

生物物理讲座

第二讲 光谱学在生物物理学研究中的应用

汪宽蓉 孙寿民

(南开大学物理系)

X射线晶体衍射技术提供了有关生物大分子的空间结构信息，几乎可以确定每个原子的位置，对分子生物学的发展做出了重大贡献。不过，绝大多数生物大分子在体内是处于溶液中或与细胞膜结合的，研究生物大分子结构与功能时需保持它与体内环境条件基本一致，才不会改变其构象，丧失其功能。光谱技术适于研究生物大分子在溶液中的构象，而且灵敏度高、准确性好、操作简便、仪器简单，故很受重视，应用极广。在此仅简略介绍采用光谱学方法研究生物大分子结构与功能某些方面的基本原理。

蛋白质是一种重要的生物大分子，由20多种氨基酸组成。某氨基酸的氨基与相邻氨基酸的羧基缩合成肽键。每个肽基团有6个原子，它们处在一个刚性平面上（见图1）。肽基团首

尾相接构成多肽链主链。多肽链的构象就是肽基团绕相应共价单键旋转形成的。给定旋转角 ϕ 和 ψ ，就完全给出了这段肽链的构象。如 $\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$ ，为 α 螺旋构象； $\phi = 180^\circ$, $\psi = -180^\circ$ ，为充分伸展构象；而反平行 β 折叠构象中 $\phi = -139^\circ$, $\psi = +135^\circ$ 。此外，还有无规卷曲等构象。这些都是蛋白质的二级结构。图1中R代表氨基酸残基，称为多肽链的侧链基团。肽链在空间卷曲盘旋，靠侧链基团间的二硫键、氢键、疏水键、离子键和范德瓦尔斯力作用，使蛋白质形成稳定的空间三维结构，称为三级结构。酪氨酸、色氨酸及某些辅基等均是重要的发色团。借助这些发色团的光谱，再与其它多种技术相配合，会使我们了解许多有关分子结构的信息。

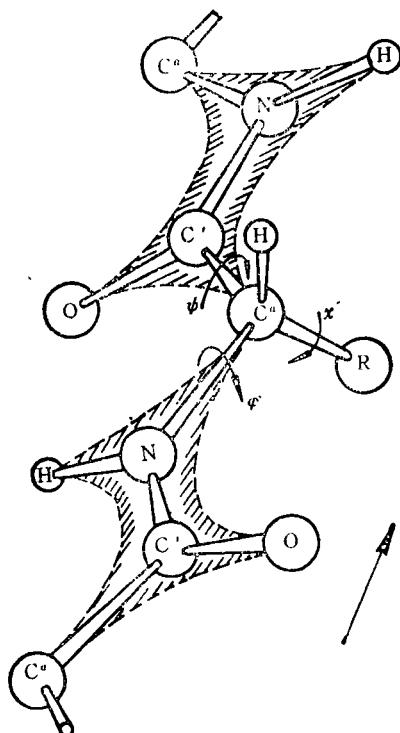


图1 肽键基团及其共价单键旋转角

一、紫外、可见吸收光谱

分子对紫外或可见光的吸收遵从比尔定律
 $A(\lambda) \text{ (吸收)} = C \text{ (浓度)} \times \epsilon(\lambda) \text{ (消光系数)} \times l \text{ (样品光径)},$ (1)

其中 λ 为波长。通过测定 A ，可定量测量样品浓度，进而可研究与浓度变化相关的反应过程及其动力学问题。 ϵ 反映分子性质。测定最大吸收峰处 ϵ_{\max} 及对应的波长 λ_{\max} ，可推测样品包括何种基团，这是许多定性分析的基础。

按量子力学关系， ϵ 与发色团从0态向a态跃迁时的跃迁偶极矩 μ_{0a} 有关，其关系为^[1]
 $D_{0a} = |\mu_{0a}|^2 = 9.180 \times 10^{-3} \int (\epsilon/\nu) d\nu \cdot (\text{德拜})^2,$ (2)

D_{0a} 称为偶极强度， ν 为光频，积分是对该吸收带进行。 μ_{0a} 是一个两端有箭头的矢量，其取向相对于发色团框架坐标是固定的。欲测量 μ_{0a} 的取向，需先后采用两互相垂直的偏振光，照射发色团取向很好的样品（如薄晶片），分别测量

样品对两偏振光的消光系数 ϵ_{\parallel} 和 ϵ_{\perp} 来确定。这种方法叫二向色性法。现在对生物大分子中重要发色团跃迁偶极矩的取向已经有所了解。使大分子沿某方向取向，例如对于长椭球形分子，可靠流动或外加电场，或将其溶于有粘性的溶液里，在干燥过程中用刷子刷来获得分子长轴沿 z 轴取向。利用 $\epsilon_{\theta}/\epsilon_{\parallel} = \cos^2 \theta$ (θ 为偏振方向与跃迁偶极矩间夹角， ϵ_{\parallel} 为 $\theta = 0$ 之情况)，可以估计这些发色团在大分子结构中的取向。由于一个吸收带对应一个吸收跃迁偶极矩，而相邻吸收带所对应的跃迁偶极矩取向不太可能一致，利用二向色性，还可以确定一条看起来比较平滑的吸收谱带是否仅涉及到两电子态间的跃迁。在做这种分析时，常将上述二向色性测量数据处理为二向色性比率 d ， d 定义为

$$d = (\epsilon_{\parallel} - \epsilon_{\perp}) / (\epsilon_{\parallel} + \epsilon_{\perp})$$

或

$$d = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp}). \quad (3)$$

例如，图 2 中虚线为吸收谱，实线为二向色性谱。二向色性谱可以清楚地指明有三条谱带： $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁谱带，平行于 z 轴偏振的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和垂直偏振的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁谱带。

简单说，谱带的位置、强度和形状主要由发色团本身决定。而实际上，它们将受环境影响，包括 pH、溶剂极性、介电常数、介质的刚性，此外邻近是否还有发色团，是否有特殊作用的化学基团等等。利用光谱对环境敏感这一特性，可以研究发色团所在的大分子微区环境和大分子构象等问题。蛋白质多肽链卷曲盘绕形成三级结构时，有的氨基酸残基在分子表面，与外部溶剂接触，有的藏在分子内部，相当于处在非极性溶剂中。实验表明，酪氨酸或色氨酸在非极性溶剂中的 λ_{\max} 和 ϵ_{\max} 比在极性溶剂中大。若把蛋白质的溶剂从非极性的逐渐变为极性的，且此过程未引起蛋白质构象变化，则可以想象，处于蛋白质分子表面的酪氨酸或色氨酸残基越多，光谱变化就越大，而藏于分子内部的该种残基一直处在非极性溶剂中，在溶剂极性改变时光谱不变化。利用这一敏感特性，再参考该残基完全暴露在表面情况下溶剂极性改变时的光

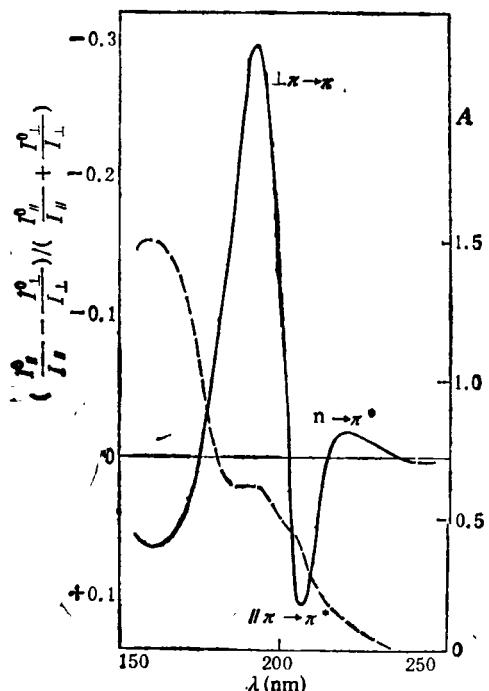
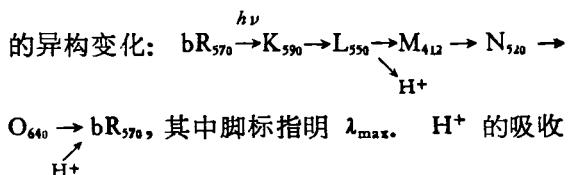


图 2 聚-L-谷氨酸吸收谱(虚线)和二向色性谱(实线)

谱变化，可以估计出暴露在蛋白质分子表面酪氨酸或色氨酸残基数目。这种方法称为溶剂微扰差光谱法。除此之外，还可采用 pH 微扰、温度微扰、浓度微扰等技术提供信息。

现以研究能量转移所用材料之一——嗜盐菌紫膜为例说明吸收光谱的应用。此膜的紫膜区域只有细菌视紫红质 bR 一种蛋白质。bR 由细菌视蛋白及视黄醛两部分按席夫碱方式结合而成。光照后，光谱技术揭示 bR 要经历一系列



与脱去，也可由光谱说明。紫膜的 570 nm 吸收带是由视黄醛生色团的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所致。这样长的 λ_{\max} 说明席夫碱是质子化的。中间产物 M 的 λ_{\max} 为 412 nm，说明此时席夫碱已非质子化，即脱去一个质子。此质子借助蛋白质从膜内逐出膜外，形成质子梯度。此跨膜质子梯度可用于产生 ATP。

用羟胺可使紫膜漂白。再加入全反型视黄

醛 I 可使膜再生。实验结果为：再生膜的 $\epsilon_{280\text{nm}}$ 比漂白膜的 $\epsilon_{280\text{nm}}$ 增加 $19000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。把视黄醛的贡献 $\epsilon_{280} = 8000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 扣除之后，所余 $11000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 部分是芳香族氨基酸的贡献。另有实验表明，此芳香族氨基酸在非极性溶剂中之 ϵ_{280} 比它在水中之 ϵ_{280} 应多出 $18000\text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。由此可以推断再生时紫膜蛋白发生了构象变化，在此构象变化中约有 60% 的芳香族氨基酸从极性环境转入非极性环境中了。如果一个分子中有几个发色团，而且相距较近（如蛋白质中的肽基团、或核酸中的碱基），它们之间就会有偶极-偶极相互作用。相互作用能与偶极子本身大小、两者距离及几何排列情况有关。为了简化讨论，首先以两个完全相同发色团组成双体的最简单情况，说明发色团几何排列不同时的光谱表现。假定每个发色团仅存在两个状态： 0 态和 a 态，且存在一条吸收线，则 $\nu_{0a} = (E_a - E_0)/h$ 。当构成双体后，每个发色团仍保持其基本特性，但由于受到另一偶极子电场的微扰作用，激发态分裂为两个： A^+ 态和 A^- 态，能级分别为 E_{A^+} 和 E_{A^-} 。根据量子力学计算，两能级间距为 $2U_{12}$ ， U_{12} 为两发色团（偶极子）相互作用能。光谱表现为吸收

带分裂为两条，称为激子分裂，裂距为 $2U_{12}/h$ 。两谱线对应的两个偶极强度为¹¹

$$D_{0A^\pm} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta, \quad (4)$$

式中 D_{0a} 为单体发色团偶极强度， θ 为两单体跃迁偶极夹角。（4）式表明，两吸收带相对强度以极其简单的方式依赖于两发色团的几何状况。图 3 给出一例，图 3(a) 的相互作用能大，故谱线裂距大； θ 小，故 D_{0A^+} 和 D_{0A^-} 相差大。由此可以看出，两个完全相同的发色团，仅因排列不同，就有不同的光谱。利用叶绿素双体光谱曾计算出两单体间角度是 82° 。一般情况是两谱带分裂与其带宽相比常常很小，以致不易分辨，而且分子中有相互作用的发色团可能较多，也不一定完全相同，谱带分裂是很复杂的。但通过上述讨论，可以认识到光谱对结构敏感性的产生原因和影响因素。图 2 中， $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 就是两条激子分裂带。可以想象，蛋白质呈 α 螺旋、 β 折叠、或无规卷曲时，由于发色团几何排列不同，光谱形状必不相同。利用这一特性，可以用来估计蛋白质的二级结构。

二、圆二色谱

一平面偏振光可以分解为幅度相等、旋转方向相反的两个圆偏振光：左旋光 E_L 和右旋光 E_R 。当这束光通过样品后，出射光可能有两点变化：一是样品对左旋和右旋光吸收 ϵ_L 和 ϵ_R 不同，两出射光强不等；二是样品对左旋和右旋光折射系数不同，出射光主轴方向相对于入射光主轴方向旋转了一个角度 ϕ 。前一个性质称为圆二色性， $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ 与入射光波长 λ 关系称为圆二色谱（简称 CD 谱）；后者称为旋光性， $\phi - \lambda$ 称为旋光色散谱（简称 ORD 谱）。由电动力学可以证明， $\Delta\epsilon$ 与 ϕ 都与描述分子旋光能力的量——旋转强度 R 有关。旋转强度 R 与分子电跃迁偶极矩和磁跃迁偶极矩两矢量之夹角有关。单纯具有电跃迁偶极矩的单体不会具有圆二色性。具有圆二色性的物质也具有旋光性。同上所

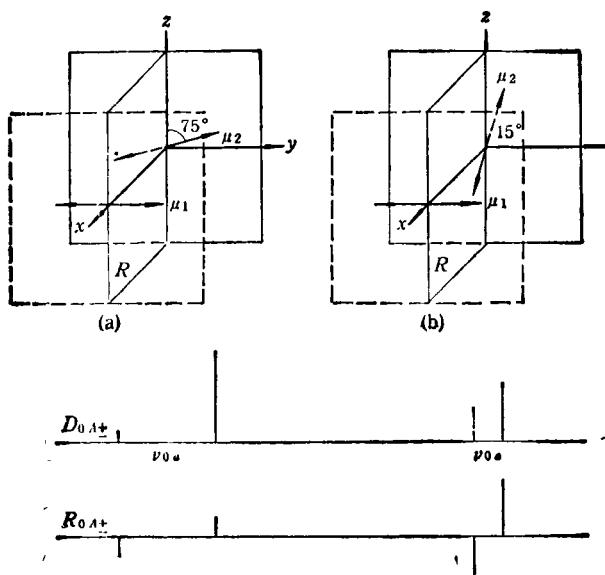


图 3 两完全相同发色团 μ_1, μ_2 呈不同排列时所给出的吸收偶极强度 D_{0A^\pm} 和旋转强度 R_{0A^\pm}

述，双体圆二色谱也是进一步讨论多聚体圆二色谱的基础。为简化起见，我们仍先考虑两相同发色团组成双体的情况。如前所述，此时激发态分裂为 A^+ , A^- 两态，故双体时将有两条 CD 带。根据量子力学计算，对很多样品来讲，虽然单体的旋转强度 R_{ss} 对双体的 R_{AA^\pm} 也有贡献，但 R_{AA^\pm} 主要是由两发色团之距离及两单体电跃迁偶极矩三矢量之混积来决定， R_{AA^+} 和 R_{AA^-} 分别取此混积之正、负值。由图 3 可以看出， R_{AA^\pm} 比 D_{AA^\pm} 对结构更为敏感，因而常把 CD 谱或 ORD 谱做为蛋白质(或核酸)二级结构种类或程度的敏感探针，并相应产生了许多半经验公式。用它来研究蛋白质二级结构以及局部环境对构象的影响和构象变化动力学与热力学问题是很有价值的。

三、荧光光谱

基态分子吸光以后，可跃迁至能级较高的激发态 a, b, c, \dots 。在激发态，由于与周围分子碰撞等因素，会以热能形式消耗一部分能量，从较高能级转换到第一激发态的最低振动能级。分子从这一能级回到基态，可能以辐射形式进行，即发荧光；也可能是非辐射形式，即能量又转换为热能。荧光强度 F 与描述样品本身发射特性的量子产率 Q 、样品浓度 C 、激发光强有关，也与激发时所用波长 λ_{ex} 和检测荧光时所用波长 λ_{em} 有关。 $F-\lambda_{\text{ex}}$ 关系称为激发光谱， $F-\lambda_{\text{em}}$ 关系称为发射光谱。它也象吸收光谱一样，可用于定性和定量测量，借助微扰差光谱法测定发色团附近微区环境等。而且荧光测量是在垂直于入射光方向的暗背景下进行的，故其灵敏度更高。对所研究分子，还可从外部引入荧光探剂，利用荧光光谱来查明探剂发色团周围的环境。光谱法可用于研究大分子的活性部位。现举一例说明。溶菌酶的荧光主要由其中色氨酸基团产生。但测得其量子产率 Q 仅为 6.5%，比一般蛋白质要低很多。这意味着荧光受分子内其它基团作用而消光。酶与底物或抑制剂结合后，随着底物浓度增加，荧光强度增大，且 λ_{em} 稍稍向短波方向移动。这说明结合以后屏蔽了上述基团对氨基酸的消光作用。进一步研究消光变化与 pH 的关系时，证明参与结合底物的色氨酸不只一个；参与消光的基团是 pK 值为 3.5 和 6.5 的羧基。由此推测，溶菌酶活性部位中有几个色氨酸和二个羧基。采用吸收谱和 CD 谱也可做此类问题的研究。

吸收谱和 CD 谱都是表现在 10^{-15}s 内发生的过程。在这个时间标度内，分子和其环境可视为静止的。荧光寿命约为 10^{-9} — 10^{-8}s 。在此期间许多过程都能发生，诸如质子化或去质子化反应、溶剂成笼弛豫、局部构象变化，以及与分子(或发色团)移动或转动相联系的任何过程等，故它可以提供吸收谱或 CD 谱得不到的信息。例如，以偏振光激发样品，由于分子激发态寿命较长，分子会经历可觉察的布朗转动，再发射时必定会使所发射之荧光偏振程度降低。若激发态寿命越长、或温度越高、或周围环境粘滞系数 η 越小、或分子体积越小，则分子布朗运动就越激烈，平均转过的角度就越大。这些因素都会降低偏振程度。因此，固定上述四个变量中的三个，测出描述偏振程度的偏振度 P ，就可测量第四个变量。这种方法叫荧光偏振法。

欲测量偏振度 P ，只需在一般荧光谱仪中，在样品前、后分别加一块起偏器和检偏器。调整起偏器方向，使激发光垂直于地面。调整检偏器平行于、垂直于激发光方向，分别测出偏振荧光强度 F_\parallel 和 F_\perp 。偏振度 P 定义为

$$P = (F_\parallel - F_\perp) / (F_\parallel + F_\perp). \quad (5)$$

某些小分子，如辅酶、辅基、半抗原等与特异蛋白质反应时，通过测量 P 值，可以了解结合程度。若结合得紧，则结合后大分子弛豫时间长， P 大。当蛋白质结合时，大分子尺度增加， P 值增加；解离时就小。大分子呈球形时，运动阻力小， P 值小；呈长形时，阻力大， P 大；若大分子不是刚性的，可相对运动，则 P 值更小。在研究细胞膜的流动性和相变时，用荧光染料 DPH 摄入细胞膜脂烃链区后，测定 P 值能计算出膜脂区的微粘度，进而可研究疾病与微粘度、药物作用与微粘度的关系。

在细胞膜上，脂类、蛋白质、或糖类分子的

分布都是有方向性的。以一束偏振光照射染有荧光的细胞膜，用带有检偏器的显微荧光计测量细胞膜正面、侧面、前面三处的偏振荧光强度，这三处分子主轴互相垂直。通过计算，可以分析被染色分子在细胞膜中的取向^[2]。有些染料与细胞膜结合后，其荧光强度对细胞膜电位是敏感的^[3]。这些染料称为膜电位探剂。它可分为两类，一类是慢反应染料，对膜电位变化的响应以秒计，可用于研究如氧化磷酸化这种较慢的反应^[4]；一类是快响应染料，如邻花青-540等，它对膜电位变化的响应可以跟得上细胞膜动作电位的时程，可用来研究玻璃微电极难于插入的小细胞动作电位变化的有关课题。

一个分子X吸收波长 λ_1 的光之后，至激发态 X^* ，假设可发出 λ_2 之荧光。若离X分子足够近处有一Y分子，而且Y之激发态 Y^* 的能级低于 X^* 的能级，那么能量有可能从 X^* 转移至 Y^* ，由 Y^* 发射波长为 λ_3 的荧光。这种现象称为能量转移。从 X^* 所发波长为 λ_2 的荧光强度与 Y^* 所发波长为 λ_3 的荧光强度间的关系可以算出能量转移百分数，称为转移效率。能量转移效率与X和Y两分子间距的负六次方有关。故通过测量能量转移效率，可以算出两发色团之间距。这种方法叫光谱尺法。Berner用铽离子(Tb^{3+})作为荧光探剂，测量了嗜热菌蛋白酶的金属结合区 Tb^{3+} 和 Co^{2+} 之间距为 $13.6 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ，与晶体结构分析得到的 13.9 \AA 数值基本一致。

四、红外光谱

分子中发色团外层电子能级变化表现在紫外至可见光谱区，而原子团骨架振动能级变化表现在红外光谱区。振动吸收光谱原理和应用与上述电子吸收谱有许多相似之处。

由经典理论模型得到，双原子分子机械振动频率为 $\nu = 1/2\pi\sqrt{k/\mu}$ ，(6) 式中k由原子间化学键强度决定， μ 是 m_1 和 m_2 两原子所组成分子的折合质量， $\mu = m_1m_2/(m_1 + m_2)$ 。复杂分子的振动可以简化为一些原子团的简正振动之和。

在蛋白质中，N—H和C=O键间可以形成氢键 N—H...O=C。由于氢键的存在，使N—H伸展振动的有效恢复力减小，因而振动频率减小。而借助氢键的帮助，形变型振动频率却增加。通过分析N—H基团的红外光谱，可以得到有关氢键形成或破坏的信息^[5]。当多肽呈 α 螺旋构象时(见图4)，氢键平行于螺旋轴，呈充分伸展构象时，垂直于纤维轴。通过对二向色性测量，可以给出此肽段的空间取向和有序程度信息。 $-\text{CH}_2-$ 在脂肪烃链中是有序排列的，其跃迁矩方向是已知的，且不易受邻近基团的影响。通过二向色性测量，可给出脂肪烃链的空间取向。由(6)式可知，基团振动频率与 $\mu^{1/2}$ 有关。用氘代替氢，谱线会发生明显变化。实验发现，氢→氘交换速率与分子结构有关。对单肽或随机盘旋的多肽，交换只需几十分钟，而对天然蛋白质，交换约需24小时。因此氢→氘交换速率也可以反映蛋白质构象情况。

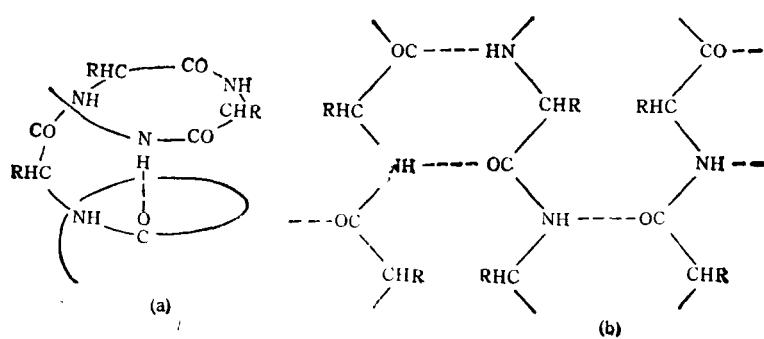


图4 多肽链构象示意
(a) α 螺旋；(b) 充分伸展

五、喇曼光谱

喇曼光谱是在可见光范围内，获取分子振动状态信息的另一种方法。频率为 ν 的光作用于分子时，不仅有与入射光频率 ν 相同的瑞利散射，而且有频率为 $\nu \pm \nu'$ 的喇曼散射峰出现，其中 ν' 是原子团振动频率。喇曼光谱和红外光谱起着互相补充的作用。

二硫键也是构成大分子三级结构的一种力。其喇曼光谱出现在 $500-730\text{cm}^{-1}$ 处，来源于 S-S, S-C 的伸缩振动。这条谱带频率可提供二硫键周围结构的信息。这种信息目前只有喇曼光谱才能给出。

细胞膜脂类烃链呈全反式构象时，C-C 对称和非对称伸缩振动频率分别为 1128cm^{-1} 和 1067cm^{-1} ；呈歪扭构象时， $\nu_{\text{C-C}}$ 为 1089cm^{-1} 。用 I_{1089}/I_{1128} 随温度变化关系，可研究细胞膜相变。同样，来自 $-\text{CH}_2-$ 振动的 $I_{2880}/I_{2850}-T$ 关

(上接第 302 页)

简单的流动的液态导体层。理论上的困难在于要解高次的非线性流体力学问题。尽管当今计算机的出现为该问题的解决提供了强有力的手段，但实验模拟还是困难的。

Muller 把地磁极反转归因于小行星的撞击并非偶然。三年前他曾是一个大灾变论的主要支持者。他认为 64 百万年前恐龙的绝迹就是一次大灾变的后果¹⁾。近来的文章已不再采用这种有争议的假说。然而 D. Raup 指出，过去 300 次的地磁极反转显示出了 30 百万年的周期性。这正是他的大灾变理论的周期。Glass 等人也曾指出，近期的灾变事件与陨石事件之间存在着明显的相关性。这就为 Muller 提供了思想基础。

值得指出的是，空前恐怖的白垩纪到第三纪的大灾变灭绝了地球上的恐龙，但伴随着这场灾变似乎并没有发生地磁场反转。对此 Muller 指出，只有半数左右的大撞击才引起地磁场反转，但目前还不知道这是否正确。他建议应该对此进行更进一步的研究。该文的作者也提议对所有陨石坑再进行一次考查，找出像 Ries 陨石坑中记录的地磁场反转的证据来。

在大灾变中，生物的灭绝只要求一定的寒冷期。两个无夏季年景就足以饿死大部分的草食动物和肉食动物。而磁场反转则要求更长时期的全球性寒冷，以造成一个突然的大幅度海降。但是，一次撞击引起的

系，也可用于研究细胞膜相变问题。

综上所述，借助光谱学方法，可以得到大分子大致形状(长形、圆形、可变形的)，蛋白质二级结构，三级结构(氢键、二硫键情况)，分子中某些基团的微区环境，某些发色团在分子表面暴露情况，分子中某段主链的空间取向，发色团在空间的取向，两发色团之间距，几何排列等结构信息；酶的活性部位，蛋白质变性，缔合，解离；细胞膜流动性，相变，膜电位变化，细胞膜融合等等信息。

- [1] C. R. Contor, and P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, pt2, San Francisco, Freeman, (1980), 390, 418.
- [2] Ernst Grell, *Membrane Spectroscopy*, Springer-Verlag, (1981), 214.
- [3] A. S. Waggoner, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 8 (1979), 47.
- [4] 程伯基等，*生物物理学报*，1-3(1985)，160。
- [5] D. W. 琼斯主编，江丕栋等译，*生物聚合物波谱学导论*，科学出版社，(1983)，62。

气候变化能持续几个世纪吗？Muller 和 Morris 在他们的文章中谈到：“虽然许多专家认为这是可能的，但至今还没有就其真实性取得一致看法。”相反有些专家指出，由于大气中 CO₂ 无限制地增加，使两极冰盖融化，引起海平面突然上升，地幔旋转角速度渐渐减慢，从而引起地磁场反转。

Malkus 研究了 Muller 等人的模型后，认为大多数发电机模型已经进入混沌状态，在这种状态下，发电机几乎不受任何干扰。这种状态的特征是自发反转。来自外层空间的扰动可能会偶然地触发地磁场反转，“但即使没有这种触发，反转迟早也会发生。”

对此，Muller 作出如下答复：“我们并不认为所有地磁场反转都是由于小行星的撞击。我们正试图说明这种地质记录与地磁反转之间惊人的巧合性。”

现在，关于地磁极反转的各种理论都不能自圆其说，每一种理论都在解释了某些现象的同时，对另外一些现象遇到困难。科学家们正在努力找出一种新的更合理的理论。

(白登海编译自 *Physics Today*, February, 1987)

1) 神话传说中的“复仇如神”不断给太阳系造成灾难，以示报复，这就是所谓的太阳的伴星“尼梅西斯”。据说，她每隔两个六百万年接近太阳系一次，使数以亿计的小行星脱离正常轨道闯入太阳系。在此期间，地球会受到一次或多次的撞击。