

表面增强激光拉曼法(SERS)研究铝酞菁对 不同核酸碱基的光敏损伤*

赵诗友 陈暨耀 宋庆梅 蔡怀新

(复旦大学物理系, 上海 200433)

提要 将表面增强激光拉曼技术(SERS)作为探针引入光敏损伤的研究。利用这种新的光谱方法研究了新光敏剂铝酞菁对几种核酸碱基分子的光敏损伤过程,发现G(鸟嘌呤)对光敏化的敏感性最强,A(腺嘌呤)其次,C(胞嘧啶)和U(尿嘧啶)则不敏感。实验证实,是铝酞菁的光动力反应产物单线态氧,在核酸碱基的光敏损伤中起主要作用。

关键词 表面增强拉曼散射,光敏损伤,单线态氧

1 引言

自肿瘤的激光光动力疗法(PDT)问世以来^[1],倍受瞩目。十余年来,在光动力技术的完善、新光敏剂的筛选,光敏作用机制等各方面的研究均有显著的进展^[2]。在研究方法上,视不同的研究目标,已有多种物理化学手段被采用,如CD,NMR,ESR,荧光,同位素示踪等。生物分子的激光拉曼光谱包含了生物分子的结构信息,由不同的Raman峰位可表征生物分子的不同部位,故可用来探测生物分子在光敏反应中的受损部位及受损过程。但由于在普通Raman光谱测量中,生物分子的背景噪声较大,往往淹没了Raman信号,使其应用受到限制。表面增强激光拉曼光谱(SERS)可使普通Raman信号增强 $10^4 \sim 10^6$ 倍,能有效地抑制背景噪声,使生物分子的Raman信号得到可观的增强,本组发展了SERS方法研究生物分子的光敏损伤。

近年来,DNA的光敏损伤已成为光敏机制研究中的一个重要方面,DNA是由4个核酸碱基分子组成,本文运用SERS作为探针,比较研究新光敏剂铝酞菁(AIPCS)对核酸碱基G(鸟嘌呤)、A(腺嘌呤)、C(胞嘧啶)、U(尿嘧啶)的光敏损伤。

2 实验

本实验采用Spex 1403型拉曼光谱仪,激发光源为美国SP164型Ar⁺离子激光器。样品装在一个三电极体系的玻璃样品池中,带有石英窗口,用以表面增强的研究电极是高纯的多晶银棒,辅助电极由钨丝制成,参比电极是饱和甘汞电极。银电极通过JH-2C型恒电位仪控制外加电位。实验时,激光透过石英窗口照射到浸在核酸碱基溶液中的银电极上,采用90°散射采集

* 国家自然科学基金资助项目。

信号。激发光波长为 514.5 nm, 激光功率为 0.2 W, 分辨率为 2 cm^{-1} , 扫描速率为 $2 \text{ cm}^{-1}/0.5 \text{ s}$ 。银电极表面用 COR 方法粗糙化处理, 以得到好的表面增强效果。

G(鸟嘌呤)是美国 Sigma 公司产品, A(腺嘌呤)、C(胞嘧啶)和 U(尿嘧啶)是上海生化试剂二厂生产的分析纯样品。因 G 的溶解度很小, 实验时用重蒸水配成饱和溶液; 而其它三种核酸碱基溶液的浓度在实验时分别配成: A 为 $3 \times 10^{-4} \text{ M}$, C 与 U 均为 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 。经预实验显示, 如此选用此四种样品溶液的浓度, 可使它们的 SERS 谱峰高大致相同, 以便由各自峰高的降低速度, 判断四种样品对光敏反应的敏感程度。光敏剂碘化氯铝酞菁(AIPCS)由本组研制, 实验时用重蒸水配成 10^{-5} M 浓度的溶液若干毫升备用。

3 结果和讨论

A, G, C, U 均为平面环状分子。作为代表, 图 1 给出了 G 的分子结构。

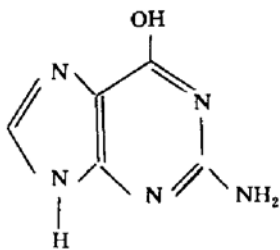


Fig. 1 Molecular structure of G
(Guanine)

当银电极外加电位为 -0.8 V 时可得到 G 的清晰的 SERS 谱。作为对照实验, 用激光连续辐照 2 h、5 h 后, 比较 SERS 谱的变化, 图 2(a) 显示在激光的连续辐照下 G 的 SERS 谱非常稳定。在 G 的光敏损伤实验中, 实验条件与对照实验相同, 外加电位也为 -0.8 V , 此时得到稳定而清晰的 SERS 谱, 然后将 4 ml 的 AIPCS (10^{-5} M) 加入盛有 60 ml 的 G 溶液的样品池。用激光定点连续辐照不同时间后, 测得的 SERS 谱如图 2(b) 所示。为了便于分析 G 的光敏损伤情况, 表 1 给出了 G 的 SERS

谱中相应峰的归属^[3]。

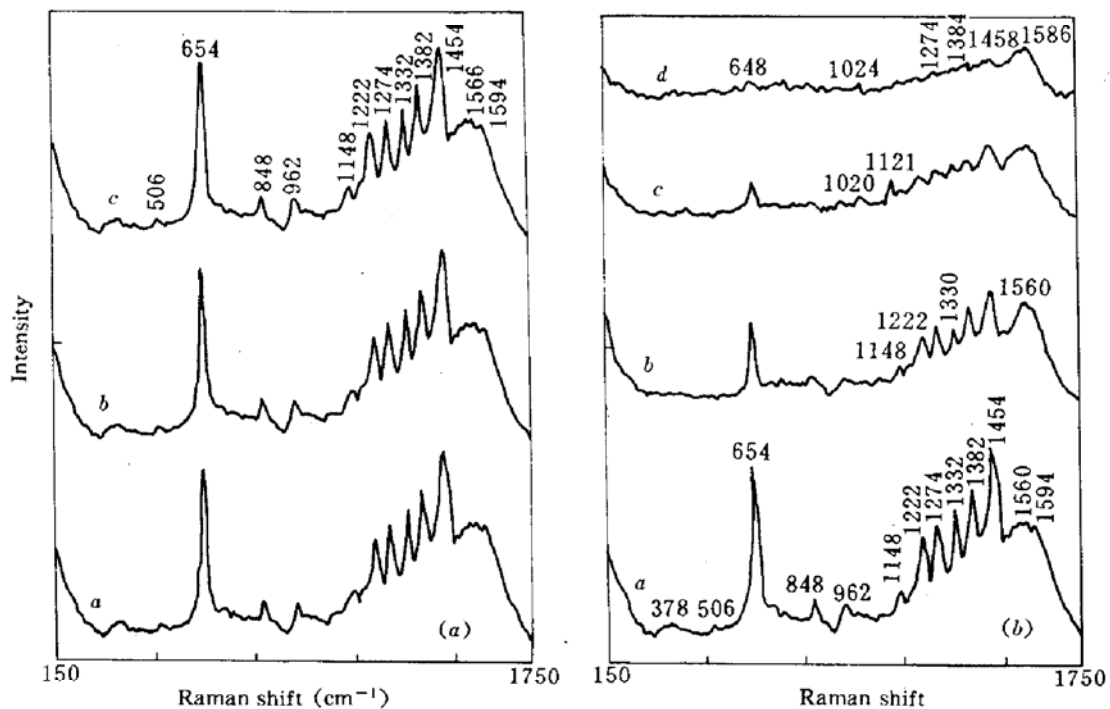


Fig. 2

(a) SER spectra of Guanine obtained in a controlled experiment. A; 0 Hr; B; 2.0 Hr; C; 5.0 Hr; (b) SER spectra of the photoactivated-oxidation of Guanine obtained after different illumination times. A; 0 Hr; B; 2.0 Hr; C; 5.0 Hr

Table 1 Assignment of the Raman spectrum of G (Guanine)

Frequency (cm ⁻¹)	Type	Frequency (cm ⁻¹)	Type	Frequency (cm ⁻¹)	Type
370	C ₂ N ₁₄ +N ₉ R	1148	-C ₈ N ₇ +N ₉ R-C ₄ N ₃	1464	N ₁ C ₂ -N ₁ C ₆
506	C ₂ N ₁ C ₆ +N ₉ R-C ₃ C ₄ N	1220	-C ₈ H+C ₈ N ₇	1508	C ₄ C ₃ -C ₄ N ₉
654	Ring breathing	1274	-C ₈ N ₇ -N ₁ C ₆ +N ₇ C ₅	1590	N ₃ C ₄ -C ₄ C ₃
854	-N ₇ C ₅ -N ₁ C ₂ N ₃	1330	C ₈ N ₉ -N ₇ C ₈		
956	-N ₉ R+N ₃ C ₂	1384	C ₂ N ₃ -C ₂		

图 2(b) 显示, G 在光敏反应中明显受损, 各谱峰消失的过程为: 与氨基有关的振动 378 cm⁻¹ 首先消失; 照光 0.6 h, G 的各 SERS 谱峰已明显降低; 照光 2 h 后, G 的 SERS 谱峰下降得更显著, 而且 848 cm⁻¹, 962 cm⁻¹ 和 1148 cm⁻¹ 几个峰相继消失; 照光 5 h 后, 1222 cm⁻¹ 和 1330 cm⁻¹ 两峰也消失, 整个 SERS 谱峰强度已变得很弱。根据 G 的归属和峰消失的先后次序可推知, G 的光敏损伤过程为: 先脱氨, 然后打开 G 的六元环, 其中 N1 和 N3 是敏感部位, 然后再打开 G 的五元环, 其中 N7 是敏感部位。此光敏损伤过程与 G 的生物降解过程一致。

当外加电位为 -0.8 V 时, 对 A 也同样获得清晰的 SERS 谱, 且可在照光 4 h 后保持稳定。然后加入 4 ml 的 AIPCS 溶液 (10⁻⁵ M), 用激光定点辐照不同的时间后, 得到的 SERS 谱如图 3 所示。从图中可见, 虽然其各谱峰强度随光照时间逐步降低, 但至 5 h 后其谱峰强度还剩有开始时的一半, 表明 A 可在 AIPCS 光敏反应中受损, 但敏感性明显逊于 G。

C 和 U 的光敏损伤情况如图 4(a) 和图 4(b) 所示, 由图中可见, 加入 AIPCS 照光几个小时后, SERS 谱基本上没有变化, C 与 U 在 AIPCS 光敏反应中并未受到损伤, 反映它们对光敏化的敏感性极差。

我组先前的工作表明 AIPCS 的主要活性产物为单性态氧 (¹O₂)^[4], 是否是 ¹O₂ 氧化 G 与 A 导致了它们的光敏损伤? 为了探讨 G 与 A 的光敏损伤机制, 在 G 与 A 的光敏化实验中加入 ¹O₂ 的淬灭剂 NaN₃, 观察在光敏反应中 NaN₃ 对 G 及 A 的保护作用, 结果显示 (图略) G 与 A 的 SERS 谱基本上不随照光时间变化, 说明 NaN₃ 确实对 G 及 A 起到了保护作用, 也证实了 AIPCS 对 A 与 G 光敏损伤主要是通过 ¹O₂ 机制介导的。

综上所述, SERS 法可成功地用于碱酸碱基分子的光敏损伤研究, 探测其分子的损伤过程及敏感部位, 为在分子水平研究损伤机制提供了一种新手段。对于那些在银电极表面有较好吸附性 (可获得较佳的表面增强效应) 的生物分子, SERS 法不失为一灵敏的探针, 可探测光敏损伤乃至其它外源效应对其结构的损伤破坏。

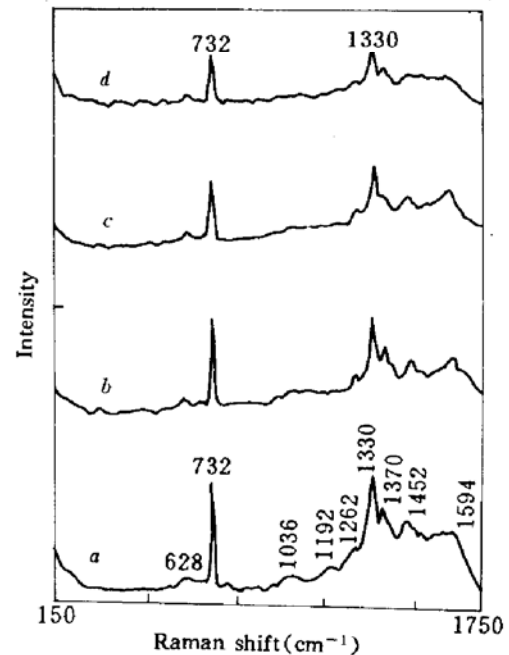


Fig. 3 SERS spectra of the photoactivated-oxidation of Adenine obtained after different illumination times

A: 0 Hr; B: 0.5 Hr; C: 3.0 Hr; D: 5.0 Hr

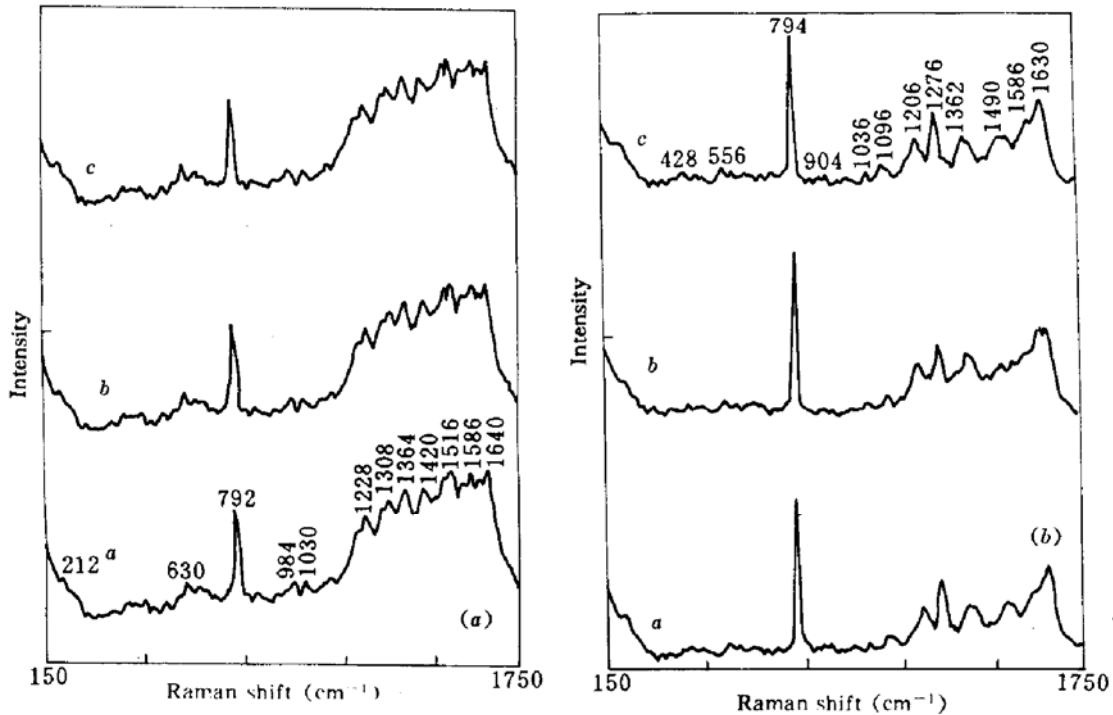


Fig. 4

(a) SER spectra of the photoactivated-oxidation of Cytosine obtained after different illumination times. A: 0 Hr; B: 1.5 Hr; C: 5.0 Hr; (b) SER spectra of the photoactivated-oxidation of Uracil obtained after different illumination times. A: 0 Hr; B: 1.5 Hr; C: 5.0 Hr

生物体中哪些是光敏损伤的活性部位,哪些是敏感的靶位分子,一直是光敏损伤机制研究中的核心问题之一。本文对核酸碱基分子 A, G, C, U 的比较研究表明, G 最为敏感, A 其次, C 与 U 则不敏感。最近 Paillous 报道^[5]在整体 DNA 的光敏损伤中, G 是活性靶位中心,其结果与本文一致,且在不同层次水平上互为佐证。

参 考 文 献

- 1 Dougherty, T. J.. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.*, 1978, **38**:2628
- 2 Dougherty, T. J.. Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1993, **58**:859
- 3 Otto, C. T. J. J. van den Tweel, F. F. M. de Mul *et al.*. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA Bases. *J. Raman Spectroscopy.*, 1986, **17**:289
- 4 陈暨耀, 陈士明, 陆亚蒙 等. 铝酞菁光敏反应中间产物的实验研究. *生物物理学报*, 1990, **6**:312
- 5 Paillous, N. Vicendo, P.. Mechanism of Photosensitized DNA Cleavage. *J. Photochem. Photobiol B*, 1993, **20**: 203

Study on the Photosensitization of the Nucleic Acid Bases Senitized by ALPCS with the Method of SERS

Zhao Shiyou Chen Jiyao Song Qingmei Cai Huaixin

(Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract In this paper, the SERS (Surface enhanced Raman scattering) method is for the first time employed as a probe to investigate the interaction between the photosensitizer

ALPCS and the nucleic acid bases. The advantage of this method is that it can provide important information on the sensitive sites and damaging process which can't be achieved by other methods. The obtained results suggest that G (Guanine) is most sensitive and vulnerable and the A (Adenine) is less vulnerable, while C (Cytosine) and U (Uracil) are totally not sensitive to the photosensitizer at all. The experiments have confirmed that singlet oxygen, the product of ALPCS photodynamic reaction, plays an important role in the damaging process of G and A.

Key words SERS, photodynamic damage, singlet oxygen



'95 国际光电子激光学术会议在杭州召开

'95 国际光电子激光学术会议 1995 年 10 月 6 日至 9 日在杭州大学邵逸夫科教馆举行。会议由中国电子学会量子电子学与光电子学分会、中国光学学会激光专业委员会和红外与光电器件专业委员会、上海市激光学会、浙江省物理学会共同主办,杭州大学承办。我国著名科学家王大珩院士、孙俊人院士和美国罗彻斯特大学终身教授 E. Wolf 担任名誉主席,周炳琨院士担任大会主席。来自美国、德国、日本、越南、香港等国家和地区约 30 名科学家以及我国科学家 100 余人出席了这次会议。会议录用论文 124 篇。在大会上 E. Wolf 教授作题为《相干光学》特邀报告,周炳琨院士作题为《清华大学的光电器件研究》特邀报告;王绍民教授作题为《衍射的原理和新光束激光器》特邀报告。作特邀报告的还有 T. Hiruma(日本)、W. H. Lowdermilk(美国)、贺贤士、M. Weber(德国)等科学家。

分 4 个分会场进行学术交流,约 100 位论文作者作了交流报告。4 个分会场的主题分别是:光电子器件与材料、光电系统、激光器件、激光束与激光应用。

会议期间美国光谱物理公司亚洲有限公司等 10 余家厂家和研究所展示了激光和光电子产品。

(纪 钟)