

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 Smekala 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.

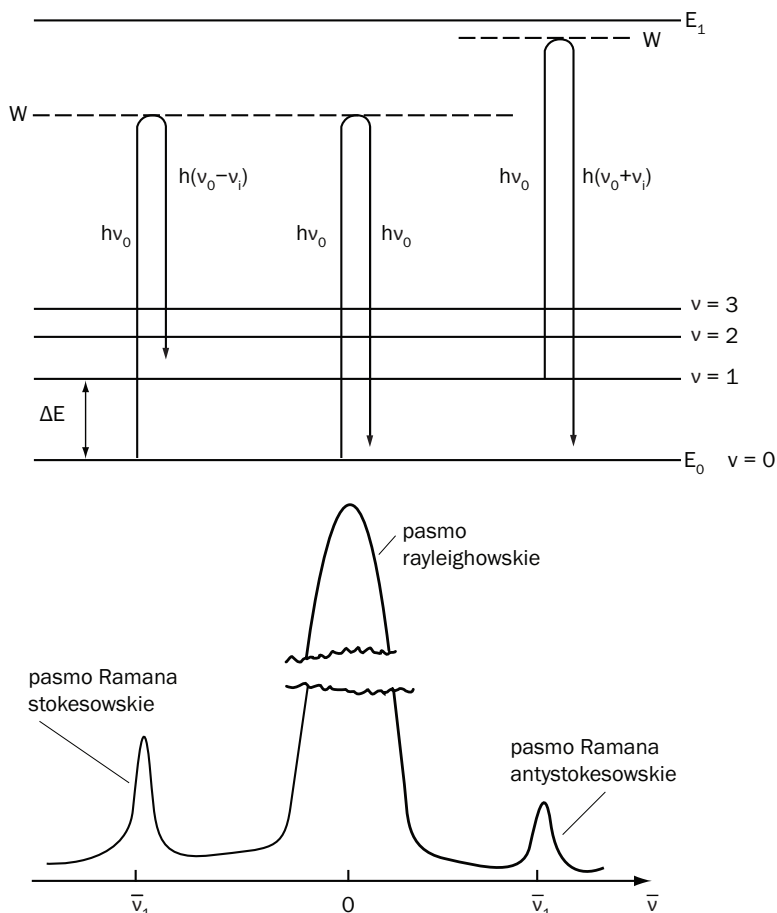
U podstaw spektroskopii ramanowskiej leży wzbudzenie rotacji lub oscylacji cząsteczki poprzez oświetlenie jej światłem (ν_0) z zakresu ultrafioletowego, widzialnego lub bliskiej podczerwieni. W wyniku oddziaływania cząsteczka-fala elektromagnetyczna obserwuje się światło rozproszone o tej samej energii (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:

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

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:

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

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:

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

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 rozpraszanego 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.

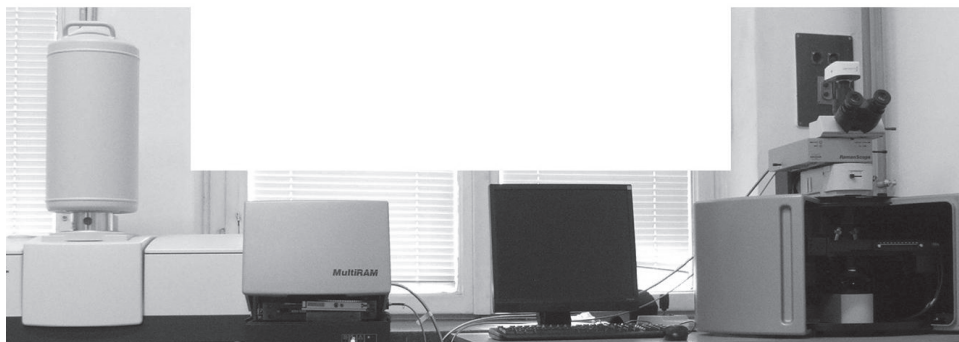
10.2. Aparatura

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 najsłabsze 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 najsłabsze 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 przesuwanym 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:

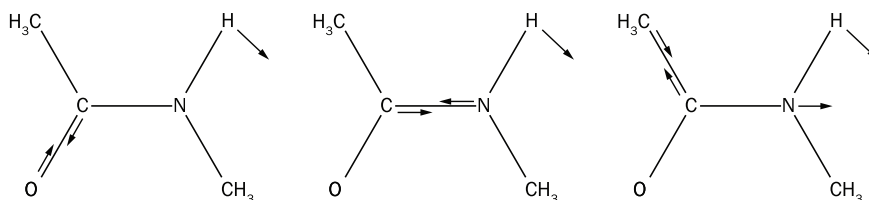
- amid I – drganie rozciągające C=O i wahadłowe N–H
- amid II – drganie rozciągające C–N i zginające N–H
- amid III – drganie rozciągające C–N i deformacyjne N–H

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.

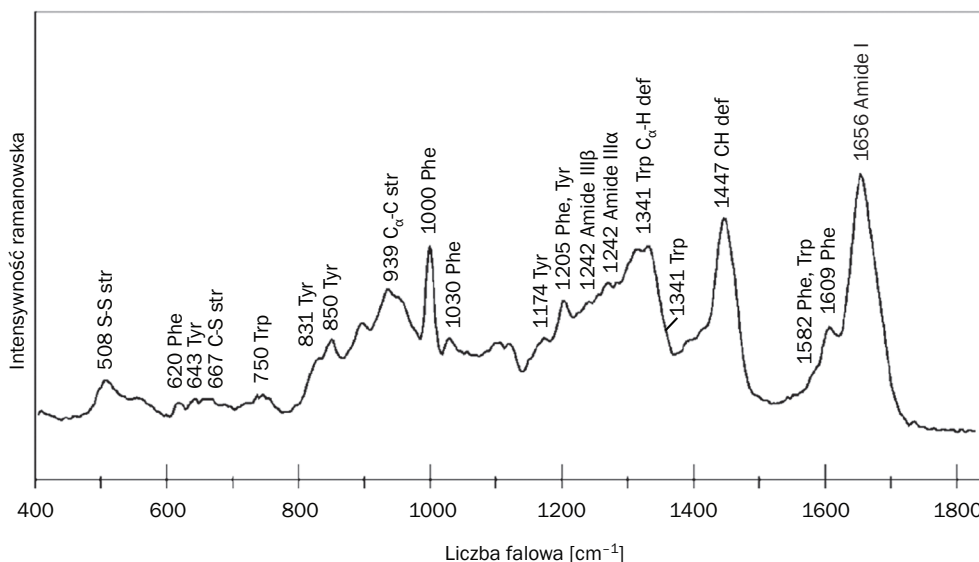
Określenie struktury II-rzędowej za pomocą częstości pasm nie jest tak dokładne, jak za pomocą krystalografii lub pomiarów CD, ale pozwala wyznaczyć ogólną tendencję. Tworzenie wiązań wodorowych $C=O \cdots H-N$ przesuwa drganie amidowe I w dół, a amidowe III – w górę skali częstości.

Dla poliglicyny mającej strukturę β wynoszą one odpowiednio: drganie amid I: $1685\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, 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 przesuwają 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 histydyny w widmie ramanowskim są wskaźnikiem protonacji jej reszty aminokwasowej. Przy 1408 cm^{-1} w D_2O są zauważalne silne i wąskie pasma dla sprotonowanej histydyny. Pasma to przypisuje się drganiom symetrycznym, rozciągającym N1-C2-N3 i zginającym N-D .

Drganie rozciągające $\text{C4}=\text{C5}$ 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: $\text{N}\pi$ czy $\text{N}\tau$. 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.

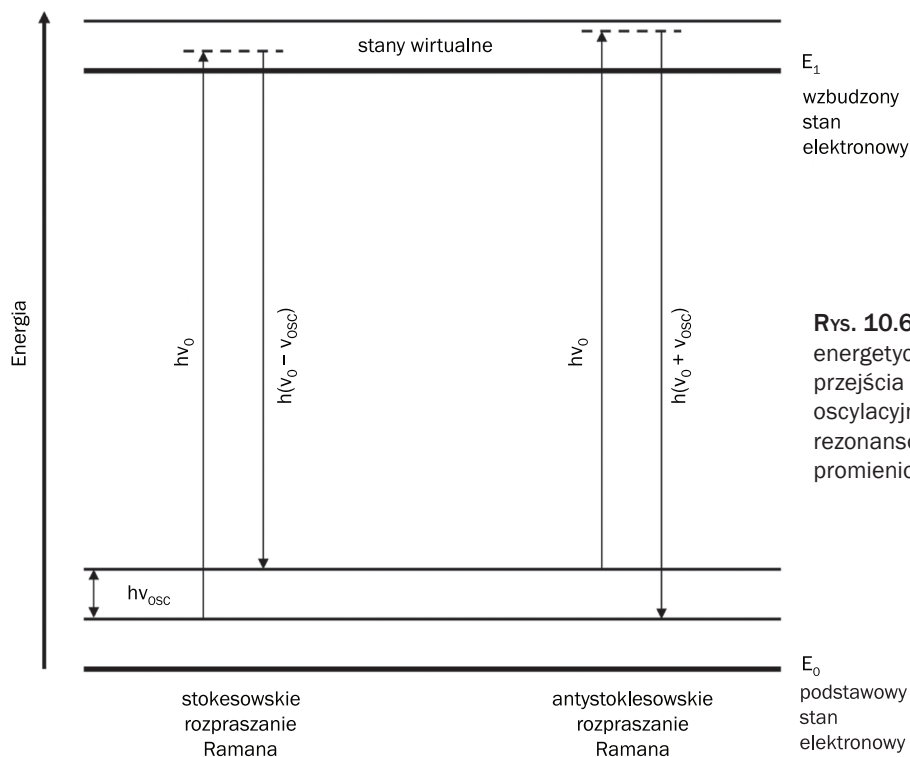
10.4. Specjalne techniki ramanowskie w proteomice i metabolomice

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 towarzyszącymi 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 szczególnie 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 mogą 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 częstość 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.