SERS 在光合作用光破坏机理中的应用

赵金涛 刘玉龙^{*} 单际修^④ 朱 恪 王居硕^④
张 昊 杨国桢 李良璧^④ 匡廷云^④

(中国科学院物理研究所光物理开放实验室, 北京 100080; ④中国科学院植物研究所光合作用基础开放实验室, 北京 100093. * 联系人)

摘要 利用检测灵敏度较高的 SERS 技术, 对浓度较低的纯化的 Pd OECC 吸附在银表面上的薄层进行了 SERS 测试. 得到了室温下的 Pd OECC 及强光破坏后的 Pd OECC 的 SERS 光谱. 在强光照下, β -胡萝卜素分子的 SERS 光谱的散射强度明显降低, 其线宽增加, 这说明强光照不但改变了 β -胡萝卜素分子的构象, 而且也改变了 β -胡萝卜素分子的微环境. 另外, 没有观察到 Pd OECC 薄层与银镜相互作用的其他新振动峰或 Pd OECC 中其他振动峰峰型的变化, 即 Pd OECC 在银镜表面保持原来的形状. 这证明 SERS 技术在光合作用光破坏机理研究中的可行性.

关键词 SERS 光合作用 光破坏 β -胡萝卜素

光合作用的光破坏机理的研究一直是该领域的研究热点之一. 光破坏常常伴随色素分子的破坏, 以及蛋白质的交联和断裂^[1]. 因此, 通过分析强光导致的色素分子结构及蛋白质微环境的变化特征, 无疑是阐明光破坏机理的有效途径之一. β -胡萝卜素(β -Car) 分子的振动能级对应于 488 nm 的可见光, 含有 β -Car 分子的样品在 488 nm 激发光下产生的 Raman 散射光谱不但能反映 β -Car 分子本身的构型、构象, 而且也能反映其结合状态及蛋白质微环境的变化. 因此, 多年来人们一直在尝试利用常规 Raman 光谱技术(Normal Raman scattering, NRS) 探讨 β -Car 分子在光破坏中的变化, 借以阐明光合作用的光破坏机理^[2~7]. 但是, 利用 NRS 对色素分子进行分析时, 由于反应体系中存在的蛋白质、脂类以及碳水化合物等有机分子对激发光的强烈吸收会使分子的 Raman 散射信号减弱, 信噪比降低, 常常难以得到理想的实验结果. 尤其当溶液的浓度降低时, 情况更是如此. 因此, 为了得到较好的 Raman 光谱, 需要加大激发光的功率或多次扫描累加. 而这样又可能会对样品本身产生一定的影响. 表面增强 Raman 散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS) 是近年来发展起来的一种高灵敏度 Raman 散射测试技术. 利用 SERS 技术可以在激发光的功率小, 不对测试分子产生影响下进行 Raman 光谱的测定. 这对测试痕量物质微小 Raman 信号, 分析研究分子的内部结构及分子与吸附表面之间的相互作用是一个有力的工具.

本文第 1 次利用检测灵敏度较高的 SERS 技术, 对浓度较低的纯化的放氧核心复合物(Purified oxygen evolution core complexes, Pd OECC) 吸附在银表面上的 Raman 散射光谱做了测试, 得到了室温下 Pd OECC 及强光破坏后 Pd OECC 的 Raman 散射光谱. 与同时得到的常规 Raman 光谱相比较, SERS 光谱明显优于后者, 证明了 SERS 在光合作用光破坏机理研究中的可行性, 并为低浓度样品的 Raman 散射光谱的测定提供了理想的工具.

1 材料与方法

() 实验材料. 参照 Ghanotakis 等人^[5]的方法从菠菜叶中分离光系统(PS) 放氧核

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-2-181>

心复合物(OECC). OECC经0.5%十二烷基麦芽糖(DM)处理后,通过SephadexG-100分子筛层得到纯化的OECC,即Pd OECC. 用于实验的样品叶绿素浓度为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

() SERS的衬底-银镜的制备. SERS的衬底-银镜用化学反应的方法制备^[8]. 在暗室中,用精密微量注射器吸取5 μL 样品液滴在银镜上,待自然干燥后,即可进行Raman光谱的测定.

() 样品的光破坏处理. 样品采用2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光照射,150 s后,在相同条件下测定Raman光谱.

() Raman光谱的测量. Raman光谱用SPEX-1403双光栅Raman光谱仪测得. 氙离子激光器的488 nm线为激发光源,步长为2 cm^{-1} . 采用柱面镜聚焦和180°背向散射配置,到达样品表面的激光功率不超过5 mW.

2 结果与讨论

实验结果表明,尽管痕量溶液在SERS的衬底上只是个薄层,但仍可观察到信噪比较高的SERS光谱(图1_1). 比如在NRS(图2)中较难观察到的位于1 300~1 500 cm^{-1} 范围内的,反映 β -胡萝卜素分子伸缩振动的弱峰,在图1_1中清晰可见.

图1 Pd OECC薄层在银衬底上的SERS光谱

1——激发波长为488 nm的SERS光谱;2——经2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光照射150s后的SERS光谱

图2 Pd OECC溶液的常规Raman光谱(NRS)

图1中位于1 524, 1 154, 1 004和960 cm^{-1} 的4条主要峰为 β -胡萝卜素分子的特征峰. 类胡萝卜素分子的Raman光谱通常分为4组: ν_1 (1 350~1 540 cm^{-1})归因于 β -胡萝卜素分子多链“—C=C—”键的伸缩振动; ν_2 (1 100~1 400 cm^{-1})为共轭多烯链振动光谱的“指纹区”,

ν_1 和 ν_2 光谱段与 β -胡萝卜素分子的构型紧密联系. ν_3 在 $1\,000\text{ cm}^{-1}$. ν_4 (960 cm^{-1} 附近) 反映—CH基团向共轭多烯链平面外的弯曲振动程度, 不仅和多烯链的平面对称性和电子的分配有关, 而且对类胡萝卜素分子的构象变化十分灵敏^[7]. 从 Pd OECC 的 SERS 谱可以看出: 吸附在银表面上的 β -胡萝卜素分子是全反式构型. ν_4 (960 cm^{-1}) 的出现表明样品中 β -胡萝卜素分子的多烯链的平面处于扭曲状态, 与细菌光合反应中心的类胡萝卜素分子的构象类似^[9]. 此外, 我们还看到在 $1\,004$, $1\,154$ 和 $1\,524\text{ cm}^{-1}$ 左右侧出现了小台阶峰, 而这些 Raman 峰在 β -胡萝卜素分子的常规 Raman 谱(NRS)中却没有看到^[9].

图 1_2 是同一块样品经光破坏后的 SERS 光谱. 我们在实验中对不同照射光强和时间的样品做了 Raman 谱的测量. 实验发现, 当样品用强光($2\,500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 连续照射 150 s 以后, β -胡萝卜素分子的 SERS 谱的强度开始明显减弱, 散射峰的线宽也有增加, 其信噪比也大大降低了. 尤其是 960 cm^{-1} 处的小峰的强度降低得几乎难以分辨. 这表明, 强光照射后, β -胡萝卜素分子原来的多烯链平面扭曲构象发生了变化, 表明 β -胡萝卜素分子可能已与蛋白分子脱离, 或者蛋白分子与 β -胡萝卜素分子结合区的构象发生了变化. 同时, 我们还观察到, 位于 $1\,200\sim 1\,400\text{ cm}^{-1}$ 范围内谱线的强度也减少到难以分辨了. 这些结果表明: 强光照射不但改变了 β -胡萝卜素分子的构象, 而且也改变了 β -胡萝卜素分子的微环境, β -胡萝卜素分子结构本身也可能受到了破坏. 但有关强光对 β -胡萝卜素分子的结构产生破坏作用的进一步研究正在进行之中.

总之, 利用 SERS 技术可以提高 Raman 散射强度. 我们用较小的激光功率就获得了较低浓度下的 Pd OECC 光谱, 这用普通共振方法是得不到的(对比图 1, 2). 实验发现, 在强光照射下, β -胡萝卜素分子的散射强度明显减弱. 这说明 β -胡萝卜素分子振动状态随光照发生变化. 除此之外, 没有观察到与银镜表面相互作用的其他新振动峰 Pd OECC 中其他振动峰峰形的变化, 即 Pd OECC 在银镜表面保持或基本保持原来的形状, 这证明了 SERS 技术在光合作用光破坏机理研究中的可行性.

参 考 文 献

- 1 Barber J, Chapman D J. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *TIBS*, 1992, 17: 61~ 66
- 2 Barber J. Composition, structure and dynamics of the isolated reaction center of photosystem two. In: Barber J, ed. *Trends in Photosynthesis Research*. Andover: Intercept Ltd, 1992. 29~ 43
- 3 Chapman D J, Barber J. Electron-transport properties of the isolated D1/D2/Cyt b₅₅₉ photosystem $\oplus$ reaction center. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 993: 423~ 431
- 4 Dorssen R J. Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47KDa chlorophyll $\oplus$ protein of photosystem $\oplus$. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 893: 267~ 274
- 5 Ghanotakis D F, Paula J C, Demetriou D M, et al. Isolation and characterization of the 47 KDa protein and the D1-D2-cytochrome $\oplus$ -559 complex. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 974: 44~ 53
- 6 Lutz M, Agalidis I, Hervo G, et al. On the state of carotenoids bound to reaction center of photosynthetic bacteria: a resonance Raman study. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 503: 287~ 303
- 7 Lu R H, Kuang T Y, Yu Z B, et al. The resonance Raman spectra of β -carotene molecules in the photosystem $\oplus$ reaction center D1/D2/Cyt b₅₅₉ complex. *Acta Botani Sinica*, 1996, 38(3): 180~ 185
- 8 Mo Y, Morke I, Wacter P. SERS of pyridine on silver surface of different roughness. *Surf Sci*, 1983, 133(9): 452~ 454
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-2-181>

- 9 Telfer A, He W Z, Barber J. Spectral resolution of more than one chlorophyll a electron donor in the isolated photosystem II reaction center complex. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1017: 143~ 151

(1998-05-14 收稿, 1998-07-23 收修改稿)

CDK4 反义 RNA 对乳腺癌细胞增殖及 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的影响

桑建利 王永潮

(北京师范大学生物系细胞增殖及调控生物学开放实验室, 北京 100875)

摘要 利用反义 RNA 抑制乳腺癌细胞中 CDK4 基因的表达, 观察分析了此基因与癌细胞增殖速率、成瘤性以及 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的相关性. 当 CDK4 表达受到抑制后, 细胞的增殖速率和致瘤性明显降低, 显示出 CDK4 在乳腺肿瘤发生与发展中的重要作用. cyclinE 基因的表达水平有较大幅度的下降, cyclinD1 和 CDK2 基因表达水平变化较小, 可以推测 cyclinE 的表达依赖于 CDK4 的诱导. 这样, CDK4 表达的抑制不仅影响自身的作用, 还影响其他基因的表达, 细胞周期进程由此受到精确的调控.

关键词 CDK4 乳腺癌细胞 反义 RNA cyclinD1

细胞增殖的失控是癌细胞的主要特征之一, 致使其失控的因素有许多种, 其中 cyclin 和 CDK 基因的异常起着重要的作用^[1, 2], 这是由于不同种类的 cyclin 和 CDK 基因的顺序表达控制着增殖细胞的周期进程. 已有研究证实 cyclinD1 就是一种细胞原癌基因^[3], 对其他种类的 cyclin 基因在癌细胞中的表达也有广泛的研究^[4], 但对于 CDK 基因与癌细胞恶性特征之间的关系以及 CDK 与 cyclin 基因在表达上的相互影响缺乏专门的研究. 我们选取 CDK4 基因, 利用反义 RNA 抑制基因表达的技术, 探讨了此基因在表达受到抑制后, 乳腺癌细胞在增殖速率和致瘤性上的变化以及对 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的影响.

1 材料与方法

(1) 实验材料. 乳腺癌细胞系 Bcap-37 来自北京医科大学第二附属医院妇科肿瘤研究所, 采用 PRMI1640 培养基加 10% 小牛血清于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养.

(2) 真核细胞反义 RNA 表达载体的构建及细胞转染. a. 本研究所用的 cyclinD1, CDK4 基因 cDNA 由美国 Cold Spring harbor 实验室的 David Beach 博士惠赠, cyclinE 基因 cDNA 由美国 Scripps 研究所的 Steve Read 博士惠赠, 真核细胞表达载体 pXJ41-neo 由新加坡国立大学王跃博士惠赠. 用 BamH I 和 Kpn I 双酶切 CDK4 cDNA 和表达载体, 通过将酶切基因片段与载体质粒连接构建成 CDK4 反义 RNA 真核细胞表达载体. b. 细胞转染采用《分子克隆实验指南》介绍的磷酸钙共沉淀法.

(3) 细胞生长曲线测定及流式细胞光度术分析. a. 取对数生长期细胞, 将其密度稀释成 1×10^4 个/mL 于小培养皿中培养, 每 24 h 取 1 次样, 每次 3 个重复, 计数后取平均数, 绘制成细胞生长曲线. b. 取对数生长期细胞, 用 75% 乙醇固定过夜, PBS 洗 2 次后加入 RNaseA (100