

热处理和紫外辐射对 DNA 影响的拉曼光谱研究

柯惟中 余多慰 陈婉蓉 缪丽萍

(南京师范大学理化中心, 江苏省光电技术重点实验室, 南京 210097)

摘 要 检测了鲑鱼精 DNA 纤维和经过 40°C、91°C、200°C 加热处理的拉曼光谱。研究结果表明, 在熔融温度以下热处理对 DNA 构象的影响是轻微的, 在熔融温度以上则随温度的升高, 对 DNA 分子结构的影响及破坏也逐渐加剧, 首先受影响的是腺嘌呤和脱氧核糖。对天然鲑鱼精 DNA 溶液和经紫外光照射后溶液拉曼谱图的检测分析表明, 紫外辐射会严重影响 DNA 的构象, 损伤碱基间的氢键和基团, 所造成 DNA 的变性是不可逆的。

关键词 拉曼光谱, 脱氧核糖核酸(DNA), 热处理, 紫外辐射。

1 引 言

DNA 是生命活动中最重要的遗传物质, 主宰着细胞的生理功能, 也是环境中物理、化学等因素攻击的靶子, 阳光对 DNA 的影响主要体现为它的热效应和紫外辐射的损伤。已有国外学者用核磁共振、X 衍射方法来研究紫外辐射造成 DNA 受损伤后双螺旋的解开和断裂, DNA 的基因突变和细胞修复的相互关系等^[1, 2], 也有用拉曼光谱研究 DNA 中核苷酸亚基的静电力, 疏水键、氢键的相互作用, 绘制真核染色体的构象^[3]。但迄今未见直接用拉曼光谱测试模拟阳光对 DNA 热效应和紫外辐射影响的报道。由于激光拉曼技术可以直接检测晶体、固体、胶体及溶液下的 DNA 样品, 较之 X 衍射谱、圆二色谱、红外光谱等技术有着独特的优点。本文用激光拉曼技术分别测试了鲑鱼精 DNA 纤维、水溶液及其经热处理、紫外辐射后的拉曼光谱, 在此基础上分析了 DNA 样品的构象变化并描述其微观特征。

2 样品和测试方法

测试用的鲑鱼精 DNA 是德国 Boehringer Mannheim 公司出品的白色固体纤维。将其直接放入直径 2 mm 的毛细玻璃管测试激光拉曼谱。再将其分成三份, 分别加热到 40°C、91°C、200°C 后, 在室温下放入毛细管内分别测试拉曼谱。经 40°C 加热后样品仍呈纤维状, 而加热到 91°C、200°C 后样品熔融成坚硬的固态块状。另将固体纤维溶于重蒸水配制成 5% 的溶液, pH 值为 7.0。直接测试该溶液的拉曼谱, 并将该溶液分成两份, 用紫外灯分别照射 0.5h 和 1h 后, 测试其激光拉曼谱。

各类样品的拉曼谱测试均在室温($20 \pm 2^\circ\text{C}$)下进行。实验在微机控制的法国 Jobin Yvon 公司的 HRD-2 型双单色仪上完成。由 RCA 31034 型光电倍增管进行信号接收和光电转换。双单色仪狭缝宽 $400 \mu\text{m}$, 扫描速度为 $0.49 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$ 。各种样品的拉曼谱图都由计算机作信号累加平均并绘图输出, 峰位误差小于 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 。

3 结果与讨论

3.1 热处理对 DNA 的影响

3.1.1 实验环境及结果 用三份 DNA 纤维分别作热处理。第一份置于温箱, 维持 40°C 温度 48 h。第二份用美国 PE 公司的 DSC-7 型差热计在氮气气氛中测 DNA 纤维的差热曲线, 温度范围: $0^\circ\text{C} \sim 91^\circ\text{C}$ (见图 1)。从该差热曲线可知, 75°C 附近有一吸热熔融峰(从 63°C 到 82°C)。该 DNA 的熔点可定为 72.67°C 。对第三份样品, 仍用该差热计升温, 温度范围: $0^\circ\text{C} \sim 200^\circ\text{C}$, 其余条件同上。

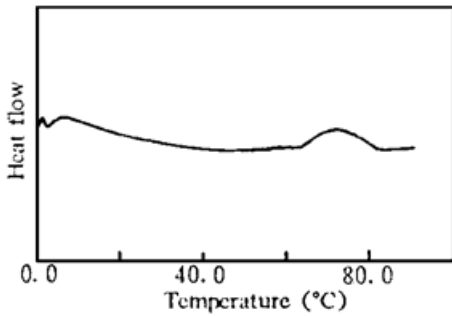


Fig. 1 DSC curve of herring sperm DNA in fibers

室温下测试的鲑鱼精 DNA 纤维和经 40°C 、 91°C 、 200°C 加热后的 DNA 的拉曼光谱分别如图 2 中的 (a)、(b)、(c)、(d) 所示。其有关的拉曼特征频率和指认^[3-7]列于表 1。A、G、C、T 分别表明碱基腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶的振动特征。在表中按照它们对谱线的贡献大小排列。

由于拉曼谱线的强度与散射中心的数目成正比^[8], 谱线强度的变化即意味着散射中心(包括基团和化学键)数目的变化。强度变小说明相应谱线所属的基团或化学键受到了损伤, 如果谱线位移, 则可能是相应的基团或化学键受到处理而发生变化的缘故^[9]。位于 1095 cm^{-1} 的拉曼谱线, 对应的是磷酸离子键的伸缩振动, 它对加热引起的构象变化是不敏感的, 因此该谱线常作为内标, 本文亦是如此。

3.1.2 鲑鱼精 DNA 纤维的构象 在拉曼图谱中, DNA 双螺旋的不同构象对应着谱线的不同位置。从图 2(a) 中可见明显的 669 cm^{-1} 特征峰, 它主要表征的鸟嘌呤环呼吸振动是 A 型 DNA 所具有的, 它受糖环折叠及糖苷扭转角(χ)影响, 反映鸟嘌呤核苷中从糖苷键到呋喃糖环的状态^[10]。另外, 图谱中出现的 816 cm^{-1} 是对核酸空间结构敏感的磷酸二酯键的伸缩振动, 它也是 A 型 DNA 的特征模, 而反映 B 型 DNA 构象的 835 cm^{-1} 却没有出现, 证实该鲑鱼精 DNA 纤维是 A 型构象。

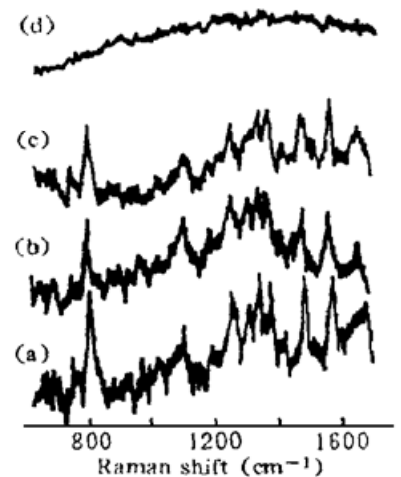


Fig. 2 (a) Raman spectrum of DNA in fibers, (b) Raman spectrum of DNA after 40°C heat treatment, (c) Raman spectrum of DNA after 91°C heat treatment, (d) Raman spectrum of DNA after 200°C heat treatment

Table 1. Raman spectra of herring sperm DNA and assignments

Raman shift (cm^{-1})						tentative assignments	Raman shift (cm^{-1})						tentative assignments
in fiber	heat treatment		in aqueous solution	ultraviolet radiation			in fiber	heat treatment		in aqueous solution	ultraviolet radiation		
	40°C	91°C		0.5 h	1.0 h			40°C	91°C		0.5 h	1.0 h	
646	644	645	647	650	650	C	1153	1155				1148	deoxyribose-phosphate
669	669	659		672	670	G, T	1181	1187	1180	1178	1181	1180	T, C
684	682	678	681	684	684	G	1231						A
726	730	726	729	727		A	1253	1248	1242	1253	1250	1252	C, A
747	749	752	750	747	747	T	1302	1305	1308	1301	1304	1305	A
782	785	779	787	785	790	T, C	1336	1338	1336	1343	1343	1344	A
816	817	807	805	805	818	$\gamma(\text{O-P-O})$, A-type	1375	1374	1371	1375	1379		T, A, G
			831	834	836	$\gamma(\text{O-P-O})$, B-type	1422	1421	1422	1421	1421	1407	A, G
862	858	860	866	861	862	deoxyribose-phosphate	1455	1456	1452	1462			deoxyribose
920	920	921	925	922		deoxyribose	1485	1488	1484	1486	1493	1484	G, A
956	961		943	940	948	deoxyribose	1508		1504				A
			992	991	980	deoxyribose	1522	1519	1523	1515	1518	1520	A
1008	1015	1017	1012	1018	1010	$\gamma(\text{C-O})$	1576	1577	1573	1579	1580	1577	G, A
1052	1058	1051	1054	1054	1049	$\gamma(\text{C-O})$	1602	1610		1610	1604	1610	δNH_2 (A, G, C)
1095	1097	1100	1094	1092	1093	$\gamma(\text{PO}_2^-)$	1624	1624	1624	1636	1638		
1133		1139	1130	1133		deoxyribose-phosphate	1659	1665	1660	1659	1658	1654	$\gamma(\text{C=O})$ (T, C)
							1673			1673	1676	1668	$\gamma(\text{C=O})$

γ -stretching vibration, δ -deformation vibration, A-adenine, G-guanine, C-cytosine, T-thymine

3.1.3 DNA 纤维加热后的构象变化 经 40°C 加热两天的纤维 DNA 和由差热计加热至 91°C 的固态 DNA 的拉曼谱分别见于图 2 的(b)和(c)。主要表征 A 型 DNA 鸟嘌呤环呼吸振动的拉曼峰在图 2(b)中仍出现在 669 cm^{-1} , 强度下降了 22%, 在图 2(c)中此峰位移至 659 cm^{-1} , 强度则下降了 37%; 表征 A 型 DNA 特征模的 817 cm^{-1} 依旧出现在原处, 强度则分别下降了 16% 和 30%, 说明加热后该 DNA 可能有部分单、双键的断裂^[11], 但图 2(b)、(c)中都没有出现 835 cm^{-1} 的 B 型构象特征峰, 意味着经 40°C 和 91°C 热处理后的纤维态和固态 DNA 都仍属于 A 型构象。

仔细比较图 2 中(a)、(b)、(c), 可见在卅余条探测到的拉曼谱线中, 有变化的只是小部分, 大部分谱线峰位位移都在仪器的 2 cm^{-1} 误差范围内, 强度变化率也在 10% 以下(由于噪声, 变化率大于 10% 才认为是可信的变化)。对经 40°C 热处理的 DNA, 仅有涉及到腺嘌呤和脱氧核糖的部分谱线位置发生变化。它们的位移也都在对应的区间, 而谱线强度未见明显变化, 证实 40°C 热处理对 DNA 纤维的影响是轻微的。

91°C 加热处理对 DNA 影响就比较大, 在图 2(c)中, 上述谱线除峰位有偏移外, 强度也发生变化。在图 2(a)和(b)中可见的 4 条较弱的谱线: 表征脱氧核糖 C-O 振动的 1008 cm^{-1} 、

表征脱氧核糖-磷酸振动的 1153 cm^{-1} 、表征腺嘌呤的 1231 cm^{-1} 和表征碱基 A、G、C 的 NH_2 弯曲振动的 1602 cm^{-1} 都消失了。在 1522 cm^{-1} 属于腺嘌呤和在 1576 cm^{-1} 属于鸟嘌呤的两条伸缩振动谱线基本在原位，但强度却分别增加了 50% 和 25%，表明热处理已破坏了其碱基堆积状况，造成拉曼增色。可见 91°C 的加热使属于该 DNA 各组分的基团——骨架磷酸二酯、脱氧核糖和各碱基都有不同程度的损伤，但该固态 DNA 主要仍为 A 型构象，并保持了大部分基团的拉曼特征。

DNA 加热到 200°C 已是安全的热变性，在这种条件下，DNA 纤维不仅外观变成坚硬的固态，内部构象也已完全破坏。在图 2(d) 上看不出 DNA 明显的拉曼特征谱线，而是产生了很高的荧光噪声本底，背景基线噪声几乎是 DNA 纤维的 8 倍。

3.2 水溶液中的 DNA 结构

将 DNA 纤维溶于重蒸水中，略加搅拌，再置于 4°C 冰箱环境下 48 h 配制成水溶液。对 DNA 水溶液和 DNA 纤维的拉曼谱图进行比较。见图 3 中的(a) 和(b)。

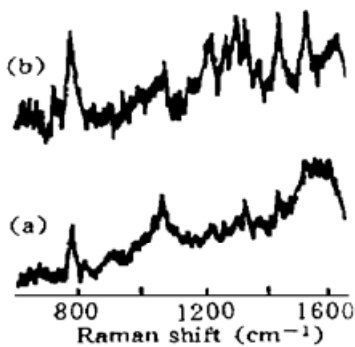


Fig. 3 (a) Raman spectrum of DNA in aqueous solution, (b) Raman spectrum of DNA in fibers

DNA 以 B 型构象为主，但局部的 DNA 片断仍存在 A 型构象。

3.3 紫外辐射对 DNA 的损伤

用消毒紫外灯(主要为 253.7 nm 紫外辐射)对鲑鱼精 DNA 溶液分别照射 30 min 和 60 min，用美国 EG&G 公司的 460-1 型数字功率计测出光的辐射照度为 3.12 W/m^2 。照射前后溶液的激光拉曼谱见图 4，其中(a) 为鲑鱼精 DNA 溶液的拉曼谱，(b)、(c) 分别为紫外光照射 30 min 和 60 min 后的拉曼谱。其拉曼频移和归属指认也见表 1。

从图 4 可见紫外辐射对 DNA 损伤是明显的。损伤主要表现在构象被破坏、无序排列增多和拉曼谱线强度的大幅下降。如原 DNA 在水溶液中主要呈 B 型构象，经紫外辐射 30 min 后，表征碱基鸟嘌呤 B 型构象的 681 cm^{-1} 和磷酸骨架 B 型构象的 831 cm^{-1} 都向高波数偏移了 3 cm^{-1} ，且强度大为降低，前者降低了 65%，后者降低了 50%；表征磷酸骨架 A 型构象的 805 cm^{-1} 谱线峰位和强度却没有变，在天然 DNA 水溶液谱图 4(a) 中未见到的，表征鸟嘌呤 A 型构象的 672 cm^{-1} 也出现了。证实了经紫外辐射 B 型构象被破坏，而 A 型构象却相对增加。在可以确定归属的卅多条谱线中，除表征磷酸离子键 PO_2^- 的 1094 cm^{-1} 、表征脱氧核糖的 925 cm^{-1} 、 943 cm^{-1} 和表征脱氧核糖-磷酸的 1130 cm^{-1} 、 866 cm^{-1} 等几条谱线外，几乎所有谱线都有 30~ 50% 的强度下降，可见紫外辐射对 DNA 的许多碱基基团都造成损伤，引起碱基之间的氢键断裂或单、双键被切断。

紫外灯照射 DNA 溶液 60 min 后, 所有的拉曼谱线强度都大规模地下降, 下降幅度相对天然 DNA 溶液基本都在 50 ~ 80%。不仅表征 B 型构象的 681 cm^{-1} 、 831 cm^{-1} 谱线强度分别下降了 80% 和 75%, 紫外灯照射 30 min 后谱线强度未下降的 1094 cm^{-1} 峰也大幅下降了 80%。表征 A 型构象的 672 cm^{-1} 、 805 cm^{-1} 等拉曼谱线也分别下降了 55% 和 50%, 有的谱线甚至消失了。可见长达一定时间的紫外辐射会对 DNA 溶液造成全面损伤。

天然 DNA 溶液的拉曼光谱噪声本底很低, 仅 250 CTS/s。经 30 min 紫外辐射后本底噪声增为 350 CTS/s; 经 60 min 紫外辐射后本底噪声则增为 1500 CTS/s。各谱线峰位偏移不大, 但谱线峰强都大幅降低。原因是由于紫外光长时间辐射, 造成大量氢键断裂, 使 DNA 变为含有单链的 DNA 和缺少某些碱基的 DNA; 诱发链间交连形成嘧啶碱基二聚体; 有的受伤的碱基还变成了另外的物质。当激光照射这些混合不均匀的由 DNA 大分子受损伤而来的交连分子和基团碎片, 测试拉曼光谱时, 便会增加荧光本底噪声。被损伤的越多, 荧光本底噪声也越高。这和 DNA 纤维热处理后的拉曼测试结果是一致的。

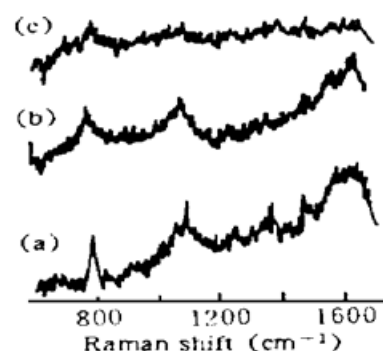


Fig. 4 (a) Raman spectrum of DNA in aqueous solution, (b) Raman spectrum of DNA in aqueous solution after 0.5 h UV radiation, (c) Raman spectrum of DNA in aqueous solution after 1.0 h UV radiation

参 考 文 献

- [1] T. S. Taylor, D. S. Garrett, I. R. Brockie *et al.*, NMR assignment and melting temperature study of cis-syn and trans-syn thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC)-d(GCATAATACG). *Biochemistry*, 1990, **29**(37) : 8858~ 8866
- [2] N. Jiang, J. S. Taylor, In vivo evidence that UV-induced C-T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry*, 1993, **32**(2) : 472~ 481
- [3] G. J. Puppels, C. Otto, J. Greve *et al.*, Raman microspectroscopic study of low-pH-induced changes in DNA structure of polytene chromosomes. *Biochemistry*, 1994, **33**(11) : 3386~ 3395
- [4] R. Savple, J. J. Jutier, S. Alex, Secondary structure of histone and DNA chromatin. *Science*, 1977, **197**(4301) : 385~ 388
- [5] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, T. R. Hays *et al.*, Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of the nucleotides with 266, 240, 218, and 200 nm pulsed laser excitation. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**(6) : 1520~ 1529
- [6] P. Y. Turpin, L. Chinsky, A. Laigle *et al.*, DNA structure studies by resonance Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 1989, **214**(1) : 43~ 70
- [7] J. P. Perno, C. A. Grygon, T. G. Spiro, Ultraviolet Raman excitation profiles for the nucleotides and for the nucleic acid duplexes poly(rA)-poly(rU) and poly(dG-dC). *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**(15) : 5672~ 5678
- [8] Weizhong Ke(柯惟中), Duowei Yu(余多慰), Raman spectral study of the influence on lysozyme conformation of extraction by nitrobenzene. *Opt. Engng.*, 1994, **33**(8) : 2607~ 2611
- [9] S. C. Erfurth, M. L. Peticolas, Melting and premelting phenomenon in DNA by laser Raman scattering. *Biopolymers*, 1975, **14**(2) : 247~ 264
- [10] 余多慰, 柯惟中, DNA 构象研究中脱氧核糖拉曼信号的作用. *化学物理学报*, 1995, **8**(6) : 509~ 514

- [11] 许以明, 张志义, 徐国瑞, 治癌药物 YHPD 对 DNA 光敏损伤的激光喇曼光谱研究. 科学通报, 1989, 34(19): 1500~ 1504
- [12] 潘家来, 激光拉曼光谱在有机化学上的应用. 北京, 化学工业出版社, 1986: 135

Raman Spectroscopic Study on the Influence of Heat Treatment and Ultraviolet Radiation on DNA

Ke Weizhong Yu Duowei Chen Wanrong Miao Liping

(Physics and Chemistry Centre, Jiangsu Provincial Key Lab for Optoelectric Technology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

(Received 7 September 1996; revised 21 February 1997)

Abstract The Raman spectra of berring sperm DNA in antive fibers and after heat treatments to 40°C, 91°C, and 200°C were presented. The Raman spectral bands indicated that the damage of the heating on the DNA conformation is limited below the melting point. The damage of the DNA molecular structure increased with a rise in temperature above the melting point. The damage was first observed in adenine and deoxyribose. The Raman spectra of DNA in aqueous solution and after ultraviolet radiation were reported. The experimental results proved that ultraviolet radiation had a serious influence on the DNA molecular conformation and damaged the hydrogen bonds and groups among the purine and pyrimidine bases. The denaturation was irreversible.

Key words Raman spectra, DNA, heat treatment, ultraviolet radiation.