

Spektroskopia ramanowska w badaniach białek – porównanie technik

10.1. Wprowadzenie

Spektroskopia ramanowska (RS) jest metodą badania przejść pomiędzy poziomami energetycznymi cząsteczek, zachodzącymi na skutek nieelastycznego rozproszenia światła. Teoretycznie efekt ten został opisany przez Adolfa Smeckla w 1923 roku, a w 1928 roku hinduski fizyk Chandrasekhara Venkata Raman potwierdził doświadczalnie jego istnienie, gdy zaobserwował kilka linii widmowych o małej intensywności dla monochromatycznego światła rozproszonego na próbce benzenu. Za to odkrycie przyznano mu w 1930 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki.

Wynikiem pomiaru próbek z użyciem spektrometru ramanowskiego są widma wyrażające zależność intensywności promieniowania rozproszonego w skali względnych wartości liczb falowych w zakresie energetycznym od 4000 do 0 cm^{-1} . Taka reprezentacja widma ramanowskiego odpowiada energetycznej skali częstości widma absorpcyjnego w podczerwieni, co pozwala na porównanie tych komplementarnych względem siebie metod spektroskopowych. Widma oscylacyjne mogą być wykorzystane do identyfikowania związku, analizy ilościowej, badania przemian w reakcjach chemicznych oraz oddziaływania z otoczeniem.

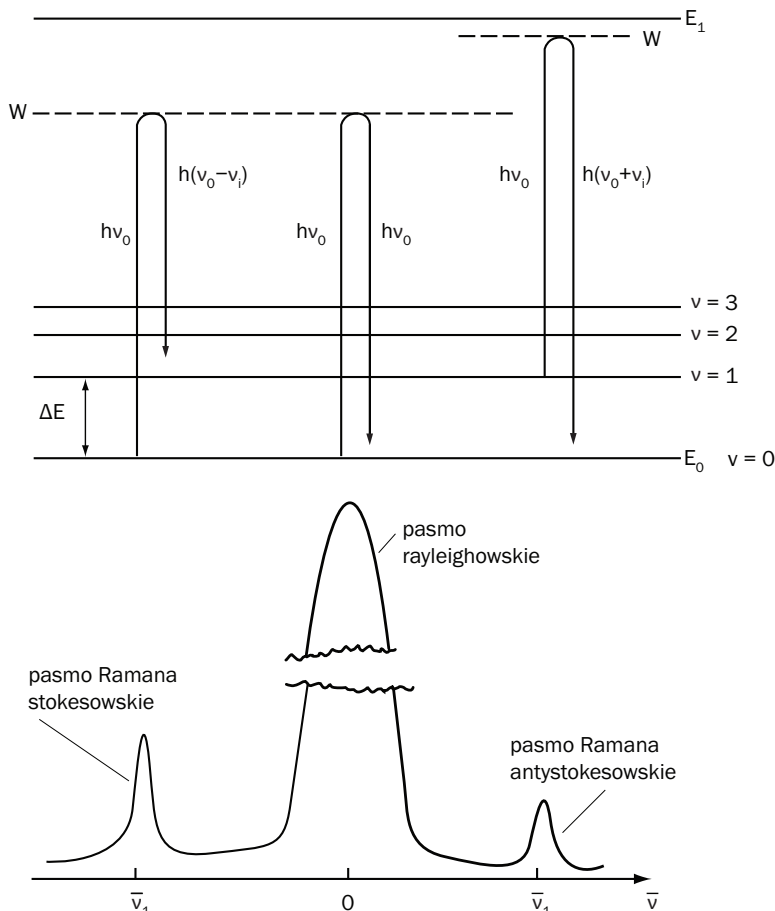
U podstaw spektroskopii ramanowskiej leży wzbudzenie rotacji lub oscylacji cząsteczki poprzez oświetlenie jej światłem (ν_0) z zakresu ultrafioletowego, widzialnego lub bliskiej podczerwieni. W wyniku oddziaływania cząsteczka-fala elektromagnetyczna obserwuje się światło rozproszone o tej samej energii (rozproszenie Rayleigha) oraz dyskretne składowe o liczbie falowej innej niż wzbudzające promieniowanie (rozproszenie Ramana). Na widmie ramanowskim, symetrycznie względem pasma Rayleigha, widoczne są pasma ramanowskie, czyli pary linii o częstości równej $\nu_0 \pm \nu_1$, gdzie ν_1 odpowiada częstości przejść pomiędzy oscylacyjnymi poziomami danej cząsteczki. Należy podkreślić, iż wielkość przesunięcia pasm ramanowskich względem pasma rayleighowskiego nie zależy od częstości promieniowania wzbudzającego, a wynika wyłącznie z właściwości cząsteczek rozpraszających. Pasma ramanowskie pojawiające się przy liczbie falowej mniejszej niż ta dla światła wzbudzającego ($\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_1$), nazywane są **pasмами stokesowskimi**, a te przy wyższych ($\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_1$) pasmami antystokesowskimi (rys. 10.1). Intensywność rozpraszania Rayleigha

jest około 10^{-3} , a Ramana 10^{-6} – 10^{-7} razy mniejsza od intensywności promieniowania wzbudającego. Jak wynika z rozkładu Boltzmana, pasma antystokesowskie są mniej intensywne w porównaniu z pasmami stokesowskimi, i z tego powodu zazwyczaj nie są rejestrowane na widmach ramanowskich.

Wyjaśnienie zjawiska rozpraszania Ramana można oprzeć na gruncie chemii kwantowej. Wiadomo, że energia stanów rotacyjnych, oscylacyjnych czy też elektronowych jakiegokolwiek układu molekularnego może przyjmować jedynie wartości dyskretne (kwantowane) i odpowiada stanom stacjonarnym cząsteczki opisanych przez jej funkcję falową Ψ . Rozwiązaniem równania własnego dla stanów oscylacyjnych w przybliżeniu harmonicznym jest wyrażenie:

$$E_v = hv_e(v + \frac{1}{2}), \quad (10.1)$$

a reguła wyboru pozwala na przejścia pomiędzy sąsiednimi stanami.



Rys. 10.1. Diagram energetyczny obrazujący przejścia między poziomami oscylacyjnymi towarzyszące rozpraszaniu promieniowania i schematyczne widmo ramanowskie odpowiadające tym przejściom

Uwzględnienie nieharmoniczności powoduje rozszerzenie reguł wyboru o przejścia, dla których $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$, czego konsekwencją są nadtony. Podejście kwantowe wyraźnie wskazuje, iż promieniowanie jest absorbowane lub emitowane również w sposób kwantowany, gdyż zachodzi na skutek przejść pomiędzy dwoma stanami energetycznymi cząsteczki.

Z mechaniki kwantowej wiadomo, że przejście energetyczne między poziomami jest dozwolone, gdy jego moment przejścia przyjmuje wartości różne od zera:

$$\alpha_{nm} = \langle \Psi_n | \hat{\alpha} | \Psi_m \rangle \neq 0 \quad (10.2)$$

W rozproszeniu Ramana decyduje o tym zmiana polaryzowalności w czasie przejścia ze stanu oscylacyjnego n do m .

Podejście kwantowe, jako jedyne, we właściwy sposób opisuje intensywność promieniowania rozproszonego dla przejścia $n \rightarrow m$ i wykazuje jego zależność od oscylacyjnej liczby kwantowej. Integralna intensywność promieniowania ramanowskiego jest zależna od czwartej potęgi częstości światła wzbudzającego i kwadratu pochodnej polaryzowalności względem danej współrzędnej normalnej i jest wyrażona ogólnie przez zależność:

$$|\alpha|_0 (v_0 \pm v_{osc}) \cdot |\alpha_{nm}|^2 \quad (10.3)$$

Wartość intensywności ma istotne znaczenie fizyczne, gdyż określa prawdopodobieństwo przejść pomiędzy poszczególnymi poziomami dwufotonowego procesu, jakim jest rozproszenie Ramana.

Wykorzystując zjawisko spektroskopii Ramana, można badać związki we wszystkich stanach skupienia, tj. gazy, ciecze, roztwory (w tym wodne), pasty, ciała stałe jako proszki mikrokryształiczne, czy też monokryształy w szerokim przedziale temperatur i ciśnień. Pomiar widm ramanowskich nie wymaga zastosowania skomplikowanych procedur przygotowania próbek, jak również nie są konieczne specjalne naczynia pomiarowe. W technikach, gdy nie używa się mikroskopu, badane substancje mogą być umieszczane w kapilarach (najczęściej szklanych) przezroczystych dla promieniowania wzbudzającego lub bezpośrednio eksponowane na działanie promieniowania w dowolnie zaprojektowanym naczyniu. Niewątpliwą zaletą spektroskopii ramanowskiej jest możliwość jej stosowania dla próbek w roztworach wodnych (szczególnie przydatne dla próbek biologicznych), gdyż mała polaryzowalność wody wyraża się małą intensywnością rozpraszającego światła.

Pewnym problemem pomiarów ramanowskich jest występowanie tła fluorescencyjnego. Usunięcie lub zmniejszenie tego efektu można osiągnąć kilkoma sposobami:

- dodając do badanej substancji tzw. wygaszaczy (KBr, NaI, KI),
- stosując technikę impulsowego wzbudzania próbki,
- wykonując pomiar w antystokesowskiej części widma,
- zmieniając długość fali promieniowania wzbudzającego,
- oczyszczając próbki z zanieczyszczeń fluorescencyjnych,
- naświetlając próbki przed pomiarem.

10.2. Aparatura

Spektrometry ramanowskie dzielą się na dwa podstawowe typy: dyspersyjne (skanujące) i tzw. fourierowskie (oparte na interferometrze). W obu tych typach można wyróżnić następujące elementy budowy: laser, komora pomiarowa, siatka dyfrakcyjna lub interferometr i detektor (rys. 10.2 i 10.3).

Intensywność rozpraszania ramanowskiego jest proporcjonalna do stężenia i częstości promieniowania padającego, co oznacza, że najsilniejsze rozpraszanie ramanowskie uzyskujemy stosując do wzbudzeń lasery z zakresu UV, zaś najłabsze dla zakresu IR.

$$I = I_0 k c l \sim \nu_0^4 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)^2 c l \quad (10.4)$$

Zależy ona również od czwartej potęgi częstości promieniowania padającego ν_0 , co oznacza, że najsilniejsze rozpraszanie ramanowskie uzyskujemy stosując do wzbudzeń lasery z zakresu UV, zaś najłabsze dla zakresu IR.



Rys. 10.2. Spektrometr FT-ramanowski. Od lewej: detektor germanowy z dewarem na ciekły azot, interferometr, komora pomiarowa, komputer, mikroskop ramanowski



Rys. 10.3. Dyspersyjny spektrometr ramanowski. Od lewej: mikroskop konfokalny ze stołem pomiarowym przesuwającym w kierunkach x-y-z

Użycie w spektrometrach fourierowskich laserów Nd:YAG pracujących w zakresie podczerwieni powoduje „ucieczkę” od fluorescencji, ale intensywność światła rozproszonego jest zredukowana w związku ze stosowaniem lasera z zakresu IR. Użycie interferometru powoduje jednak częściową kompensację tego zjawiska. Stosowanie lasera Nd:YAG w spektrometrach fourierowskich stwarza też możliwości detekcji promieniowania rozproszonego. Dla tego zakresu widmowego nie mogą być stosowane wielokanałowe, czułe detektory CCD (używane często w spektrometrach dyspersyjnych), wykorzystuje się natomiast detektory Ge lub InGaAs, które jednak charakteryzują się większym szumem i niższą czułością.

Korzyści ze stosowania spektrometrów fourierowskich w stosunku do dyspersyjnych to:

- korzyść Connesa: optyczna kontrola przesuwu zwierciadła, wysoka precyzja skali częstości widma, dzięki stosowaniu lasera (He i Ne) jako wzorca częstości,
- korzyść Fellgetta (zysk multipleksowy): zbieranie wszystkich długości fal w tym samym czasie, skrócenie czasu pomiaru i poprawa stosunku sygnału (S) do szumu (t), gdyż:

$$(S/N \sim n^{\frac{1}{2}}), \quad n - \text{liczba pomiarów} \quad (10.5)$$

- korzyść Jacquinota: brak szczelin ograniczających wiązkę promieniowania, a więc możliwość rejestracji całego widma w tym samym czasie,
- zmiana rozdzielczości widma jest prosta i szybka – dokonywana przez zmianę w programie komputerowym, zaś w spektrometrach dyspersyjnych wymaga zmiany siatki dyfrakcyjnej i rekaliibracji aparatu.

10.3. Wprowadzenie do analizy aminokwasów, białek i metabolitów

Spektroskopię ramanowską wykorzystuje się do badania zarówno pierwszo-, jak i drugorzędowej struktury białek. W przypadku struktury pierwszorzędowej może być wykorzystana do stwierdzenia obecności w białku pewnych aminokwasów (np. aromatycznych oraz cysteiny) i nie nadaje się do analizy sekwencji łańcucha. Natomiast w pełni jest wykorzystywana do określenia procentowego udziału struktur helikalnej (α), typu β i nieuporządkowanej oraz śledzenia ich zmian w różnych warunkach fizykochemicznych. W pośredni sposób RS można również stosować do analizy wyższych struktur białek oraz lokalnych zmian w niektórych aminokwasach.

Atomy tworzące wiązanie peptydowe dają w widmie pasma amidowe nazwane, odpowiednio: A, B, I–VII. Pasma, które wyróżniają widmo polipeptydowe od mieszaniny aminokwasów w spektroskopii ramanowskiej, to przed wszystkim drgania amidowe:

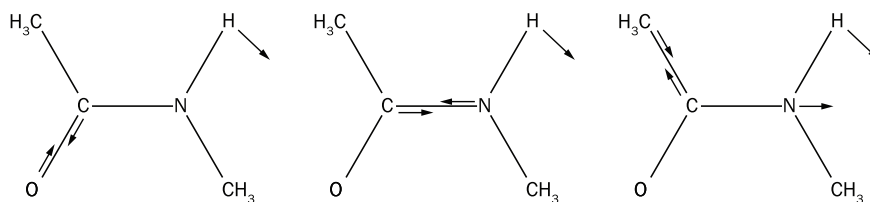
- amid I – drganie rozciągające C=O i wahadłowe N–H
- amid II – drganie rozciągające C–N i zginające N–H
- amid III – drganie rozciągające C–N i deformacyjne N–H

Spośród tych drgań do określenia struktury drugorzędowej w spektroskopii ramanowskiej wykorzystuje się drgania amidowe I i III (rys. 10.4 i 10.5), natomiast drganie II jest widoczne w spektroskopii UV RRS omówionej niżej.

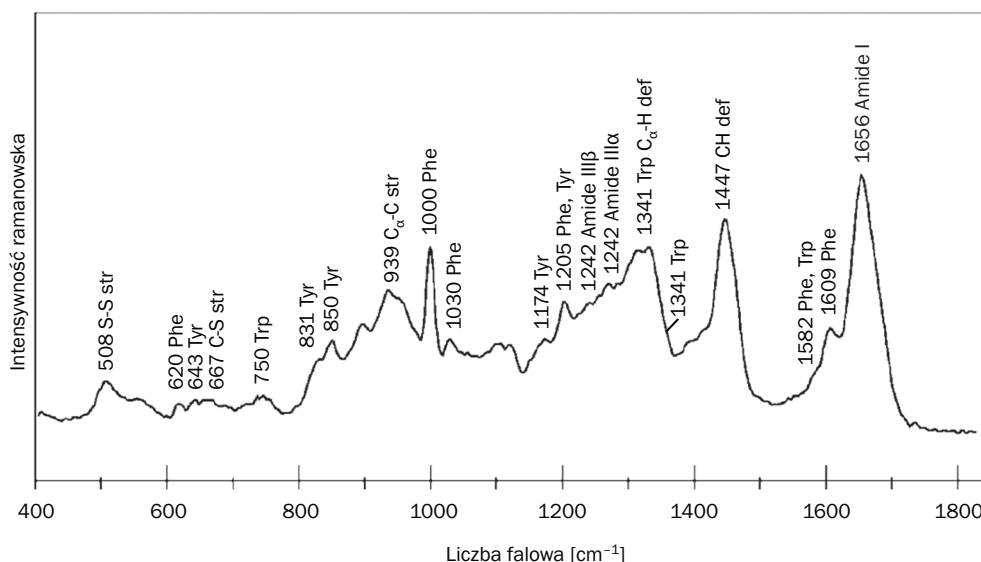
Określenie struktury II-rzędowej za pomocą częstości pasm nie jest tak dokładne, jak za pomocą krystalografii lub pomiarów CD, ale pozwala wyznaczyć ogólną tendencję. Tworzenie wiązań wodorowych C=O...H-N przesuwają drgania amidowe I w dół, a amidowe III – w górę skali częstości.

Dla poliglicyny mającej strukturę β wynoszą one odpowiednio: drganie amid I: 1685–1630 cm^{-1} , amid III: 1297 cm^{-1} , zaś dla poliglicyny o strukturze α , odpowiednio: 1641 cm^{-1} oraz 1309 cm^{-1} . Przykładowe dane dla glukagonu podano w tabeli 10.1.

Na podstawie przeprowadzonych badań przewidziano położenia pasm amidu I dla różnych struktur II-rzędowych. W widmie struktury helikalnej z podwójnym wiązaniem wodorowym występuje pasmo przy 1642 cm^{-1} , w widmie analogicznej struktury z pojedynczym wiązaniem wodorowym występuje pasmo przy częstości 1658 cm^{-1} oraz słabsze pasmo przy 1682 cm^{-1} . Częstość



Rys. 10.4. Drgania amidowe, kolejno od lewej: amid I, amid II i amid III



Rys. 10.5. Widmo ramanowskie białka: obok pasm charakterystycznych dla aminokwasów występują pasma amidowe I i III

TABELA 10.1. Częstości drgań glukagonu w zależności od struktury II-rzędowej (w cm^{-1})

| Glukagon | Rodzaj drgania | | | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | amidowe I | | | amidowe III | | |
| | α -helisa | stuktura β | struktura nieregularna | α -helisa | stuktura β | struktura nieregularna |
| Forma krystaliczna | 1658 | | | 1266 | | |
| Żel | | 1672 | | | 1232 | |
| Roztwór kwaśny | | | | | | 1248 |

pasma dla antyrównoległej struktury β wynosi 1675 cm^{-1} , dla równoległej struktury β – 1671 cm^{-1} , dla zwrotnej struktury β 1655 cm^{-1} (I typu – $1640\text{--}1690 \text{ cm}^{-1}$, II typu – $1660\text{--}1665 \text{ cm}^{-1}$), z dodatkowym słabym pasmem przy $1685\text{--}1690 \text{ cm}^{-1}$, oraz dla nieuporządkowanej między $1650\text{--}1660 \text{ cm}^{-1}$ i pasmo jest szerokie. Jeśli chodzi o najbardziej typowe położenia pasm charakteryzujących strukturę drugorzędową w zakresie pasm amidowych i drgań szkieletowych (rozciągających) łańcucha polipeptydowego, to pasma amidu III dla struktury helikalnej występują w zakresie $1264\text{--}1300 \text{ cm}^{-1}$, dla struktury β w zakresie $1230\text{--}1243 \text{ cm}^{-1}$, a dla nieregularne przy około 1243 cm^{-1} .

W trakcie traktowania deuterem, drganie amidowe III zanika z powodu podstawienia N-D, natomiast drganie I przesuwa się w stronę niższych częstości o około 5 cm^{-1} .

Występujący w widmach Ramana zakres pasm związany z drganiami rozciągającymi C-C między $890\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$ charakteryzuje także strukturę drugorzędową. Pasma struktur helikalnych występuje przy częstości około 930 cm^{-1} , a jego intensywność maleje w miarę powstawania struktury β , czy nieregularnej. Dla tej ostatniej pasmo to leży przy $950\text{--}970 \text{ cm}^{-1}$. Pasma przypisywane strukturze β obserwowano także w zakresie $1020\text{--}1060 \text{ cm}^{-1}$.

10.3.1. Tryptofan

Pasma tryptofanu są czułe na mikrośrodowisko reszty aminokwasowej: stosunek intensywności pasm przy 1360 i 1340 cm^{-1} (dublet tryptofanowy) I_{1360}/I_{1340} jest związany ze środowiskiem hydrofobowym/hydrofilowym, w którym znajduje się reszta tryptofanowa (większa wartość występuje dla środowiska hydrofobowego).

10.3.2. Tyrozyna

Pasma pochodzące od drgań reszty aminokwasowej tyrozyny są czułe na obecność wiązań wodorowych. Około 860 cm^{-1} i 833 cm^{-1} pojawiają się dwa pasma, których stosunek intensywności (I_{860}/I_{833}) wynosi około 2,5, gdy grupa OH jest akceptorem w silnym wiązaniu wodorowym, lub około 0,3, gdy jest donorem

w silnym wiązaniu wodorowym. Jeśli w białku obecne są więcej niż 2 reszty tyrozynowe, pasma ramanowskie są średnią ze wszystkich reszt.

10.3.3. Histydyna

Pasma histydydy w widmie ramanowskim są wskaźnikiem protonacji jej reszty aminokwasowej. Przy 1408 cm^{-1} w D_2O są zauważalne silne i wąskie pasma dla sprotonowanej histydydy. Pasma to przypisuje się drganiom symetrycznym, rozciągającym N1-C2-N3 i zginającym N-D.

Drganie rozciągające C4 = C5 w pH obojętnym pojawia się przy $1574\text{--}1587\text{ cm}^{-1}$, natomiast gdy nastąpi związanie z jonem metalu, np. Cu(II), czy Zn(II), pasmo to przesuwa się. Nowa częstość pasma zależy od miejsca przyłączenia metalu: N π czy N τ . Efekt ten wykorzystuje się do analizy struktury metalicznie indukowanej agregacji peptydów beta-amyloidu w nierozpuszczalnych fibrylach, które występują w chorobie Alzheimera.

10.3.4. Drgania mostka disiarczkowego

Mostek disiarczkowy pełni kluczową rolę w strukturze III-rzędowej białek. Widmo ramanowskie mostka S-S jest wrażliwe na jego konformację, dzięki czemu można określić strukturę białka za pomocą RS. Obecne są w widmie przede wszystkim dwa drgania: rozciągające S-S ($\nu_{\text{S-S}}$) i rozciągające C-S ($\nu_{\text{C-S}}$), obydwa zależące od kąta dwuściennego C-C-S-S-C-C. Drganie $\nu_{\text{S-S}}$ pojawia się około $508\text{--}512\text{ cm}^{-1}$ dla konformacji GGG, $523\text{--}528\text{ cm}^{-1}$ dla TGG i $540\text{--}545\text{ cm}^{-1}$ dla TGT (T – trans, G – gauche). Warto zauważyć, że spektroskopia ramanowska jest jedną z nielicznych metod umożliwiających badanie mostków disiarczkowych w roztworach.

10.3.5. Metionina i cysteina

Cysteina i metionina zawierają ugrupowanie –C–S–, których drganie rozciągające daje pasma $\nu_{\text{C-S}}$ około $630\text{--}750\text{ cm}^{-1}$. Dodatkowo po utlenianiu metioniny za pomocą H_2O_2 , przy 1010 cm^{-1} i 704 cm^{-1} pojawiają się pasma przypisywane drganiom rozciągającym S=O i C-S sulfotlenku metioniny. Pasma te są dość intensywne i mogą służyć jako wskaźniki degradacji białka.

Jako przykład wykorzystania RS w analizie mogą służyć badania u pacjentów chorych na bielactwo nabyte. W trakcie tej choroby w białkach naskórka następują reakcje utlenienia metioniny do pochodnej tlenku siarki i siarczanu, a także cysteiny do kwasu cysteinowego oraz L-tryptofanu do 5-OH-Trp, N-formylokinureniny i kinureniny. Badania prowadzone *in vivo* pozwoliły na bezpośrednią detekcję zachodzących zmian oraz tych związków w naskórku pacjentów.

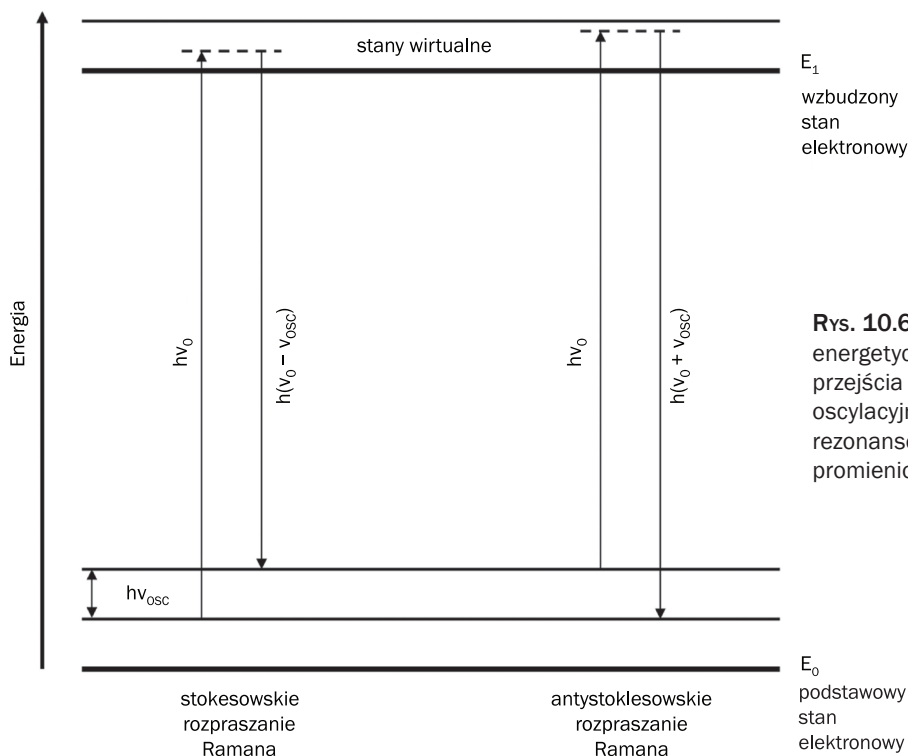
10.4. Specjalne techniki ramanowskie w proteomice i metabolomice

Zwykła (klasyczna) spektroskopia ramanowska, ze względu na stosunkowo niewielką czułość i selektywność, ma ograniczone zastosowanie do badań związków występujących w małych stężeniach lub w obecności innych komponentów. Z powodzeniem jednak stosuje się specjalne techniki, które czynią ze spektroskopii ramanowskiej nie tylko wysokoselektywną i wysokorozdzielczą metodę analityczną, ale też umożliwiają badania dodatkowych właściwości cząsteczek (tj. np. aktywność optyczna), czy też rozkład substancji w wybranych przekrojach próbki. Na potrzeby tego opracowania omówiono te, które szczególnie dotyczą zagadnień bioanalitycznych.

10.4.1. Rezonansowe rozpraszanie ramanowskie, RRS

Rezonansowa spektroskopia ramanowska (RRS, ang. *resonance Raman spectroscopy*) jest szczególną odmianą klasycznej spektroskopii ramanowskiej. Polega ona na rejestracji widma przy użyciu lasera o długości fali leżącej w zakresie przejścia elektronowego analizowanego związku, co oznacza, że w praktyce wykorzystywana jest dla substancji zawierających ugrupowania chromoforowe (rys. 10.6).

Główną cechą efektu RRS jest dodatkowe, selektywne wzmocnienie pasm pochodzących od drgań atomów wchodzących w skład fragmentu chromoforowego. Pozwala to na zwiększenie czułości metody i zmniejszenie stężenia badanej



Rys. 10.6. Diagram energetyczny obrazujący przejścia między poziomami oscylacyjnymi towarzyszące rezonansowemu rozpraszaniu promieniowania

substancji do wartości 10^{-5} – 10^{-7} mol/dm³. Umożliwia również zidentyfikowanie pasm chromoforowych pochodzących od konkretnego fragmentu cząsteczki w bardzo złożonym zazwyczaj układzie biologicznym. Użycie laserów barwnikowych pozwala na dokładne dopasowanie linii wzbudzającej do odpowiedniego pasma absorpcyjnego związanego z konkretnym fragmentem cząsteczki.

Obecnie ten rodzaj spektroskopii ramanowskiej stosuje się często w zestawieniu z innymi technikami, np. SERS (SERRS).

10.4.2. Rezonansowa spektroskopia ramanowska białek zakresu UV

W ostatnim czasie coraz częściej do analizy białek stosuje się rezonansową spektroskopię ramanowską z zakresu UV (UV RRS, ang. *UV resonance Raman spectroscopy*). Ponieważ światło z zakresu UV (250–200 nm) przypada na zakres absorpcji aminokwasów aromatycznych i szkieletu polipeptydowego, pozwala to na selektywne wzmocnienie sygnału od tych fragmentów i uzyskanie szczegółowej informacji na temat konformacji białka.

10.4.2.1. Drgania amidowe

II drganie amidowe, składające się ze sprzężonych drgań N–H i C–N, zwykle jest zbyt słabe w klasycznej RS, aby służyć do identyfikacji struktury, lecz może być obserwowane w UV RRS. Jego intensywność wzrasta wraz ze wzrostem zawartości struktury α -helikalnej.

10.4.2.2. Drgania aminokwasów aromatycznych

W spektroskopii UV RRS szczególnie dobrze są wzmacniane pasma od aromatycznych reszt aminokwasowych. Podobnie jak w RS, położenie poszczególnych drgań i ich ewentualne przesunięcie jest związane ze środowiskiem, w którym znajduje się reszta aminokwasowa, a szczególny wpływ ma tworzenie wiązań wodorowych.

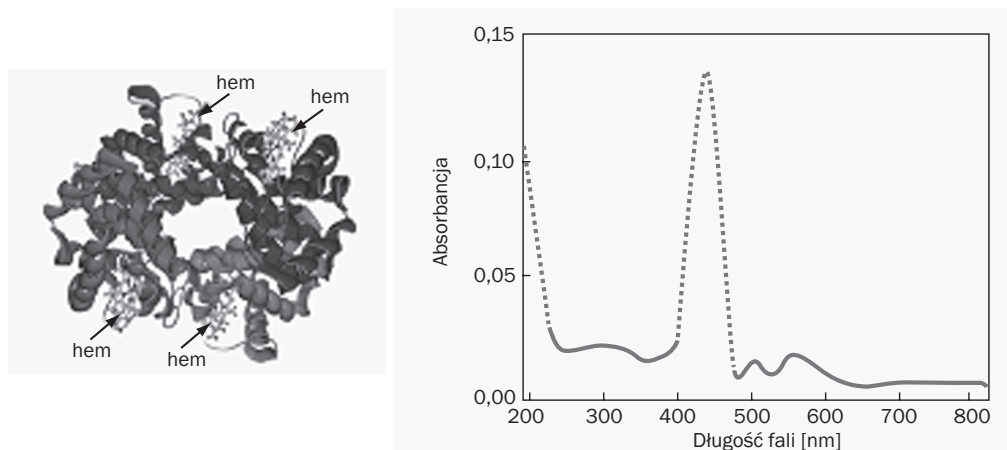
Na przykład w widmie HbA, pasmo przy 1511 cm^{-1} , które jest przypisywane do Trp, w D₂O jest przesunięte 5 cm^{-1} w stronę wyższych częstotliwości. Pasma te może być wykorzystywane jako ilościowy wskaźnik HbA (hemoglobiny A), określający strukturę wyższych rzędów.

10.4.2.3. Drgania związane z cysteiną

W UV RRS można także obserwować drganie rozciągające S–H bocznego łańcucha cysteiny. Jego częstotliwość jest czuła na wiązanie wodorowe – pojawia się przy 2525 – 2560 cm^{-1} , 2560 – 2575 cm^{-1} lub przy 2572 – 2580 cm^{-1} , odpowiednio, dla silnego, średniego i słabego wiązania wodorowego. Drganie to jest również wrażliwe na skręcenia kąta torsyjnego bocznego łańcucha wokół wiązania C α –C β .

10.4.3. Widzialna rezonansowa spektroskopia ramanowska białek

Ten rodzaj spektroskopii (visRRS, ang. *visible resonance Raman spectroscopy*) stosuje się często do badania zależności pomiędzy strukturą a funkcją wielu pigmentów biologicznych. W szczególności często wykorzystuje się ją do analizy białek hemowych.



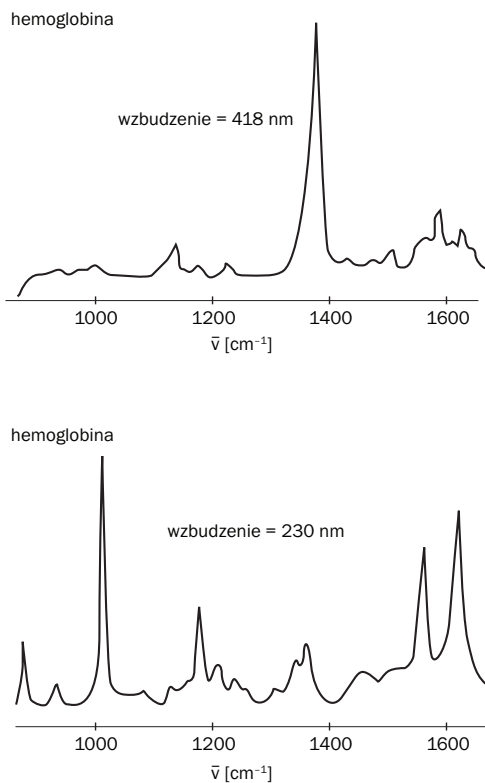
Rys. 10.7. Struktura białka hemowego wraz z widmem absorpcyjnym UV-VIS

10.4.3.1. Białka hemowe

Jak wspomniano wyżej, główną cechą efektu RRS jest selektywne wzmocnienie pasm pochodzących od drgań atomów wchodzących w skład fragmentu chromoforowego. Poniżej przedstawiono przykład selektywnego wzbudzania białka hemowego w zakresie 418 i 230 nm (patrz na widmo absorpcyjne UV-VIS zamieszczone obok struktury białka, rys. 10.7). Pierwsze wzbudzenie pozwala na uzyskanie informacji na temat grup hemowych, drugie zaś – reszt aminokwasowych w części białkowej: tyrozyny (Tyr) i tryptofanu (Trp) (rys. 10.8).

VisRRS stosuje się do analizy ligandowych wiązań białek hemowych oraz do badania interakcji pomiędzy ligandem wewnętrznym i żelazem hemowym, a także pomiędzy ligandem zewnętrznym i żelazem lub bliskim fragmentem białka. Widma visRRS w zakresie wysokich częstotliwości, gdzie pojawiają się drgania szkieletowe pierścienia porfirynowego, odzwierciedlają stan utlenienia, liczbę koordynacyjną i spin żelaza hemowego. Na przykład pasmo ν_4 przy 1370–1375 cm^{-1} oraz pasmo przy 1355–1362 cm^{-1} , odpowiednio dla Fe(III) i Fe(II), służą jako markery stanu utlenienia.

Drganie rozciągające $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ pojawia się w oksyhemoglobinie przy około 567 cm^{-1} i przesuwa się do 540 cm^{-1} dla kompleksu z $^{18}\text{O}_2$. Drgania $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ obserwuje się nie tylko dla oksyhemoglobiny, ale dla różnych białek hemowych. Obecne są w nich drgania nie tylko $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ rozciągające, ale również



Rys. 10.8. Widma ramanowskie białka hemowego otrzymane przy wzbudzeniu 418 i 230 nm. Widma są całkowicie różne z powodu wzmocnienia rezonansowego

zginające Fe-O-O (δ_{FeOO}). Interesujące jest to, że $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ ma podobną wartość dla Mb, Hb, CcO, cytochromu *bo* i oksygenazy hemowej HO, mimo że funkcja tych białek jest całkowicie odmienna.

10.4.3.2. Białka miedziowe

Ten rodzaj białek jest intensywnie badany za pomocą visRRS. Zwłaszcza niebieskie białka miedziowe typu I można łatwo analizować dzięki silnemu pasmu absorpcji przy około 600 nm. Z kolei dla plastocyanin izolowanych z różnych źródeł, po wzbudzeniu laserem o długości fali około 600 nm widoczne są pasma w regionie 300–500 cm^{-1} . Pasma te przypisuje się głównie drganiom rozciągającym Cu–S oraz drganiom wewnętrznym skoordynowanego łańcucha bocznego Cys.

Drganie $\nu_{\text{Cu-S}}$ służy jako czuły wskaźnik siły wiązania Cu–S (Cys) i geometrii skoordynowania miedzi w białku.

10.4.3.3. Drgania chinonowe

Chinony odgrywają ważną rolę ze względu na łatwe przejście redoksove pomiędzy strukturą chinonową i chinolową. W szczególności rolą chinonów jest sprzężenie transferu elektronów z translokacją protonów w membranach. Zhaoal. i in. badali ten proces za pomocą spektroskopii visRR u bichinonów w centrach fotosyntetycznej reakcji bakterii.

10.4.3.4. Drgania rodników tyrozyny w białkach

Rodniki tyrozyny wykryto jako półprodukty reakcji oksydaz zawierających miedź, tj. galaktozooksydazy i gliksalooksydazy. Związki te mają silne pasmo absorpcji przy około 450 i 800–850 nm. Widmo ramanowskie aktywnej galaktozooksydazy i gliksalooksydazy otrzymane przy użyciu światła laserowego o długości około 450 nm pokazuje drganie rozciągające C–O reszty Tyr przy 1487 cm^{-1} . Z kolei drgania rozciągające C–O rodników fenolowych i fenoksylo- wych pojawiają się, odpowiednio, przy 1265 i 1505 cm^{-1} .

10.4.3.5. Flawoproteiny

Ten rodzaj białek jest szczególnie ważny jako redoksyenzymy. Ponieważ flawiny wykazują zwykle dużą fluorescencję w stanie utlenionym, trudno zmierzyć widmo RR flawoprotein. W specjalnych warunkach fluorescencja może być wygaszona i pomiar RR staje się możliwy. Pierwsze rezonansowe widmo utlenionej flawoproteiny obserwowano dla ryboflawiny. Pasma na widmie visRRS flawin przypisano do poszczególnych drgań na podstawie danych pochodzących z widma dla izotopowo znaczonego pierścienia izoalloksazyнового.

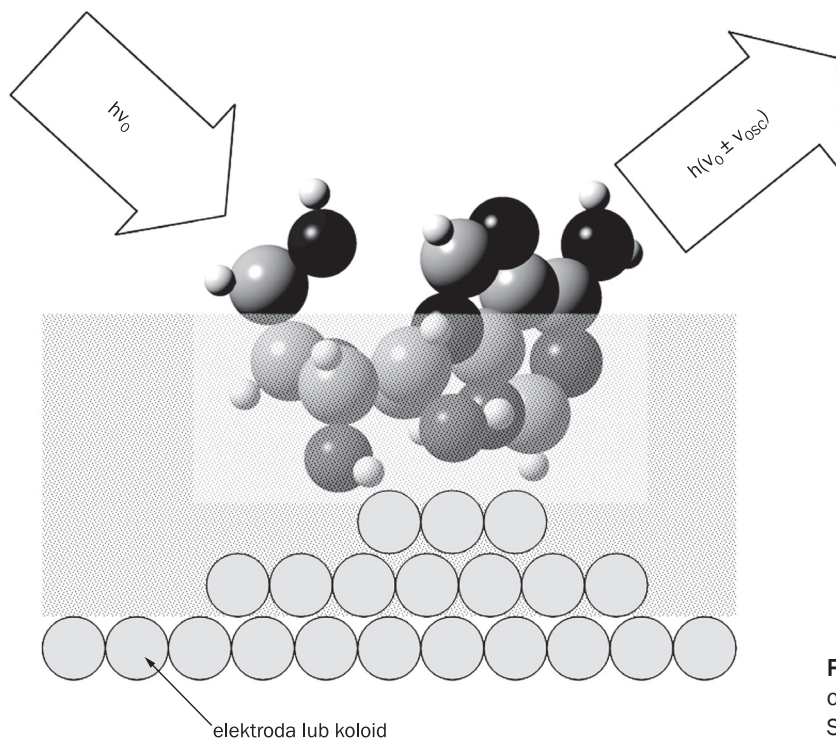
10.4.4. Powierzchniowe wzmocnienie rozpraszania Ramana, SERS

Jednym z ograniczeń klasycznego rozpraszania ramanowskiego jest słaba intensywność sygnału, a tym samym mała czułość metody w badaniach roztworów. W latach 70. ubiegłego wieku zauważono jednak, że wzbudzenie ramanowskie może być wzmocnione nawet 10^6 -krotnie, jeśli cząsteczka zostanie zaadsorbowana lub jest w bliskiej odległości od specjalnie przygotowanej powierzchni metalicznej (Ag, Au, lub Cu). Technika związana z tym zjawiskiem jest znana jako

powierzchniowe wzmocnienie rozpraszania Ramana (SERS, ang. *surface enhanced Raman spectroscopy*). Dodatkowo, w przypadku rejestracji widma przy użyciu lasera o długości fali bliskiej elektronowej absorpcji badanej próbki, sygnał jest wzmocniony w sposób rezonansowy i wówczas technika nosi nazwę SERRS (ang. *surface enhanced resonance Raman spectroscopy*). Doniesienia literaturowe świadczą o tym, że SERS (SERRS) umożliwia obserwację nawet pojedynczej cząsteczki (SMD, ang. *single molecule detection*), czego jak dotąd inne metody spektroskopowe nie oferują. Zaletą techniki SERS jest też wysoki poziom specyficzności pomiędzy analizowaną substancją a powierzchnią metalu oraz jednoczesna detekcja wielu składników na poziomie śladowym.

Mechanizm wzmocnienia SERS jest związany z dwoma zjawiskami: elektromagnetycznym i chemicznym. Pierwsze z nich pojawia się na skutek wzmocnienia pola elektromagnetycznego w wyniku wzbudzenia plazmonów na powierzchni metalicznej padającym promieniowaniem laserowym i jego działanie ma charakter dalekozasięgowy. To znaczy, że pojawia się wzmocnione rozpraszanie ramanowskie pochodzące od cząsteczek znajdujących się nawet do 10 Å od powierzchni metalu. Drugi mechanizm wymaga bliskiego kontaktu cząsteczki z powierzchnią metalu i wymiany elektronu pomiędzy nimi. Nazywany jest mechanizmem z przeniesieniem ładunku (CT, ang. *charge transfer*). Jako powierzchnia metaliczna służyć mogą nanocząstki koloidalne, elektrody, filmy lub wyspy srebra i złota (rys. 10.9).

Z powodu prostoty przygotowania, najczęściej wykorzystuje się koloidy srebra lub złota (o pH 6,5–8), do których dodaje się niewielką ilość wodnego (i nie tylko) roztworu analizowanej substancji (do kilku μL) o stężeniu 10^{-2} – 10^{-10} M.



Rys. 10.9. Schemat obrazujący metodę SERS

Dostępne są również płytki z przygotowanym już nanochipem srebra. Widma mierzy się przy użyciu lasera z zakresu VIS-NIR.

Metoda SERS pozwala też na określenie orientacji zaadsorbowanej cząsteczki i mechanizmu oddziaływania z powierzchnią substratu (metal). Analiza widm SERS jest oparta na wzmacnieniu drgań pochodzących z tych fragmentów cząsteczki, które oddziałują z powierzchnią, a zatem, w porównaniu z normalnym widmem ramanowskim, widoczne są tylko niektóre pasma.

Spektrometr ramanowski sprzężony z mikroskopem konfokalnym pozwala na wykrycie białek komórkowych w sposób niedestrukcyjny w pojedynczych komórkach. W tym celu wykorzystuje się związki chemiczne wykazujące wysoką aktywność ramanowską i dające wyraźne pasma na widmach ramanowskich jako potencjalne markery. Związki te, sprzężone następnie z cząsteczkami biologicznymi, mogą być wykorzystane do detekcji enzymów bądź receptorów komórkowych. Dodatkowy wzrost intensywności rozpraszania ramanowskiego takich układów obserwowano po dodaniu srebra koloidalnego.

SERS stosuje się do analizy jakościowej leków, glukozy, sekwencjonowania DNA i białek badanych w ich naturalnym stanie występowania. Technikę tę wykorzystuje się do analizy wieloskładnikowych próbek biologicznych, jako specyficzną sondę do badań leków oraz ich oddziaływań z różnymi makrocząsteczkami, takimi jak proteiny czy kwasy nukleinowe. Badania te prowadzi się w celu poznania i zrozumienia mechanizmów działania danej grupy farmaceutyków na poziomie komórkowym i zastosowania tej wiedzy do syntezy i charakterystyki cząsteczek o potencjalnym wpływie terapeutycznym. Tego typu podejście do badań leków metodą SERS jest dość powszechne w literaturze.

Widma SERS wykorzystuje się do badania mechanizmu tworzenia wiązania ligand–receptor, co jest szczególnie ważne w określeniu struktury kompleksu lek–proteina. Są też próby wykorzystywania SERS do analiz ilościowych. Wykazano, że SERS może być metodą analityczną wyznaczającą stężenia glukozy, triacylogliceroli, cholesterolu, białek, HDL, LDL, mocznika i kwasu moczowego w surowicy krwi w zakresie klinicznym.

Spektroskopia SERS umożliwia również w pewnych przypadkach rozróżnienie enancjomerów związków optycznie czynnych. Takim przykładem są leki z grupy β -brokerów. Badania SERS nad propranololem, alprenololem, acebutololem i atenololem wskazały na obecność pasm markerowych pozwalających na rozróżnienie poszczególnych enancjomerów i mieszaniny racemicznej w próbkach o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$.

10.4.5. Ramanowska aktywność optyczna, ROA

Substancje czynne optycznie po wzbudzeniu promieniowaniem spolaryzowanym wykazują różną prędkość propagacji składowych promieniowania kołowo spolaryzowanych lewo- i prawoskrętnie. W wyniku tego następuje skrócenie płaszczyzny polaryzacji promieniowania rozproszonego. Technika ramanowska służąca do określenia chiralności cząsteczek jest spektroskopia ROA (ang. *Raman optical activity*). Pomiar ramanowskiej aktywności optycznej polega na określeniu różnicy w rozpraszaniu nieelastycznym przez substancję chiralną światła spolaryzowanego kołowo – w lewo i w prawo. Na podstawie różnicy w intensywności

widm ramanowskich dla różnej polaryzacji światła padającego (czyli z sygnału ROA) można badać strukturę związków czynnych biologicznie. Możliwe jest też określenie absolutnej konfiguracji cząsteczki, co jest szczególnie istotne, gdy inne metody wyznaczenia konfiguracji zawodzą (na przykład metody dyfrakcyjne dla substancji niekryształizujących). Ponieważ zdecydowana większość biomolekuł i biopolimerów ma budowę chiralną, przed spektroskopią ROA otwierają się fascynujące perspektywy aplikacji na polu biofizyki molekularnej, biochemii i biologii strukturalnej. Jako że widmo oscylacyjne jest z natury bogatsze w sygnały niż widmo elektronowe, spektroskopia ROA jest potencjalnie nawet bardziej obiecującą metodą badawczą niż szerzej znana spektroskopia elektronowego dichroizmu kołowego (CD). Widma ROA są bardzo słabe (widmo różnicowe jest około 1000 razy słabsze niż zwykłe widmo Ramana), dlatego spektroskopia ta rozwija się od stosunkowo niedawna.

Jednym z najważniejszych obszarów zastosowań ROA są badania typu zwinienia białek oraz struktury i dynamiki kwasów nukleinowych.

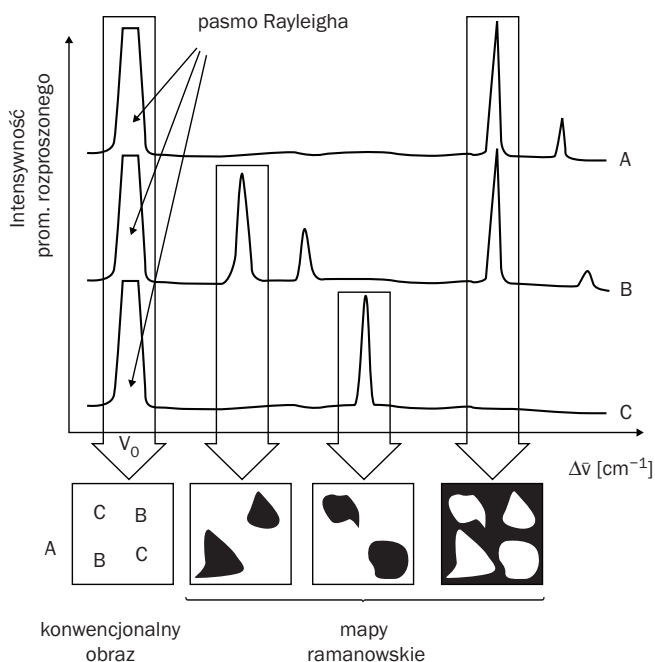
Zastosowanie ROA w biofizyce molekularnej daje możliwość charakteryzowania przejściowych stanów konformacyjnych białek zarówno z punktu widzenia podstawowych motywów II-rzędowych, jak i ich upakowania przestrzennego. Co bardzo istotne, spektroskopia ROA pozwala na badanie dynamiki szybko fluktuujących, i przez to słabo ustrukturyzowanych konformacji polipeptydów, które nie są widoczne w wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Fakt, iż właśnie takie konformacje są postrzegane jako odgrywające główną rolę w genecie cytotozyczności nieprawidłowo zwiniętych białek (ang. *misfolded protein conformations*), czyni z ROA jedną z najbardziej atrakcyjnych metodologii w badaniach nad molekularnymi mechanizmami chorób konformacyjnych, m.in. choroby Alzheimerera, Parkinsona czy Creutzfeldta–Jakoba – choroby prionowej.

Ważnym atutem ROA jest jej zdolność do jednoczesnego badania struktur białek i kwasów nukleinowych w ich wielocząsteczkowych i często nie kryształizujących kompleksach, tj. w wirusach. Ten problem, bardzo trudny z punktu widzenia biologii, a zwłaszcza proteomiki strukturalnej, nie pozwala na zastosowanie technik dyfrakcji promieni X, ani – ze względu na masę cząsteczkową wirusów – wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Czulość chiroptycznej spektroskopii ROA na łamanie symetrii strukturalnej jest z jednej strony narzędziem badania dryftu konformacyjnego w białkach kapsydów wirusowych, z drugiej zaś – poprzez charakteryzowanie subtelných zmian struktury tych białek – ROA może być pomocna w projektowaniu nowych molekularnych strategii antywirusowych.

Sygnał ROA charakteryzuje się słabą intensywnością, co może w pewnych przypadkach utrudniać detekcję właściwości chiralnych cząsteczek o małym stężeniu. Jednak połączenie tej metody ze wzmocnieniem powierzchniowym rozpraszania ramanowskiego pozwala obniżyć poziom detekcji. Tego typu metoda nosi nazwę SEROA (ang. *surface enhanced Raman optical activity*). Pomiar przeprowadza się na spektrometrze ROA, a różnicą jest sposób przygotowania próbki do badań. Należy badać substancję umieścić w koloidzie srebra lub złota, tak jak w typowych pomiarach SERS. Na przykład, widmo SEROA dla cytydyny zmierzono przy stężeniu μM , a mioglobiny czy cytochromu *c* – nawet dla stężeń 10^{-7} M. W tym ostatnim przypadku sygnał ROA został dodatkowo wzmocniony przez efekt rezonansowy (SERROA). Technika SEROA/SERROA pozwala również na obserwację

mechanizmu przyłączania ligandu do białka, jak wykazano na przykładzie połączenia mioglobiny z azydkami – niewielkimi strukturalnie cząsteczkami. Widmo rezonansowego rozpraszania Ramana, zwykle wykorzystywane w tego typu badaniach, nie wykazało żadnych zmian spektralnych, sugerując brak oddziaływania. Natomiast widma SERROA ujawniły zmiany położenia pasm i ich intensywności charakterystycznych dla pierścienia porfiryнового, co jednoznacznie wykazuje czułość tej metody nawet na niewielkie zmiany strukturalne.

10.5. Mapowanie ramanowskie, RM

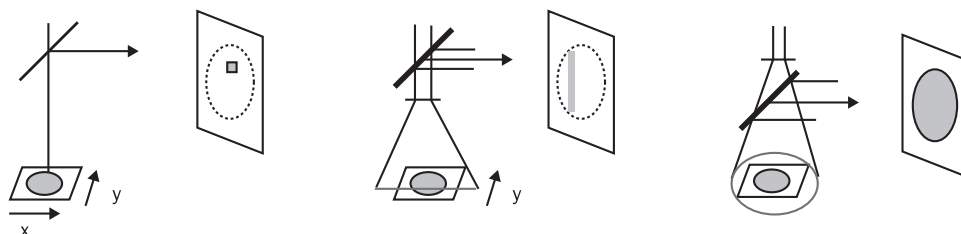


Rys. 10.10. Tworzenie map ramanowskich obrazujących rozkład pojedynczych składników A, B i C na podstawie charakterystycznych pasm dla tych substancji. (Zaadaptowane z: Dhamelincourt, 2002)

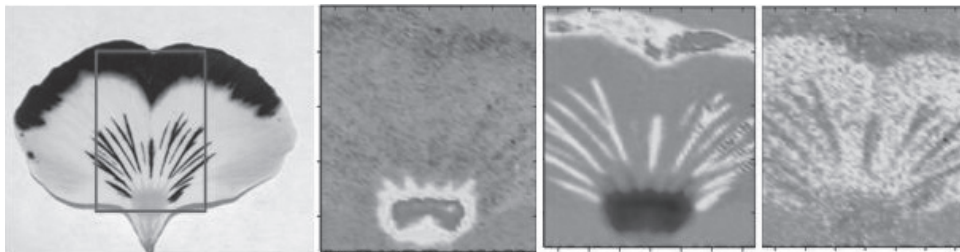
Znacznie więcej informacji o badanym układzie dostarcza, ostatnio intensywnie rozwijana, technika mapowania ramanowskiego, która pozwala zbierać informacje o rozkładzie przestrzennym badanego związku bezpośrednio w tkankach czy komórkach. Rozmieszczenie wybranych związków w przekrojach próbki jest obrazowane rozkładem intensywności ich sygnałów ramanowskich w badanym przekroju. Pozwala to na otrzymanie 2-wymiarowych obrazów przedstawiających rozkład pojedynczych składników w złożonych układach biologicznych (rys. 10.10).

Powszechnie są znane i stosowane trzy techniki mapowania ramanowskiego: punktowa, liniowa i powierzchniowa (rys. 10.11).

W wyniku mapowania seryjnego, czyli techniką punktową lub liniową, otrzymuje się zbiór widm, z którego konstruowana jest mapa



Rys. 10.11. Techniki mapowania ramanowskiego, od lewej: punktowa, liniowa i powierzchniowa



Rys. 10.12. Od lewej: fotografia bratka; mapa rozdziału karotenów (integracja $\sim 1156 \text{ cm}^{-1}$); mapa rozdziału antocyjanów (intensywność pasma $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$); mapa rozdziału glikozydów flawonolowych (intensywność pasma $\sim 1570 \text{ cm}^{-1}$) (kolor p. dysk CD)

ramanowska. Mapowanie powierzchniowe polega natomiast na bezpośrednim naświetleniu określonego obszaru próbki. W tym przypadku za pomocą odpowiednio przestrajalnych filtrów wybiera się pewien zakres długości fali promieniowania rozproszonego, które jest rejestrowane przez detektor. Prowadzi to do otrzymania zbioru obrazów, z których można rekonstruować poszczególne widma ramanowskie.

Na przykładzie kwiatu bratka pokazano, że zastosowanie mapowania ramanowskiego umożliwia nie tylko identyfikację głównych barwników bezpośrednio w żywej tkance płatków, ale też zbadanie ich ewentualnej kopigmentacji (rys. 10.12.)

Dodatkowe sprzężenie spektrometru z mikroskopem sił atomowych pozwala na prowadzenie badań z rozdzielczością poniżej 1 mikrometra (przy wzbudzeniu linią 532 rozdzielczość wynosi 200 nm!), a dzięki wprowadzeniu mikroskopii konfokalnej można oglądać przekroje poprzeczne poszczególnych fragmentów tkanek, a zatem dokonywać 3-wymiarowego mapowania próbki.

Spektroskopię ramanowską można stosować do badania tkanek roślinnych i zwierzęcych zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. A więc np. widma ramanowskie wykonane *in vitro* ze ściany tętnicy wieńcowej człowieka z płytką miażdżycową bez ognisk zwapnienia wskazują jednoznacznie na wysoką zawartość cholesterolu, protein i (fosfo)lipidów oraz małe stężenie soli wapnia w miejscu analizy, podczas gdy pomiar zaawansowanej płytki miażdżycowej zawierającej ogniska zwapnienia wykazuje odwróconą skalę stężeń wymienionych wyżej składników.

Mikroskopia ramanowska pozwala też na niedestrukcyjne badania lipoprotein bogatych w triacyloglicerole (TGRL), zarówno ich składu, jak i rozmieszczenia. Można określić stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych oraz dynamikę metabolizmu poszczególnych cząsteczek TGRL w oddziaływaniu z lipazą lipoproteinową, która jest zlokalizowana na powierzchni komórek śródbłonna i odgrywa podstawową rolę w regulacji poziomu triacylogliceroli we krwi, zwłaszcza po posiłku. Wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej może więc również umożliwiać badania mechanizmów działania leków obniżających stężenie triacylogliceroli we krwi.

W tabeli 10.2 przedstawiono zestawienie technik ramanowskich.

TABELA 10.2. Zestawienie technik ramanowskich

| Technika | | | | | |
|--|---|--|--|---|--|
| Charakterystyka | RS | RR | SERS | ROA | RM |
| Spektrometr | FT-ramanowski lub dyspersyjny | dyspersyjny | FT-ramanowski lub dyspersyjny | przystosowany do pomiaru aktywności optycznej | FT-ramanowski lub dyspersyjny, z przystawką do mapowania |
| Przedmiot badań | uśredniony stan całej cząsteczki | grupy chromoforowe | grupy, których drgania leżą w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni | cząsteczki aktywne optycznie | dystrybucja wybranych związków |
| Rozdzielczość zależy od długości linii wzbudzającej, rzędu 0,2–kilka μm | | | | | |
| Problemy | fluorescencja | fluorescencja | rozpuszczalność | mała czułość, długie pomiary | długie pomiary techniką punktową |
| Próbki | ciała stałe: wielkość μg roztwory: $\sim 1 \text{ M}$ | ciała stałe: wielkość μg roztwory: 10^{-5} – 10^{-7} M | roztwory: 10^{-2} – 10^{-10} M | roztwory: $\sim 1 \text{ M}$ | ciała stałe o płaskiej powierzchni |
| Współczynnik depolaryzacji | 0–3/4 | 0– ∞ | – | – | – |

Zagadnienia

1. Wyjaśnij oddziaływanie promieniowania z oscylującymi cząsteczkami. Opis przejść pomiędzy poziomami energetycznymi towarzyszącymi rozpraszaniu ramanowskiemu.
2. Podaj wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej do badania struktury pierwszo- i drugorzędowej białek.
3. Omów rezonansową spektroskopię ramanowską w badaniach białek hemowych.
4. Opisz technikę SERS oraz jej zalety w stosunku do normalnego rozpraszania ramanowskiego.
5. Opisz badania aktywności optycznej związków biologicznych za pomocą spektroskopii ramanowskiej.

Literatura

- Barańska M., Malek K., Weselucha-Birczyńska A. Spektroskopia Rozproszenia Ramana W: *Wybrane metody spektroskopii i spektrometrii molekularnej w analizie strukturalnej*, K. Malek, L.M. Proniewicz (red.), Wydawnictwo Naukowe UJ, 2005, 47–67.
- Kitagawa T., Hirota S. *Raman spectroscopy of proteins*. W: *The Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chalmers ed.: J.M and Griffiths P.R., John Wiley & Sons, Chichester 2002.
- Twardowski J. *Biospektroskopia tom IV*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1990.