

不同 pH 值的酸处理 DNA 溶液的拉曼光谱分析

衡航,柯惟中,籍康

(江苏省光电技术重点实验室,南京师范大学分析测试中心,江苏 南京 210097)

[摘要] 通过拉曼光谱研究了经不同 pH 值的酸处理后的 DNA 溶液. 小牛胸腺 DNA 被配制成 pH 6.0、pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0、pH 2.0、pH 1.0 的酸性溶液,经 24 h 充分水合后测试其拉曼光谱. 实验结果表明, DNA 分子内部产生了明显的质子化,其拉曼特征频率和强度均发生了变化,而且不同的 pH 值致使它们的变化程度也不同. 对 DNA 分子结构的影响包括磷酸骨架基团,脱氧核糖及碱基. 随着酸性的增强, DNA 的构型也发生变化:在 pH 6.0、pH 5.0 时 DNA 溶液为标准 B 构型,而在 pH 4.0、pH 3.0、pH 2.0 的 DNA 溶液出现 B 和 C 构型共存,到 pH 1.0 时出现了 Z 构型. 从 pH 3.0 碱基开始质子化,逐渐地 GC 碱基对之间形成了 Hoogsteen 型氢键, AT 碱基对之间的氢键发生断裂,双螺旋结构遭到破坏,而脱氧核糖也受到不同程度的损伤.

[关键词] 拉曼光谱, 小牛胸腺 DNA, 质子化

[中图分类号] O657.37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0046-04

Spectral Analysis of DNA Solution Treated with Acid of Various pH

Heng Hang, Ke Weizhong, Ji Kang

(Jiangsu Key Lab on Opto-Electronic Technology, Analysis and Testing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The Raman spectra of DNA solution treated with various pH values were reported. The Raman spectra of DNA in acidic solution divided into pH 6.0, pH 5.0, pH 4.0, pH 3.0, pH 2.0 and pH 1.0 were measured. The results showed that protonation of DNA occurred and the Raman characteristic shifts and their intensities were changed in different degree for various pH values. With the increased acidity, the conformation of DNA changed: at pH 6.0 and pH 5.0, DNA in acid solution was present at the B form, but at pH 4.0, pH 3.0 and pH 2.0, DNA in acid solution was present at B and C type, and up to pH 1.0 Z-DNA appeared. At pH 3.0, the bases of the DNA started to protonate, and the protonated GC base pairs became Hoogsteen GC base pairs, with AT base pairs disrupted. While the conformation of right-handed double helix was damaged, deoxyribose was also damaged in different degree.

Key words: Raman spectra, DNA of calf thymus, protonation

0 引言

研究生物大分子构象^[1]在不同的酸度处理下分子结构的变化是一件非常有意义的工作. 医学上采用酸直接处理肿瘤并应用于临床,已取得较为满意的成果^[2],同时在细胞水平对其作用机理进行了一些研究. 随着细胞研究工作的深入,许多问题更需要在分子水平了解不同酸度处理对生物体分子的影响. DNA 是生物遗传信息的载体,是生物遗传的物质基础,也是一个很好的受体. 曾有多篇文献研究过酸化对 DNA 的影响,例如文献[2]报道过乙酸对鲐鱼精 DNA 空间结构损伤的拉曼光谱研究,同时也对乙酸对 DNA 损伤的作用机理进行了探讨,文献[3,4]也报道了对鲐鱼精 DNA 纤维用 pH 1.85 酸溶液处理不同时间后的拉曼光谱分析.

收稿日期: 2006-02-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(399770117).

作者简介: 衡航,1980—,硕士研究生,主要从事拉曼光谱的学习与研究. E-mail: henghang71@sohu.com

通讯联系人: 柯惟中,1947—,教授,主要从事拉曼光谱的教学与研究. E-mail: keweiz@jlonline.com

DNA 分子的构型有 A、B、C、Z 等多种,在正常的生理环境里,DNA 构型为 B 型. Cytological 的研究表明:DNA 分子在低 pH 酸化作用时,会发生 DNA 构型由 B→Z 的转变,在 $\text{pH} \leq 3.6$ 酸化的条件下,DNA 分子开始发生质子化作用,AT 碱基对和 GC 碱基对发生氢键分离,当 $\text{pH} \leq 2.2$ 酸化时完全分离(不可逆)^[5]. Tajmir-Riahi 研究小组用三价的铝和钙离子药物及阿司匹林与小牛胸腺 DNA 相互作用,也观察到 A、B 构型之间的转变^[6,7]. 我们曾研究过在紫外照射条件下,DNA 分子的构型不稳定,可在 B、A 之间转化^[8]. 但迄今为止,未见有对 DNA 分子酸化过程中逐点检测 DNA 分子构型变化的报道.

本文利用拉曼光谱技术研究小牛胸腺 DNA 的酸溶液($\text{pH} 6.0$ 、 $\text{pH} 5.0$ 、 $\text{pH} 4.0$ 、 $\text{pH} 3.0$ 、 $\text{pH} 2.0$ 、 $\text{pH} 1.0$),逐点测试得到了各个 pH 值点的 DNA 分子拉曼谱图并进行分析. 通过实验发现,在酸化的过程中确实存在着 DNA 构型由 B→C→Z 的转变,并分析了该过程中 DNA 分子拉曼特征峰的峰位和强度变化的情况,进而得到 DNA 的磷酸骨架、脱氧核糖、碱基等组分随 pH 值变化的重要的信息.

1 材料与方法

小牛胸腺 DNA 为购置于美国 Sigma 公司的白色固体纤维,将其称取 6 份各为 10 mg. 同样称取 6 份各为 32 mg 的 Na_2SO_4 粉末,用 $\text{pH} 6.0$ 、 $\text{pH} 5.0$ 、 $\text{pH} 4.0$ 、 $\text{pH} 3.0$ 、 $\text{pH} 2.0$ 、 $\text{pH} 1.0$ 的磷缓冲液分别将其溶解,配制成 0.045 mol/L 的溶液,再分别用针管抽取 190 μL 的 $\text{pH} 6.0 \sim \text{pH} 1.0$ 的 Na_2SO_4 酸溶液,用其将 6 份 DNA 纤维溶解,这样便制得 6 份 5% DNA 酸溶液样品,其 pH 值分别为 6.0、5.0、4.0、3.0、2.0 和 1.0. 将其放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,经 24 h 以达到充分水合,再取出分别测其拉曼谱图,以硫酸根 SO_4^{2-} 的 981 cm^{-1} 为内标,以此作为各拉曼峰强度变化的依据. 在实验前先测试了 6 份磷缓冲液的拉曼谱图,均未见明显拉曼峰.

样品的拉曼测试均在室温(22 $^{\circ}\text{C}$)下进行. 实验在法国 Jobin Yvon 公司 LABRAM HR800 型激光共焦显微拉曼谱仪上完成. 由 CCD 进行信号接受和光电转换. 由光谱物理公司的 163 型氩离子激光器作光源,激发线波长 514.5 nm,出射功率 10 mW. 狭缝宽 200 μm ,每个样品都重复扫描 3 次以上,各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 $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$.

2 结果与讨论

测试的 $\text{pH} 6.0$ 、 $\text{pH} 5.0$ 、 $\text{pH} 4.0$ 的 5% DNA 溶液拉曼谱图见图 1, $\text{pH} 3.0$ 、 $\text{pH} 2.0$ 、 $\text{pH} 1.0$ 的 5% DNA 溶液拉曼谱图见图 2,有关的拉曼特征频率和指认列于表 1. A、G、C、T 分别代表碱基腺嘌呤、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. 谱线中 981 cm^{-1} 作为内标,各谱中以它的强度作为 1,在此基础上计算了不同 pH 值的 DNA 溶液中各个基团的谱线强度的变化率. 谱线强度的变化率为负值时,说明它所属的基团的化学键受到了损伤,当基团和化学键被修饰时谱线的位移是明显的^[9].

2.1 pH 值对骨架磷酸基团、DNA 构象的影响

在拉曼光谱里,DNA 主链结构里表征磷酸二脂键伸缩振动的 805 ~ 816 cm^{-1} 谱线被看作是 A 型双螺旋规则结构的标志,而 B 式构型的拉曼峰出现在 835 cm^{-1} 左右,C 式构型的拉曼峰出现在 865 ~ 880 cm^{-1} ^[2]. 因此从测得的拉曼光谱就可以方便地判断出 DNA 是属于哪种构型. 在 $\text{pH} 6.0$ 、 $\text{pH} 5.0$ 的拉曼谱图里,在 805 ~ 816 cm^{-1} 范围内始终未见有明显的拉曼谱峰,而在 $\text{pH} 6.0$ 、 $\text{pH} 5.0$ 、 $\text{pH} 4.0$ 、 $\text{pH} 3.0$ 和 $\text{pH} 2.0$ 的拉曼谱图里都有 835 cm^{-1} 左右的拉曼谱峰,但在 $\text{pH} 1.0$ 时 835 cm^{-1} 左右拉曼谱峰消失了. 这表明从 $\text{pH} 6.0$ 到 $\text{pH} 2.0$ 酸溶液环境中的 DNA 分子一直以 B 型结构形式存在着,但在 $\text{pH} 1.0$ 酸溶液的环境下 DNA 已不再是 B 型结构了. 曾有文献报道过,经 $\text{pH} 2.6$ 酸处理后的 DNA,会出现 877 cm^{-1} 左右的拉曼谱峰,这是 DNA 分子 C 构型的特征峰^[5]. 实验中,在 $\text{pH} 4.0$ 、 $\text{pH} 3.0$ 、 $\text{pH} 2.0$ 的拉曼谱图中开始分别出现了 879 cm^{-1} 、877 cm^{-1} 、878 cm^{-1} 的拉曼峰位,这表明从 $\text{pH} 4.0$ 的酸溶液起已有 C 构型的 DNA 出现,随着酸度的增加,在 $\text{pH} 3.0$ 和 $\text{pH} 2.0$ 的条件下,C 构型的 DNA 都继续稳定地存在并有所增强. 而此时表征 B 型结构 835 cm^{-1} 左右的拉曼谱峰的强度却在下降,这说明 877 cm^{-1} 峰位是伴随着 B 型结构特征峰的减弱而出现的,由此造成了 DNA 骨架结构的无序化. Puppels 等曾指出,DNA 磷酸骨架基团的质子化在 $\text{pH} 1.0$ 左右,经 $\text{pH} 1.8$ 或 45% 的醋酸处理后的 DNA,极有可能出现 Z 的构型^[5]. 我们实验证实了这个结论,在实验中的一系列图谱里,仅在 $\text{pH} 1.0$ 的谱图中出现了 891 cm^{-1} 这一强峰,而 $\text{pH} 2.0$ 谱图里则不出

现这峰,这一强峰的出现说明在 pH 1.0 的条件下 DNA 溶液出现了 Z 型 DNA(也称左旋 DNA).

表 1 经 24 h 酸处理后的拉曼光谱及指认

In aqueous solution	Raman shift/(cm ⁻¹)						Tentative assignments
	pH						
	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	
648	648	648	648				C
673	671			672	669		T G
681	681	679	681	682			G
730	728	729	728	729	720		A
752	751	755	751	749	750		T
789	786	786	787	787	786		T C γ(o - p - o)
815							γ(o - p - o) A - type
836	830	832	838	835	825		γ(o - p - o) B - type
881	884	882	879	877	878	891	deoxyribose
922	920	919	920	925	919		deoxyribose
945	950	943			936		deoxyribose
975		959			954		deoxyribose
1 001	1 000	1 003					deoxyribose
1 094	1 093	1 085	1 092	1 092	1 091	1 075	γ(po ₂ ⁻)
1 146	1 145	1 147	1 141	1 145	1 149		Deoxyribose
1 153	1 149	1 151	1 159	1 146	1 149		Deoxyribose-phosphate
1 180	1 178	1 187		1 185			T C
1 302	1 303	1 302	1 303	1 304			A
1 343	1 341	1 342	1 341	1 339	1 335		A
1 376	1 375	1 373	1 376	1 373	1 375		T A G
1 424	1 421	1 419	1 422	1 423	1 412		A G
1 455	1 452	1 459	1 462	1 464	1 460		Deoxyribose-phosphate
1 487	1 488	1 491	1 491	1 489	1 488		G A
1 519	1 515	1 519	1 514	1 510	1 511		A
1 582	1 578		1 579	1 577	1 578		G A
1 672	1 669	1 663	1 668	1 668	1 667		γ(c = o)

γ— stretching vibration.

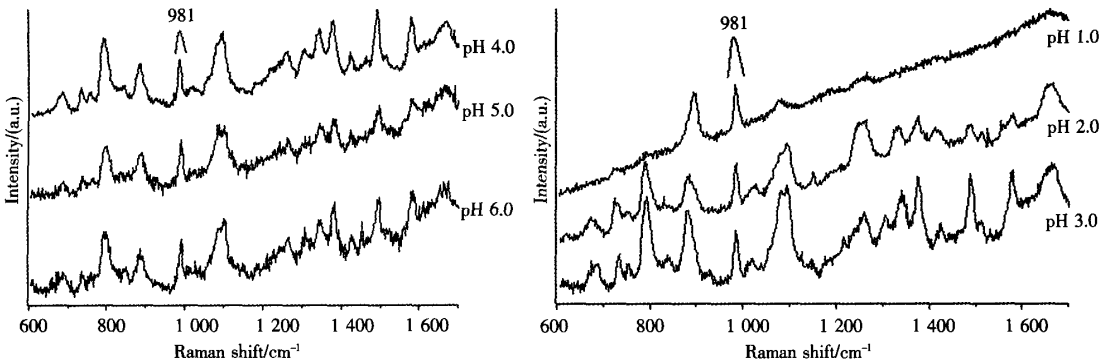


图 1 分别经过酸 (pH 4.0,pH 5.0,pH 6.0) 处理后 DNA 的拉曼光谱 图 2 分别经过酸 (pH 1.0,pH 2.0,pH 3.0) 处理后 DNA 的拉曼光谱

2.2 pH 值对碱基的影响

DNA 的碱基在低波数对质子化是不敏感的,而在高波数段对质子化和去堆积却是敏感的. 我们的实验证实了这个现象,如低波数段的鸟嘌呤(681 cm⁻¹)、腺嘌呤(730 cm⁻¹)、胸腺嘧啶(752 cm⁻¹)、胞嘧啶(789 cm⁻¹)的环呼吸振动的峰强对质子化是不敏感的,它们与碱基的去堆积相对应,鸟嘌呤随着去堆积而峰强减小,腺嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶则是增加. 鸟嘌呤在图 1 pH 6.0、pH 5.0、pH 4.0 的谱图中峰位分别出现在 681 cm⁻¹、679 cm⁻¹、681 cm⁻¹,相对强度为 0.051、0.465、1.277,表明从 pH 6.0 到 pH 4.0 峰强增加,DNA 双螺旋结构更加稳定. 在 pH 3.0~pH 1.0 中鸟嘌呤相对强度为 0.108、0、0,说明从 pH 3.0 开始 DNA 产生了去堆积和碱基质子化的作用,从而使拉曼峰强下降,直到 pH 2.0 和 pH 1.0 时强度减为零.

DNA 分子里碱基对的质子化在高端与低端明显不同. 如位于 1488 cm^{-1} 的表征 GC 碱基对的拉曼峰, 在 pH 6.0 到 pH 1.0 的谱图中它的相对峰强分别为 0.253、1.475、2.202、1.116、0.574、0, 从 pH 3.0 条件下拉曼峰强开始下降, 直到 pH 1.0 时降为零. 这说明此振动非常敏感, 质子化会引起它强度急剧下降, 此时 GC 碱基对之间形成了 Hoogsteen 型氢键^[5]. 腺嘌呤 A 的谱峰 1302 cm^{-1} 从 pH 6.0 到 pH 3.0 峰位分别出现在 1303 cm^{-1} 、 1302 cm^{-1} 、 1303 cm^{-1} 、 1304 cm^{-1} , 其相对峰强为 0.500、0.618、1.028、0.433, 在 pH 2.0 和 pH 1.0 则为 0, 拉曼峰的强度也是在 pH 3.0 开始下降, 意味着腺嘌呤 A 也是在 pH 3.0 开始质子化, 直到 pH 2.0 和 pH 1.0 时酸化作用更加明显, 此时腺嘌呤 A 强度已降为零.

2.3 pH 值对脱氧核糖的影响

从 pH 6.0 到 pH 2.0 酸环境下 DNA 分子表征的脱氧核糖的拉曼谱线变化是不同的: 922 cm^{-1} 峰位分别偏移了 2 cm^{-1} 、 3 cm^{-1} 、 2 cm^{-1} 、 3 cm^{-1} 、 3 cm^{-1} , 相对强度分别为 0.077、0.100、0.145、0.055、0.013, 而在 pH 1.0 的谱图中已不见 922 cm^{-1} 附近的拉曼峰, 由此可以看出, 在 pH 6.0 ~ pH 4.0 酸环境下该峰强增加, 说明脱氧核糖保持稳定, 未受质子化影响. 而从 pH 3.0 ~ pH 1.0 脱氧核糖的 922 cm^{-1} 峰强急剧下降. 由前述分析可知, DNA 溶液从 pH 3.0 开始出现了质子化, 出现 AT 和 CG 碱基间氢键的断裂, DNA 构型也发生了变化, 此时脱氧核糖也受到了不同程度的损伤, 到了 pH 1.0 酸环境下脱氧核糖的 922 cm^{-1} 峰已基本消失. 属于磷酸脱氧核糖的 1455 cm^{-1} 峰, 从 pH 6.0 到 pH 2.0 它的峰位分别偏移了 3 cm^{-1} 、 4 cm^{-1} 、 7 cm^{-1} 、 9 cm^{-1} 、 5 cm^{-1} , 强度分别为 0.254、0.065、0.060、0.053、0.051, 由此可知在 pH 6.0 的谱图中表征磷酸脱氧核糖的拉曼峰很强, 从 pH 5.0 该峰强度开始下降, 在 pH 5.0 ~ pH 2.0 的范围内其峰强一直保持相对稳定, 直到 pH 1.0 峰强变为零, 说明在 pH 6.0 条件下 DNA 中磷酸脱氧核糖结构比较稳定, 而从 pH 5.0 开始磷酸脱氧核糖遭到了一定程度的损伤, 在 pH 4.0 ~ pH 2.0 中受到质子化影响, 直到 pH 1.0 时已完全受到损伤.

3 结论

(1) 在 DNA 分子从 pH 6.0 ~ pH 1.0 逐点变化的酸溶液中, 在 pH 6.0 ~ pH 4.0 范围内, 拉曼光谱无明显变化; 而从 pH 3.0 到 pH 1.0 时, DNA 分子内部发生了明显的质子化作用, 出现酸变性的现象, GC 碱基对之间形成了 Hoogsteen 型氢键. 随着腺嘌呤 A 的质子化, AT 碱基对之间氢键发生断裂, 双螺旋结构遭到破坏, 脱氧核糖遭到了不同程度的损伤.

(2) 在 pH 6.0 和 pH 5.0 时, DNA 分子构型仍为 B 型; 从 pH 4.0 到 pH 2.0 开始出现 C 构型, 在此范围内为 B 和 C 构型共存; 至 pH 1.0 时, DNA 分子的 B 和 C 构型全被破坏, 而在正常情况下隐藏着的 Z 构型却显现出来, 即 DNA 出现 Z 构型.

【参考文献】

- [1] 柯惟中, 余多慰. 溶菌酶水溶液的激光拉曼谱[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 1993, 16(4): 48-51.
- [2] 柯惟中, 余多慰, 顾柏平, 等. 乙酸对鲱鱼精 DNA 空间结构微观损伤的拉曼光谱特征[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(6): 790-792.
- [3] 余多慰, 柯惟中. DNA 纤维经醋酸处理后脱嘌呤的拉曼谱带分析[J]. 分析测试学报, 2001, 20(5): 1-4.
- [4] 余多慰, 朱景宁, 柯惟中. DNA 纤维质子化及脱嘧啶的拉曼光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(4): 734-736.
- [5] Puppels G J, Otto C, Greve J, et al. Raman microspectroscopic study of low-pH-induced in DNA structure of polytene chromosomes[J]. Biochemistry, 1994, 33(11): 3386-3395.
- [6] Neault J F, Naoui M, Manfait M, et al. Aspirin-DNA interaction studied by FTIR and laser Raman difference spectroscopy[J]. FEBS Letters, 1996, 382(1/2): 26-30.
- [7] Ahmad R, Naoui M, Neault J F, et al. An FTIR spectroscopic study of calf-thymus DNA complexation with Al(III) and Ga(III) cations[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1996, 13(5): 795-802.
- [8] 周殿凤, 柯惟中. 不同波段的紫外辐射对 DNA 构象影响的拉曼光谱研究[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 61-64.
- [9] 柯惟中, 余多慰, 缪丽萍. 热处理和紫外辐射对 DNA 影响的拉曼光谱研究[J]. 光学学报, 1997, 17(12): 1684-1689.

【责任编辑: 丁 蓉】