

## PolyA, PolyU 及双链复合物 PolyA · PolyU 的拉曼光谱研究

廖昱博<sup>1</sup>, 孟耀勇<sup>1\*</sup>, 雷浩东<sup>1</sup>, 王 英<sup>2</sup>

1. 华南师范大学光子中医学实验室, 广东 广州 510631

2. 中国科学院广州地球化学研究所, 广东 广州 510640

**摘要** 测试了 PolyA, PolyU 及其双链复合物 PolyA · PolyU 的拉曼光谱, 研究了双链形成前后的光谱变化。结果显示: (1) 15 °C 下, 在 pH 7.0 的 0.14 mol · L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol · L<sup>-1</sup> Tris 水溶液中, PolyU, PolyA, PolyA · PolyU 分别以无规卷曲、A 型单螺旋和 A 型双螺旋结构存在。后两种结构区别于前者主要光谱标志之一是有序结构在 814 cm<sup>-1</sup> 附近出现的拉曼峰。另一光谱标志则是 1 100 cm<sup>-1</sup> 附近的谱峰半高宽的大小。PolyA, PolyA · PolyU 在该处有着相同的半高宽, 而 PolyU 在该处的谱峰则有明显的展宽。此外, 还发现 PolyA 的有序程度不及 PolyA · PolyU, 这可以从 (813 ± 2) cm<sup>-1</sup> 与 1 100 cm<sup>-1</sup> 的峰强比推知; (2) PolyU, PolyA 形成双螺旋复合物之后, 多聚核苷酸碱基-碱基堆积力大为增强, 主链构象变得更为有序化, 从而产生了明显的拉曼减色效应并伴随着相关谱带的频移。在这个过程中, PolyU 链比 PolyA 链所产生的光谱变化更为显著。该研究表明, 从这类实验结果中提取特征光谱标志有望实现基因芯片的拉曼光谱检测。

**关键词** PolyA; PolyU; 基因芯片; 拉曼光谱**中图分类号:** O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)05-0940-04

## 引 言

PolyA 和 PolyU 是人工合成的只含有一种碱基的特殊序列的单链多聚核苷酸。在一定条件下, 根据碱基摩尔比的不同, 它们能够形成双链螺旋 PolyA · PolyU 或三链螺旋 PolyU · PolyA · PolyU 结构。研究这些人工合成的多聚核苷酸的结构和物理性质已经成为认识天然核酸最有效的途径之一。这不仅可以为具有相似碱基成分和碱基序列的天然 RNA 以及寡核苷酸的结构和功能的分析提供有效的参考, 而且对基因转录的研究也有重要的意义。人们已在核酸热动力学以及离子强度<sup>[1-4]</sup> 和温度<sup>[5, 6]</sup> 对多聚核苷酸单、双链结构稳定性的影响方面做了大量的工作。本研究利用拉曼散射的方法比较和分析了 PolyA, PolyU 碱基配对形成 PolyA · PolyU 双螺旋前后的光谱, 发现有特征明显的光谱变化。这就提示我们有可能通过拉曼光谱这一手段实现基因芯片信号检测。虽然, 目前基因芯片信号检测中主要采用荧光法<sup>[7-10]</sup>, 但核酸本身不发荧光, 检测前需要结合荧光标记物, 存在着标记不完全、靶标的非特异性吸附、荧光漂白、猝灭和背景干扰等缺点。此外, 荧光谱带比较宽, 不适合多重检测<sup>[11-13]</sup>。

比之于荧光检测, 激光拉曼光谱方法无需样品标记, 能够提供关于样品分子结构丰富的光谱信息, 而且谱峰细锐, 便于识别, 加之它几乎不受水溶液的干扰, 特别适合于生物样品的检测<sup>[14, 15]</sup>。因此, 激光拉曼光谱技术是一种很有前景的生物芯片检测方法。

## 1 材料与实验方法

PolyA, PolyU 购自 Pharmacia 公司, 使用前未做进一步纯化。其他化学试剂均为国产分析纯, 实验用水为三蒸水。为了得到双螺旋核酸 PolyA · PolyU, 根据文献<sup>[5]</sup>, 将碱基摩尔比为 1:1 的 PolyA 和 PolyU 混合溶于 0.14 mol · L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol · L<sup>-1</sup> Tris 缓冲液中(pH 7.0), 置于 4 °C 冰箱中保存一周, 然后进行拉曼光谱测试。用于拉曼测试的样品分别为: 5% PolyA, 5% PolyU 以及总百分比为 5% 的 PolyA · PolyU。使用氩离子激光器 514.5 nm 波长激发, 样品封装于玻璃毛细管中。聚焦在样品上的光功率约为 3 mW。采用 RM2000 型显微激光拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司), 分辨率 1~2 cm<sup>-1</sup>。光谱采集使用 CCD 检测器, 每个样品扫描三次求平均, 每次采集时间 30 s, 波数范围 500~1 800

**收稿日期:** 2006-04-18, **修订日期:** 2006-07-26**基金项目:** 广东省自然科学基金项目(021093)和广东省重点科技项目(2KM04502S)资助**作者简介:** 孟耀勇, 1964 年生, 华南师范大学光子中医学实验室教授 \* 通讯联系人

e-mail: mengyy@scnu.edu.cn

cm<sup>-1</sup>, 测试温度为 15 °C。

## 2 结果与讨论

图 1(a), (b)中分别给出了 PolyA, PolyU 和 PolyA · PolyU 的拉曼光谱原始图以及经过去基线平滑处理后的结果。图 2(a), (b)则分别显示了三种样品在 700~1 150 cm<sup>-1</sup> 和 1 150~1 800 cm<sup>-1</sup> 两个波数范围的光谱细节。表 1 列出了 PolyA · PolyU 主要谱带的特征频率及其指认。

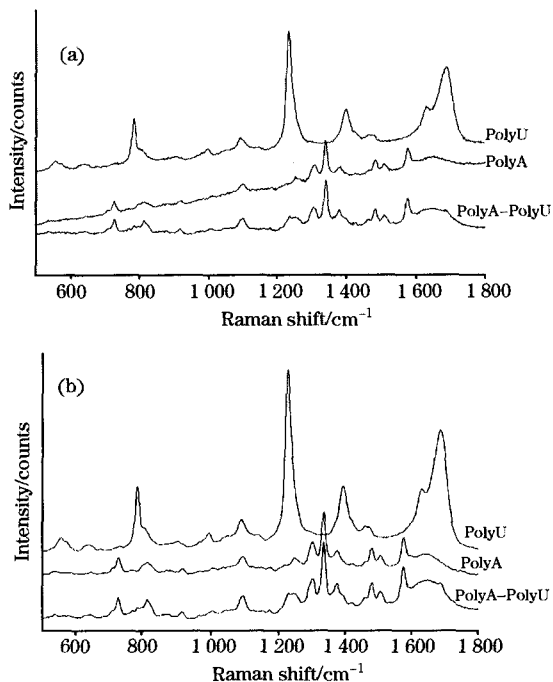


Fig. 1 (a) Raw spectra of PolyA, PolyU and PolyA · PolyU and (b) Results of what baseline-corrected and smoothed

Conditions: 0.14 mol · L<sup>-1</sup> NaCl and 1 mmol · L<sup>-1</sup> Tris solution at 15 °C

Table 1 Raman band tentative assignments of PolyA · PolyU

Bands /cm <sup>-1</sup>	Assignments	Bands /cm <sup>-1</sup>	Assignments	Bands /cm <sup>-1</sup>	Assignments
728	A	1 100	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	1 426	A
769	U	1 236	U	1 484	A
786	U	1 253	A	1 509	A
814	$\nu_s(\text{O-P-O})$	1 306	A	1 577	A
918	Ribose-Phosphate	1 339	A	1 687	U $\nu(\text{C=O})$
1 008	A U	1 379	A		

$\nu$ , stretching;  $\nu_s$ , symmetric stretching; A, adenine; U, uracil

### 2.1 磷酸核糖振动与主链构象

如图 2(a)所示, 800~1 150 cm<sup>-1</sup> 波数范围的拉曼光谱反映了骨架磷酸基团和糖环的振动模式, 是用于识别核酸构象的最直接的证据。从图中可以看出, 双链螺旋 PolyA · PolyU 区别于单链 PolyU 最主要的光谱标志是前者出现了强度较大的 814 cm<sup>-1</sup> 峰。它源于对构象灵敏的磷酸二酯基团

3'O-P-O5'特有的几何形状, 是核酸有序构象的表征<sup>[16-20]</sup>, 该峰的出现说明在研究的离子浓度下双螺旋多核苷酸 PolyA · PolyU 采取 A 型构象(即糖折叠为 C3'-endo, 碱基处于 anti)。然而, 单链 PolyU 在此条件下未能形成有序构象, 谱峰位移至约 808~795 cm<sup>-1</sup>, 成为 783 cm<sup>-1</sup> 峰旁宽度较大的肩带。根据文献<sup>[21]</sup>, 我们推断此处的单链 PolyU 完全暴露在水溶液中, 呈现无规卷曲的结构。相比之下, 单链 PolyA 的结构显得比较独特。众所周知, 溶液中的 PolyA 因温度和 pH 值的差异而表现出多种不同的结构状态。光谱图中 812 cm<sup>-1</sup> 处的拉曼峰显示溶液中的单链 PolyA 也是以 A 型的有序构象存在。不过, 812 cm<sup>-1</sup> 峰无论在峰形和半高宽上都与双螺旋 PolyA · PolyU 的 814 cm<sup>-1</sup> 峰不同, 前者的半高宽明显变大。这说明了单链 PolyA 的有序程度不及双链螺旋, 其结构存在一定的“柔性”<sup>[19]</sup>。在中性 pH 值的水溶液中, 它通过强度较大的碱基-碱基堆积作用形成单螺旋结构<sup>[22-24]</sup>。

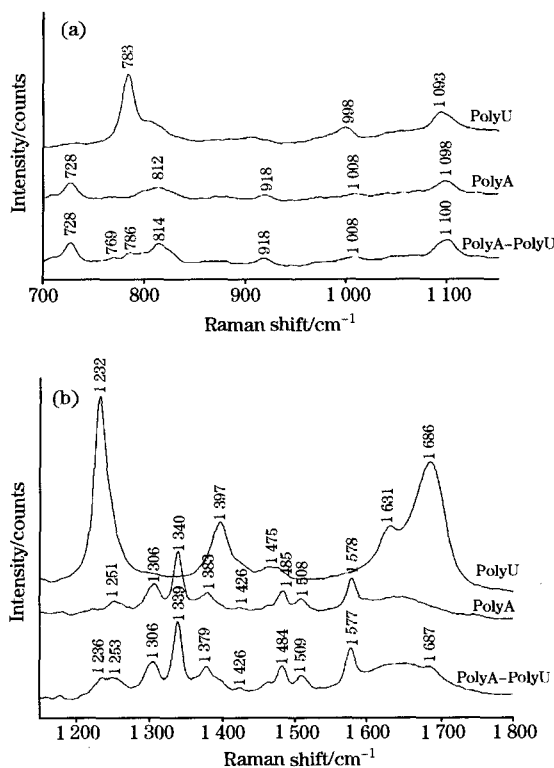


Fig. 2 Raman spectral details of PolyA, PolyU and PolyA · PolyU obtained from 700 to 1 150 cm<sup>-1</sup> (a) and from 1 150 to 1 800 cm<sup>-1</sup> (b)

Conditions, same as figure 1

拉曼光谱 1 090~1 100 cm<sup>-1</sup> 的强谱带对应主链上磷酸离子 PO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的对称伸缩振动。与磷酸二酯对称振动的 814 cm<sup>-1</sup> 峰不同, 其强度对构象不灵敏, 故常用作强度内标<sup>[16]</sup>。图 2(a)中显示 PolyA, PolyU 和 PolyA · PolyU 的对应谱峰分别落在 1 098, 1 093 和 1 100 cm<sup>-1</sup> 处。其中 PolyA 与 PolyA · PolyU 的峰位基本保持一致, 而在 PolyU 的谱图中产生了位移。有趣的是, 比较三者的半高宽, 发现形成了螺

旋构象的 PolyA 和 PolyA·PolyU 的半高宽相同(34 cm<sup>-1</sup>),而在 PolyU 的谱图中则发生了较大的展宽(57 cm<sup>-1</sup>)。这可能与单链 PolyU 的无规卷曲结构有关。这一结果在其他文献中未见报道。

Thomas<sup>[25, 26]</sup>等指出利用(813±2) cm<sup>-1</sup>峰与 1 100 cm<sup>-1</sup>峰的强度比  $R = I_{813}/I_{1100}$  的大小可以定量表示核酸 A 型螺旋结构的有序程度。这种判定方法不仅适用于不同碱基组成的 A-RNA 以及 A-DNA( $I_{806}/I_{1099}$ ),而且对单链 RNA 也同样适用。经计算,双螺旋 PolyA·PolyU 以及单螺旋的 PolyA 的 R 值分别为 0.869 和 0.665。支持了二者在有序程度上的差异。

## 2.2 碱基配对与拉曼减色效应

700~800 cm<sup>-1</sup>和 1 200~1 800 cm<sup>-1</sup>范围的谱带共同反映了碱基环式振动、碱基堆积和氢键配位的情况(如图 2 所示)。为了方便讨论双螺旋形成前后主要谱线强度的变化,选取 1 100 cm<sup>-1</sup>峰强(单链 PolyA 的 1 098 cm<sup>-1</sup>和 PolyU 的 1 093 cm<sup>-1</sup>)作为参考。约定计算谱线强度变化率的公式如下:

$$\Delta I_n = \frac{I_n - I_0}{I_0} \times 100\%$$

式中:  $I_0$  代表单链多核苷酸图谱中的相对强度;  $I_n$  代表双螺旋复合物图谱中的相对强度。

单链 PolyU 在 1 600 cm<sup>-1</sup> 以上的双键振动区域出现了两个强谱带,分别位于 1 631 和 1 686 cm<sup>-1</sup>。前者源于尿嘧啶的 C<sub>5</sub>=C<sub>6</sub> 振动与 C<sub>4</sub>=O (即 Watson-Crick 碱基氢键位)振动的耦合;后者的宽度很大,它是由 U 的两个 C=O 振动及它们之间耦合所产生的各谱带相互重叠所致<sup>[27]</sup>。与 PolyA 形成双链之后,这一区域的光谱发生了很大的变化。首先,1 631 cm<sup>-1</sup> 处的峰消失。这可能是因为相对强度减弱并同时伴随谱带位移的缘故。但是由于这一区域 H<sub>2</sub>O 弯曲模式的宽谱带的干扰,未能加以确定。其次,虽然 1 686 cm<sup>-1</sup> 峰位置基本没有改变,相对强度却大幅度减小,减小率达 61%。这些结果说明尿嘧啶的羰基由原先的暴露状态变为“隐藏”,多核苷酸链也随之形成了双链螺旋的有序构象。

双链螺旋形成的另一大特征是,碱基的一些环式振动谱带发生了明显的减色。这些谱带主要包括尿嘧啶的 783, 1 232, 1 397 cm<sup>-1</sup> 和腺嘌呤的 1 306, 1 340 cm<sup>-1</sup>。其中尤以尿嘧啶的 783 和 1 232 cm<sup>-1</sup> 的减色更为显著,它们的强度减小率分别为 75% 和 81%,这从图 2 中可以清楚地看出。相比

之下,腺嘌呤的减色程度要弱得多,1 306 和 1 340 cm<sup>-1</sup> 分别减小 9% 和 11%。其他谱带减色较小或相对强度基本不变。与此同时,伴随着碱基环模式的减色,一些谱带也发生了较小的频移。如尿嘧啶的 783 和 1 232 cm<sup>-1</sup> 分别向高波数方向位移了 3 和 5 cm<sup>-1</sup>。腺嘌呤除了 1 383 cm<sup>-1</sup> 向低波数移动 4 cm<sup>-1</sup> 外,其他谱带位置基本上没有变化。与尿嘧啶相比,腺嘌呤碱基环模式改变甚小。但考虑到 PolyA 与 PolyU 构象的差别,这一结果不足为怪。这些谱带的减色频移都表明双链的形成使相邻碱基之间的堆积力大为增强,同时也反映了主链构象发生了变化,变得更为有序。

## 3 结 论

通过碱基互补单链 PolyA、PolyU 及其双链复合物 PolyA·PolyU 的拉曼光谱研究发现:

(1) 在实验条件下(0.14 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, pH 7.0, 15 °C), PolyU, PolyA 和 PolyA·PolyU 分别以无规卷曲、A 型单螺旋和 A 型双螺旋结构存在。后两种结构区别于前者的主要光谱标志之一在于有序结构在 814 cm<sup>-1</sup> 附近的拉曼峰。另一光谱标志则是 1 100 cm<sup>-1</sup> 附近的谱峰半高宽的大小。

(2) 双链的形成使得碱基-碱基堆积力大为增强,主链构象变得更为有序化,从而产生了明显的拉曼减色效应并伴随着相关谱带的频移。在这一过程中, PolyU 链比 PolyA 链所产生的光谱变化更为显著。

以单链多聚核苷酸及其双链复合物作为模式的拉曼光谱研究,一方面可以为具有相似碱基成分和碱基序列的 DNA、RNA 以及寡核苷酸的结构的分析提供有效的参考,另一方面,鉴于拉曼光谱在反映分子结构的细微变化,无需标记、制样简便、测试快捷等方面的优越性,可被利用作为进行基因芯片杂交信号检测的基础。本工作以 PolyA, PolyU 作为模式物对两条碱基互补的单链进行研究,发现采用(813±2) cm<sup>-1</sup> 峰与 1 100 cm<sup>-1</sup> 峰的强度比  $R = I_{813}/I_{1100}$  能够定量比较核酸 A 型螺旋结构的有序程度。选定这一指标并辅以其他参考指标(如碱基环模式的拉曼减色程度等)用于定量碱基配对程度具有一定价值。然而如何确定 R 与碱基配对程度的关系,尚需进一步的研究。至于碱基失配或错配的两条单链之间会有哪些拉曼光谱特征,将是我们下一步工作的重点。

## 参 考 文 献

- [1] Sorokin V A, Valeev V A, Gladchenko G O, et al. *Macromolecular Bioscience*, 2001, 5(1): 191.
- [2] Chmelová K, Štěpánek J, Hanuš J, et al. *Journal of Molecular Structure*, 2001, 565, 231.
- [3] Buckin V, Tran H, Morozov V, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 7033.
- [4] Kazuo Sakurai, Ristuko Iguchi, Masami Mizu, et al. *Bioorganic Chemistry*, 2003, 31: 216.
- [5] Enoch W Small, Warner L. *Biopolymers*, 1971, 10: 1378.
- [6] Blagoi! Y P, Sorokin V A, Valeev V A, et al. *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions*, Kluwer Dordrecht, 1999. 305.
- [7] Schulze H G, Bass A, Addison C, et al. *Proc. of SPIE*, 2005, 5969: 1.
- [8] Park Taehan, Lee Sangyeop, Seong Gi Hun, et al. *Lab on a Chip*, 2005, 5: 437.
- [9] Kneipp K, Kneipp H, Itzkan I, et al. *Chem. Rev.*, 1999, 99: 2957.

- [10] Nie S, Emory S. *Science*, 1997, 275: 1102.
- [11] Cheung V G, Morley M, Aguilar F, et al. *Nature Genetics*, 1999, 21: 15.
- [12] Hedge P, Qi R, Abernathy K, et al. *Biotechniques*, 2000, 29: 548.
- [13] George Chumanov, Therese M Cotton. *SPIE*, 1999, 3608: 204.
- [14] DONG Rui-xin, YAN Xun-ling, WU Jing, et al(董瑞新, 闫循领, 吴 憬, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(9): 1075.
- [15] LUO Lei, ZHAO Yuan-li, GE Xiang-hong, et al(罗 磊, 赵元黎, 葛向红, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(6): 1076.
- [16] XU Yi-ming(许以明). *Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology(拉曼光谱及其在结构生物学中的应用)*. Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. 3.
- [17] Thomas G J Jr, Kyogoku Y. in: *Infrared and Raman Spectroscopy Part C*. Bram E G Jr, Grasselli J G Edited by Marcel Dekker, Inc. USA, 1977. 717.
- [18] Thomas G J Jr, Tsuboi M. *Adv. Biophys. Chem.*, 1993, 3: 1.
- [19] Nishimura Y, Tsuboi M. *Spectroscopy of Biological Systems Edited by Clark R H J, et al. Wiley, Chichester*, 1986, 177.
- [20] Prescott B, et al. *Biopolymers*, 1974, 13: 1821.
- [21] Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*. New York: Springer Verlag, 1984.
- [22] Besik I Kankia. *Biophysical Chemistry*, 2003, 104: 643.
- [23] Bloomfield V A, Crothers D M, Tinoco I J. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*, University Sciences Books, Sausalito, 2000.
- [24] Ram Chandra Yadav, Gopinatha Suresh Kumar, Kakali Bhadra, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13: 165.
- [25] Thomas Jr G J, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 312: 311.
- [26] Chou C H, Thomas G J Jr, et al. *Nucleic Acids Research*, 1977, 5(7): 2407.
- [27] Hanuš J, Barvík I, Ruzsová-Chmelová K, et al. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(24): 5182.

## Analysis of PolyA, PolyU and Double-Stranded Complex PolyA • PolyU via Raman Spectroscopy

LIAO Yu-bo<sup>1</sup>, MENG Yao-yong<sup>1\*</sup>, LEI Hao-dong<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>

1. Photonic Chinese Medicine Lab, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China

**Abstract** The Raman spectra of PolyA, PolyU and their double-stranded complex were measured, and the spectral changes upon the formation of double-stranded complex were studied. The experimental results show: (1) Under the experimental conditions used in the present work (0.14 mol · L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol · L<sup>-1</sup> Tris solution, neutral pH and 15 °C), PolyU, PolyA and PolyA • PolyU occur as random-coiled, A-single-stranded helical and A-double-stranded helical conformations, respectively. One of the main spectral differences between the latter two conformations and the former one is the Raman band near 814 cm<sup>-1</sup> of ordered structures. Another difference is in the full width at half the maximum (i. e. FWHM) of the band near 1 100 cm<sup>-1</sup>. The FWHM of the band 1 100 cm<sup>-1</sup> of PolyA is the same as that of PolyA • PolyU, while the band of PolyU shows remarkable broadening. In addition, we found that the conformation of PolyA is somewhat not so ordered as that of its duplex, which can be concluded from the value of  $I_{814}/I_{1100}$  of the two polynucleotides. (2) The formation of duplex makes base-base stacking interactions much stronger, and the conformation of the backbone more ordered, which leads to obvious Raman hypochromic effect with some corresponding band shift. In this process, PolyU underwent more significant spectral changes than PolyA. As spectral markers, these results can be of great importance in Raman spectral signal detection of gene-chips.

**Keywords** PolyA; PolyU; Gene-chips; Raman spectroscopy

(Received Apr. 18, 2006; accepted Jul. 26, 2006)

\* Corresponding author