

# 质粒 DNA 超螺旋构象的激光喇曼光谱研究\*

余多慰 柯惟中\*\*

(南京师范大学生物系 南京 210097)

**摘要** 将 pBR322 重组质粒 DNA 纯化, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定其主要具共价闭合环状空间构象。对此制备物进行激光喇曼散射光谱分析, 发现在表征其二级结构为 B 型的特征模之外, 还有另外二个表征磷酸脱氧核糖主链骨架振动状态的特征模 854 和 1083  $\text{cm}^{-1}$ 。本文对此进行探讨, 认为这二个特征模与闭合环状 DNA 分子的超螺旋状态有关, 可作为质粒 DNA 三级结构的特征模。碱基堆积状态分析表明, 超螺旋的存在使分子中脱氧胸苷的堆积反应活性增强, 并使 AT 碱基间 Hoogsteen 型氢键有相当数量的破坏, 导致反映脱氧胸苷参与氢键组成的二个基团振动状态的特征模 1378  $\text{cm}^{-1}$  产生相对于线性 DNA 分子的明显减色及脱氧胸苷羰基双键振动模向高波数偏移。

**关键词** 质粒 DNA, 三级结构, 激光喇曼光谱

质粒 DNA 是原核细胞中染色体 DNA 分子以外的另一类共价闭合环状双链分子。与线性分子不同的是, 此环形分子不仅具有右手双螺旋的二级结构, 还可以因环形分子特有的超螺旋而形成一定的三级结构<sup>[1]</sup>。在 DNA 纯化过程中, 线性与开环 DNA 分子极少保留天然的超螺旋状态<sup>[2]</sup>。在已有的 DNA 空间构象喇曼光谱研究中, 依据线性分子只能得到核苷酸构象及主链二级结构的信息。细菌染色体也为双链环状分子, 但极易因纯化操作而断裂, 它们的喇曼谱与其它线性分子的谱基本一致<sup>[3]</sup>。Bamford 等仅对 600 ~ 900  $\text{cm}^{-1}$  区域内双链线性与双链开环 DNA 作了比较, 表明不存在显著差异<sup>[4]</sup>。但双链闭环分子形成三级结构时分子内应力改变, 共价键振动能不同于线性及开环分子, 用喇曼技术是可以检测出这些变化的, 不过迄今尚未见有讨论质粒超螺旋结构的喇曼分析发表。

本文对 pBR322 重组质粒 DNA 喇曼数据中与质粒三级结构有关的信息进行探讨, 揭示除表明主链二级结构为 B 型的 830、1096  $\text{cm}^{-1}$  特征模外, 尚有 854、1083  $\text{cm}^{-1}$  强峰, 反映碱基环内振动的 1378  $\text{cm}^{-1}$  峰强明显低于线性分子, 1600 ~ 1700  $\text{cm}^{-1}$  双键区喇曼峰强十分突出, 这些成为质粒 DNA 喇曼谱的主要标志。由此也表明利用喇曼信号的高灵敏性完全可以揭示天然 DNA 的三级结构状态。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

\* 江苏省教委自然科学基金资助项目。

\*\* 南京师范大学理化测试中心。

本文于 1996 年 3 月 12 日收到。

pBR322 重组质粒购自华美公司, 在本实验室内将其转入 *E. coli* JM109 菌株内。氯化铯购自上海试剂一厂, 溴化乙锭购自 Fluka 公司。

## 1.2 质粒提取与纯化

细菌培养, 质粒碱裂解法提取, 超速冷冻离心, 抽取 DNA, 脱溴化乙锭, 透析, 沉淀及 TE 溶解均按 Sambrook 等的方法<sup>[5]</sup> 进行。琼脂糖凝胶电泳证明制备物为一条区带,  $\lambda$ DNA 浓度梯度标准曲线测得制备物浓度为  $0.4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 。

## 1.3 喇曼光谱测定

用 HRD2 型双单色仪 (Jobin Yvon 公司) 进行测定, 由 286 型微机联动控制, 狭缝宽度  $500 \mu\text{m}$ , 扫描速度为  $\text{cm}^{-1} / \text{s}$ , 积分时间为 2s。采用美国 RCA31034 光电倍增管进行光电转换和信号接受。激光光源为 Coherent 公司的 Innova70 型氩离子激光器, 激发波长  $514.5 \text{ nm}$ , 出射功率  $150 \text{ mW}$ 。采用  $90^\circ$  方向散射几何装置。质粒 DNA 水溶液  $10 \mu\text{l}$  注入内径为  $1 \text{ mm}$  的毛细管内, 蜡膜封口。样品扫描 5 次, 由计算机作信号累加和绘图输出, 峰值误差  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ 。整个实验过程在  $20^\circ \text{C}$  进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 磷酸脱氧核糖骨架的空间构象

质粒 DNA 水溶液激光喇曼谱 [图 1, 图 2] 特征表明, 尽管样品浓度不高, 但二级结构特征模明确表征质粒在水溶液中呈 B 型构象。反映磷酸二酯键对称伸缩的振动模在  $798 \text{ cm}^{-1}$ , 磷酸二酯键非对称伸缩模位于  $830 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{PO}_2^-$  对称伸缩模在  $1096 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[6]</sup>。本谱与小牛胸腺 DNA 及其它线性 DNA 分子喇曼谱存在着一定差异<sup>[7]</sup>。在谱图中还有  $854$  与  $1083 \text{ cm}^{-1}$  强峰。

### 2.2 OPO 磷酸二酯键振动模

由于同时出现了  $830$  与  $854 \text{ cm}^{-1}$  二个喇曼峰, 有必要判明是否存在蛋白质喇曼信号的干扰。常见的酪氨酸费米双峰应同时伴有  $644 \text{ cm}^{-1}$  附近的酪氨酸模<sup>[8]</sup>, 从图 1 可见无

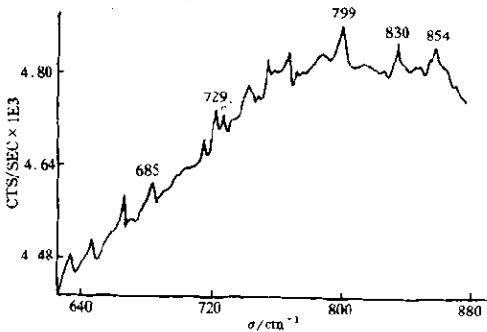


图 1 在  $630 \sim 870 \text{ cm}^{-1}$  区域内的质粒 DNA 喇曼谱

Fig.1 Plasmid DNA Raman spectrum in the region  $630 \sim 870 \text{ cm}^{-1}$

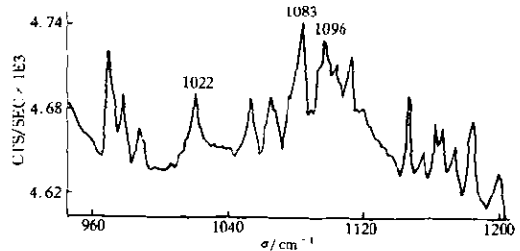


图 2 在  $950 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$  区域内的质粒 DNA 喇曼谱

Fig.2 Plasmid DNA Raman spectrum in the region  $950 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$

此特征,此外在  $1225 \sim 1300 \text{ cm}^{-1}$  区域及  $1650 \sim 1675 \text{ cm}^{-1}$  区域[图3]没有表征蛋白质的酰胺 III 和酰胺 I 强峰,因此  $854 \text{ cm}^{-1}$  峰不属酪氨酸,也不属来自 TE 缓冲体系的干扰<sup>[9]</sup>。

已有资料表明,在  $800 \sim 840 \text{ cm}^{-1}$  区域内的磷酸二酯键模,能反映主链  $\alpha(\text{P}-\text{O}5')$ 、 $\beta(\text{O}5' - \text{C}5')$  和  $\gamma(\text{C}5' - \text{C}4')$  三个扭转角的排列是  $g^-tg^+$ 。而  $850 \sim 860 \text{ cm}^{-1}$  区域内的模则代表全反式(ttt)的构象<sup>[8-10]</sup>。ttt 构象可显著增加 DNA 单链间嘌呤——嘌呤碱基堆积反应<sup>[8-11]</sup>。图1中  $854 \text{ cm}^{-1}$  峰的出现及显著的强度,表明有高百分比的核苷酸处于 ttt 构象中, DNA 单链间嘌呤堆积大量存在可以指认是与超螺旋有关。

$830 \sim 854 \text{ cm}^{-1}$  区间随波数增加而峰强渐增,反映 DNA 双螺旋中小沟沟槽尺寸变窄<sup>[12]</sup>,但在质粒负超螺旋结构中是否存在这一事实,还需其它实验证明。

规则的 B 型 DNA 里 OPO 骨架  $\alpha(\text{P}-\text{O}5')$  与  $\xi(\text{O}3' - \text{P})$  是  $g^-g^-$  构象。扭转角范围越大, B 骨架模的峰宽越大,峰位向高波数偏移<sup>[9]</sup>,因而  $854 \text{ cm}^{-1}$  峰可能代表比规则的 B 型 DNA 有更宽幅度的扭转角范围,这也应与质粒的超螺旋有关。

### 2.3 $\text{PO}_2^-$ 基团振动模

有报告认为 DNA 分子聚集后  $\text{PO}_2^-$  基团峰强会下降,这是因高度聚集的 DNA 所具有的负电荷引起溶液中局部阳离子浓度增高,产生的静电屏蔽降低  $\text{PO}_2^-$  伸缩振动极化率所致<sup>[12]</sup>。图2中  $1096 \text{ cm}^{-1}$  峰的相对强度低于线性分子,其原因应与三级结构的存在有关。

本谱中具  $1083 \text{ cm}^{-1}$  峰,这是以往各种 DNA 样品谱中所少见的<sup>[10]</sup>,仅出现在二类聚核苷酸结晶中。这表明质粒超螺旋结构与结晶在空间构象上存在一定共性,此峰曾归属为异常 B 型或修饰的 B 型骨架<sup>[11]</sup>。我们认为  $1083$  与  $1096 \text{ cm}^{-1}$  同时存在表明后者是二级结构特征模,而前者很可能是与三级结构密切相关的二级结构成份。

本谱中在 B 型构象特征模之外出现  $854$  和  $1083 \text{ cm}^{-1}$  二个辅助峰,这并不是孤立的现象。已报道的二例具  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  峰的 DNA 结晶喇曼谱内,也偶联着  $850 \text{ cm}^{-1}$  峰的出现。它们不影响主链二级结构特征模的存在,这有助于我们对三级结构特征峰存在的认识。在紫外共振激发中,出现过  $1080 \text{ cm}^{-1}$  强峰<sup>[13]</sup>,但它是取代了二级结构特征模的结果。

$\text{PO}_2^-$  基团与其它基团可借助水分子产生氢键,这将造成振动模向低波数方向偏移。 $1083$  与  $1096 \text{ cm}^{-1}$  二峰共存是否说明有部分  $\text{PO}_2^-$  因超螺旋而与原先不能相邻的其它基团通过水桥产生氢键反应而形成  $1083 \text{ cm}^{-1}$  峰,还有待进一步证实。

### 2.4 碱基堆积反应

碱基环平面的面内振动与碱基堆积反应有关。当双链变性解成单链时,堆积状态消除,可使碱基环平面内振动峰强增高(增色),反之则减色。表1列举了有关模的表现。各种碱基特征模以脱氧胸苷(dT)的  $1240 \text{ cm}^{-1}$  峰强为基准,可见闭环分子与线性分子之间的差异。在线性分子中,小牛胸腺 DNA 与  $\Phi\text{X}174$  复制 III 型 dsDNA 均为水溶液样品<sup>[8]</sup>。鼠伤寒沙门氏菌 P22 噬菌体的线性双链 DNA 为包装核衣壳后的样品<sup>[12]</sup>,采用这一数据是为了便于将处于超螺旋的分子与处于高度聚集下的线性分子作一比较。表中涉及到 dA、dG、dT 三种核苷酸,胞嘧啶的信号由于通常属弱峰或仅与酸碱度变化有关而未列入<sup>[14]</sup>。

表 1 各碱基环平面内振动模的相对强度

Table 1 Relative intensity of in-plane ring vibration diagnostic bands on the three type base

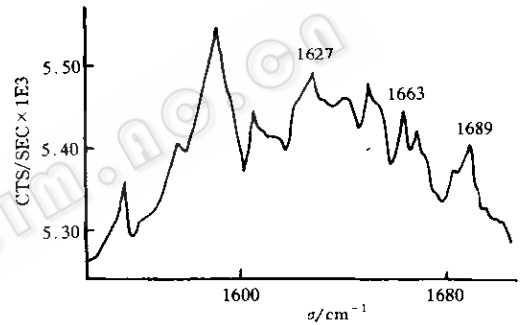
频率 Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	指认 Assignment	质粒 ccc-DNA Plasmid ccc-DNA	P22 噬菌体 DNA P22 phage DNA	小牛胸腺 DNA Calf Thymus DNA	$\Phi$ X174 复制 III 型双 链 DNA $\Phi$ X174 RF III ds-DNA
685 $\pm$ 4	dG	0.38	0.34	0.41	0.43
729 $\pm$ 1	dA	0.45	0.35	0.44	0.43
1240 $\pm$ 2	dT	0.50	0.50	0.50	0.50
1301 $\pm$ 1	dA	0.54	0.55	0.62	0.60
1342 $\pm$ 3	dG dA	0.76	0.82	0.88	0.85
1378 $\pm$ 4	dT dA dG	0.18	0.78	1.03	1.00

由表1可见除1378  $\text{cm}^{-1}$ 以外, 质粒DNA与其它三类分子表现基本一致, 表明质粒超螺旋中碱基堆积作用并未发生大变化。认为1374  $\text{cm}^{-1}$ 峰是重要的DNA反应活性标志峰<sup>[15]</sup>, 它的峰强明显降低与金属离子作用及氢键状态有关<sup>[16]</sup>, 该峰主要敏感于dT的变化<sup>[13]</sup>, 归属于 $-\delta\text{N}3\text{H}(48) - \text{C}40(27)$ <sup>[17, 18]</sup>。这正是参与氢键形成的二个价键, 其能量降低导致峰强下降, 表明有部分氢键受损或变化, 并且主要发生在近dT侧。图3的双键区内dT的C40峰向高波数(1663  $\text{cm}^{-1}$ )偏移也证实了这AT间氢键状态的变化<sup>[13]</sup>。

## 2.5 双键区振动模

图3中双键区峰强在整个扫描谱中(450 ~ 1750  $\text{cm}^{-1}$ )十分突出, dG的C2=O因碱基配对而波数降低(1689  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[6]</sup>, 表明质粒超螺旋结构中GC间保持正常配对, 但dG的N7氢键状态模1482  $\text{cm}^{-1}$ 峰强明显降低, 此峰位置表明配对正常而峰强表明极化率减弱。dT的C4=O则如2.4节中所述, 由于有相当一部分氢键状态变化而振动模向高波数偏移。与线性分子的喇曼谱相比, 质粒谱中峰位与峰强均有明显差异, 这揭示了超螺旋状态的存在所带来的影响。

综上所述, 我们利用激光喇曼分析技术, 通过对质粒DNA的磷酸脱氧核糖骨架特征模、碱基环面内振动模及羰基振动模的分析, 可以了解与超螺旋空间构象有关的信息。本工作为确立质粒分子三级结构喇曼特征模提供了依据。

图3 在1550 ~ 1700  $\text{cm}^{-1}$ 区域内的质粒DNA喇曼谱Fig.3 Plasmid DNA Raman spectrum in the region 1550 ~ 1700  $\text{cm}^{-1}$

## 参 考 文 献

- [1] 尤复翰, 陆佩洪. 细胞的遗传. 南京: 江苏科技出版社, 1983, 171.
- [2] Morjani H, Riou J F, Nabiev I *et al.* *Cancer Research*, 1993, **53**: 4784 ~ 4790.
- [3] Wartell R M, Harrell J. *Biochemistry*, 1986, **9**: 2664 ~ 2671.
- [4] Bamford D H, Bamford J K H, Towse S A *et al.* *Biochemistry*, 1990, **25**: 5982 ~ 5987.
- [5] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T M. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. 1, 21 ~ 1.46.
- [6] Benevides J M, Wang A H J, Marel G A V *et al.* *Biochemistry*, 1989, **1**: 304 ~ 310.
- [7] 余多慰, 柯惟中. 光散射学报, 1995, **1**: 24 ~ 29.
- [8] Benevides J M, Weiss M A, Thomas Jr G J. *Biochemistry*, 1991, **24**: 5955 ~ 5963.
- [9] Thomas J G J, Prescott B, Opella S J *et al.* *Biochemistry*, 1988, **12**: 4350 ~ 4357.
- [10] Fabian H, Holzer W, Heinemann V *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1993, **3**: 569 ~ 576.
- [11] Benevides J M, Wang A H J, Rich A *et al.* *Biochemistry*, 1986, **25**: 41 ~ 50.
- [12] Aubrey K L, Casjens S R, Thomas J G J. *Biochemistry*, 1992, **47**: 11835 ~ 11842.
- [13] 赵晓杰, 江山, 陆冬生, 等. 中国科学(B辑), 1993, **12**: 1287 ~ 1294.
- [14] 潘家来. 激光喇曼光谱在有机化学上的应用. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 1986. 149.
- [15] Langlais M, Tajmir-Riahi H A, Savcic R. *Biopolymers*, 1990, **30**: 743 ~ 752.
- [16] 许以明, 张志义, 徐国瑞. 科学通报, 1989, **19**: 1500 ~ 1504.
- [17] Perno J R, Grygon C A, Spiro T G. *J Phys Chem*, 1989, **93**: 5672 ~ 5678.
- [18] Fodor S P A, Rava R P, Hays T R *et al.* *J Am Chem Soc*, 1985, **107**: 1520 ~ 1529.

## LASER RAMAN SPECTRAL ANALYSIS OF SUPERHELICAL SPATIAL CONFORMATION ON PLASMID DNA

Yu Duowei Ke Weizhong

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

**Abstract** The pBR322 recombinant plasmids DNA products, which purified by phenol-extract and equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradients, have been shown as mainly spatial conformation of covalently closed circular DNA (i. e. cccDNA) by agarose gel electrophoresis for homogeneity detection. Laser Raman spectra in the region  $450 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$  have been obtained for the circular double-stranded plasmids DNA molecule in an aqueous solution, indicating not only contain those marker peaks of secondary structure as in conventional B-form of DNA, but also present both  $854$  and  $1083 \text{ cm}^{-1}$  diagnostic bands of reflecting the vibration state of deoxyribosyl phosphodiester backbone. The present analysis have demonstrated relationships between the superhelical state for cccDNA and the two conformational marker bands that can be considered as the tertiary structure marker on plasmids DNA. Because of markedly Raman hypochromicity of character band  $1378 \text{ cm}^{-1}$  of dT in contrast to linear DNA molecule, as well as the carbonyl double bond vibration line of dT have shifted to higher wave number position, the base stacking analysis represent occurrence of both increase in stacking reaction activity of dT, and injury of a number of the Hoogsteen hydrogen bond between dA and dT with exist supercoil structure in cccDNA.

**Key words** Plasmid DNA, Tertiary structure, Laser Raman spectroscopy