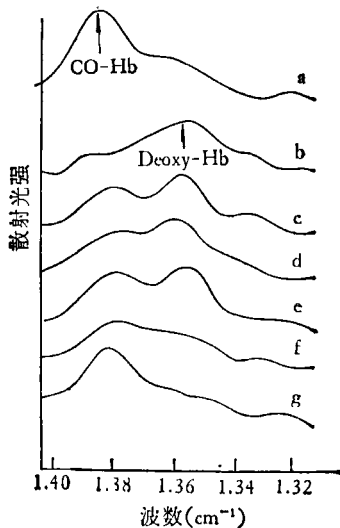


图6 HbCO 的瞬态喇曼光谱  
a. 光解前; b. 15ns 后; c. 100ns; d. 1 $\mu$ s;  
e. 10 $\mu$ s; f. 100 $\mu$ s; g. 1ms

敏，用喇曼光谱就更容易探测。

随着 ps 激光脉冲能量的提高，用一次脉冲激发 ( $> 1mW$ )，有可能获得喇曼光谱或是共振喇曼光谱的信号。典型的高时间分辨率共振喇曼光谱(亦称瞬态共振喇曼光谱)是由  $Nd^{+++}$  YAG 被动锁模染料激光器经过放大、倍频，或是同步抽运的染料激光器激发样品，用光学多道分析器(OMA)作为记录系统，分光器视工作要求选择。这种方法可以一次获得整个谱图，得到比吸收光谱和荧光光谱更为详尽的资料。

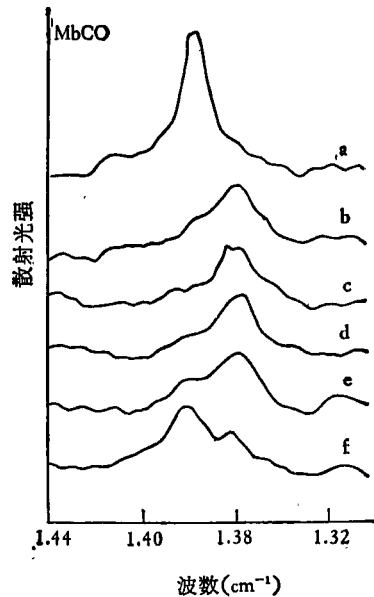


图7 MbCO 的瞬态喇曼光谱  
a. 光解前; b. 15ns 后; c. 100ns; d. 1 $\mu$ s;  
e. 10 $\mu$ s; f. 1ms

图6和图7分别为 HbCO 和 MbCO 光分解的瞬态共振喇曼光谱图。激发波长落在 Soret 带范围内，光谱记录的波段为  $1225-1575cm^{-1}$ 。血红蛋白特征谱线对脱氧血红蛋白为  $1357cm^{-1}$ ，对碳氧合血红蛋白为  $1373cm^{-1}$ ，对氧合血红蛋白为  $1377cm^{-1}$ ；对肌球蛋白来说，相应各谱线的波长是一样的。从图6看到，在 ps 脉冲作用下，HbCO 被光分解，释放出 CO；15ns 后看到的仍然是脱氧血红蛋白的光谱；100ns 时 CO 峰重新出现，表明 CO 与 Hb 重新结合了；逐渐地经过 1ms 后光谱形状和光分解

前一样。对 MbCO 来说(图 7), CO 被光分解后一直到 1ms 才又重新与 CO 结合, 这表明 MbCO 一经被光分解, 释出 CO, 就比 HbCO 难以重新与 CO 结合了。这个实验现象和这两种蛋白质在生理上的功能是一致的。通过瞬态喇曼光谱实验, 还可以进一步探讨蛋白质多肽链对卟啉环与 O<sub>2</sub>, CO 结合的影响等等机制。

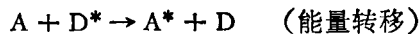
此外, 瞬态喇曼光谱在研究视紫质的光化构象变化, 叶绿素的光合作用等方面也都有成功的例子。

## 2. 生物分子的能量转移

光与原子、分子相互作用存在两种普遍形式:



和



吸收和发射是光谱工作者所熟悉的过程, 能量转移可定义为: “在分子(或原子)或分子体系中, 一个能量量子从吸收部位到利用部位的非辐射的传递, 它们之间的距离大大超过原子间的距离, 过程中没有转换为振动热能, 也没有发生动力学上的碰撞, 而是在供体和受体之间进行的能量转移”。虽然能量转移现象早在二十年代已被观察到(当时称为第二类碰撞), 但是对生物分子中能量转移的大量研究工作却是近十年之内的事<sup>[16-18]</sup>。

根据共振能量转移机制的理论, 能量转移需要满足三个条件: (1) 能量供体必须是发荧光的(在没有受体存在时), 荧光量子产额越高, 能量转移过程越有效; (2) 供体的荧光光谱必须与受体的吸收光谱有重叠, 其效率随光谱重叠部分的增加而增加; (3) 要发生有效的能量转移, 供体和受体之间的距离不能超过 50—100 Å。生物大分子能够充分满足这些条件, 因为生物大分子内各个功能团或活性部位之间的距离往往落在共振转移的特征距离之内; 无论蛋白质活性部位的主要功能团——芳香氨基酸或是核酸结构中的嘌呤和嘧啶环, 都是发荧光的, 它们的电子跃迁吸收光谱均在紫外区, 并且

有较大的重叠区域。此外, 由于蛋白质的多肽链和核酸的糖-磷酸骨架所形成的空间结构既保证了氨基酸残基和碱基残基在分子中排列的有序性, 又有一定的空间形变余地, 容许这些发色基团在一定的范围内活动, 这也有利于能量转移过程的进行。

能量转移也广泛发生在自然界之中。例如在紫外线照射对酶的失活作用中看到: 酶分子吸收光能后, 可以将能量转移到发生失活的部位, 当光能达到某一阈值时, 失活部位发生永久性的变化。又如现在已经证明: 在叶绿素的光合作用过程中, 仅有一小部分的分子是具有最初的光反应中心的作用的, 另外还有比反应中心多几百倍的大多数叶绿素分子则是作为吸收光的天线, 并且在它们的分子间进行能量转移, 一直传到一个发生光化学反应的中心中去<sup>[19]</sup>。

许多实验表明, 生物大分子的发色团的荧光寿命为 10<sup>-9</sup>s (ns) 量级, 而能量转移过程是发生在 10<sup>-10</sup>—10<sup>-13</sup>s 量级, 这正是 ns, ps 瞬态光谱——激光诱发吸收光谱、激光诱发荧光光谱和瞬态激光喇曼光谱的工作范围。

研究生物分子中的能量转移过程是很有意义的, 而瞬态激光光谱实验技术的迅速发展和日趋完善, 两者结合起来, 便开辟了一个大有可为的园地。

## 四、结 语

生物大分子的激光光谱经历了几个发展阶段: 六十年代初始, 首先做了对各种生物分子的吸收光谱、荧光光谱的辨认, 喇曼光谱谱线的归属这些带有基础性的工作。然后是共振喇曼光谱的发展, 由于它对特定功能团的选择性和高灵敏度, 为研究生物分子某些特定的功能做出了很好的实验结果。第三阶段是瞬态光谱(ns, ps 量级)技术的发展, 它对于分子的特征参数, 如能级的荧光寿命、量子产额、键的结合能、激发态(单重态、三重态)的吸收与发射截面等的测定, 以及对某些生物分子功能的动态过程的研究提供了极其重要的手段。虽然在生物分

子反应动力学研究中有许多实验手段可供使用(例如核磁共振谱、电子顺磁共振谱、穆斯堡尔谱等),它们各有特长,可以提供不同的信息。但是,从时间分辨率的尺度来看,只有激光光谱可以达到 ns 和 ps 的量级,而这正是分子能级寿命和分子反应的时间区域。从这个意义上可以看出,激光光谱在研究生物分子方面的重要性,前景诱人!

就光谱方法而论,近年来许多非线性光谱学方法的发展可以用到生物分子的研究上,例如蛋白质,由于结构复杂,加上荧光效应,致使喇曼光谱的背景很高,采用相干反斯托克斯喇曼光谱(CARS)可以减少背景,国内外都有人做这方面的工作<sup>[20]</sup>。偏振光谱对于研究分子的退偏振特性也很有作用。

激光作为研究生物大分子的工具,实际上是扮演两个角色,一个作为探测手段,主要记录各种光谱,所需能量较低;另一个作为参加或诱发分子的反应,如光解、光诱发效应等等,这方面所需能量将视需要而定。激光诱发-光谱测量这种方法目前使用较多。另外,我们是否可以考虑激光诱发-其它谱测定,如激光-穆斯堡尔谱、激光-核磁共振谱等,相信这种尝试也会得到一些新的信息。

生物分子激光光谱就其研究对象来看,无论人工合成的生物分子,生物体内分离出来的具有活性的蛋白质,或是生物体都有人探讨。但是与种类繁多的生物物质相比较,目前被研究过的对象还是非常少的,还有许多工作可做。

分子生物学作为生物、化学和物理学相结合的一门新兴的交叉学科,正在吸引着越来越多的物理学工作者加入到这个领域中来。在这个学科之中,用光学的方法、光谱学的方法去研究生命现象中分子活动的规律,相信会得到许多更接近自然的真实的知识。

### 参 考 文 献

[1] R. J. H. Clark, *Advances in Infrared and Raman*

*Spectroscopy* Heyden and Son Lid., Vol. 1. (1975), Chap. 2 and Chap. 3.

- [2] J. A. McCray and P. O. Smith, *Laser Application* (M. Rose ed.) Academic Press Inc., Vol. 3, p. 1.
- [3] N. T. Yu, et al., *Exp. Eye Res.*, **24** (1977), 331.
- [4] J. F. P. Kuck et al., *Exp. Eye Res.*, **23** (1976), 9.
- [5] N. T. Yu and E. J. East, *J. Biol. Chem.*, **250** (1975), 2196.
- [6] R. A. Schachar and S. A. Solin, *Invet. Ophthalmol.*, **14** (1975), 380.
- [7] E. J. East et al., *J. Biol. Chem.*, **253** (1978), 1436.
- [8] T. G. Spiro and T. C. Sterkas, *J. Amer. Chem. Acta*, **96** (1974), 338.
- [9] A. E. Sidwell et al., *J. Biol. Chem.*, **123** (1938), 355.
- [10] T. G. Spiro, T. C. Sterkas, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96** (1974), 338.
- [11] 李焕玲等, *中国激光*, **11-4**(1984), 244, 11-4 (1984), 244.
- [12] Yoshifumi et al., in *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, Vol. 5, Heyden London, (1980), 218.
- [13] G. J. Thomas et al., *J. Mol. Biol.*, **102** (1976), 103.
- [14] A. J. Murphy and M. F. Morales, *Biochemistry*, **9** (1970), 1528.
- [15] J. M. Friedman and K. B. Lyons, *Nature*, **284-10** (1980), 570.
- [16] A. Laubereau, von der Linde and W. Kaiser, *Phys. Rev. Lett.*, **28**, (1972), 1162.
- [17] M. Gueron, J. Eisinger and A. A. Lamola, *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 1. (Ed. by O. P. Paul et al.), Academic Press, New York, (1974), 312.
- [18] J. Eisinger and R. E. Dale, *Excited States of Biological Molecules* (Ed. by J. B. Birks), John Wiley and Sons, (1976), 579.
- [19] R. K. Clayton, *Light and Living Matter*, McGraw-Hill, New York, (1972).
- [20] 刘颂豪等, *应用激光* **1-3**(1981), 9.