

用位相失匹配 CARS 方法研究尿嘧啶核苷分子的振动结构*

韩立群 赵朔嫣 张培林

(清华大学物理系, 北京 100084)

周义东 赵玉芬 李艳梅

(清华大学生命有机磷化学国家教委开放实验室)

提要 在 $900\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 波段范围内, 检测了尿嘧啶核苷水溶液的 CARS 谱。由于采用了位相失匹配方法, 从而消除了非共振背景, 由此确定了碱基环骨架振动的若干模式, 以及 C-H 键和 N-H 键的弯曲振动模式, 侧链糖环的弱振动模式也可以在谱中观察到。对失匹配方法的原理及其实验条件给予了讨论。

关键词 相干反斯托克斯拉曼, 位相失匹配, 尿嘧啶核苷, 振动结构

1 引言

研究生物的基因表示一直是生物学界的热点之一, 作为基因中的遗传物质 DNA, 其分子结构及排序问题, 已经成为当今生化领域中的一个重要课题, 那么对组成 DNA 的核苷进行研究的重要性就显得十分突出了。

对于核苷的研究, 振动光谱法一直是一种重要的研究方法^[1,2], 生化领域中常用的振动光谱方法之一为红外光谱, 但是 DNA 的生物环境一般在水中, 而水在红外区吸收带的干扰给检测带来了一定的困难, 并且对于有一定对称性的振动模式, 用红外光谱无法检测^[1]; 另一种生化领域应用得较广的振动光谱方法是拉曼光谱法, 它克服了以上的困难, 并且为提高灵敏度, 又出现了共振拉曼光谱方法, 但是此方法受分子荧光干扰^[2]。进入 70 年代以后, 相干反斯托克斯拉曼光谱, 简称 CARS, 作为一种高灵敏度相干拉曼光谱方法被生化领域所应用; CARS 的灵敏度是拉曼光谱的 10^5 倍, 可以消除荧光的干扰。W. Qin 等人曾检测过尿嘧啶碱基水溶液的 CARS 谱^[3], 但是此 CARS 谱存在着强的非共振背景, 以至使共振峰存在着较大的不确定性, 给分析带来困难。尽管如此, 在有关文献中还未曾有过用 CARS 检测核苷的报道。本文采用了位相失匹配 CARS 方法^[4], 消除了 CARS 谱中的非共振背景; 此方法主要利用非共振背景的相干性, 在选择合适条件时, 样品池窗片的非共振背景与样品的非共振背景相干相消, 从而显著地增加了共振信号与非共振背景的比值。

我们在 $900\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 的波段范围内, 检测了尿嘧啶核苷的水溶液; 此波段包括了分子的“指纹区”, 各种分子在“指纹区”的谱形都是独特的, 所以此波段可用来对核苷进行识别, 另

* 国家自然科学基金和清华大学科学基金资助项目。

收稿日期: 1995年1月10日; 收到修改稿日期: 1995年4月20日

外,侧链官能团与环境(如 PH 值)的影响都可以在此波段有所体现。

2 位相失匹配方法

CARS 是三阶光学非线性效应,泵浦光与斯托克斯光在样品中发生四波混频,产生相干的反斯托克斯光,其强度为^[5]

$$I_{\text{CARS}} = \frac{9}{16} \frac{\mu_0^2 \omega_{\text{as}}^2}{n_s n_p^2 n_{\text{as}}} |\chi^{(3)}| L^2 I_p^2 I_s \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k \cdot L}{2}\right) \quad (1)$$

其中 I_p, I_s 分别是泵浦光与斯托克斯光的光强; L 为光与介质作用长度; Δk 为泵浦光、斯托克斯光和反斯托克斯光三者的波矢差,即 $\Delta k = |2k_p - k_s - k_{\text{as}}|$,其中 k_p, k_s, k_{as} 分别为三者的波矢。 $\chi^{(3)}$ 为三阶非线性极化率,用半经典模型,它可以表示为非共振与共振的三阶非线性极化率之和:

$$\chi^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \sum_r \frac{R_r}{\omega_r - (\omega_p - \omega_s) - i\Gamma} \quad (2)$$

ω_r 为能级间距,假设各振动模式间距较远,互不耦合,且令 $\delta_r = \omega_r - (\omega_p - \omega_s)$,则(2)式可简化为

$$\chi^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \frac{R}{\delta - i\Gamma} \quad (3)$$

要使 CARS 信号 I_{CARS} 最强,则要求 $\Delta k = 0$,即要求位相匹配;在色散介质中,必须以非共线方式进行位相匹配,如图 1 所示,要求泵浦光与斯托克斯光的夹角 θ 等于匹配角 θ_{match} ,其中 θ_{match} 满足下式

$$\cos\theta_{\text{match}} = \frac{|2k_p|^2 - |2k_s|^2 - |2k_{\text{as}}|^2}{4|2k_p||2k_s|} \quad (4)$$

由(3)式可以知道,非共振项的存在使 CARS 谱的线型会变得较为复杂,尤其对于复杂大分子更是如此,给进一步分析带来困难;如果非共振项过大,则其涨落会淹没共振信号,使振动模式无法分辨。

为消除非共振项的影响,我们采用了位相失匹配方法;此方法要求窗片和样品都参与四波混频作用,由于泵浦光与斯托克斯光以非共线方式相互作用,作用区很短,所以失匹配方法中要求很薄的窗片和样品层。

对于窗片,三阶非线性极化率只有非共振项 $\chi_{NR}^{(3)}$,而样品的三阶极化率包括共振项与非共振项;在 Kleinman 对称性条件下,可以设想样品的非共振项与窗片的非共振项的比值为 F ,即 $F = \chi_{NR}^{(3)}/\chi_{NR}^{(3)}$, F 值由材料决定。

在窗片中,泵浦光、斯托克斯光与反斯托克斯光三者的波矢差用 Δk_p 表示,在样品中用 Δk_s 表示。

由耦合波方程^[5],在小信号近似下,可以得到 CARS 光强为:

$$I_{\text{CARS}} = \frac{9\omega_{\text{as}}^2}{64c^2 n_{\text{as}}^2} I_p^2 I_s L^2 \text{sinc}^2 \frac{\Delta k_s \cdot L_2}{2} \left(B^2 + \frac{2BR\delta}{\delta^2 + \Gamma^2} + \frac{R^2}{\delta^2 + \Gamma^2} \right) \quad (5)$$

其中

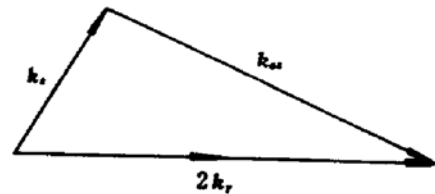


Fig. 1 Configuration of phase matching

$$B = \chi_i^{NR} \left[\frac{L_1 \operatorname{sinc} \frac{\Delta k_p \cdot L_1}{2}}{L_2 \operatorname{sinc} \frac{\Delta k_s \cdot L_2}{2}} \cos \frac{\Delta k_p L_1 + \Delta k_s L_2}{2} + F \right] \quad (6)$$

它为样品与窗片的总非共振项,是 $\Delta k_s, \Delta k_p, F$, 窗片厚度 L_1 和样品厚度 L_2 的函数,其中 $\Delta k_s, \Delta k_p$ 由材料的色散特性以及泵浦光与斯托克斯光的夹角决定 θ 。

当 θ, L_1, L_2 , 选择合适时,满足以下关系式

$$F = - \frac{L_1 \operatorname{sinc} \frac{\Delta k_p \cdot L_1}{2}}{L_2 \operatorname{sinc} \frac{\Delta k_s \cdot L_2}{2}} \cos \frac{\Delta k_p L_1 + \Delta k_s L_2}{2} \quad (7)$$

则 $B = 0$, 即总非共振背景完全被消除。而在此 θ, L_2 条件下,共振项并未得到很多的减少。这种在一定的 L_1, L_2 条件下,对于一定的泵浦光与斯托克斯光的频率之差 $\omega_p - \omega_s$,使 $B = 0$ 的 θ 角为最佳失匹配角。我们理论计算了尿嘧啶碱基 1239 cm^{-1} 振动模的 $\operatorname{sinc}^2(\Delta k_s L_2/2)$, B 和 B^2 随匹配角 θ 变化的规律。计算时取 $L_1 = 0.17 \text{ mm}$, $L_2 = 0.34 \text{ mm}$, $\chi_i^{NR} = 1$, 计算曲线示于图 2。从图可以看到:

(1) 当 $\theta = 1.75^\circ$ 时, $B_2 = 0$, 非共振背景完全被消除,此 θ 角为最佳失匹配角。这时,样品的共振信号由于位相失匹配 $\operatorname{sinc}^2(\Delta k_s L_2/2)$ 值只减小为最大值的 40%。

(2) 从 B 随 θ 角变化看到,在最佳失匹配角附近, B 值改变正负号, $\theta < 1.75^\circ$ 时, $B > 0$; $\theta > 1.75^\circ$ 时, $B < 0$, 从公式(5)可以知道 CARS 线型与 B 有关, $B > 0$ 时为正色散型, $B < 0$ 时为负色散型,只有当 $B = 0$, 非共振背景完全消除时,线型为罗仑茨线型。所以在实验中我们可以用 CARS 谱的线型来判断位相匹配角是否是最佳值。

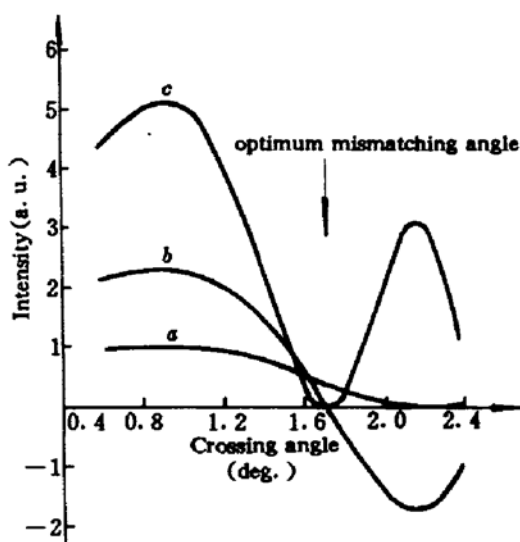


Fig. 2 Calculated curves of resonant signal (a), $B(b)$ and $B_2(c)$ vs crossing angle at $\omega_p - \omega_s = 1239 \text{ cm}^{-1}$

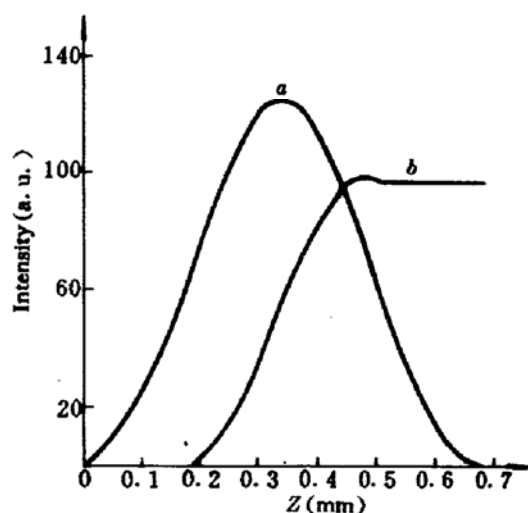


Fig. 3 Calculated curves of the background from sample plus window glass (a) and the resonant signal from sample (b) versus position Z ; crossing angle $= 1.75^\circ$; $L_1 = 0.17 \text{ mm}$, $L_2 = 0.34 \text{ mm}$, and $\omega_p - \omega_s = 1239 \text{ cm}^{-1}$

为清楚起见,我们给出了 $L_1 = 0.17 \text{ mm}$, $L_2 = 0.34 \text{ mm}$, $\theta = 1.75^\circ$ 时,尿嘧啶碱基 1239 cm^{-1} 模在样品池中不同位置处的共振信号以及窗片加样品非共振信号随位置 Z 变化的理论

曲线,示于图 3。从图中看到 $Z = 2L_1 + L_2$ 处非共振背景光强完全被消除,而共振信号仍维持 $Z = L_1 + L_2$ 处的值。

3 实验装置

实验用脉冲 Nd:YAG 泵浦染料激光器系统,脉宽为 10 ns,重复频率为 10 Hz, $\lambda = 1.06 \mu\text{m}$ 的脉冲光经 KDP 晶体倍频后再经过一双色分束镜,用透过分束镜的 532 nm 倍频光泵浦染料激光器,所用染料为若丹明 590。产生可在 554 ~ 580 nm 范围内调谐的激光,此激光经限束后作为斯托克斯光 W_s , 能量为 0.5 mJ, 线宽为 0.021 nm; 由分光镜反射的 1.06 μm 激光再通过 KDP 晶体倍频,此倍频光经限束后作为 CARS 的泵浦光 W_p , 能量为 1 mJ, 线宽为 0.019 nm。CARS 的泵浦光与斯托克斯光经透镜会聚后在样品池内以适当的角度相交混频,在样品池后方经空间滤波后,CARS 信号光被准直并通过一个球面透镜和柱面透镜组成的会聚系统 LG 进入单色仪,然后被光电倍增管接收,电信号用取样积分器平均后经 A/D 转换,进入微机系统进行处理。

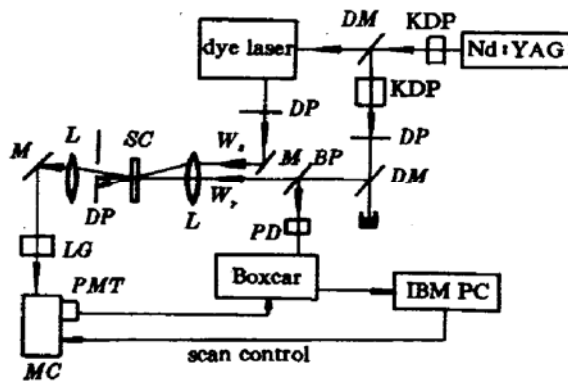


Fig. 4 Experimental arrangement of CARS

DM: dichroic mirror; DP: diaphragm; M: mirror;
BP: beam splitter; PD: photodiode, L: lens;
SC: sample cell; LG: lens group; MC: monochromator;
PMT: photomultiplier

实验装置示意图如图 4 所示。

单色仪主要作用是滤除散射光,由于单色仪出射狭缝最大时的输出波长范围仅为 3 nm,而实验中 CARS 信号波长扫描范围大于 3 nm,所以单色仪由微机控制,与 CARS 信号波长同步扫描。

球面透镜与柱面透镜组成的会聚系统是用来调节收集角度及其孔径的。

检测样品为 Segma 公司的尿嘧啶核苷,用蒸馏水(H_2O)配成 0.1 M 浓度的溶液。

样品厚度为 0.34 mm,窗片为 0.17 mm 玻片。

4 实验结果及分析

我们测量了满足位相匹配条件的尿嘧啶核苷水溶液 CARS 谱,结果示于图 5,共振模完全湮没于强的非共振背景涨落内。

我们用位相失匹配方法,测量了最佳失匹配角附近不同匹配角 θ 的尿嘧啶核苷水溶液 1239 cm^{-1} 模的 CARS 谱,结果示于图 6。从图看到 $\theta = 1.9^\circ$ 时,谱的线型是正色散型, $\theta = 2.0^\circ$ 时,是负色散型, $\theta = 1.95^\circ$ 时,线型为罗伦茨线型,这角度是最佳失匹配角,非共振背景完全被消除。实验结果与前面理论计算分析一致,只是最佳失匹配角比理论计算值 1.75° 大了 0.2° ,这主要由于计算中所用的色散公式与实际色散情形有一定的差异所致。

我们选取 1.95° 作为匹配角,测量了尿嘧啶核苷水溶液 $900 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ 范围的 CARS 谱,结果示于图 7。图上还画出了尿嘧啶核苷分子式,式中的六元环为碱基,五元环为糖环,它是尿嘧啶碱基的衍生物。糖环作为支链基团取代了碱基 1-N 上的 H,由于糖环的振动模式要比碱

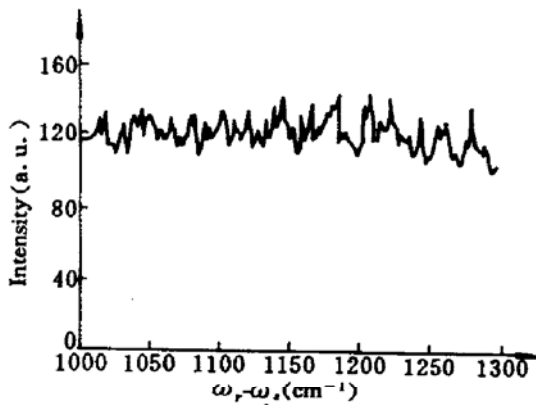


Fig. 5 CARS spectrum of uridine at phase matching
(crossing angle=1°)

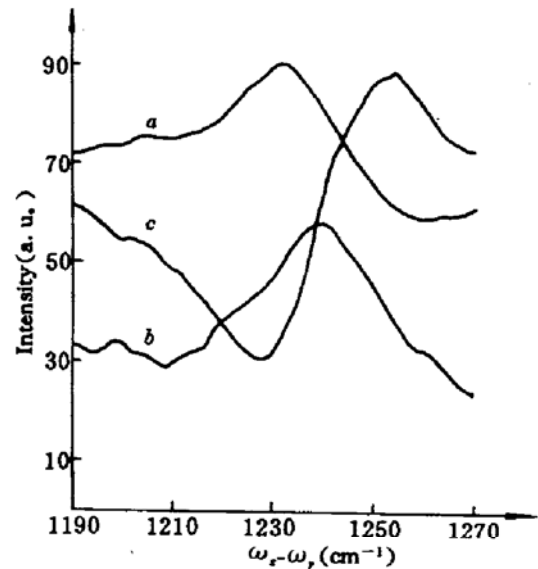


Fig. 6 CARS spectrum of uridine
a; crossing angle=1.9°; b; crossing angle=1.95°;
c; crossing angle=2.0°

基的模式弱许多^[2],所以我们主要结合碱基的结构来说明 CARS 谱峰所对应的振动模。图中 1010 cm⁻¹, 1100 cm⁻¹, 1239 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹ 分别对应碱基六元环骨架伸缩振动的不同模式, 其中 1100 cm⁻¹ 处较强的峰在红外谱中却很弱, 说明此模式的对称性较高, 永久偶极矩小, 1239 cm⁻¹ 模式在红外谱中也是一个较强的峰, 此频率与碱基的相应频率相同, 说明 1-N 取代对骨架振动影响不大, 但实验证明 3-N 取代会使频率发生较大变化^[2], 故我们认为两个 C—O 键与骨架振动发生了耦合; 另外, 970 cm⁻¹ 对应的振动模为骨架的伸缩振动与弯曲振动相耦合的结果。

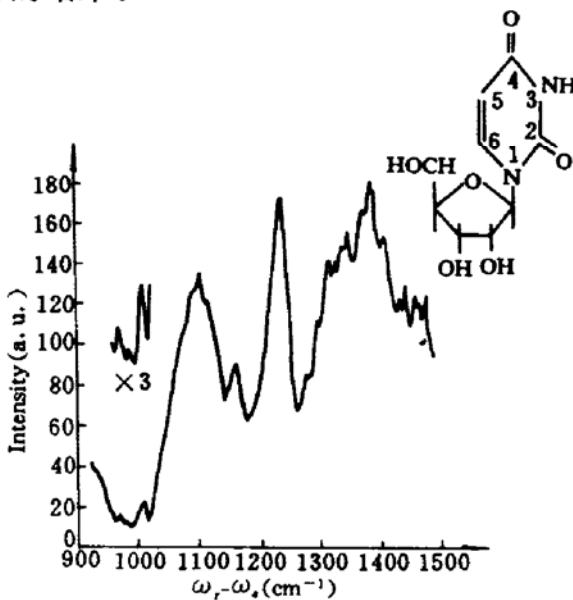


Fig. 7 CARS spectrum of uridine

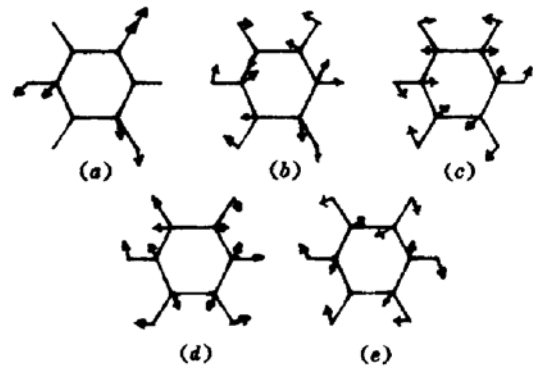


Fig. 8 Cartesian displacement for
ring modes of base

尿嘧啶碱基环的对称性很低, 但是就其骨架振动而言, 它与 C6 环有较大的相似性, 这可以从它与苯环骨架振动拉曼谱的相似上得到证实, 所以可以用 D_{6h} 点群近似地对碱基环骨架振动模式进行分析, 可以得到更为详细的信息; 表 1 给出了 D_{6h} 点群的不可约表示对以上骨架振动模式进行分类的结果, 图 8 为相应模式的座标位移图。

Table 1 Ring skeletal mode of base

| CARS line of ring modes (cm^{-1}) | 970 | 1010 | 1100 | 1239 | 1450 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mode of C6 ring | B_{1g} | E_{1g} | E_{1g} | B_{2g} | E_{2g} |
| Cartesian displacement | (a) | (b) | (c) | (d) | (e) |

图 7 中的 1160 cm^{-1} 与 1380 cm^{-1} 两个 CARS 峰分别对应着 CH 键的 out-phase 和 in-phase 的两种弯曲振动,其中 1160 cm^{-1} 模在红外谱中很难被观察到;另外, 1430 cm^{-1} CARS 峰对应 NH 键的弯曲振动。

在 1100 cm^{-1} 峰左右的 1080 cm^{-1} 及 1120 cm^{-1} 两处出现了肩峰,在 1380 cm^{-1} 附近的 1340 cm^{-1} 处也存在一个肩峰,这些是由糖环的弱模产生的,它们的存在加宽了碱基振动对应的 CARS 峰。

最后把以上的结果总结到表 2 中。

Table 2 Experimental result of vibrational modes of uridine

| CARS line (cm^{-1}) | Line width HWHM (cm^{-1}) | $\chi_{111}^{(1)}$ (relative to mode 1239 cm^{-1}) | Assignment |
|-----------------------------------|---|--|---|
| 970 | 10 | 0.09 | base ring skeletal stretch-bend coupling mode |
| 1010 | 10 | 0.12 | base ring skeletal stretching mode |
| 1100 | 40 | 0.79 | base ring skeletal stretching mode |
| 1160 | 20 | 0.53 | CH bending mode out of phase |
| 1239 | 20 | 1 | base ring skeletal stretching mode |
| 1340 | | | mode of ribose |
| 1380 | 30 | 1.06 | CH bending mode in phase |
| 1130 | | | NH bending mode |
| 1450 | | | base ring skeletal stretching mode |

5 结 论

本文用位相失匹配 CARS 方法,得到了尿嘧啶核苷水溶液的消非共振背景的 CARS 谱,由于非共振背景得到了较好的消除,CARS 峰位置的确定性较好,所以可明确地确定相应的振动模式,其中 $900 \sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ 范围内以碱基六元环骨架伸缩振动模式为主,而 $1300 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ 波段内主要包括 CH 键和 NH 键的弯曲振动模式,而糖环的弱模则表现为碱基 CARS 峰侧的肩峰。

通过本文的工作,我们认为消非共振背景的 CARS 方法作为一种非线性光谱方法在生化检测领域中有着广阔的应用前景,并有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 H. Susi, J. S. Ard. Vibrational spectra of nuclei acid constituents. *Spectrochim. Acta*, 1971, 27A:1549~1562
- 2 R. C. Lord, G. J. Thomas, Jr. Raman spectral studies of nuclei acids and related molecules. *Spectrochim. Acta*, 1967, 23A:2551~2591
- 3 Wenhong Qin, Dong Zhao, Chu Guo. PH effect on structural character of uracil in aqueous solution studied by single-shot CARS. *Chem. Phys. Lett.*, 1991, 184:387~390

- 4 T. A. H. M. Scholten, G. W. Lucassen, F. F. M. Demul *et al.*. Nonresonant background suppression in CARS spectra of dispersive media using phase mismatching. *Appl. Opt.*, 1989, 28(7):1387~1399
- 5 G. L. Easley. Coherent Raman spectroscopy. First Edition. London: Pergamon press, 1981. 20~27

Study of the Vibrational Structure of Uridine in Aqueous Solution by Phase-mismatched CARS

Han Liqun Zhao Shuoyan Zhang Peilin

(Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084)

Zhou Yidong Zhao Yufen Li Yanmei

(Opening Laboratory of State Education Commission for Bio-organic Phosphorous Chemistry, Tsinghua University)

Abstract CARS spectra of Uridine in aqueous solution are examined in the region of 900~1500 cm^{-1} . The nonresonant background has been remarkably suppressed by using a phase mismatching method. The ring skeletal stretching modes of base, C-H bending modes and N-H bending mode can be assigned unambiguously, and the very weak vibrational modes of ribose are also observed. The experimental conditions of the phase mismatching technique are discussed with a numerical calculation. We conclude that background-eliminated CARS measurement is a powerful tool for studying the structures of nucleic acids.

Key words coherent anti-Stokes Raman phase mismatching, uridine, vibrational structure

更 正 启 事

本刊 1995 年第 9 期刊登的“用单光束扫描法测量球状电介质悬浮液的非线性折射率”一文中,第 667 页第 5 行“ $\Delta n_i = [(dn/dt) \cdot I\omega^2(z)\alpha]/4\kappa$ ”应为“ $\Delta n_i = [(dn/dt) \cdot I\omega^2(z)\alpha_1]/4\kappa$ ”,特此更正。