

激光拉曼光谱在生物学研究中的应用

蔡 惠 罗

(中国科学院动物研究所细胞室)

前 言

光谱分析是研究物质结构的重要手段。分子光谱分析通常涉及三种类型的能量跃迁：(一)分子中电子态跃迁，(二)分子的振动态跃迁，(三)分子的转动态跃迁。三种类型的能量跃迁以一定波长的辐射能的形式表现出来，这就是光谱分析法的基础。拉曼散射光谱是分子的振动和转动光谱，1928年为印度物理学家拉曼(Raman)在研究液体苯的散射光谱时发现。由于拉曼散射谱线很弱(只有入射光源强度的 10^{-7})，在仪器设计上就需要采用较强的激发光源和分光性能较高的单色仪。这些技术上的困难使得拉曼光谱长期未能在实验室广泛应用。六十年代激光作为光源被引入拉曼光谱研究之中，激光技术为拉曼光谱提供了高光强、高光谱分辨率和高时间分辨率的激发光源，为拉曼光谱的微量分析、偏振性的研究和非线性拉曼光谱学的研究创造了条件。目前在生物大分子和生物超分子体系的构型研究中，特别是在溶液中空间结构与功能关系的动态研究中激光拉曼光谱已成为很有发展前途的一门新技术。同时这门技术也开始在鉴别肿瘤细胞与正常细胞的实际应用中发挥作用。

一、拉曼光谱的基本原理

一种透明的物质在入射单色光的辐射下，大部分光透过了分子或被分子所吸收，小部分光发生了散射。在分子的散射光谱中有一条很强的谱线，频率与入射光相等，称为瑞利散射峰(见图1)，在瑞利峰的两侧是能量很弱的与入

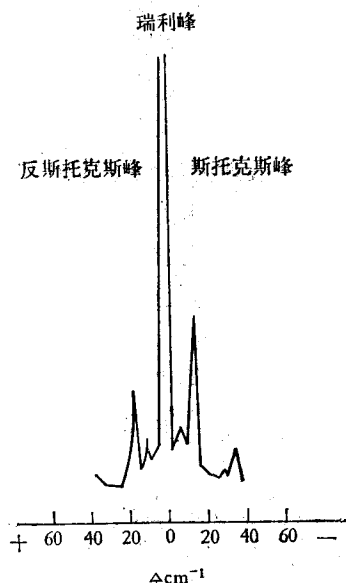


图 1

射光的频率不相同的峰，称作拉曼散射峰。瑞利峰与拉曼谱线之间的频率位移(之差)称作拉曼位移。拉曼位移与分子内原子间的振动和分子的转动频率相对应。散射强度代表分子在振动运动中极化度的改变。最简单的情形是双原子分子，在入射光电磁场的作用下，分子的电子壳发生变形，因而极化度便改变，产生了诱导偶极矩，此种诱导偶极矩引起了光的散射。当入射电磁场作用于具有对称中心的振动分子时，电子云与正核之间的偶极幅度由大到小、由小到大地与入射光频率成周期性地变化(分子周期性改变着它的极性)。分子在平衡位置时产生与入射光频率相等的散射光——瑞利散射；极化度改变时的分子振动产生的散射光为拉曼散射，它等于入射光频率(瑞利频率)加减分子的

振动频率。高于入射光频率的散射带称作反斯托克斯带，低于入射光频率的散射带称作斯托克斯带。

拉曼散射光的退偏振作用

如上所述，对称分子在入射光电磁场的作用下产生的偶极矩(P)与场强(E)成正比：

$$P = aE$$

式中 a 代表分子的极化度，如果分子被各向同性地极化，那么分子中感生偶极子所辐射的光波是与入射光方向一致的偏振光。

如果分子的电子壳层在各方向的长度不同，分子的极化度在各个方向就应不同。例如双原子分子沿键长的方向的极化度比垂直于键长方向的大。一般地讲，分子的极化度是各向异性的。由于分子极化度的各向异性，诱导偶极矩的方向就不再与入射光电磁场的方向一致。也就是说，分子辐射的散射光不完全是偏振光，而是部分地退偏振了。

退偏振度的测量等于垂直于入射光方向的振动光强度与平行于入射光方向的振动光强度之比

$$P = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$$

测量拉曼散射的退偏振度，可以知道分子的振动类型。是完全对称振动，还是不完全对称振动，它反应了分子的极化率，也就是分子的电子壳的性质。

共振拉曼光谱

共振拉曼光谱是分子的振动跃迁和电子跃迁的叠加，一般生色基团上的价电子跃迁($\pi-\pi^*$ 电子跃迁)需要的激发能比较低(在近紫外和可

见光区)在振动能级范围内伴有 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁，因此具有生色基团的化合物如蛋白质、核酸、维生素等都会产生共振拉曼光谱。共振效应提高了这类样品的光谱强度，从而样品可以在稀浓度下进行测定(如细胞色素 C 的测定浓度是 0.8mM)。具有生色基团的化合物如在高浓度下，经激光光源辐射会引起局部升温，导致样品的分解，以及产生很强的荧光干扰。因此共振拉曼光谱弥补了有色物质测定中的困难。

二、激光拉曼分光光度计的基本结构

激光拉曼分光光度计由三部分组成：光源部分、光学部分和检测部分。

拉曼分光光度计要求稳定的，高强度的单色光光源。现今分辨率较高的拉曼分光光度计(分辨率 <1 厘米 $^{-1}$)均采用激光作光源，每台光度计可以配备不同波长的激光器，以便选择使用。其中以 $Ar^{+}-Kr^{+}$ 混合气体激光器的性能最好。

分光光度计光学部分的设计，要求尽量减低杂散光，提高分辨率。由于拉曼散射光谱很弱，在减低杂散光的同时，要考虑尽量保持散射光的强度。通常采用蔡尼-特纳型双联单色器，杂散光可以降低到 10^{-10} ，使仪器分辨率达到 <1 厘米 $^{-1}$ 。近年来分光器的性能不断提高，采用了三联单色器，杂散光进一步降低到 10^{-13} ，分辨率相应地提高到 <0.5 厘米 $^{-1}$ 以下。

为了扩大使用范围，光度计可以备有不同波长范围和输出功率的激光器，不同的液体、固体、气体样品池，微量毛细管样品池和退偏振度的测量装置。测定生物样品时为了避免样品分解和荧光干扰，可采用旋转样品池。

三、激光拉曼光谱在生物大分子及生物膜研究上的应用

1. 多肽和蛋白质

关于蛋白质结构的研究，六十年代后利

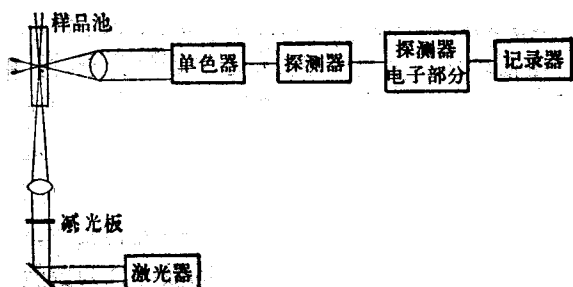


图2 激光拉曼分光光度计示意图

用X 光衍射研究蛋白质的晶体结构已取得了巨大成果。但是生物大分子发挥生物功能大都是在溶液中或界面上,而且都是动态的变化,这些动态变化过程常常包含几个大分子的相互作用。X 光衍射只能研究晶态下的生物大分子。而激光拉曼光谱在探测溶液中构型变化及其功能关系的研究中,已初步显示了巨大的潜力。

激光拉曼光谱与红外吸收光谱都是来自分子内原子的振动和转动,两者不同的是分子的极性愈小拉曼谱线的强度愈大,分子的极性愈大,红外谱线愈强,它们在分子结构的测定中可互为补充。

多肽和蛋白分子肽键中的酰胺基团 $\begin{pmatrix} \text{O} & \text{H} \\ || & | \\ \text{C} & - \text{N} \end{pmatrix}$ 在红外光谱和拉曼散射中都显示强烈的特征性

谱带。蛋白分子的构型是由肽链的盘曲方式和侧链基团的空间关系决定的。肽键的盘曲方式主要有三种: α 螺旋、 β 折叠与无规则卷曲。酰胺基团的化学振动键对肽链的盘曲方式是敏感的,从酰胺基团的振动光谱能够探测多肽和蛋白分子的空间构型及其变换。

通过对几种稳定的模式分子如 N-甲基乙酰胺 ($\text{CH}_3\text{CONHCH}_3$) 分子中 CONH 基团的研究,已知酰胺基团显示的谱带有三种化学键振动: ① $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}-\text{H}$ 为伸缩振动; ② OCN , CNH 为面内弯曲振动; ③ $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 为面外弯曲振动。同时化学键的位能分配也得到了清楚的解析。酰胺基团显示的主要谱带由此命名为: 酰胺 A、B; 酰胺 I—VII。表 1 列出了红外光谱的酰胺带。

表 1 肽键的红外吸收谱带

名 称	近似频率 (厘米 ⁻¹)	振 动 分 键 及 配 位 能	对 称 性
A	3300	N—H(s) 和酰胺 II 之间的 Fermi 共振	平面的
B	3100		平面的
I	1650	C=O(s)80%, C—N(s)10%, N—N(b)10%	平面的
II	1560	C—N(s)40%, N—H(b)60%	
III	1300	C=O(s)10%, C—N(s)30% N—H(b)30%, O=C—N(b)10% 其他 20%	平面的
IV	625	O=C—N(b)40%, 其他60%	平面的
V	725	N—H(b)	平面外
VI	600	C=O(b)	平面外
VII	200	C—N(扭转)	平面外

注 s: 伸缩振动; b: 弯曲振动

多肽的拉曼散射谱带,除了显示酰胺基团的特征性振动而外,它与肽链骨架振动和侧链基团的振动也密切有关。表 2 列举了聚-L-丙氨酸的主要振动谱带,其中许多拉曼散射峰与红外吸收频率是一致的。

用差示光谱法,在稀的水溶液样品(1 毫克/毫升)测定了聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸在不同条件下构型变化的高分辨率拉曼光谱。表 3 列举了聚-L-赖氨酸肽链的三种盘曲方式: α 螺旋、 β 反平行折叠与无规则卷曲的拉曼谱带及其与红外吸收光谱的比较。

聚-L-谷氨酸肽链的 α 螺旋和无规则卷曲显示的拉曼谱带与聚-L-赖氨酸的相似,结果

表示酰胺 I 和酰胺 II 在肽链构型变化中反应是敏感的。虽然到目前为止拉曼光谱谱带尚未全部得到清楚的解释,但是此项技术在鉴定肽链的三种构型上是很精确的。

以溶菌酶作为天然蛋白质样品进行的拉曼光谱测定(在水溶液中),结果表示分子中 S—S 键的散射是强的,从它的相对强度可以推测分子内 S—S 键的数目,并可研究 C—S—S—C 基团的区域构型。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的芳香族基团可以产生很强的共振拉曼谱带,这些谱带对构型或聚合状态的变化是不敏感的。酰胺 I (1660 厘米⁻¹) 和酰胺 II (1626 厘米⁻¹) 在蛋白变性过程中的构型变化是敏感的。

表2 聚-L-丙氨酸的红外和拉曼频率

拉 曼		红 外		振 动 基 团
厘 米 ⁻¹	相对强度	厘 米 ⁻¹	相对强度	
294	弱			骨架变形振动
314	弱			骨架变形振动
		325	强	
375	强	368	强	骨架变形振动
444	非常弱	445	中	骨架变形振动
527	非常强	528	强	骨架变形振动
		595		
610	弱	615	弱	{ 酰胺 VI
662	弱	655	中	酰胺 IV
698	中	690	弱	
756	中	770	非常弱	酰胺 V 和骨架振动
800	非常弱			
884	弱	890	强	
907	非常强	907	中	甲基—碳 (CH ₃ —C) 伸缩和骨架振动
930	非常弱			
964	中	960	强	
1016	弱			
1048	非常弱	1049	非常强	甲基基团
1065	非常弱			
1104	非常强	1105	强	甲基—碳伸缩振动
1168	中	1167	强	甲基基团转动振动
1243	弱	1240	弱	
1310	中	1300	强	酰胺 III
1331	强	1328	中	C—H 弯曲振动
1371	中	1376	非常强	甲基基团对称变形振动
1453	非常强	1453	非常强	甲基基团对称变形振动
	非常弱	1537	非常强	
1549		1555	弱	{ 酰胺 II
1654	非常强	1651	非常强	酰胺 I

表3 聚-L-赖氨酸的拉曼和红外光谱频率 (1500—1700 厘米⁻¹)

α -螺 旋		β -反平行折叠		无 规 则 卷 曲	
拉 曼	红 外	拉 曼	红 外	拉 曼	红 外
1517 弱	1516 弱	1511 弱		1521	
1537 中	1535 强	1535 弱	1530 强 AII		1535 AII
		1564 中		1547	
1600 中				1565	
1617 中		1617 中			
		1631 非常强	1636 强		
1639 强	1650 非常强			1653 非常强	
1647 非常强	1652 中	1672 非常强		1665 非常强	
			1685 中	1683 非常强	

以上是介绍拉曼光谱通过多肽和蛋白分子内的局部振动信息的综合(如肽链骨架,侧链基团,肽链中的酰胺基团,某些化学键及某些基团的振动)来确定分子的构型,这些局部振动都在高频光谱区。近年来由于仪器性能的提高,可以获得低于 150 cm^{-1} 的谱带。Brown 报道,许多蛋白分子的拉曼光谱有低频谱带($<50\text{ cm}^{-1}$),它的出现依赖于蛋白分子的构型。 α -胰凝乳蛋白酶在 29 cm^{-1} 处有一个明显的峰,经 SDS 处理变性后,峰即消失,或在 $20\text{--}150\text{ cm}^{-1}$ 范围内呈现宽的谱带,这是分子结构顺序性减弱的反映。低频谱带产生于蛋白分子线型肽链骨架的诸邻近侧链基团之间的周期性的振动运动。因此低频谱带必然包含了分子的全部,至少是大部分的振动运动信息。

总的看来,蛋白质分子在溶液中的空间构型的研究尚处于初步描述阶段,拉曼光谱在构型分析上的应用也才是近十年来的成就。目前的工作主要是谱带的解释。由于激光拉曼光谱谱线多,有可能提供较多的构象信息。拉曼光谱除了已对一些可溶性和分子量较小的蛋白开展了构型研究外,也进行了膜内蛋白组份的研究,借助于特征性谱带的变化,可以观察膜内蛋白质分子的运动与其功能的关系。

2. 类脂

拉曼光谱在研究长链脂肪酸、脂肪酸酯和某些磷脂等方面已有一些报道。类脂的拉曼光谱主要是碳氢链的振动,包括 CH_3 基团中 C—H 的振动, CH_2 和 =C—H 的变形振动, C—C 和 C—O (酯)的伸缩振动和碳氢链的骨架振动等。拉曼光谱测定表示类脂在结晶态(反式异构体)有两个特征谱带—— 1080 cm^{-1} 强带和 1125 cm^{-1} 弱带;液态时由于 gauche 异构体¹⁾的增多, 1080 cm^{-1} 带减弱, 1125 cm^{-1} 带增强。结晶态时 CH_3 基团的 C—H 对称性伸缩振动占优势;液态时则以 CH_2 基团的 C—H 对称性伸缩振动为主。

二棕榈酸卵磷脂的脂微球测定,烷烃链在反式异构体时有两条强的带 1066 cm^{-1} 和 1130 cm^{-1} , 融解时 gauche 异构体增多,在 1089 cm^{-1} 处出现一条宽带。

$1089\text{ cm}^{-1}/1128\text{ cm}^{-1}$ 或 $1089\text{ cm}^{-1}/1066\text{ cm}^{-1}$ 的强度比,灵敏地反应了烷烃链的结构状态。

从拉曼光谱的测定来辨别饱和和碳氢链的反式构型和 gauche 异构体是比较容易做到的事,但是考虑到生物膜内的脂主要是不饱和脂肪酸的衍生物,拉曼光谱能否监视不饱和脂肪酸的构型变化是一个值得探索的问题。1972 年 Lippert 将不饱和长链脂肪酸和磷脂与水混合,超声振荡使之形成均匀分散的脂微球,光谱分析确定了反式异构体的特征谱带,以及脂肪酸链上烯键的位置和构型。在脂肪酸和磷脂的碳氢链上, —C—C— 伸展区显示出两条强的散射峰。一个峰代表碳氢链上的羧基末端(结合链)到双键之间的甲撑($\text{CH}_2\text{=}$)的反式构型;另一个峰代表甲基末端(游离链)到双键之间的甲撑的反式构型。 $\text{L-}\alpha$ -二油酰卵磷脂(α -dioleoyl lecithin)形成的双分子脂膜的拉曼光谱表示,样品在低温条件下测定的光谱证明, $\text{L-}\alpha$ -二油酰卵磷脂上的结合链和游离链均是反式结构,温度上升至 27°C ,两条侧链均由反式构型转变为无序结构。但是两条侧链的拉曼散射强度指出双分子脂膜的内部流动性比极性表面的流动性大。原因是极性磷酸基团结合侧链在温度升高时它的运动受到限制,因此代表结合链的拉曼散射光的强度变化不大。

激光拉曼光谱提供的模式脂膜的结构和动力学信息与核磁共振、红外光谱、差示热分析的结果是一致的。

3. 生物膜

拉曼光谱用于生物膜的研究,最早是红血球膜。纯净的红血球膜悬浮在缓冲液里,拉曼光谱测定在 $1000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内有 4 条清楚的带,这 4 条带都是由膜脂的碳氢链产生的,可能少部分来自胆甾醇的 CH_2 基团的振动。脂微球体的拉曼光谱测定,发现双分子脂膜内部疏水区的碳氢链流动性大于极性表面的特性,首先在天然红血球膜上得到了验证。

1) gauche 异构体——分子旋转异构的一种构型。

拉曼光谱在色素膜上的研究,如牛视网膜,嗜盐菌(H. halobium)紫质膜,发现这些色素膜的谱带主要来自生色基团的共振拉曼光谱,非共振光谱被掩盖了。

选用适宜波长的激光光源,可以显示不同色素的拉曼谱带,如叶绿体膜上的叶绿素a、叶绿素b和胡萝卜素。这些色素的谱带对微环境的改变异常敏感。又如线粒体膜上的细胞色素c,其还原型的共振光谱很强,氧化型的共振光谱强度减弱;有些谱带消失,同时出现新的散射峰。这些现象在生物膜结构与功能关系的研究中,可以提供非常精细的构型变化信息,而且不会出现分子探针可能造成的结构扰动或其它含糊不清的问题。

四、在活细胞研究中的应用

随着实践的广泛和深入,激光拉曼光谱技

表 4 正常细胞和肿瘤细胞的拉曼位移线(厘米⁻¹)

小田鼠肾细胞		小田鼠肾肿瘤细胞	
1	2	1	2
526	523	—	405
740	741	556	—
—	—	607	607
—	—	1031	—
—	1159	—	1159
—	1320	1229	1229
1420	—	—	1261
1590	—	1340	—
2039	—	—	1375
—	2108	1628	1628
—	2359	2390	—
2375	—	2576	2580
—	2711	—	2711
—	—	2952	2952

注. 1、2 是两次连续扫描记录,1、2 两次扫描不完全相同反应了强的拉曼位移只有在细胞生活的特定时间出现

术也运用到病毒、细菌和活细胞的研究中。1975 年 Thomas 报道,根据病毒蛋白质外壳不同氨基酸侧链的振动频率,能够鉴别两种相近品系的病毒 pfl 和 fd。同时构型敏感的酰胺基团(Amide)频率提示,pfl 和 fd 病毒的外壳蛋白有同样的 α -螺旋结构。病毒的 DNA 骨架不显示 A 型几何结构。

1975 年 Webb 测定了细菌、正常细胞和肿瘤细胞的拉曼光谱。发现细胞在静止期和代谢活动期的散射程度明显地不同;散射峰的出现与细胞的代谢生理时律紧密相关。

表 4 列举了幼小田鼠肾细胞和幼小田鼠肾的肿瘤细胞的拉曼位移线。

结果表明肿瘤细胞产生了一些新的,在正常细胞测定中不存在的拉曼位移线。

不同细菌的光谱测定,如大肠杆菌和芽孢杆菌的拉曼位移也反应出种的特异性。

总之,拉曼光谱能通过特征性的拉曼位移线和细胞的代谢生理时律快速鉴别活细胞种类。

五、结 语

拉曼光谱可以提供较多的结构信息,特别是生物样品在水环境下的结构信息和活细胞的结构信息。近年来激光技术的发展,为拉曼光谱提供了极为理想的光源,促使激光拉曼光谱成为生物大分子溶液构型和生物膜动态结构研究中的一项重要技术。拉曼光谱在活细胞的快速鉴别和医学实践上也已初露苗头,潜力是很大的。

激光拉曼分光光度计在国内已有试制,它将为我国的生物学研究创造更为有利的条件

[本文于 1976 年 12 月 10 日收到]