

DNA 碱基激光拉曼光谱检测方法的研究

李振庆^{1*}, 何志祥¹, 尚 华², 张大伟¹, 山口佳则³

(1. 上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 教育部医用光学仪器与设备重点实验室, 上海 200093; 2. 开封市儿童医院, 河南 开封 475000; 3. 大阪大学 先进光子研究中心, 大阪 565-0871)

摘要: 以激光拉曼光谱仪采集腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)的拉曼光谱图, 分析了各碱基谱峰归属, 并依据归属结果检测混合碱基组成。结果显示: 4种碱基的特征峰集中在175~1800 cm^{-1} 。相同积分时间和激光功率条件下, 该波段内嘌呤碱基的激光拉曼光谱峰高于嘧啶碱基的谱峰。腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶分别在723、648、791、1368 cm^{-1} 处的谱峰最强, 利用这些特征峰能在2 min内鉴别出混合碱基中的各碱基。

关键词: 激光拉曼光谱; 碱基; 特征峰

中图分类号: O657.37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)02-0235-05

Study on Detection of DNA by Laser Raman Spectrometry

LI Zhen-qing^{1*}, HE Zhi-xiang¹, SHANG Hua², ZHANG Da-wei¹, Yoshinori Yamaguchi³

(1. School of Optical-Electrical and Computer Engineering, Key Laboratory of Medical Optical Instrument and Equipment of Ministry of Education, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Children's Hospital of Kaifeng City, Kaifeng 475000, China; 3. Photonics Advanced Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan)

Abstract: A method of laser Raman spectrometry was developed for the detection of DNA bases. The Raman spectra of adenine(A), guanine(G), cytosine(C) and thymine(T) were collected with laser Raman spectrometer in this work. The characteristic peaks in the spectra for each DNA base were analyzed, which were used to determine the components of DNA base mixtures. Results demonstrated that the characteristic peaks mainly ranged from 175 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} . The peaks of A and G were higher than those of C and T when the integration time and laser power were certain. The strongest Raman signals for A, G, C, and T are at 723, 648, 791 and 1368 cm^{-1} , respectively. Each DNA base could be determined by using the characteristic peaks from the mixed DNA bases within 2 min.

Key words: laser Raman spectrometry; DNA base; characteristic peak

核酸是生物体内的遗传物质, 由磷酸、五碳糖和碱基组成, 是生物遗传信息的中间载体^[1], 参与遗传信息在细胞内的传递和表达, 进而促进和控制生物代谢过程。核酸碱基是核酸分子的重要组成部分, 其卤代、加成、脱氮等化学反应是核酸分子存储和信息传递的基础。碱基对的不同排列组合是生物遗传、变异和进化的根本原因^[2]。对核酸碱基分子的研究有助于探索生物体行为以及生物活性, 是生物和化学研究领域的重要内容之一。

激光拉曼光谱法是一种高效的在线分析方法, 具有实时、准确、快速、无损且无需对检测物质进行复杂处理的特点^[3-6], 能反映不具红外活性的对称性振动和非极性基团的振动, 可增强显示红外光谱上特征不明显的分子信息。激光拉曼光谱法弥补了水的红外光谱吸收峰强和空间分辨率低的缺陷, 已经被广泛应用于食品安全^[7-10]、真伪鉴定^[11-12]、地质学^[13-15]、生物医学^[16-18]等领域。目前激光拉曼光谱峰法在医学领域还有很大的研究和应用空间, 特别是在核酸碱基序列方面的研究较少。本文研究了腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶粉末的激光拉曼光谱快速鉴别方法。

收稿日期: 2018-07-31; 修回日期: 2018-08-30

基金项目: 上海市2018年度“科技创新行动计划”(18441900400)

* 通讯作者: 李振庆, 副教授, 研究方向: 显微拉曼光谱技术, E-mail: zhenqingli@163.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

便携式拉曼光谱仪(美国必达泰克有限公司), 配套采集软件 Bw&Ram, 激发波长 785 nm, 功率可调范围 0~300 mW, 光谱采集范围 175~1 800 cm^{-1} , 分辨率 4.5 cm^{-1} 。光谱采集可使用光纤探头, 或视频显微镜检测平台 BAC151, 配置 20 倍放大物镜。电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)最大称重 200 g, 最小称重 0.1 g, 精度 0.1 mg。

腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶(纯度 $\geq 99\%$, 南京多福尼生物科技有限公司), 使用时未做任何处理。

分别称取上述 4 种碱基的粉末各 0.6 g, 单独存放, 标号为样品 1; 分别称取上述 4 种碱基的粉末各 0.3 g, 混合均匀, 标号为样品 2。

1.2 实验方法

1.2.1 样品放置与显微镜调整 将待测碱基粉末平铺于 BAC151 显微镜的样品台上, 压平。通过样品台的高度微调旋钮调节显微物镜到样品表面的距离, 使激光聚焦在样品上。

1.2.2 碱基拉曼光谱的采集 取样品 1 进行测量。测量嘌呤碱基时设置激光强度在档位 20, 积分时间为 4 000 ms; 测量嘧啶时设置激光强度在档位 40, 积分时间为 6 000 ms。依次采集待测碱基的拉曼散射光谱, 每组实验在相同条件下测试 3 次, 取平均值。

1.2.3 混合碱基拉曼光谱的采集 样品 2 测量时将激发功率设定为档位 40, 积分时间设为 4 000 ms。相同条件下测试 3 次, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 碱基拉曼光谱

腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶的激光拉曼散射光谱显示, 4 种碱基在 0~175 cm^{-1} 波段内的相同或邻近位置均出现很强的拉曼光谱峰, 无法作为碱基鉴别的特征谱峰, 而在 1 800 cm^{-1} 以后的波段, 4 种碱基亦均无明显波峰。因此本文选取光谱采集范围为 175~1 800 cm^{-1} , 该波段也是碱基特征峰集中波段。

腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶粉末的激光拉曼光谱图(图 1)差别显著, 谱峰位置和强度均明显不同, 该现象为进一步采用激光拉曼光谱法检测碱基提供了可能。在相同实验条件下, 嘌呤碱基(A 和 G)粉末的拉曼谱峰强度明显高于嘧啶(C 和 T)的拉曼谱峰强度, 这是由于嘌呤碱基内存在双环结构, 使得指征嘌呤碱基分子内部环呼吸振动的谱峰更强, 同时化学基团对化学键振动的影响也更加明显。因此在相同实验条件下嘌呤碱基的谱峰强度更高。

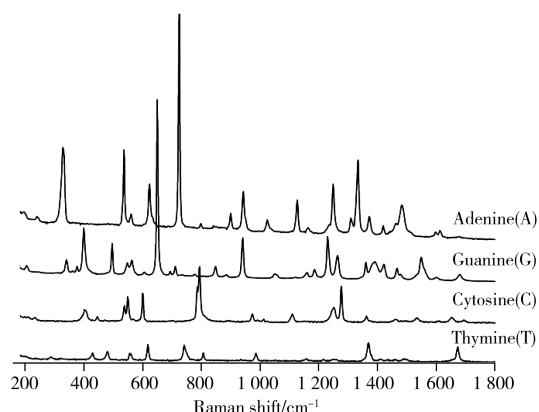


图 1 不同碱基的激光拉曼光谱对比图
Fig. 1 Comparison of different DNA bases' laser Raman spectra

2.2 碱基拉曼谱峰的归属与特征峰的选择

图 2 分别为 4 种碱基的激光拉曼光谱图。腺嘌呤在 327、534、622、723、942、1 126、1 248、1 331、1 480 cm^{-1} 位移处出现了较明显的谱峰(图 2A), 其中强度最大的在 723 cm^{-1} 和 1 331 cm^{-1} 处。723 cm^{-1} 处的谱峰指征整个腺嘌呤分子嘌呤环的呼吸振动, 由于其分子内部存在双环的基本构架, 所以此处腺嘌呤的呼吸振动峰更强; 1 331 cm^{-1} 处的谱峰指征腺嘌呤分子内 C—N、C—C 的伸缩振动以及 C—H、N—H 在平面内的摆动振动, 反映了腺嘌呤的结构特征, 对其检测和定性分析具有重要作用。图 2B 表明, 鸟嘌呤在 398、494、648、940、1 228、1 547 cm^{-1} 拉曼位移处出现了明显的谱峰, 且 648、1 228 cm^{-1} 处的谱峰较强, 前者指征鸟嘌呤分子内部双环的呼吸振动, 后者是 C—C、C—N 平面

内伸缩振动和 N—H 平面内的摇摆振动, 两者可作为特征峰对鸟嘌呤碱基定性和定量分析。图 2C 表明, 胞嘧啶在 400、548、598、791、972、1 108、1 274、1 361、1 651 cm^{-1} 处出现了明显的拉曼光谱峰, 其中 791、1 274 cm^{-1} 处的谱峰较强。791 cm^{-1} 处谱峰指征胞嘧啶分子内环的呼吸振动; 1 274 cm^{-1} 处谱峰指征分子内部 C—C、C—N 在平面内的伸缩振动和 N—H 在平面内的摇摆振动, 两者均可作为特征峰对胞嘧啶进行定性和定量研究。从图 2D 可知, 胸腺嘧啶在 427、479、564、615、740、803、984、1 368、1 672 cm^{-1} 处出现了明显的拉曼谱峰, 其中在 615、740、1 368、1 672 cm^{-1} 处拉曼谱峰较强。615 cm^{-1} 处谱峰指征胸腺嘧啶碱基内部 N—C—O 的弯曲振动; 740 cm^{-1} 处谱峰指征胸腺嘧啶碱基内部平面上分子的呼吸振动; 1 368 cm^{-1} 处谱峰指征分子内部 N—H 在平面内的弯曲振动和 C=O 在平面内的伸缩振动; 1 672 cm^{-1} 处指征分子内部 C=O 在平面内的伸缩振动。上述 4 个较强谱峰可用于胸腺嘧啶的定性和定量分析。4 种碱基各谱峰的详细归属如表 1 所示。通过谱峰归属发现, 每种碱基均有很多特征谱峰, 这些峰均可作为鉴别碱基的理论谱峰。但是部分拉曼谱峰相对较弱, 在混合物检测中容易被邻近谱峰或干扰信号所覆盖, 所以选择较强谱峰用作碱基鉴别的理论特征峰。

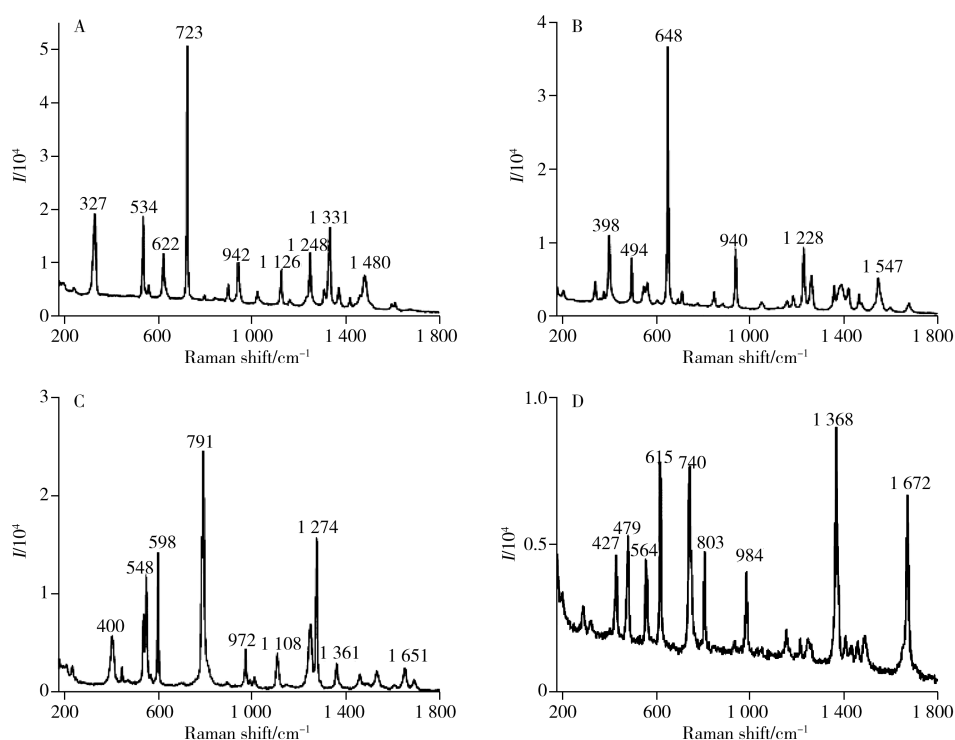


图 2 碱基样品的激光拉曼光谱图

Fig. 2 Laser Raman spectra for DNA bases

A. adenine; B. guanine; C. cytosine; D. thymine

表 1 4 种碱基各谱峰位置归属

Table 1 Characteristic peaks assignment of bases

Bases	Raman shift/ cm^{-1}	Assignment
Adenine	327	torring
	534	def ring(N—C—C)
	622	def ring(C—C—C)
	723	ring breath wholemolecular
	942	rock NH_2 spr N—C
	1 126	str C—N, bend N—H
	1 248	str C—N, bend N—H
	1 331	str C—N, C—C, rock NH_2
	1 480	str C—N, bend N—H C—H

(续表 1)

Bases	Raman shift/cm ⁻¹	Assignment
Guanine	398	def ring
	494	bend C—N—C, N—C—C
	648	ring breath whole melocular
	940	def ring
	1 228	str C—N
Cytosine	1 547	str C—N, C—C, bend N—H
	400	sciss NH ₂
	548	bend C—N—C, N—C—N
	598	bend C=O, C—N
	791	ring breath
	972	str C—N, C—C
	1 108	str C—N
	1 274	str C—N, C—C, rock NH ₂
	1 361	str C—N, C—C
	1 651	str C—C, C=O
Thymine	427	tor ring
	479	bend N—C—C, C—N—C
	564	bend N—C—N, C—N—C
	615	bend N—C—O
	740	ring breathing
	803	str N—C
	984	str N—C, C—C
	1 368	str C=O, bend N—H
	1 672	str C=O

def: deformation, sciss: scissoring, str: stretching, tor: torsion

2.3 激光拉曼光谱法对混合碱基的有效检测

实验进行 2 min, 碱基混合物的拉曼光谱图(图 3)显示, 混合碱基拉曼光谱在 327、398、534、648、723、791、940、1 333、1 368、1 486、1 672 cm⁻¹拉曼位移处出现明显的谱峰, 其中 327、534、723、940、1 486 cm⁻¹处的谱峰为腺嘌呤的特征谱峰; 648 cm⁻¹与 791 cm⁻¹处的谱峰分别为鸟嘌呤和胞嘧啶的特征谱峰; 1 368 cm⁻¹与 1 672 cm⁻¹处为胸腺嘧啶的特征谱峰。因此, 激光拉曼光谱方法可以快速检测混合物中碱基的种类, 且混合物中各碱基谱峰的相对强度为碱基的定量分析提供了可行性。

3 结论

本文对腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶等核酸碱基进行了激光拉曼光谱研究, 通过光谱分析处理得到碱基特征峰波段集中在 175 ~ 1 800 cm⁻¹。分析归纳了 4 种碱基分子的激光拉曼光谱特征峰, 在混合碱基分析中, 通过将混合碱基拉曼光谱图中的谱峰与已获取的 4 种碱基的特征峰位置进行比对, 实现了碱基混合物中各碱基的快速鉴别。该鉴别方法不仅速度较快, 而且无需对碱基进行复杂的预处理, 研究结果为采用激光拉曼光谱法对碱基进行量化分析奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Wang F, Zhao D B, Jiang L, Xu L, Sun H J, Liu Y F. *Spectrosc. Spectral Anal.* (王芳, 赵东波, 蒋玲, 徐莉, 孙海军, 刘云飞. 光谱学与光谱分析), **2016**, 36(12): 3863–3869.
- [2] Wu L, Li F, Jin Z Y, Li Y T, Hu W. *Biochem. Biophys.* (吴雷, 李菲, 金周雨, 李雨婷, 胡薇. 生物化学与生物物理进展), **2016**, 43(3): 281–290.

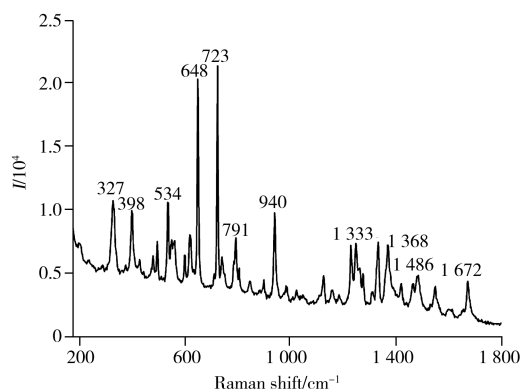


图 3 碱基混合物的激光拉曼光谱图
Fig. 3 Laser Raman spectrum for the mixture of DNA bases

- [3] Jiang L H, Shen J, Yu Z H, Shao Y N, Chen X W, Chen X D. *Opt. Instrum.* (蒋林华, 沈俊, 余治昊, 邵咏妮, 陈小婉, 陈晓东. 光学仪器), **2018**, 40(2): 31–37.
- [4] Chen Z Y, Lu Y L, Liang Y, Zeng C, Zhang Z M, Li G K. *J. Instrum. Anal.* (陈正毅, 卢雅琳, 梁豫, 曾晨, 张卓旻, 李攻科. 分析测试学报), **2017**, 36(5): 650–654.
- [5] Felipe M F, Alan L V, José A G N, George L D, Bradley T J. *Microchem. J.*, **2017**, (133): 76–80.
- [6] Zeng Q J, Ni Y, Li Z Q, Zhang D W, Yoshinori Y. *Chin. J. Anal. Lab.* (曾庆杰, 倪一, 李振庆, 张大伟, 山口佳则. 分析实验室), **2015**, 34(4): 405–408.
- [7] Zhao J H, Li Y, Yuan H C, Liu M H. *J. Instrum. Anal.* (赵进辉, 李耀, 袁海超, 刘木华. 分析测试学报), **2017**, 36(5): 701–704.
- [8] Chen X M, Lei H Y, Hu Y L, Li G K. *J. Instrum. Anal.* (陈小曼, 雷皓宇, 胡玉玲, 李攻科. 分析测试学报), **2016**, 35(10): 1343–1346.
- [9] Rico S, Jürgen K, Heinar S. *Vib. Spectrosc.*, **2014**, (70): 12–17.
- [10] Peng Y, Zhang Z M, Lu H M, Liang Y Z, Liu C, Chen Q Z, Liu G K. *J. Instrum. Anal.* (彭颖, 张志敏, 卢红梅, 梁逸曾, 刘察, 陈启振, 刘国坤. 分析测试学报), **2017**, 36(5): 627–632.
- [11] Wan Q E, Liu H P, Zhang H M, Liu S H. *Spectrosc. Spectral Anal.* (万秋娥, 刘汉平, 张鹤鸣, 刘颂豪. 光谱学与光谱分析), **2012**, 32(4): 989–992.
- [12] Huang X L, Zhan Y L, Li J, Zhang C B, Wang X Q, Tang L N. *Sci. Technol. Food Ind.* (黄秀丽, 詹云丽, 李菁, 张长斌, 王晓琴, 唐丽娜. 食品工业科技), **2016**, 37(20): 59–62, 67.
- [13] Meng Q G, Liu C L, He X L, Ye Y G, Zhu Y H, Xia N. *Geol. Bull. Chin.* (孟庆国, 刘昌岭, 贺行良, 业渝光, 祝有海, 夏宁. 地质通报), **2011**, 30(12): 1863–1867.
- [14] Ding J Y, Ni P, Rao B, Zhou J, Zhu X T. *Geol. Rev.* (丁俊英, 倪培, 饶冰, 周进, 朱筱婷. 地质论评), **2004**, (2): 203–209.
- [15] Nicola F, Emily D M, Andrew H K, Christian H, Roger E S. *Carbon*, **2016**, (108): 440–449.
- [16] Mao D Z, Weng X X, Yang Y J. *Chin. J. Pharm.* (毛丹卓, 翁欣欣, 杨永健. 中国医药工业杂志), **2012**, 43(9): 776–779.
- [17] Dolenko T A, Burikov S A, Laptinskiy K A, Sarmanova O E. *Laser Phys.*, **2016**, 26(2): 025206.
- [18] Fu Y, Zhang W H, Gong L, Wen J X, Liang Z, Gong Y T, Xie F Y, Chen J. *J. Instrum. Anal.* (浮钰, 张卫红, 龚力, 温锦绣, 梁正, 巩玉婷, 谢方艳, 陈建. 分析测试学报), **2015**, 34(6): 652–657.

(责任编辑: 盛文彦)