

# 衛星燒孔光譜研究 DNA 與蛋白質間的認知

將染料分子鏈接在特定 DNA 序列的五端，根據其衛星燒孔光譜的變化探討 DNA 與蛋白質間的認知機制。在凝血酵素與特定 DNA 序列的認知，以及酵母中 Cdc13p 酵母蛋白與其端粒序列的認知之實驗結果顯示：適當的 DNA 結構是蛋白質認知的重要因素。

張大釗

## 一、簡介

近年來，生物物理化學在自然科學的研發中日趨重要。舉凡在光合作用中電荷分離、電子傳遞到質子轉移，對於研發日光能量的儲存與運用是極重要的；蛋白質摺疊中氫鍵效應與疏水性 (hydrophobic) 作用對結構與功能之影響；DNA 分子結構與藥物分子或蛋白質的交互作用與其功能的相關性等，都與生物科技的發展息息相關，這些都是二十一世紀初極重要的研究方向。要對這些反應有深入的認識，就得回歸到基礎的研究：分子認知 (recognition)。分子認知是研究分子功能的基本課題，而分子結構當然與分子認知以及分子功能都有密切關係。本文將介紹兩組實驗：凝血酵素 (thrombin) 與特定 DNA 序列的認知，以及酵母中 Cdc13p 酵母蛋白與其 DNA 端粒 (telomere) 序列之

認知。實驗方法則是先將一染料分子 (bodipy) 鏈接在特定的 DNA 序列，根據染料分子的衛星燒孔光譜 (satellite hole spectroscopy) 在不同環境中之變化，探討 DNA 與蛋白質的認知機制。

## 二、DNA - 蛋白質的認知

凝血酵素在血液凝結中可能引起冠狀動脈栓塞與腦溢血型中風等疾病<sup>(1)</sup>，因此如何抑制血液凝結，減低血管栓塞的形成，成為今日重要的研究主題。Bock 研究群<sup>(2)</sup> 首先在一系列的 DNA 中，發現凝血酵素可以認知特定之單股去氧核糖核酸序列 (d(G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>), aptamer, 文中以 Apt 代表之)，經由耦合造成血液凝結時間的延長，其反應機制可能與 Apt 的特殊結構有關。經由 NMR<sup>(3)</sup> 與 X-ray<sup>(4)</sup> 的研究，發現 Apt 具有非常穩定的單分子四股結構 (如圖 1(a))；包含由一個 TGT 與兩個 TT 所形成的圈環相連接的兩個 G-quartet。有趣的是，在 DNA 的端粒中也會具有類似的四股結構，

---

張大釗先生為美國愛荷華州立大學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所研究員。

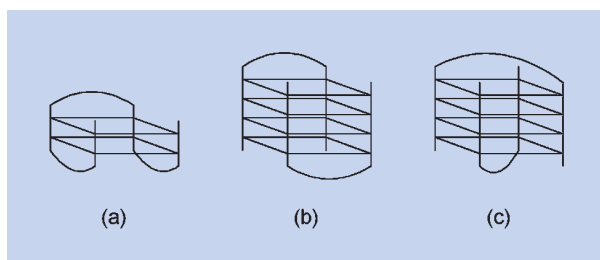


圖 1. 四股結構與不同結構的四股異構物。

例如在 *Oxytricha* 的 DNA 端粒重複序列  $d(G_4T_4)$ 。已知  $d(G_4T_4G_4)$  序列 (在文中以 *Oxy* 代表之)，可以經由其髮夾式雙分子聚合成不同結構的四股異構物 (如圖 1(b) 與(c))<sup>(5,6)</sup>。為了比較 Apt、四股、雙股等不同的去氧核苷酸序列與凝血酵素之作用，另一組單分子髮夾式雙股結構： $d(GCGCT_4GCGC)$  (在本文中以 *HD* 代表之) 也被用來探討 Apt 與凝血酵素的認知機制<sup>(7)</sup>。

為了進一步探討 DNA 結構對於蛋白質認知的重要，我們研究酵母 (yeast) 的端粒序列 ( $d(TGTGTG_3TGTG_2TG)$ ，文中以 *YT* 代表之) 與 Cdc13p 酵母蛋白之認知作用<sup>(8,9)</sup>。首先將 bodipy 分子鍵接在 *YT* 序列的五端，由於 bodipy 分子與 *YT* 序列的耦合作用，干擾了 *YT* 序列的結構<sup>(10)</sup>，因此有可能影響 Cdc13p 與 *YT* 的認知作用。本文中，我們將介紹衛星燒孔光譜作為偵測方法來探討 DNA 與蛋白質的認知機制。

### 三、衛星燒孔光譜

染料分子與溶劑的作用一般可由紫外—可見光的吸收光譜作初步的判定。在不同的溶劑環境中，可經由譜線的位移、頻寬及強度的改變而探討其間交互作用。但是吸收光譜經常受限於非均相增寬 (inhomogeneous broadening)，以致其實用性降低。持久性燒孔光譜<sup>(11,12)</sup> 是一種消除譜線非均相增寬的方法。在低溫下，利用頻寬小於吸收譜線頻寬的雷射光激發樣品，使溶質產生光反應，造成與雷射光頻率相同躍遷能階的分子減少，致使吸收光譜上產生凹陷，稱之為燒孔光譜。燒孔的頻寬取決於雷射光的頻寬與吸收譜線的均相增寬。通常燒孔的解析

度要比吸收光譜好上約千倍。有關持久性燒孔光譜的實驗方法與應用，可以參考筆者先前的介紹性論文<sup>(13)</sup>，以及這個領域傑出學者的回顧性論文<sup>(14-18)</sup>。

經由燒孔方式所提供的激發態振動光譜是在 1977 年由兩組研究群所提出<sup>(19,20)</sup>。當雷射光的波長被調至非均相增寬的藍邊 (高能階)，該雷射波長可以與數個甚至數十個不同的電子激發態的振動能階相吻合。經由在高能階的振動能量的迅速消散，造成在吸收光譜的紅邊 (低能階) 產生一系列的非共振 (衛星) 燒孔譜線。衛星燒孔譜線的波長與雷射波長的差值提供了符合 Franck-Condon 原理之電子激發態的振動能階。相對之，每一條衛星燒孔譜線都可被視為其共振燒孔譜線的電子躍遷。因此衛星燒孔譜線的強度可大幅提昇<sup>(21,22)</sup>。很可惜的，這項特質在過去並未被重視，主要是因為長久以來，光譜燒孔的方法過於著重在頻域光碟的發展。筆者近年來致力於將衛星燒孔光譜發展成為研究激發態分子振動的普遍光譜方法。

衛星燒孔光譜對於研究分子在激發態的振動光譜是非常有用的，不僅可以提供互補於紅外線和拉曼共振光譜的資訊，且由於其具有選位能力與高解析度，更適用於研究非晶相固態中主客分子間耦合作用及其反應機制<sup>(21,22)</sup>。近年來，我們研發衛星燒孔光譜的獨特性，首次將衛星燒孔光譜應用在研究染料分子中官能基與溶劑分子間的耦合作用<sup>(23-25)</sup>。在 9-aminoacridine 與 thionin 的幾何異構物之研究中，明確地強調衛星燒孔光譜的獨特性。特別是互變異構物的結構差異，可經由特定振動能階的位移，反映在衛星燒孔光譜而得到肯定的辨識。另外由於燒孔光譜特有的累積性，可以用來鑑定光反應的產物，進而研究光化學的反應機制。結果顯示氫鍵效應在激發態電子轉移帶動質子交換過程中扮演了重要的角色。

由於衛星燒孔光譜的高解析度與靈敏度，可以用來辨識結構的差異。我們是國際上第一個將衛星燒孔光譜應用於研究染料分子與 DNA 的交互作用的研究團隊<sup>(26,27)</sup>，特別是耦合模式與構形變化的探討。由於染料分子在不同 DNA 序列的作用下，可能會產生不同的衛星燒孔光譜，而這些特定振動模的改變，可以提供耦合位置與其結構的資訊<sup>(28-32)</sup>。

不同的分子可經由嵌入 (intercalation)、溝槽 (groove binding)、共價鍵接 (covalent binding) 與 DNA 作用。我們的實驗結果顯示：對於嵌入在 DNA 序列中的 9-aminoacridine 與 thionin，衛星燒孔強度均大幅下降；但是譜線漂移則不明顯<sup>(28,29)</sup>。至於染料 (DODC<sup>+</sup>) 在溝槽中，則觀察到少數低頻的振動譜線之漂移<sup>(30)</sup>。在研究 bodipy 分子鍵接 d(G<sub>10</sub>) 與 d(T<sub>10</sub>) 核甘酸鏈的實驗中，衛星燒孔光譜顯出極大的差異<sup>(31)</sup>。前者僅在燒孔強度上有明顯的減弱，後者在某些特定的振動模上有大幅的變化。實驗結果說明衛星燒孔的變化可以提供 bodipy 分子與鍵接核甘酸鏈的耦合位置。本文中，我們將利用衛星燒孔的變化來探討 DNA 與蛋白質認知的機制。

#### 四、實驗結果

由於本文的重點是利用鍵接 bodipy 分子在不同的單股核甘酸序列，經由其衛星燒孔光譜的變化來研究 DNA - 蛋白質的認知機制。Bodipy-DNA 序列之複合物的配製與純化可參考文獻<sup>(27,32)</sup>。使用 HPLC (Shimadzu, SCL-6A) 配備二極體排列 (diode array) 偵測系統 (SPD-M10A) 來分離樣品的混合液。利用在 260 nm 與 590 nm 的光吸收相對強度，鑑定與純化經由 HPLC 在不同時間收集的溶液。我們例舉 bodipy-d(T<sub>10</sub>) 之化學結構，如圖 2 所示。

為了說明衛星燒孔光譜的優越性，以及強調 bodipy 分子中活性較強的振動模，圖 3 是 bodipy、bodipy-d(T<sub>10</sub>) 和 bodipy-d(G<sub>10</sub>) 溶在甘油與水的溶劑

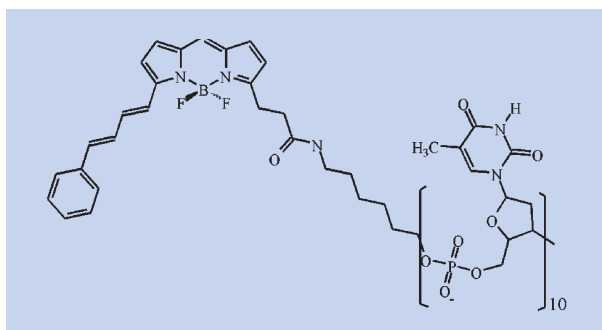


圖 2. Bodipy-d(T<sub>10</sub>) 的化學結構。

(體積比 5 : 4) 中之衛星燒孔光譜。我們將樣品由室溫直接放入液態氫 (約 4.2 K)，實驗溫度約在 6 K。我們用一自組的同步激發染料雷射進行燒孔實驗。光子能量約 2.5 μJ，在波長為 580 nm 照射 10 分鐘。比較圖 3 中的 bodipy 與 bodipy-d(T<sub>10</sub>) 之衛星燒孔光譜，觀察到有非常明顯的譜線變化，特別是頻率為 590 cm<sup>-1</sup> 的衛星燒孔在 bodipy-d(T<sub>10</sub>) 的光譜中完全消失。經由振動模的理論計算與相關分子的實驗結果對應比較分析<sup>(31)</sup>，這 590 cm<sup>-1</sup> 的衛星燒孔是與 bodipy 中 N<sub>2</sub>BF<sub>2</sub> 之振動模的運動有關。而這個振動模的變化肯定與 d(T<sub>10</sub>) 之耦合作用有關。但是在 bodipy-d(G<sub>10</sub>) 之衛星燒孔光譜中，除了譜線的強度降低些，就沒有明顯的變化。由於單鏈的 d(G<sub>10</sub>) 可以經由 Hoogsteen 方式的氫鍵形成雙股，進而可形成 G-quartet 的四股較穩定結構<sup>(33)</sup>。我們預測 bodipy 可能在 d(G<sub>10</sub>) 之外<sup>(32)</sup>，因此光譜中沒有呈現 bodipy 與 d(G<sub>10</sub>) 之特定耦合。至於在 bodipy-d(T<sub>10</sub>) 中，由於 d(T<sub>10</sub>) 容易形成捲曲，進而 bodipy 之芳香環會與 d(T<sub>10</sub>) 耦合作用形成圈環 (loop)。所以在光譜中，與耦合位置相關的譜線會有所改變。明顯的，衛星燒孔光譜可被用來鑑定染料分子對 DNA 的耦合位置與其染料—核甘酸鏈複合體結構之變化。

我們進而將 bodipy 鍵接在 Apt 序列的五端。圖 4 是 bodipy/thrombin、bodipy-Apt 與 bodipy-Apt/thrombin 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜。其

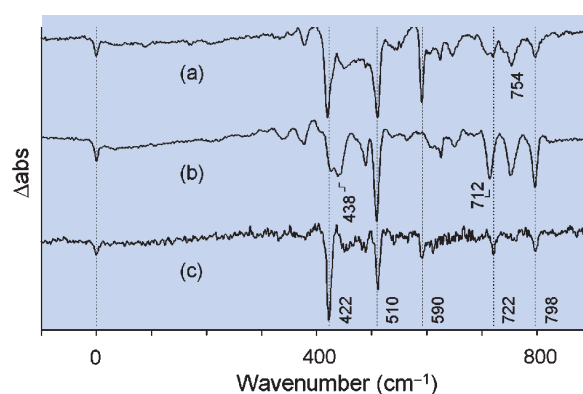


圖 3. (a) bodipy、(b) bodipy-d(T<sub>10</sub>)、(c) bodipy-d(G<sub>10</sub>) 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜。部分衛星燒孔由激發態振動能階所標示。

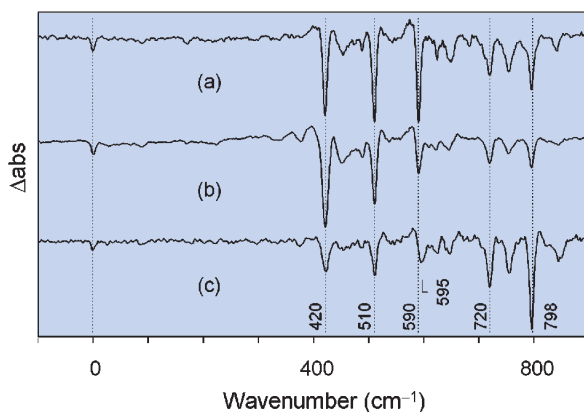


圖 4. (a) bodipy/thrombin、(b) bodipy-Apt、(c) bodipy-Apt/thrombin 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜。

中前二者的衛星燒孔光譜相似，並類似與 bodipy 之光譜。顯示 bodipy 並未受到凝血酵素的干擾，同時 bodipy 鏈接在 Apt 序列，似乎也未受到 Apt 明顯的影響。但是在 bodipy-Apt/thrombin 的光譜中，發現原先在  $590\text{ cm}^{-1}$  的衛星燒孔漂移到  $595\text{ cm}^{-1}$ 。由於 bodipy 沒有受到 Apt 之影響，換言之，Apt 的結構也可能沒有因為 bodipy 而有明顯的變化，因此凝血酵素仍然可以認知 Apt。由於 bodipy 具疏水性，經由凝血酵素對 Apt 之認知作用，使得鏈接在 Apt 上的 bodipy 會傾向凝血酵素，進而產生耦合作用。根據 bodipy/thrombin 之光譜，並未發現  $590\text{ cm}^{-1}$  衛星燒孔的漂移。我們相信雖然  $590\text{ cm}^{-1}$  衛星燒孔漂移到  $595\text{ cm}^{-1}$  是由於  $\text{N}_3\text{BF}_2$  的振動模受到凝血酵素之影響所造成，但主因卻是由於凝血酵素對 Apt 之認知作用所誘導的<sup>(7)</sup>。

已經知道 Apt 可以形成單分子四股結構。為了探討凝血酵素對 Apt 之認知機制是由於序列或是結構，我們進而比較 bodipy-HD 與 bodipy-Oxy 在凝血酵素中之衛星燒孔光譜。這是因為前者只能形成單分子髮夾式的雙股結構<sup>(34)</sup>，後者卻能形成雙分子髮夾式四股結構。圖 5 是 bodipy-Oxy、bodipy-Oxy/thrombin、bodipy-HD 與 bodipy-HD/thrombin 之衛星燒孔光譜。結果顯示： $590\text{ cm}^{-1}$  的衛星燒孔在 bodipy-Oxy 光譜中沒有明顯的變化；但是當其在凝血酵素中則漂移至  $595\text{ cm}^{-1}$ 。這個光譜現象和

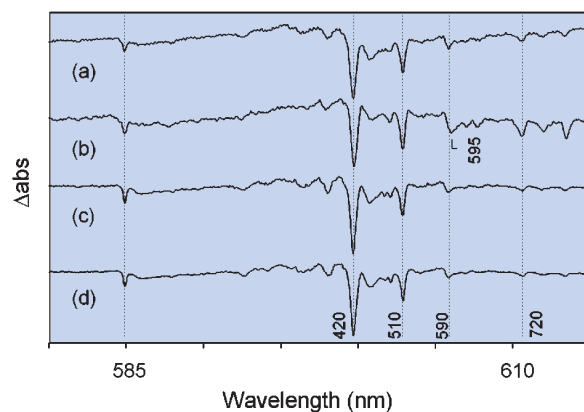


圖 5. (a) bodipy-Oxy、(b) bodipy-Oxy/thrombin、(c) bodipy-HD、(d) bodipy-HD/thrombin 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜。

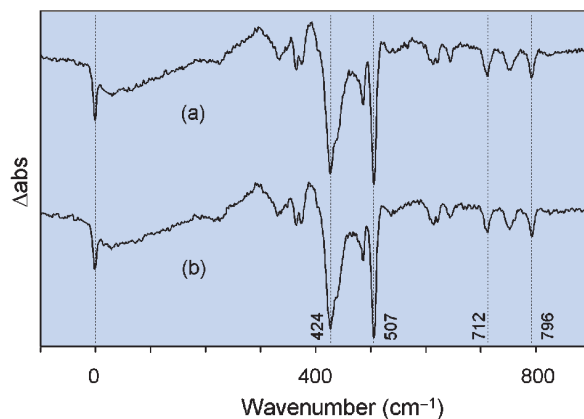


圖 6. (a) bodipy-YT 與 (b) bodipy-YT/Cdc13p 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜。

bodipy-Apt 及其在凝血酵素中類似。但是 bodipy-HD 之衛星燒孔光譜與其在凝血酵素中的光譜則沒有明顯差異。說明 G-quartet 的特殊結構，極可能是 Apt 與 Oxy 被凝血酵素認知的主要因素<sup>(7)</sup>。我們希望經由認知的特異性，可以提供藥物設計的資訊，或許有助於控制血液凝結之病症。

由於在實驗中發現凝血酵素對 Apt 的認知與結構有密切關係，我們選擇研究另一系統：酵母 YT 序列與 Cdc13p 酵母蛋白之認知作用<sup>(7,8)</sup>。圖 6 是 bodipy-YT 與 bodipy-YT/Cdc13p 在甘油水溶劑中之衛星燒孔光譜，顯示 bodipy-YT 與 bodipy-d(T<sub>10</sub>) 之

衛星燒孔光譜相似。說明當 bodipy 共價鍵接 YT 時，bodipy 之芳香環會與 YT 耦合形成圈環。進而可能改變 YT 原來的結構。我們希望經由 YT 結構的變化，判別 Cdc13p 認知 YT 的機制是取決於序列或結構。在圖 6 中，bodipy-YT 之衛星燒孔光譜與其在 Cdc13p 中的光譜沒有明顯差異。有可能是 Cdc13p 喪失了認知 YT 之能力。我們進而在電泳的實驗中，證實 Cdc13p 失去了對 bodipy-YT 認知的能力<sup>(10)</sup>。根據兩組 DNA—蛋白質的認知作用之實驗結果，我們相信適當的 DNA 結構是蛋白質認知的重要因素。

## 五、結論

我們的實驗結果說明：將一高靈敏度的染料分子鍵接在特定 DNA 序列，經由其衛星燒孔的變化，可以提供一個有效的實驗方法來鑑定 DNA - 蛋白質的認知作用。事實上，只要有一個夠靈敏的振動模 (如  $N_2BF_2$  of bodipy) 就足以作為偵測系統的探針。實驗結果顯示：染料分子鍵接在 DNA 序列，有可能會直接干擾序列之結構，進而影響序列與蛋白質之認知。另一方面，若是染料分子與其鍵接序列沒有明顯的作用，則染料分子可能會因蛋白質認知鍵接序列而靠近蛋白質，進而產生耦合作用，造成特定衛星燒孔的譜線漂移。結果顯示，適當的 DNA 結構是蛋白質認知的重要因素。由於衛星燒孔的實驗方法具有選位能力與高靈敏度，因此極有潛力發展成為一些基因疾病的診斷方法。

DNA 端粒序列在生命科學上有極重要的地位。DNA 端粒是由重複的 G-rich 序列所組成。而四股 G-rich 序列可形成特殊的結構，四個 G-base 可形成一環狀的平面結構：G-quartet。當 DNA 尾端未形成 G-quartet 時，將導致染色體的不穩定。在 DNA 複製過程中，其尾端的序列需要有特定的端粒酵素 (telomerase) 來重建。有趣的是：在正常細胞中很少發現端粒酵素。相反的，在幾乎所有的癌細胞中都有端粒酵素。科學家也發現當尾端的 G-rich 變短時，與老化有密切的關係。因此研究 DNA 端粒成為今日重要的課題之一。我們希望藉由不同染料分子或藥物分子對特定結構的 DNA 端

粒與 DNA 結合蛋白酵素之認知，探討分子結構與耦合位置的相關性，進而研究耦合作用對藥物功能與 DNA 結構之影響。這將是衛星燒孔光譜可以發展的另一方向。

## 誌謝

首先要感謝中央研究院與國科會對系列研究工作的支持。謝謝白果能教授 (中研院生醫所) 在合成染料 - DNA 複合物的指導，張文祥博士 (中研院生醫所) 在凝血酵素研究工作的合作，林敬哲教授與林以千小姐 (陽明大學) 在酵母酵素研究工作的合作。特別要感謝作者實驗室參與此系列研究的同仁：林凱君、江建志、鄭鄧言、郭清通、楊屹沛、黃維君。

## 參考文獻

1. J. W. II Fenton, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **370**, 468 (1981).
2. L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole, *Nature*, **355**, 564 (1992).
3. R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, and J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3745 (1993).
4. K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, and A. Tulinsky, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17651 (1993).
5. F. W. Smith and J. Feigon, *Nature*, **356**, 164 (1992).
6. C. K. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, and A. Rich, *Nature*, **356**, 126 (1992).
7. T.-C. Chang, K. C. Lin, C. C. Chiang, Y. P. Yang, and W. S. Chang, *ChemBioChem*, **3**, 197 (2000).
8. J.-J. Lin and V. A. Zakian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13760 (1996).
9. M. J. Wang *et al*, *Nucleic Acids Res.*, in press (2000).
10. T.-C. Chang, J.-J. Lin, K. C. Lin, Y. C. Lin, W. C. Huang, Y. P. Yang, and J. Y. Cheng, *Proceedings of 3rd OPCA*, in press (2000).
11. A. A. Gorokhovskii, R. K. Kaarli, and L. A. Rebane, *JETP Lett.*, **20**, 216 (1974).
12. B. M. Kharlamov, R. I. Personov, and L. A. Bykovskaya, *Opt. Commun.*, **12**, 191 (1974).
13. 江建志, 張大釗, *科儀新知*, **15** (5), 5 (1994); **16** (3), 71 (1994); **18** (2), 51 (1996).
14. W. E. Moerner, Ed., *Topics in Current Physics, Persistent Spectral Hole Burning: Science and Applications*, New York: Springer-Verlag (1988).
15. J. Friedrich and D. Haarer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 113 (1984)..

16. S. Volker, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **40**, 499 (1989).
17. L. R. Narasimhan, K. A. Littau, D. W. Pack, Y. S. Bai, A. Elschner, and M. D. Fayer, *Chem. Rev.*, **90**, 439 (1990).
18. R. Jankowiak, J. M. Hayes, and G. J. Small, *Chem. Rev.*, **93**, 1471 (1993).
19. A. A. Gorokhovskii and J. Kikas, *Opt. Commun.*, **21**, 272 (1977).
20. B. M. Kharlamov, L. A. Bykovskaya, and R. I. Personov, *Chem. Phys. Lett.*, **50**, 407 (1977).
21. T.-C. Chang, C. C. Chiang, and J. Y. Cheng, *Trends in Chemical Physics*, **4**, 141 (1996).
22. C. C. Chiang, J. Y. Cheng, and T.-C. Chang, *Proc. Natl. Sci. Count. ROC (A)*, **23**, 679 (1999).
23. C. C. Chiang, B. C. Hwang, J. Yu, J. Y. Cheng, C. Y. Mou, S. H. Lin, and T.-C. Chang, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **93**, 1297 (1997).
24. C. C. Chiang, C. Y. Mou, and T.-C. Chang, *Chem. Phys. Lett.*, **273**, 153 (1997).
25. K. Weng, C. C. Chiang, J. Y. Cheng, and T.-C. Chang, *Chem. Phys. Lett.*, **302**, 347 (1999).
26. T.-C. Chang, C. C. Chiang, and K. Peck, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7576 (1995).
27. T.-C. Chang, C. C. Chiang, and K. Peck, in *OSA Trends in Optical and Photonics on Biomedical Optical Spectroscopy and Diagnostics*, Vol. 3, E. Sevick-Muraca and D. Benaron, Eds.; Optical Society of America, Washington, 245 (1996).
28. J. Y. Cheng, C. C. Chiang, Y. R. Cheng, H. S. Chen, L. J. Lin, and T.-C. Chang, *J. Chin. Chem. Soc.*, **44**, 97 (1997).
29. Y. P. Yang, K. C. Weng, C. S. Yan, C. C. Chiang, and T.-C. Chang, *J. Photoscience*, **6**, 153 (1999).
30. J. Y. Cheng, S. H. Lin, and T.-C. Chang, *J. Phys. Chem.*, **B102**, 5542 (1998).
31. C. T. Kuo, C. C. Chiang, J. Yu, K. Peck, and T.-C. Chang, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 1989 (1998).
32. T.-C. Chang, C. T. Kuo, C. C. Chiang, J. Y. Cheng, C. S. Yan, and K. Peck, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1**, 3783 (1999).
33. M. Gellert, M. N. Lipsett, and D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 2013 (1962).
34. R. Chattopadhyaya, S. Ikuta, K. Grzeskowiak, and R. E. Dickerson, *Nature*, **334**, 175 (1988).