

拉曼光谱

及其在结构生物学中的应用

▶ 许以明 编著



化学工业出版社

教材出版中心

拉曼光谱及其在 结构生物学中的应用

许以明 编著



化学工业出版社
教材出版中心

·北京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

拉曼光谱及其在结构生物学中的应用/许以明编著.
北京: 化学工业出版社, 2005.2
ISBN 7-5025-6429-2

I. 拉… II. 许… III. 拉曼光谱法-应用-生物结构 IV. Q617

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 139491 号

**拉曼光谱及其在
结构生物学中的应用**

许以明·编著

责任编辑: 何曙霓 宋林青

责任校对: 蒋宇 李军

封面设计: 于剑凝

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京红光印刷厂印装

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 10¼ 字数 190 千字

2005 年 3 月第 1 版 2005 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6429-2/G·1637

定 价: 20.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

作者在 20 多年的科研与教学生涯中，致力于应用拉曼光谱研究蛋白质、核酸、碳水化合物、类脂、生物膜、染色质、病毒和细胞的空间结构，取得了丰硕的成果，绘制出精致的图、表，积累了独到的见解，编成此书。全书共有八章，包括基本原理和基础理论；在蛋白质（酶）的拉曼光谱及其定量估计一章中，论述了拉曼光谱对“溶栓”药物——血纤维蛋白溶酶原激活剂 e-TPA 酶的研究，用表面增强拉曼散射（SERS）研究带发色团蛋白质（R-藻红蛋白和维酶素）的结构的进展；在核酸的拉曼光谱一章中，论述了竹红菌素及其衍生物抗癌和抗艾滋病毒的分子机理——竹红菌甲素、乙素和乙素的溴代物对 DNA 空间结构的微观光敏损伤的拉曼光谱研究；核蛋白的拉曼光谱一章，论述了鸡红血球染色质与金属离子钠、钙作用时构象变化的拉曼光谱研究——染色质内 DNA 和组蛋白复合和分离时的构象，还用拉曼光谱研究了人类免疫缺损病毒（HIV）的空间结构及其与抗 HIV 药物作用的分子机理；生物膜及类脂的拉曼光谱，则论述了竹红菌素及其衍生物对脂质体和红细胞膜空间结构的微观光敏损伤的拉曼光谱特征，探讨其抗癌和抗艾滋病毒的分子机理，还介绍了抗胆碱能药物山莨菪碱对混合磷脂脂质体中酸性磷脂的选择性作用的拉曼光谱研究，以及矽肺发病的分子机理——二氧化硅与脂质体相互作用的拉曼光谱研究；在活细胞的拉曼光谱一章中，论述了活细胞黏附时功能发生变化的分子机理——黏附活细胞内生物大分子结构变化的拉曼光谱研究；本书还介绍了一些拉曼光谱仪，包括它们的组成、附件和进展等。

本书的特点是与上述主要内容以及学术应用价值密不可分的，它从分子水平阐明生物学和生物医学方面感兴趣的问题，揭示更深层次的机理是本书的重要特点。该书是以拉曼光谱图作为研究问题的依据，图谱的质量直接影响着结果的分析与研究的深度。天然生物大分子（小牛胸腺 DNA、溶菌酶，DPPC、DPPE 脂质体和鸡红血球染色质）和细胞与病毒是课题研究常用的材料，在本书中，它们的拉曼光谱的信噪比和分辨率是很高的。由我提出的“拉曼强度的变化率”的使用，使对课题的研究从定性发展到半定量。配上各种表格，以使结果更加简洁、明了，也是本书的特点之一。

本书中标题、图题、表题均采用了中、英文示出。图题与表题中所有的条件与解释均以英文形式出现，以使读者在阅读时方便与国际接轨。本书第 1 章~第 7 章由中国科学院生物物理所许以明编著，第 8 章由许以明和中国科学院物理所刘玉龙共同编著。

衷心感谢 FRANCE JOBIN YVON 公司在出版本书时给予的资助。永远难忘并衷心感谢蒋丽金院士在我研究 R 藻红蛋白的结构和竹红菌素及其衍生物抗癌及抗艾滋病毒的分子机理中与我进行有益的讨论并为我修改论文。衷心感谢同事们所给予的多方面的帮助。我还要向朱自莹、李国华、许振华和陈建文四位研究员致谢，在实验中他们给予的帮助非常宝贵。

许以明

内 容 简 介

本书共有八章，主要结合作者 20 多年来的研究和教学工作，详细叙述了用拉曼光谱研究蛋白质（包括酶）、核酸、碳水化合物、类脂、生物膜、染色质、病毒和细胞空间结构的成果。对拉曼光谱在结构生物学中的应用（包括特点和方法）有详细独到的论述。书中还配有大量的图、表供读者参考。

本书可供从事生物化学、生物物理、细胞生物学、生物医学、食品、环保、商检、公安法医等的职工、科研人员、大专院校师生和相应的管理人员参考。

目 录

绪论	1
参考文献	2
第 1 章 基本原理和基础理论	4
1.1 拉曼散射和瑞利散射	4
1.2 有关拉曼散射的解释	4
1.2.1 经典的电磁理论解释	4
1.2.2 量子理论的解释	5
1.3 特征拉曼频率	6
1.4 拉曼谱线相对强度的变化率	7
1.5 退偏比	7
1.6 共振拉曼散射	8
1.7 表面增强拉曼散射 (SERS)	9
参考文献	10
第 2 章 蛋白质的拉曼光谱	11
2.1 蛋白质的拉曼光谱	11
2.1.1 主链构象	11
2.1.2 蛋白质二级结构的定量估计	11
2.1.3 侧链构象	12
2.2 应用	13
2.2.1 溶栓药物-纤溶酶原激活剂 e-TPA 酶的拉曼光谱研究	13
2.2.2 表面增强拉曼散射 (SERS) 研究带发色团蛋白质的进展	19
2.2.3 扬州血卟啉的衍生物 (YHPD) 抗癌的分子机理研究	26
2.3 实验技术与图谱解析方法	31
2.3.1 实验技术	31
2.3.2 图谱解析	32
参考文献	32
第 3 章 核酸的拉曼光谱	36
3.1 DNA 的拉曼光谱	36

3.1.1	骨架磷酸基团	38
3.1.2	DNA 的构象	38
3.1.3	脱氧核糖和磷酸脱氧核糖	39
3.1.4	碱基	39
3.2	RNA 的拉曼光谱	39
3.2.1	骨架磷酸基团	39
3.2.2	核糖	39
3.2.3	碱基	39
3.3	应用	40
3.3.1	竹红菌素及其衍生物抗癌和抗病毒的分子机理研究	40
3.3.2	扬州血叶啉的衍生物 (YHPD) 抗癌的分子机理研究	45
3.3.3	高能质子辐射对 DNA 空间结构的损伤	51
3.4	实验技术和图谱解析方法	58
3.4.1	实验技术	58
3.4.2	图谱解析	58
	参考文献	59
第 4 章 核蛋白的拉曼光谱		63
4.1	染色质的拉曼光谱	63
4.1.1	染色质的组成和结构	63
4.1.2	应用鸡红血球染色质与金属钠、钙离子作用时构象变化的比较	66
4.1.3	实验技术及图谱解析方法	69
4.2	病毒的拉曼光谱	71
4.2.1	人类免疫缺损病毒 (HIV) 的拉曼光谱——HIV 中蛋白质、DNA、碳水化合物及膜脂双层的空间结构	71
4.2.2	应用: 金丝桃萜酮素诱导的人类免疫缺损病毒 (HIV) 结构的光敏损伤	79
4.2.3	实验技术及图谱解析方法	85
	参考文献	85
第 5 章 碳水化合物的拉曼光谱		90
5.1	单糖的拉曼光谱	90
5.1.1	葡萄糖、葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖和 N-乙酰基葡萄糖的拉曼光谱	90
5.1.2	甘露糖的拉曼光谱	93
5.2	多糖的拉曼光谱	96
5.2.1	直链淀粉、支链淀粉、糖原、葡聚糖和纤维素	96
5.2.2	麦芽糖、麦芽三糖和环己直链淀粉	98
5.3	实验技术和图谱解析方法	100

参考文献	100
第 6 章 生物膜与类脂的拉曼光谱	101
6.1 生物膜的模型——磷脂脂质体的拉曼光谱	101
6.1.1 C—C 伸缩振动及链内纵向有序性参数	101
6.1.2 C—H 伸缩振动及链间横向相互作用序参数	102
6.2 红细胞膜的拉曼光谱	102
6.3 应用	102
6.3.1 竹红菌素及其衍生物抗癌和抗病毒的分子机理研究——竹红菌素及其衍生物敏 化的脂质体空间结构的光损伤	102
6.3.2 竹红菌素及其衍生物抗癌和抗病毒的分子机理研究——竹红菌乙素敏化的人红 细胞膜结构的光损伤	111
6.3.3 抗胆碱能药物山莨菪碱对混合磷脂脂质体中酸性磷脂的选择性作用及其与酸性 磷脂脂质体的亲水与疏水作用	119
6.3.4 二氧化硅与脂质体的相互作用——矽肺病发生的分子机理研究	119
6.4 实验技术与图谱解析方法	120
6.4.1 实验技术	120
6.4.2 图谱解析方法	121
参考文献	121
第 7 章 活细胞的显微拉曼光谱	125
7.1 单个活细胞内生物大分子的空间结构的显微拉曼光谱	125
7.1.1 单个活细胞内蛋白质的空间结构	127
7.1.2 单个活细胞内 DNA 的空间结构	130
7.1.3 单个活细胞内的碳水化合物	131
7.1.4 单个活细胞内脂类的空间结构	131
7.2 应用：黏附的活细胞内生物大分子空间结构的显微拉曼光谱研究	132
7.2.1 单个和黏附的癌细胞内 DNA 构象的比较	134
7.2.2 单个和黏附的癌细胞内蛋白质构象的比较	136
7.2.3 单个和黏附的癌细胞内碳水化合物构象的比较	137
7.2.4 单个和黏附的癌细胞内脂类构象的比较	137
7.3 实验技术及图谱解析方法	138
参考文献	139
第 8 章 激光拉曼光谱仪及其进展	142
8.1 色散型激光拉曼光谱仪	142
8.1.1 组成	142

8.1.2 简介法国 JY-T64000 拉曼光谱仪	146
8.2 非色散型的拉曼光谱仪	146
8.3 重要部(附)件制造的进展和特殊的技术	147
8.3.1 显微拉曼光谱系统	147
8.3.2 光学多道分析器 (OMA) 和电子耦合器件 (CCD)	147
8.3.3 槽型滤波器	148
8.3.4 特殊的技术	149
8.3.5 其他	149
参考文献	150

Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology

Contents

Introduction	1
References	2
CHAPTER 1 BASIC PRINCIPLES AND ELEMENTARY THEORY	4
1.1 Raman Scattering and Rayleigh Scattering	4
1.2 Explanation in Raman Scattering	4
1.2.1 Classical Electromagnetic Model for Raman Scattering	4
1.2.2 A Quantum Theory for Raman Scattering	5
1.3 Characteristic Raman Frequencies	6
1.4 Variant Rates of Raman Line Intensities	7
1.5 Depolarization Ratio	7
1.6 Resonance Raman Scattering	8
1.7 Surface-Enhanced Raman Scattering	9
References	10
CHAPTER 2 PROTEINS	11
2.1 Proteins	11
2.1.1 Conformation of Main Chains	11
2.1.2 Quantitative Estimation of Secondary Structure	11
2.1.3 Conformation of Side Chains	12
2.2 Applications	13
2.2.1 An Effective Pharmaceutical Solvent of Thrombus-Fibrinokinase e-TPA-Raman Spectroscopic Study	13
2.2.2 Advances in Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) of Protein- Bound Chromophors	19
2.2.3 Anticancer Molecule Mechanism's Study of Yangzhou Hematoporphyrin Derivative (YHPD)	26

2.3	Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	31
2.3.1	Experimental Technology	31
2.3.2	Methods of Spectrum Analysis	32
	References	32
CHAPTER 3	NUCLEIC ACIDS	36
3.1	DNA	36
3.1.1	Backbone Phosphate Groups	38
3.1.2	Conformaion of DNA	38
3.1.3	Deoxyribose and Deoxyribose-phosphate	39
3.1.4	Bases	39
3.2	RNA	39
3.2.1	Backbone Phosphate Groups	39
3.2.2	Ribose	39
3.2.3	Bases	39
3.3	Applications	40
3.3.1	Anticancer and Antiviral Molecule Mechanism's Study of Hypocrellin and Its Derivatives (HA, HB and 5-Br-HB)	40
3.3.2	Anticancer Molecule Mechanism's Study of YHPD	45
3.3.3	Damage of The Space Structure of DNA Caused by High Energy Proton Radiation	51
3.4	Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	58
3.4.1	Experimental Technology	58
3.4.2	Methods of Spectrum Analysis	58
	References	59
CHAPTER 4	NUCLEOPROTEINS	63
4.1	Chromatin	63
4.1.1	Component and Structure of Chromatin	63
4.1.2	Applicatons Comparison of Conformation on Interaction of Chicken Erythrocyte Chromatin With Na ⁺ and Ca ²⁺	66
4.1.3	Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	69
4.2	Virus	71
4.2.1	Raman Spectroscopy of Human Immunodeficiency Virus (HIV)—The Space Structure of Viral Protein, DNA, Carbohydrate and Lipid Bilaye of HIV	71
4.2.2	Applications: Hypericin-Induced Photosensitive Damage of Human Immunodeficiency Virus (HIV)	79
4.2.3	Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	85
	References	85

CHAPTER 5 CARBOHYDRATES	90
5.1 Monosaccharides	90
5.1.1 D-glucose, D-glucuronic acid, D-glucosamine • HCl and <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine ...	90
5.1.2 D-mannos	93
5.2 Polysaccharides	96
5.2.1 Amylose, Amylopectin, Glycogen, Dextran and Cellulose	96
5.2.2 Maltose, Maltotriose and Cyclohexaamylose	98
5.3 Experimental Technology and Methode of Spectrum Analysis	100
References	100
CHAPTER 6 LIPIDS AND BIOLOGICAL MEMBRANES	101
6.1 A Model for Biological Membranes—Liposomes of Phospholipids	101
6.1.1 C—C Stretching Vibration and Longitudinal Order Parameters in Chains (S_{trans})	101
6.1.2 C—H Stretching Vibration and The Order Parameters for The Lateral Interaction Between Chains (S_{lat})	102
6.2 Erythrocyte Membranes	102
6.3 Applications	102
6.3.1 Anticancer and Antiviral Molecule Mechanism's Study of Hypocrellin and Its Derivatives—Photodamage to The Space Structure of Liposomes Sensitized byHA, HB and 5-Br-HB.	102
6.3.2 Anticancer and Antiviral Molecule Mechanism's Study of Hypocrellin and Its Derivatives—Photodamage to The Structure of Human Erythrocyte Membranes Sensitized by HB	111
6.3.3 Preferntial Action of Anisodamine—Anticholinergic Drug With Acidic Phospholipids in Mixid Model Membranes, and Hydrophilic and Hydrophobic Action of Anisodamine with Acidic Phospholipids Liposomes	119
6.3.4 Interaction of Silica (SiO_2) with Liposomes—Molecule Mechanism's Study of A Silicosis Disease Coming On	119
6.4 Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	120
6.4.1 Experimental Technology	120
6.4.2 Methods of Spectrum Analysis	121
References	121
CHAPTER 7 RAMAN MICROSPECTROSCOPY OF LIVING CELLS	125
7.1 Raman Microspectroscopy of Biomolecular Space Structure Inside Living Single Cell ...	125
7.1.1 The Space Structure of Protein Inside Living Single Cell	127
7.1.2 The Space Structure of DNA Inside Living Single Cell	130
7.1.3 The Space Structure of Carbohydrate Inside Living Single Cell	131

7.1.4	The Space Structure of Lipids Inside Living Single Cell	131
7.2	Application: Raman Microspectroscopic Study of Biomolecular Space Structure Inside Living Adhesive Cells	132
7.2.1	Comparison of The Conformation of DNA Inside Single and Adhesive Living Cancer Cells	134
7.2.2	Comparison of The Conformation of Protein Inside Single and Adhesive Living Cancer Cells	136
7.2.3	Comparison of The Conformation of Carbohydrate Inside Single and Adhesive Living Cancer Cells	137
7.2.4	Comparison of The Conformation of Lipids Inside Single and Adhesive Living Cancer Cells	137
7.3	Experimental Technology and Methods of Spectrum Analysis	138
	References	139

CHAPTER 8 LASER RAMAN SPECTROPHOTOMETER AND ITS ADVANCE 142

8.1	Dispersion Raman Spectrophotometer	142
8.1.1	Components	142
8.1.2	Brief Introduction of France JY-T64000 Raman Spectrophotometer	146
8.2	Nondispersive Raman Spectrophotometer	146
8.3	Advances in Components and Attachments and Special Techniques	147
8.3.1	Raman Microspectroscopy System	147
8.3.2	Optics Multiplex Analyser (OMA) and Charge-Coupled Devices (CCD)	147
8.3.3	Notch Filter	148
8.3.4	Special Techniques	149
8.3.5	Others	149
	References	150

绪 论

拉曼光谱是由印度科学家拉曼 (Raman C. V.) 于 1928 年发现的, 与此同时前苏联学者兰斯伯格也独立地发现了这一效应^[1]。半个多世纪以来, 许多国家的科学家们在不同领域内对拉曼效应及其应用进行了广泛的研究。

分子生物学是一门新兴的学科, 三十多年来, 其大量的、主要的研究工作是用生化方法, X 光衍射, 红外光谱与拉曼光谱等方法进行的。随着科学的发展, 在搞清楚分子的成分和结构以后, 必然要研究其结构与功能的关系。例如视觉生理的分子过程, 血红蛋白的呼吸功能, 光合作用等。用激光拉曼光谱可以在生理环境或活体中实验, 能更真实地反映生命过程。在这个基础上进一步用瞬态激光拉曼光谱研究生物分子快速反应动力学方面的问题^[1]。

生物大分子的拉曼光谱可以使我们得到许多结构方面的信息。例如蛋白质主链和侧链的构象; DNA 有序结构的类型 (A, B, C 型) 以及 DNA、RNA 的磷酸骨架、核糖或脱氧核糖和碱基的信息, 各种构型的碳水化合物, 不同状态的膜蛋白和类脂的结构等信息。在对染色质、病毒和活细胞的结构描述中也有独到之处^[1~4]。在此基础上展开的结构与功能关系的研究由于拉曼光谱的使用而获得更加准确和全面的结果^[5~14], 当蛋白质、核酸和染色质等与金属离子结合或分离, 当它们被高能质子和 γ 射线照射, 或在它们之中加入药物, 以及对它们进行加热、改变 pH 或加入酶激活剂等物理或化学的处理以后, 从它们的拉曼光谱可以得知发生变化的基团, 相互作用的位置与模式等。从而能够从分子水平较深入地研究它们的构象变化和相互作用的过程。这有助于我们探讨某些药物治疗疾病的机理、搞清各种物理、化学因素对生物大分子的影响与原因, 并进一步为某些重要理论的发现提供可靠的依据。特别是显微拉曼光谱技术的应用, 使原位、实时地观察活细胞中生物大分子的变化成为可能^[5], 其中包括一些信息分子和调控因子的结构, 这对细胞间通讯、胚胎发育、肿瘤发生机制的理解是十分重要和有益的。

现在拉曼光谱已不是单纯的测定物质结构的工具, 它在包括生物化学、生物物理和生物医学在内的课题研究中进展迅速。本书将在每一章叙述应用拉曼光谱方面的成果 (特别是我国学者的成果)^[5~14], 还将长期积累的有关实验技术和复杂图谱解析的

方法公之于众。本书还介绍了国际上部分著名生物拉曼光谱专家历年来发表的数据和图谱, 这些较早发表且已被实践证明是正确、可靠的数据奠定了生物拉曼光谱发展的基础。本书设有中英文图题便于国际学术交流。关于拉曼光谱的原理和基础理论在许多专著中都有精湛的论述。本书只作简单介绍, 并且不再重复解释生物化学、生物物理和生物医学方面的基础知识。

参 考 文 献

- 1 许以明. 激光拉曼光谱. 见: 阎隆飞, 孙之荣主编. 蛋白质分子结构. 北京: 清华大学出版社, 1999. 171~177
- 2 Thomas G J Jr and Kyogoku Y. *Biological Science*. In *Infrared and Raman Spectroscopy, Part C*, Bram E G Jr, Grasselli J G eds, New York and Besel: Marcel Dekker Inc, 1977, 778~782
Part C. Bram E G, et al. eds. Marcel Dekker. Inc. USA. 1977, 717~872
- 3 Carey P R. *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Academic Press New York: 1982, 71~98
- 4 Tu A T. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*. New York: John Wiley & Sons, 1982. 19: 31~36
- 5 李光, 杨红英, 许以明, 张志义. 黏附细胞中生物大分子结构变化的显微 Raman 光谱. 中国科学 (C 辑), 2002, 32 (2): 177~183
- 6 Xu Y M*, Zhao H X and Zhang Z Y. Raman spectroscopic study of microcosmic and photosensitive damage on the liposomes of the mixed phospholipids sensitized by hypocrellin and its derivatives. *Int. J. Photochem. & Photobiol. B: Biol.*, 1998, 43: 41~46
- 7 Xu Y M, Yang H Y, Yan Y C and Zhang Z Y. Raman spectroscopic study of photodamage on the space structure of DL- α -phosphatidylcholine liposomes sensitized by hypocrellin B. *Int. J. Photochem. & Photobiol. B: Biol.*, 1998, 45: 179~183
- 8 Xu Yiming, Liang Li. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering of R-Phycocerythrin Adsorbed by Silver Hydrosols. *J. Applied Spectroscopy*, 1994, 48 (9): 1147
- 9 Xu Yiming, Zhou Zhixiang, Yang Hongying, Xu Yan and Zhang Zhiyi. Raman Spectroscopic study of microcosmic photodamage of the space structure of DNA sensitized by Yangzhou hematoporphyrin derivative and photofrin II. *J. Photochem. Photobio. B: Biol.*, 1999, 52: 30~34
- 10 许以明, 杨红英, 张志义. 竹红菌乙素敏化的人红细胞膜结构光损伤的 Raman 光谱特征. 中国科学 (C 辑), 1999, 29 (2): 138
- 11 许以明, 张志义, 张伟. 竹红菌素及其衍生物对脂质体空间结构微观光敏损伤的 Raman 光谱特性. 中国科学 (C 辑), 1998, 28 (5): 417
- 12 Xu Yiming, Zhang Zhiyi, Zhang Hongyu. Raman Spectroscopic Study of DNA After The Photosensitive Damage Caused By Hypocrellin A And B. *Science in China (Series C)*, 1998, 41 (4): 360
- 13 Yang Hongying, Xu Yiming and Zhang Zhiyi. Raman spectroscopic study on the structure of RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm photodamaged with hypericin. *Int Asian J. Spectroscopy*,

1998, 2: 131

- 14 Xu Yiming and Lu Chuanzong. Raman spectroscopy study on human immunodeficiency virus (HIV1-HIV2) space structure and microcosmic and photosensitive damage to the virus, Proceedings of the Fifteenth International Conference on Raman Spectroscopy. August 11~16, Pittsburgh, PA, USA, Ed. by S. A. Asher and P. Stein, New York: John Wiley & sons, 1996