

H₂O₂ 对 DNA 影响的拉曼光谱分析

周殿凤¹, 柯惟中², 衡 航², 籍 康²

(1 盐城师范学院 物理系, 江苏 盐城 224002; 2 江苏省光电技术重点实验室, 南京师范大学分析测试中心, 江苏 南京 210097)

[摘要] 检测了鲐精 DNA 水溶液及其经过 1%、2% 和 3% H₂O₂ 处理 48h 的拉曼光谱图. 实验结果表明 DNA 在水溶液中同时具有 A、B 两种构象, 但以 B 型构象为主. 经 H₂O₂ 处理后, DNA 水溶液的 A 型构象有所增强, 碱基堆积程度下降. H₂O₂ 对碱基和脱氧核糖几乎没有损伤, 对 DNA 的主链结构也只造成很轻微的损伤. 由此可见 H₂O₂ 本身对 DNA 的损伤是很小的, 只有在外界因素诱发下 H₂O₂ 经反应生成 HO· 才会给 DNA 造成严重损伤.

[关键词] 拉曼光谱, DNA, H₂O₂

[中图分类号] O657.37 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1292(2006)03-0083-03

Influence of H₂O₂ on DNA by Raman Spectroscopy

ZHOU Dianfeng¹, KE Weizhong², HENG Hang², JI Kang²

(1. Department of Physics, Yancheng Normal College, Yancheng 224002, China)

2. Jiangsu Provincial Key Lab for Photoelectric Technology, Analysis and Test Centre, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The Raman spectra of DNA in aqueous solution treated by 1wt-%, 2wt-% and 3wt-% H₂O₂ for 48h are measured. The Raman spectral measurements indicate that DNA in aqueous solution shows both A-type and B-type conformation with B-type conformation in the majority. A-type conformation of DNA in aqueous solution is dominated after treatment of H₂O₂ for 48h. H₂O₂ leads to decrease in the base stacking. H₂O₂ doesn't damage the bases nearly and only damages the backbone of DNA slightly. The damage of DNA is mainly from HO· resulted from chemical reaction instead of H₂O₂ itself.

Key words Raman spectra, DNA, H₂O₂

H₂O₂ 是一种强氧化剂, 具有消毒、杀菌、漂白等功能, 在工业及医疗领域广泛使用. 有关学者提出过多食用双氧水会导致人体遗传物质损伤及 DNA 基因突变, 具有致癌、致畸形的潜在危险, 与老年帕金森氏病、脑中风、动脉硬化及糖尿病性肾病和糖尿病性神经性病变的发生关系密切. 到目前为止, 尚没有人运用拉曼光谱研究 H₂O₂ 对 DNA 的损伤. 为了探讨 H₂O₂ 对 DNA 的损伤, 我们配置了不同浓度的 H₂O₂ 与 DNA 作用, 并且测试它们的拉曼谱图, 对这些谱图进行比较、分析, 从分子水平上探讨了 H₂O₂ 对 DNA 的损伤.

1 材料与实验

测试用的鲐精 DNA 购自 Fluka 公司, 为白色固体纤维, 放于冰箱中 4℃ 保存. H₂O₂ 为分析纯. 测试前用 pH 值为 7.0 的重蒸水配置 4 份 DNA、H₂O₂ 和 Na₂SO₄ 的混合液. 其中 DNA 的质量百分数均为 5%, Na₂SO₄ 为 0.045 mol/L (作为内标), H₂O₂ 的质量百分数分别为 0%、1%、2% 和 3%, 每份样品实验前均密封保存, 在冰箱里放置 48 h 以达到充分水合. 然后在相同条件下测试了它们的拉曼光谱. 拉曼散射测试在法国 Jobin Yvon 公司的 LabRam HR800 上进行. 激光波长为 514.5 nm, 功率 10 mW. 整个实验过程在室温 20℃ 进行.

2 结果与讨论

DNA 水溶液及其经 1%、2% 和 3% H₂O₂ 处理 48 h 后的拉曼谱图如图 1 所示. 拉曼频移和指认如表 1

收稿日期: 2006-01-13

作者简介: 周殿凤(1978-), 女, 助教, 主要从事拉曼光谱研究. E-mail: zhou dianfeng@sohu.com

所示, 其中 A、G、C、T 分别代表腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶的振动特征, 在表中按它们对该谱线的贡献大小排列. 所有谱线的强度都以 Na_2SO_4 的 981 cm^{-1} 谱线为标准.

表 1 鲑精 DNA 拉曼光谱的频率特征及指认

拉曼频移 / cm^{-1}				归属
DNA 水溶液	经 1% H_2O_2 处理 48 h 的 DNA	经 2% H_2O_2 处理 48 h 的 DNA	经 3% H_2O_2 处理 48 h 的 DNA	
649	645	644	650	C
673	671	673	673	A
683	683	692		T
716	717	713	703	G
732	730	732	729	A
752	748	751	745	T
791	789	793	786	T C
815			809	A-type
830	834	827	835	B-type
923	922	916	912	deoxyribose
943		928	962	deoxyribose
1017	1015	1017	1026	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1053	1053	1057	1051	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1094	1093	1099	1092	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1148	1146	1152	1145	PO_4^-
1178	1181	1174	1175	T C
1209	1210	1206	1211	T
1223	1223	1225	1230	A
1242	1238	1242		T
1256	1257	1260	1256	C A
1306	1302	1303	1303	A
1345	1338	1346	1339	A
1376	1376	1380	1376	T A G
1424	1422	1422	1427	A G
1462	1462	1464	1468	Deoxyribose
1493	1487	1491	1480	G A
1517	1511	1523	1512	A
1533		1543	1528	G C
1578	1577	1580	1579	G A
1614	1621	1616	1618	δ_{NH_2}
1646	1640	1635	1630	
1656	1656	1660	1658	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1669	1669	1674	1670	$\nu(\text{C}=\text{O})$

ν - stretching vibration δ - deformation vibration

一般认为 DNA 在水溶液中呈 B 型构象, 在固体纤维中呈 A 型构象. A、B 型构象的主要标志是出现在 $805\sim 835\text{ cm}^{-1}$ 内的谱线, $805\sim 815\text{ cm}^{-1}$ 内的谱线表示 DNA 呈现 A 型构象, 而 $820\sim 835\text{ cm}^{-1}$ 内的谱线表示 DNA 呈现 B 型构象. 近几年来, 有不少实验发现水溶液中 DNA 同时具有 A、B 两种构象, 但以 B 型构象为主^[1,2]. 本次实验也证明了水溶液中 DNA 同时具有 A、B 两种构象. 从图 1(a) 中可见一个双峰即 673 cm^{-1} 和 683 cm^{-1} , 其中 683 cm^{-1} 谱线强度明显高于 673 cm^{-1} . ERFURTH THAMANN 认为, 由简正计算所确认的鸟嘌呤环呼吸振动峰 673 cm^{-1} 是 A 型 DNA 所具有的, 它受糖环折叠类型及糖苷扭转角影响, 反映鸟嘌呤核苷中从核苷键到呋喃环的状态. 从这一指标可以看出, 水溶液中的 DNA 具有 A 型构象. 683 cm^{-1} 谱线是 B 型 DNA 所具有. 另外表征 A 型构象的 815 cm^{-1} 谱线和表征 B 型构象的 752 cm^{-1} (815 cm^{-1} 谱线)、 1424 cm^{-1} 等谱线的出现也证明了 DNA 在水溶液中同时具有 A、B 两种构象, 但以 B 型构象为主. 加入 H_2O_2 处理 48 h 后, DNA 的构象有所变化. 当 DNA 被 1% 的 H_2O_2 处理 48 h 后, 683 cm^{-1} 谱线强度有所下降, 而 673 cm^{-1} 谱线移到 671 cm^{-1} , 强度增强, 此时仍然是 683 cm^{-1} 谱线强度较大. 当 H_2O_2 浓度为 2% 时, 683 cm^{-1} 谱线移到 692 cm^{-1} , 并且其强度低于 673 cm^{-1} 谱线. 当 H_2O_2 浓度为 3% 时, 683 cm^{-1} 谱线消失, 只剩下表征 A 型构象的 673 cm^{-1} 谱线了, 不过此时表征 B 型构象的 835 cm^{-1} 谱线强度很强. 综合

673, 683 和 835 cm^{-1} 谱线的变化, 得出经 H_2O_2 处理 48 h 后, DNA 的 A 型构象增强了。

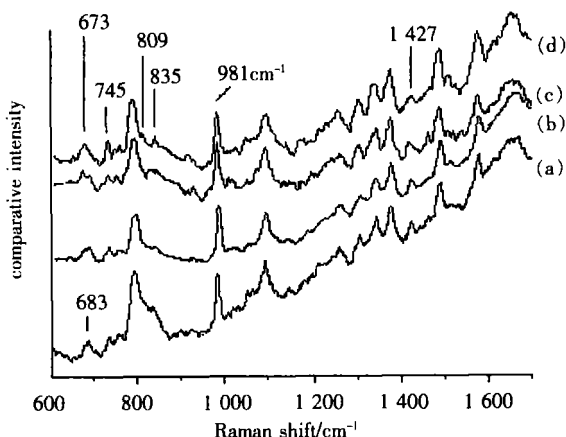
经浓度为 1%、2% 和 3% H_2O_2 处理 48 h 后, 表征 DNA 骨架振动的 1094 cm^{-1} 谱线位置几乎没变, 强度下降分别为 10%、11% 和 14%, 可见 H_2O_2 几乎没有破坏 DNA 的主链结构。表征腺嘌呤 A 的几条谱线: 732, 1223, 1306, 1345 和 1517 cm^{-1} , 除了 732 和 1223 cm^{-1} 谱线在加入 H_2O_2 前后几乎没有变化外, 其余几条谱线在加入 H_2O_2 后都出现增色。 $1200\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 范围内的谱线对碱基堆积程度很敏感^[3], 表征 A 的 1306 , 1345 和 1517 cm^{-1} 谱线的增色说明 DNA 经 H_2O_2 处理后, 碱基堆积程度有所降低。表征 G、C、T 和脱氧核糖的众多谱线在加入 H_2O_2 前后几乎没有变化 (如图 1 所示), 可见 H_2O_2 对 DNA 的碱基和脱氧核糖几乎没有损伤。

不少文献^[4, 5]认为 H_2O_2 对 DNA 有很大伤害, 而在我们的实验中, H_2O_2 对 DNA 只造成了轻微的损伤。究其原因, 我们觉得是在文献 [4, 5] 中, H_2O_2 已不是以 H_2O_2 形式存在, H_2O_2 通过 Fenton 反应或由于其他原因产生了羟基自由基 $\text{HO}\cdot$ 。羟基自由基对 DNA 的损伤很严重^[2, 6], 它可与碱基反应, 造成碱基变异, 也可和脱氧核糖反应, 还可导致 DNA 氢键、双链断裂。所以在文献 [4, 5] 中, 即使是很低浓度 (小于 1%) 的 H_2O_2 也严重损伤了 DNA。我们仅将 DNA 与 H_2O_2 混合在一起, 然后在冰箱里放置 48 h, 可以推测, 在此期间, 没有或者只有非常少量的 $\text{HO}\cdot$ 生成, 所以 DNA 只受到轻微的损伤。当我们将 DNA + H_2O_2 放置 72 h 后再测其拉曼谱图时, 发现与图 1(d) 几乎没有区别, 由此推出 H_2O_2 自生成 $\text{HO}\cdot$ 的速度是非常低的。

由以上分析可知, H_2O_2 自身对 DNA 的损伤是非常低的, 只有在外界因素 (如金属离子) 诱发下, 生成 $\text{HO}\cdot$ 才对 DNA 造成严重损伤。

[参考文献] (References)

- [1] 刘颂豪, 孟耀勇. 血卟啉单甲醚对 DNA 损伤的拉曼光谱研究 [J]. 光学学报, 2000, 20(4): 529-532
LU Songhao, MENG Yaoyong. Photodynamic damages of DNA with HEME probed by Raman spectroscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2000, 20(4): 529-532 (in Chinese)
- [2] 周殿凤, 柯惟中, 顾柏平, 等. 维生素 C 对紫外线诱发 DNA 损伤的保护作用 [J]. 光学学报, 2005, 25(5): 643-646
ZHOU Dianfeng, KE Weizhong, GU Boping, et al. Protective effect of vitamin C on ultraviolet radiation-induced DNA damage [J]. Acta Optica Sinica, 2005, 25(5): 643-646 (in Chinese)
- [3] PUPPELS G J, OTTO C, GREVE J, et al. Raman microspectroscopic study of low-pH-induced changes in DNA structure of polytene chromosomes [J]. Biochemistry, 1994, 33(11): 3384-3391.
- [4] 欧荣, 邹国林. 维生素 C 或 H_2O_2 系统中 $\text{HO}\cdot$ 对 DNA 的损伤作用 [J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1997, 43(2): 239-241
OU Rong, ZOU Guolin. DNA damage by $\text{HO}\cdot$ in the systems containing ascorbate or H_2O_2 [J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 1997, 43(2): 239-241 (in Chinese)
- [5] 朱志良, 庄志雄, 黄钰. GSH 在 H_2O_2 致 DNA 损伤中的作用研究 [J]. 现代预防医学, 2002, 29(4): 518-520
ZHU Zhiliang, ZHUANG Zhixiong, HUANG Yu. Study on effect of GSH on DNA damage due to H_2O_2 [J]. Modern Preventive Medicine, 2002, 29(4): 518-520 (in Chinese)
- [6] 赵红霞, 许以明, 张志义. 竹红菌乙素及其溴代物对 DNA 结构光敏损伤的 Raman 光谱 [J]. 科学通报, 1998, 43(9): 960-966
ZHAO Hongxia, XU Yiming, ZHANG Zhiyi. The photosensitive damage of HB and 5-BrHB to DNA structure [J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43(9): 960-966 (in Chinese)



(a) DNA 水溶液拉曼谱线
(b) DNA 水溶液经 1% H_2O_2 处理 48 h 的拉曼谱线
(c) DNA 水溶液经 2% H_2O_2 处理 48 h 的拉曼谱线
(d) DNA 水溶液经 3% H_2O_2 处理 48 h 的拉曼谱线

图 1 DNA 水溶液拉曼谱图

[责任编辑: 丁蓉]