

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова
Физический факультет
Кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества

Работа студентки 204М группы
Рубцовой Ольги Владимировны

**Исследование структуры гемоглобина методом комбинационного
рассеяния света**

Научный руководитель

к. ф. – м. н., м.н. с.

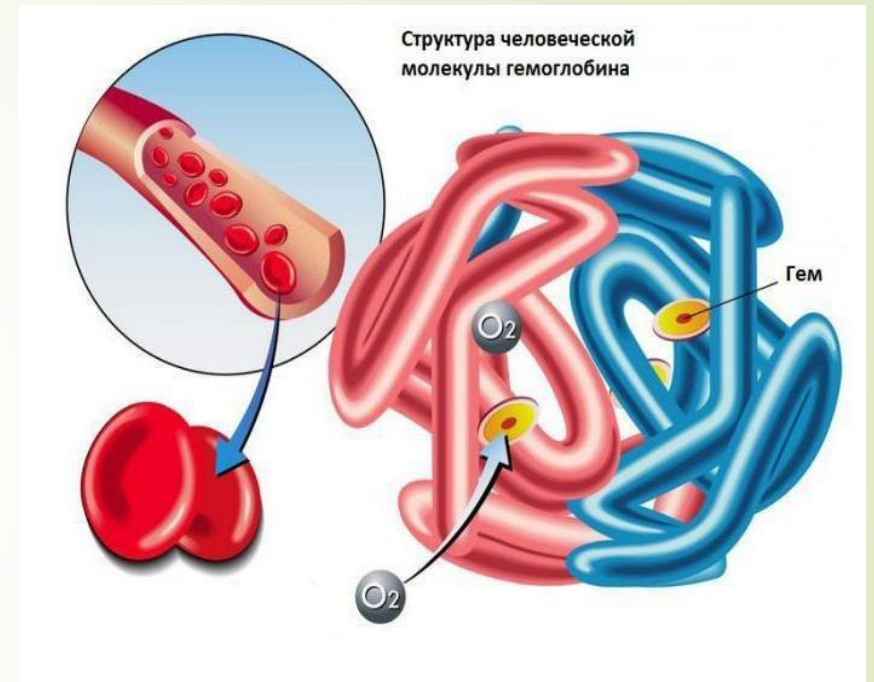
В. В. Гибизова

Москва
2020

➤ **Актуальность:** исследование структуры белка – одна из важнейших задач при изучении биологических молекул, поскольку функциональная активность белков связана с их структурой. С помощью данных о структуре белка можно создавать лекарственные препараты направленного действия с заранее известной активностью, а также синтезировать новые химические препараты.

➤ Методы лазерной спектроскопии позволяют получать информацию о структуре и подвижности функциональных групп биомолекул.

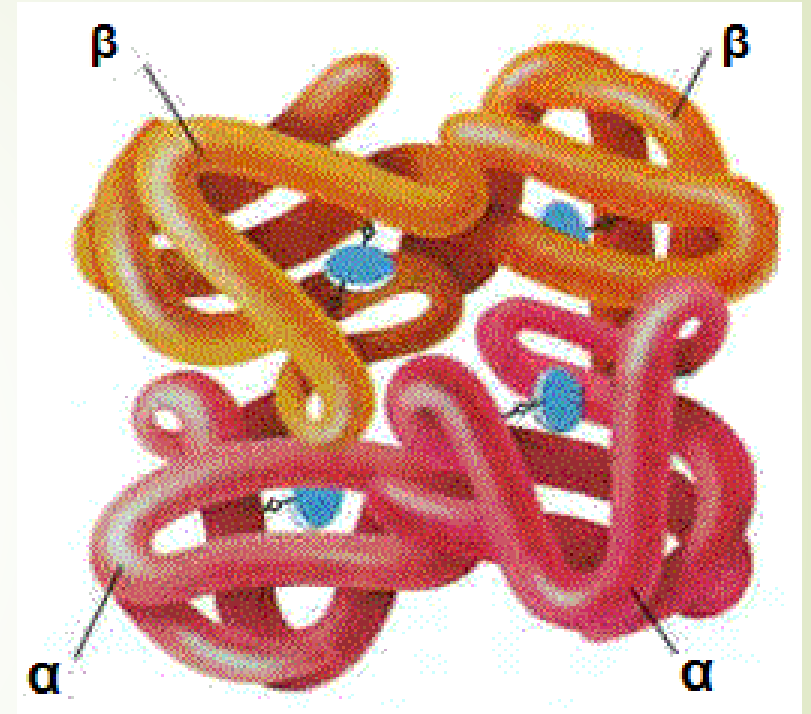
➤ **Цель** : изучение особенностей комбинационного рассеяния света (КР) в чистых растворах гемоглобина и в растворах гемоглобина, содержащих соль хлорида железа (III).



Структура человеческой молекулы гемоглобина [1]

Гемоглобин

- ▶ Гемоглобин (Hb) – глобулярный белок. Относится к сложным белкам хромопротеидам. Hb составляет 35% от общей массы эритроцита.
- ▶ В состав ядра гема входит ион Fe^{2+} .
- ▶ Молекулярная масса: 64,5 – 68 кДа.
- ▶ Радиус: 6 нм.
- ▶ Количество Hb в крови у мужчин составляет 13–170 г/л (8,56–10,7 ммоль/л), у женщин несколько меньше (на 10 %), чем у мужчин – 120–150 г/л (7,5–9,36 ммоль/л).
- ▶ В ходе работы использовался гемоглобин человека H7379-1G фирмы Sigma.



Четвертичная структура гемоглобина [2]

Хлорид железа (III)

- Хлорное железо FeCl_3 — средняя соль трехвалентного железа и соляной кислоты.
- Железо в виде солей является основным источником поступления железа в организм, особенно при его пониженном содержании — анемии.
- Но и избыточное железо откладывается в тканях, образуется соединение трехвалентного железа с белками, но уже в виде нерастворимого в воде комплекса — гемосидерина.
- Его накопление расстраивает функции тканей и органов и приводит к развитию заболевания — гемосидероза.



Метод комбинационного рассеяния

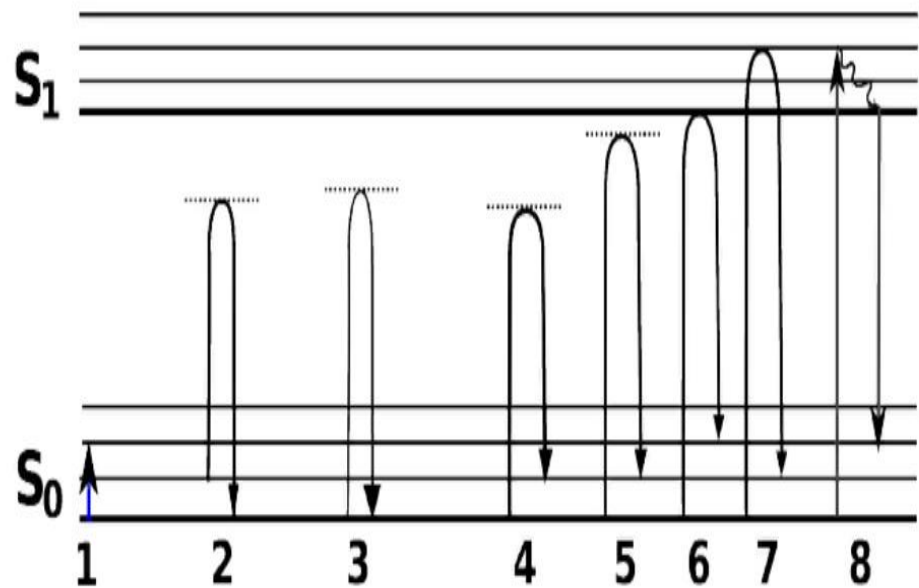


Рисунок 1. Схема переходов между колебательными подуровнями и электронными уровнями молекулы

- Комбинационное рассеяние света (КР) – это рассеяние света веществом, сопровождающееся изменением частоты рассеиваемого света. В основе метода лежит взаимодействие монохроматического излучения с веществом.
- В результате наблюдается переход молекулы на некий виртуальный уровень m с исходного уровня n (рис.1). При обычном, релеевском, рассеянии молекула возвращается на исходный энергетический уровень (переход 3). При комбинационном рассеянии молекула переходит в другое колебательное состояние i , обладающее иной энергией (переход 2, 4-7).

- КР спектроскопия используется для анализа пептидной структуры.
- Рамановская спектроскопическая характеристика может быть применена к белкам в различных состояниях: водный (разбавленный) раствор (имеет низкую интенсивность в спектрах Рамана), аморфные агрегаты, твердые частицы и кристаллы.



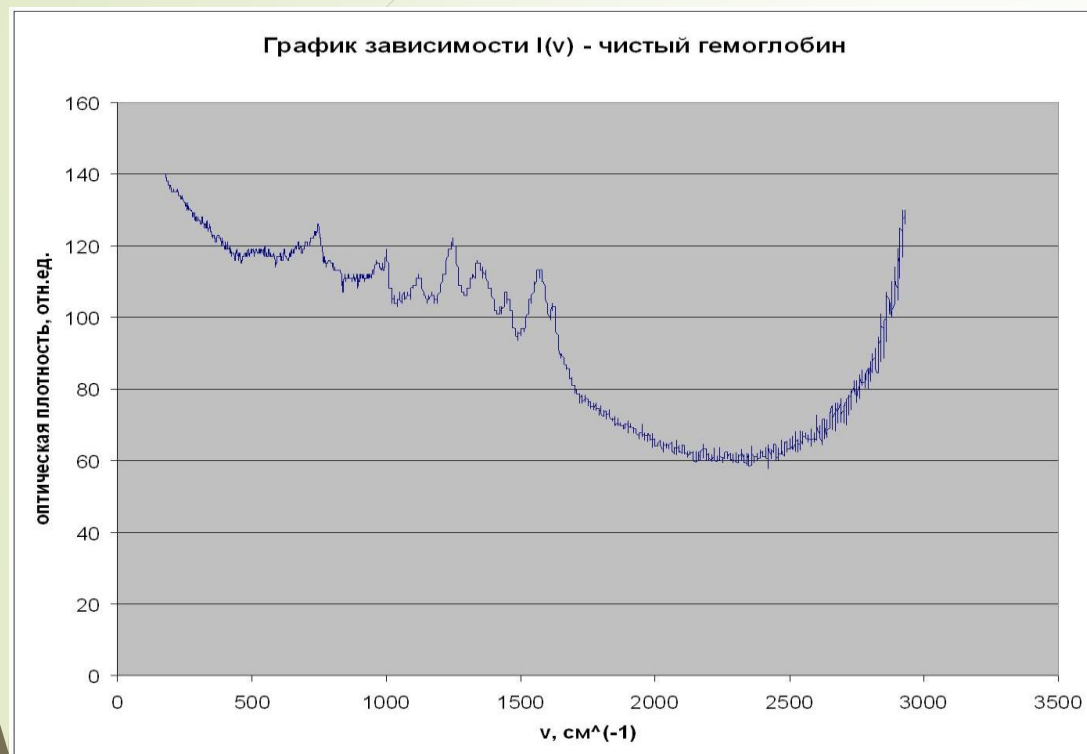
Методом КР были исследованы колебательные и вращательные состояния молекул белка Нв.

Спектр Нв представляет собой совокупность полос, вызванных нормальными колебаниями связей в гемопорфирине



Экспериментальная установка: КР-микроскоп DXR Raman Microscope

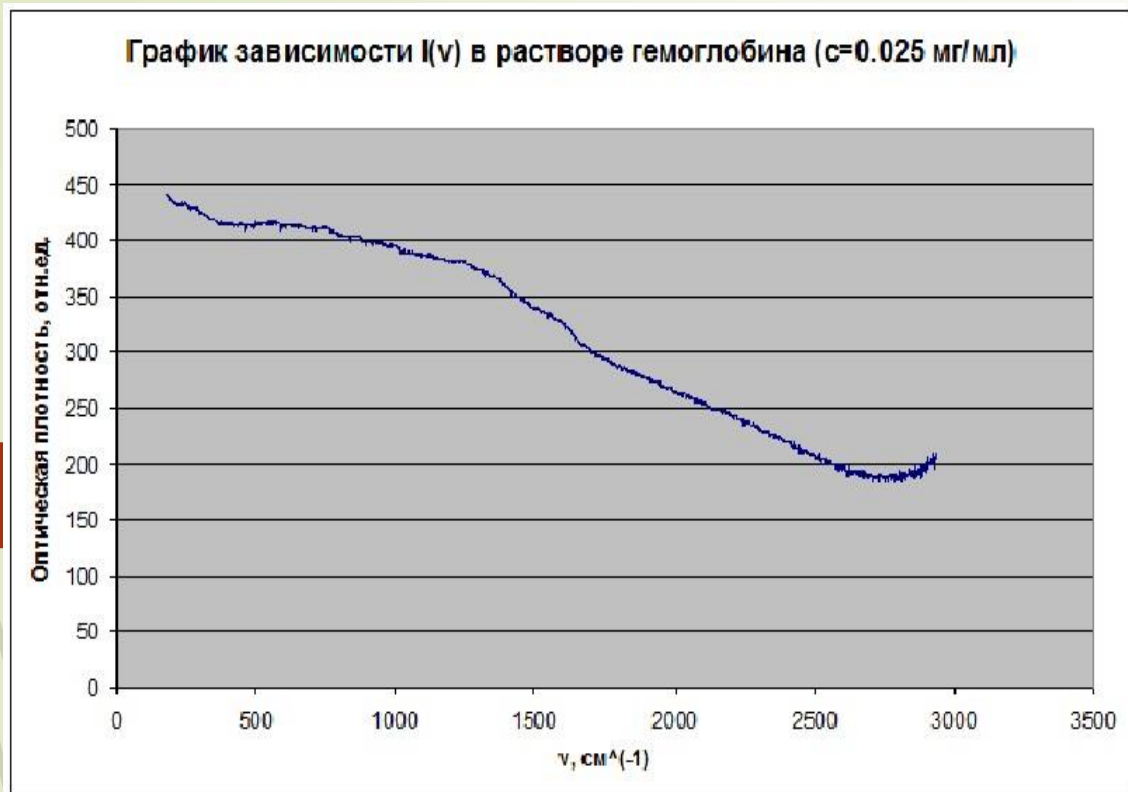
Экспериментальные результаты



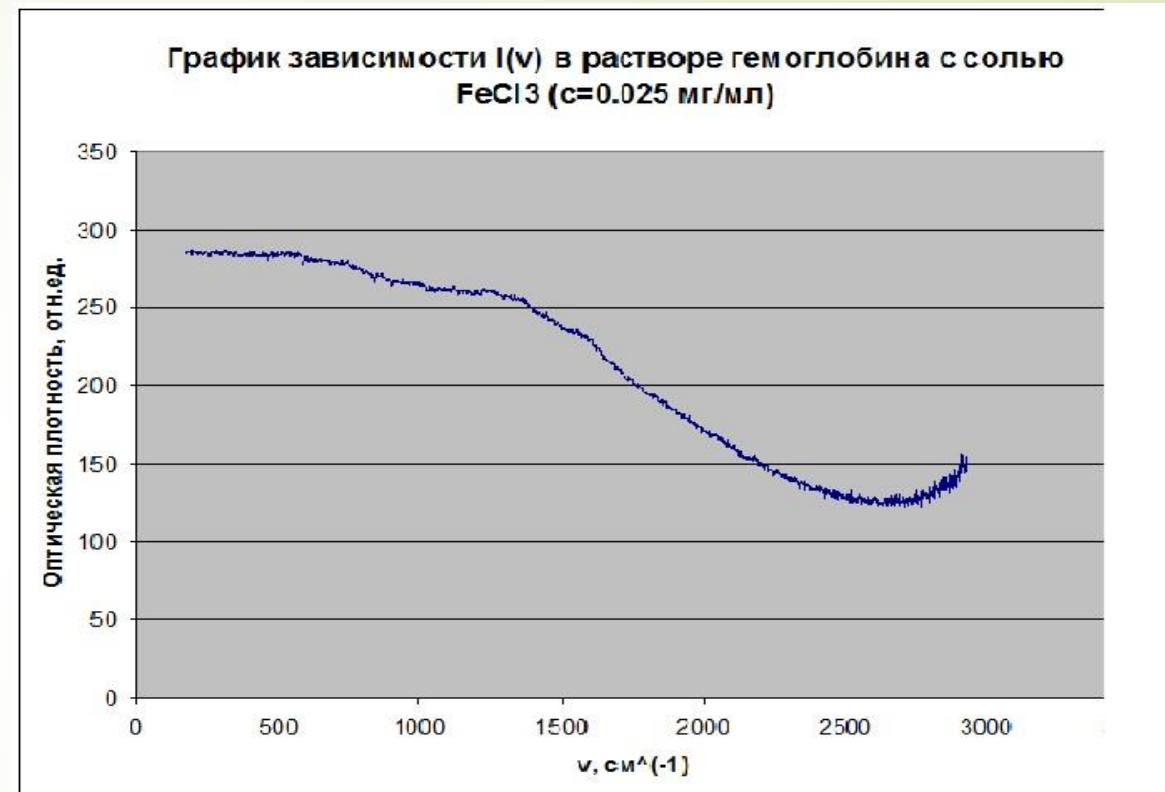
Спектр КР сухого гемоглобина



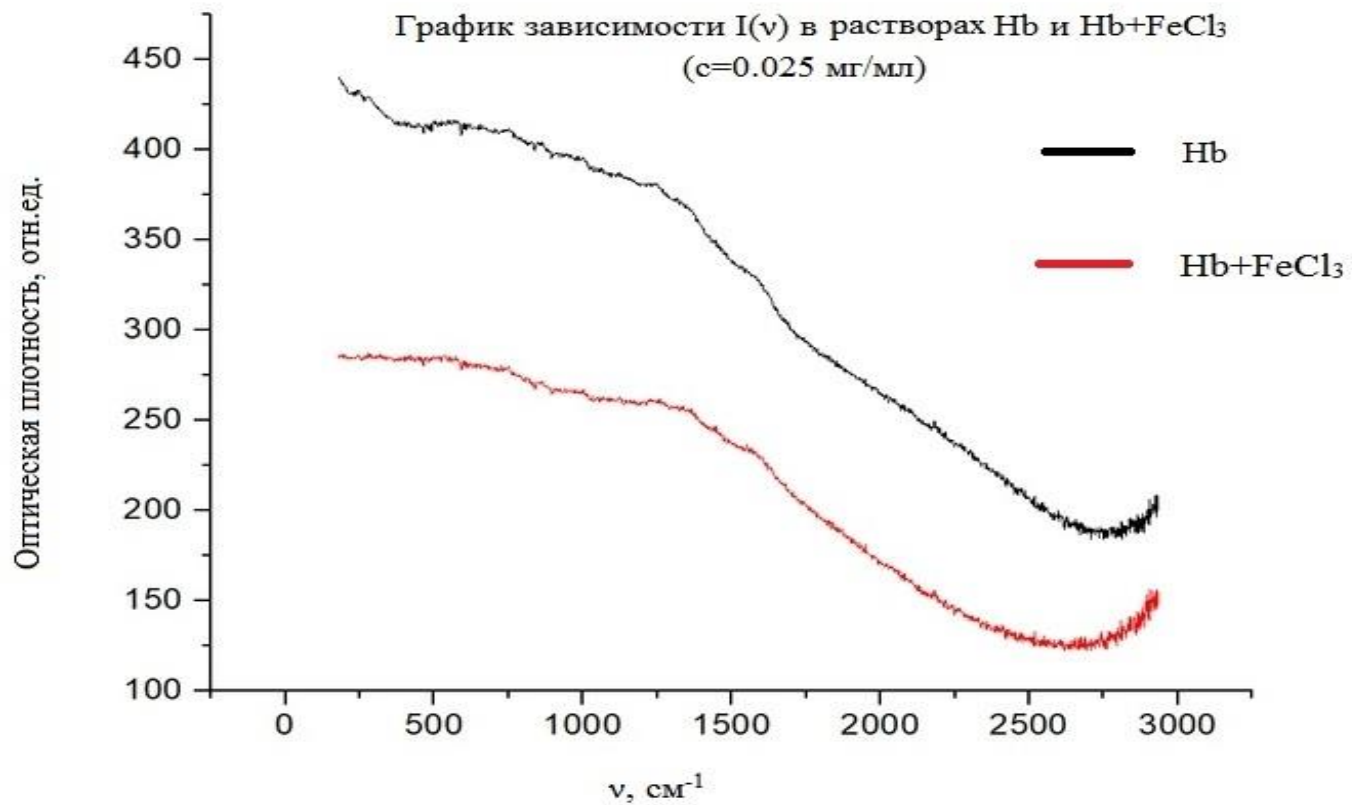
Спектр КР сухого Нб в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1}



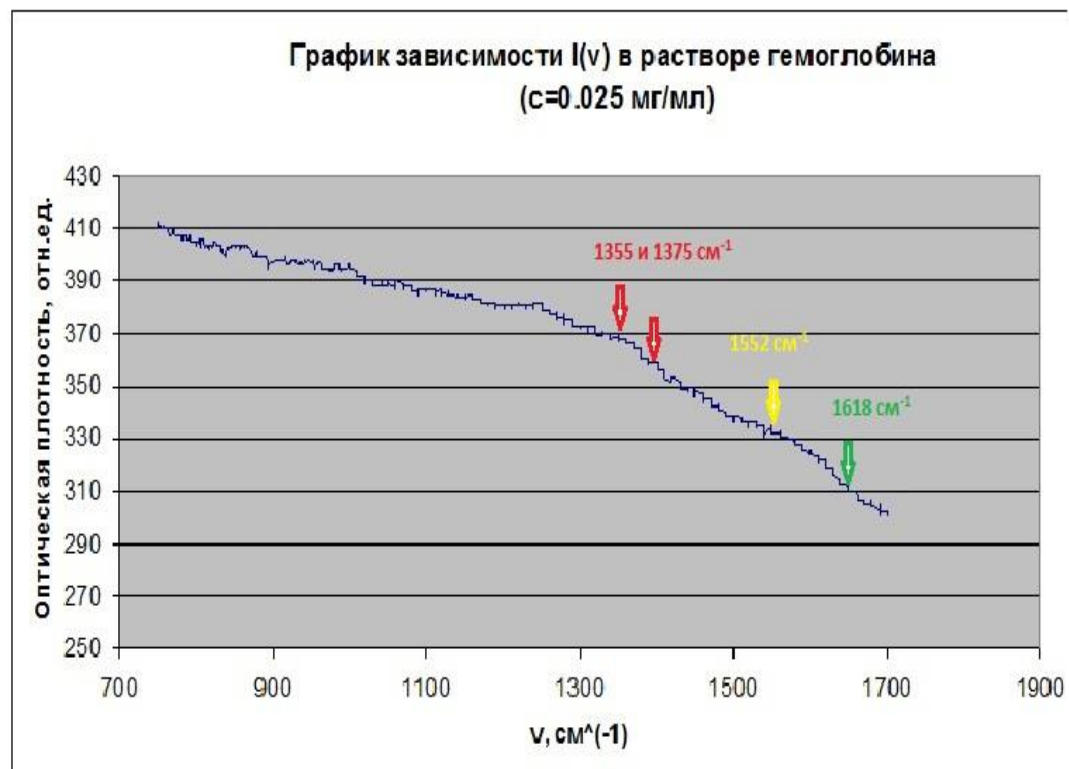
Спектр КР раствора Нв ($c=0.025$ мг/мл)



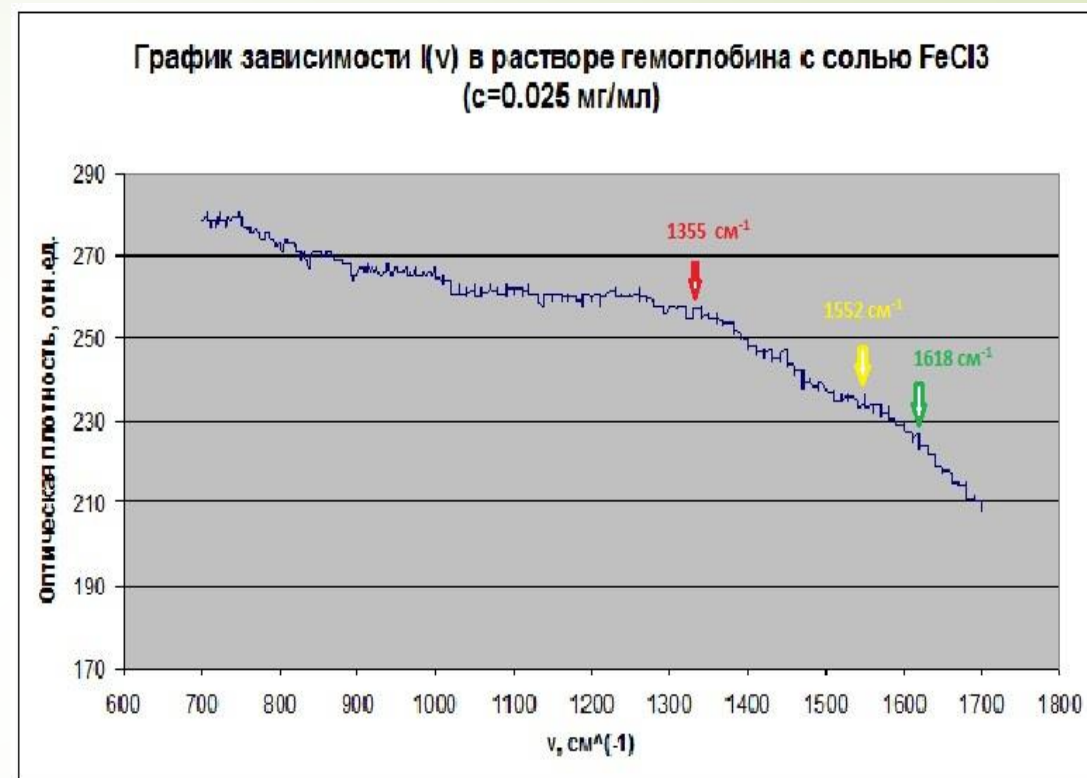
Спектр КР раствора Нв с солью FeCl_3 ($c=0.025$ мг/мл)



Сравнительный КР спектр растворов Hb и Hb с солью FeCl₃ ($c=0.025$ мг/мл)

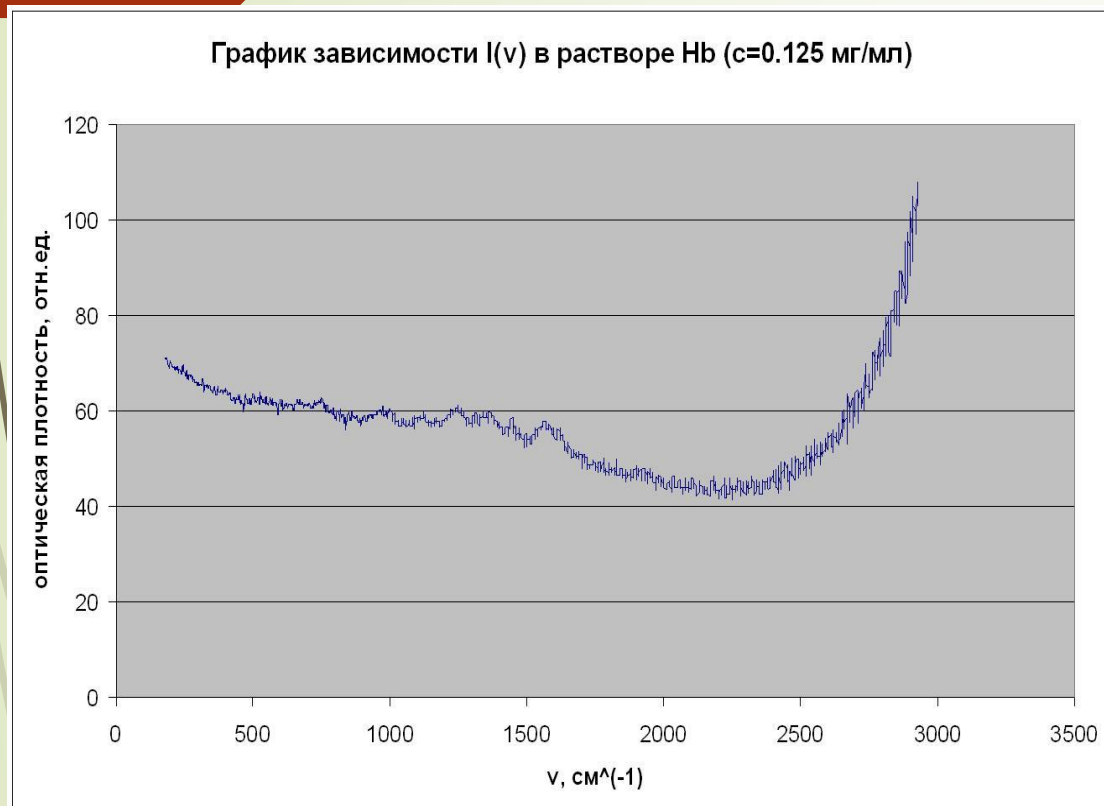


Спектр КР раствора Нв в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1} ($c=0.025$ мг/мл)

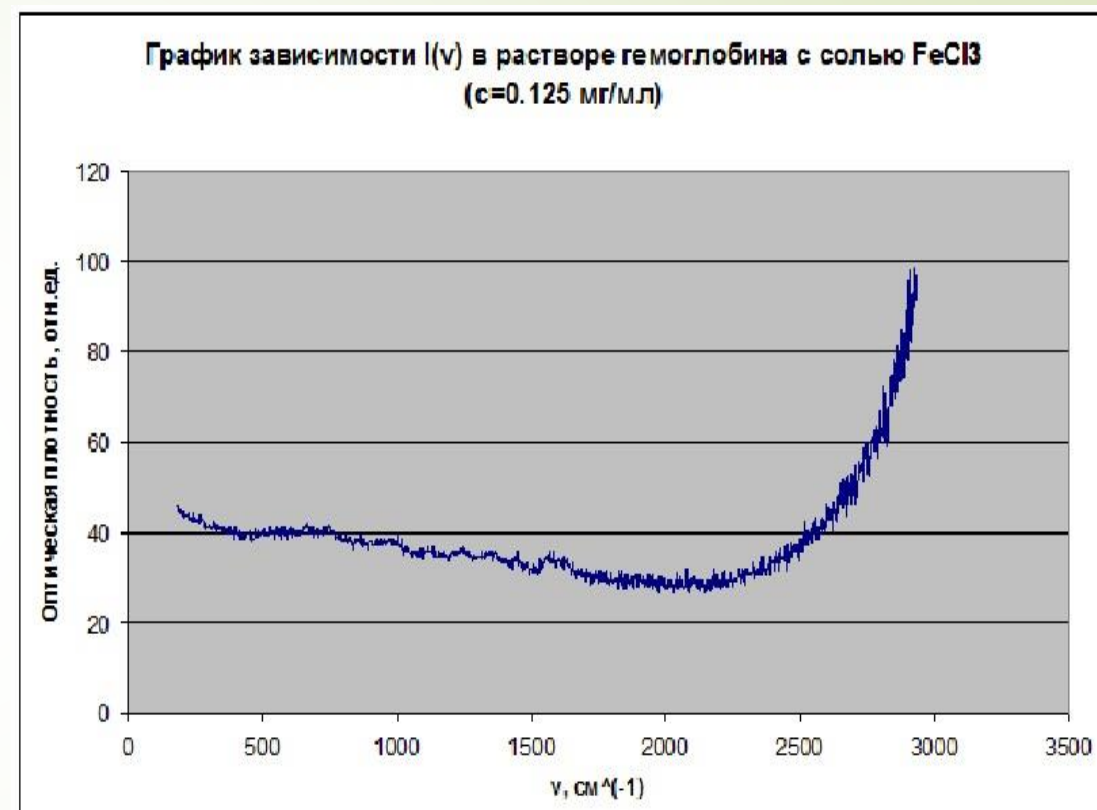


Спектр КР раствора Нв с солью FeCl_3 в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1} ($c=0.025$ мг/мл)

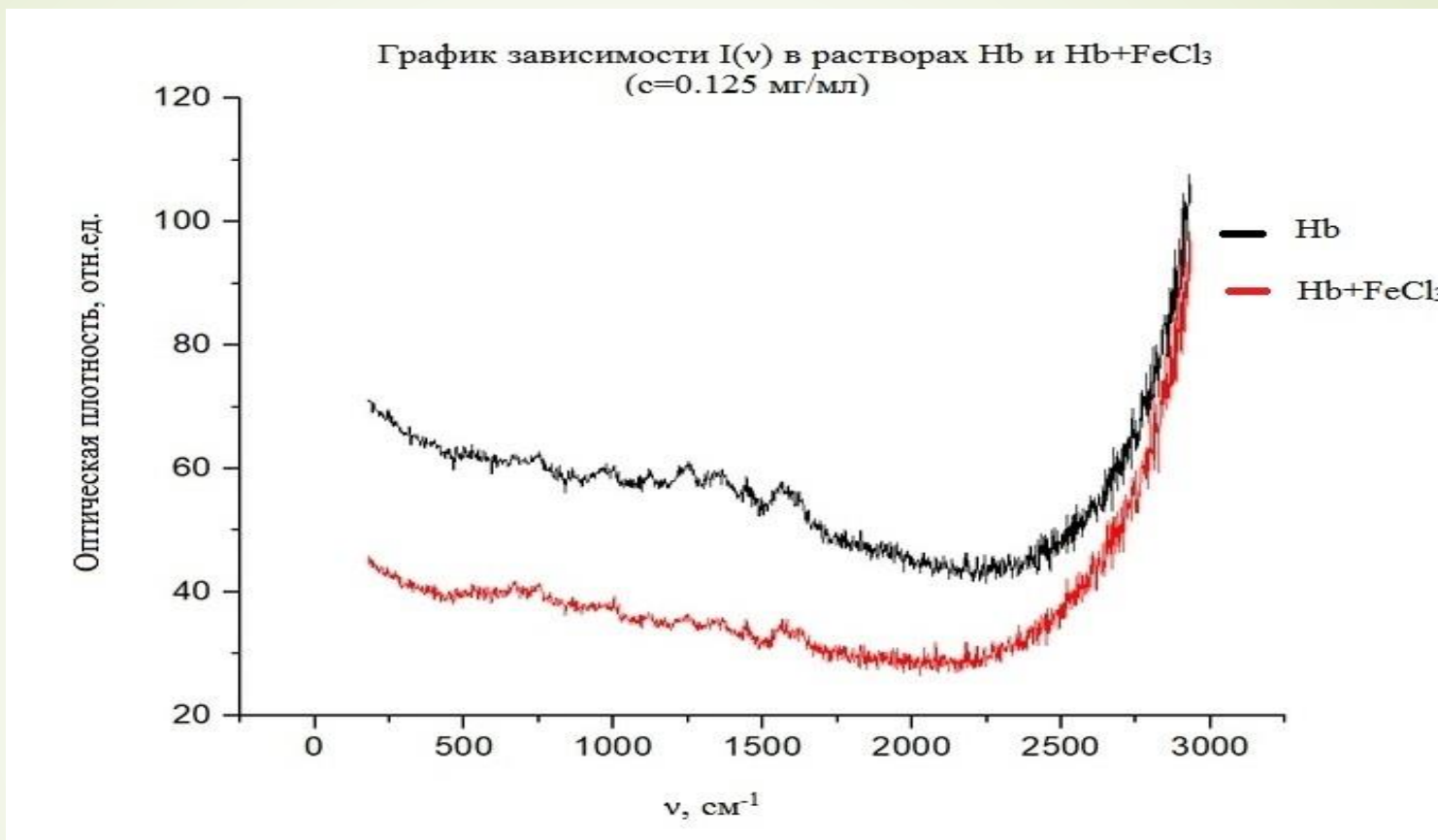
$\mu (\text{FeCl}_3) = 0,105$ моль/л



Спектр КР раствора Нб ($c=0.125$ мг/мл)



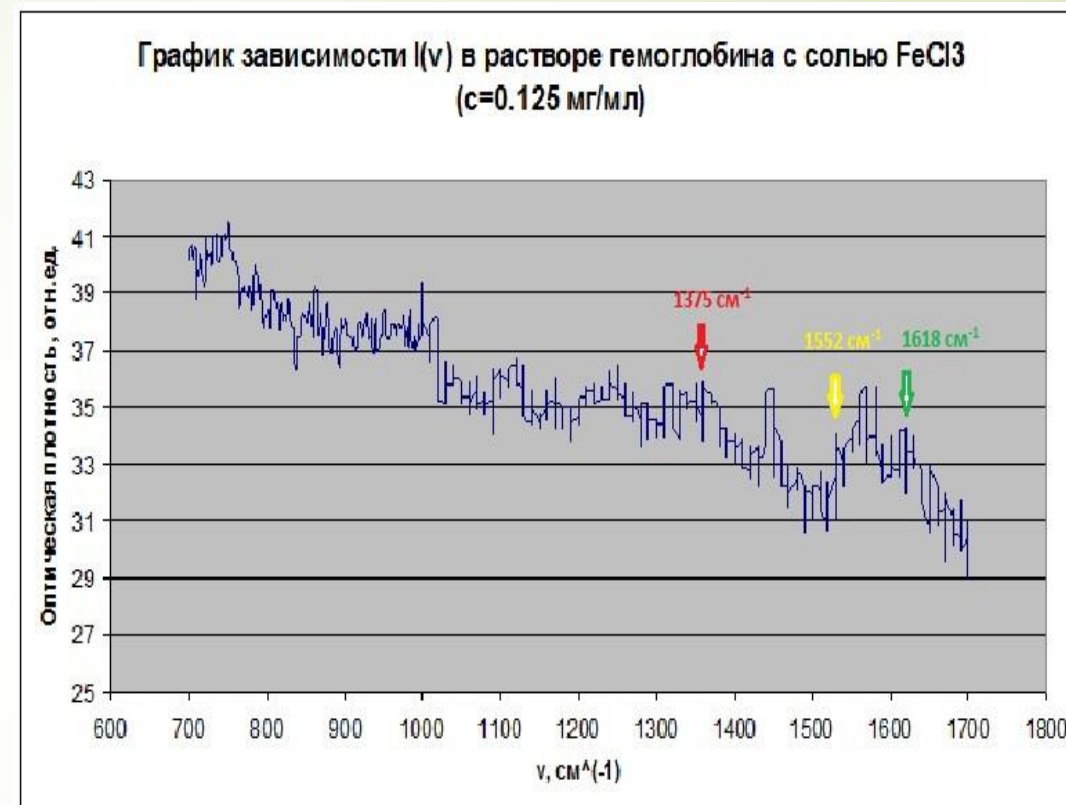
Спектр КР раствора Нб с солью FeCl_3 ($c=0.125$ мг/мл)



Сравнительный КР спектр растворов Hb и Hb с солью FeCl₃ ($c=0.125$ мг/мл)



Спектр КР раствора Нв в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1} ($c=0.125$ мг/мл)



Спектр КР раствора Нв с солью FeCl_3 в диапазоне частот 700 – 1700 см^{-1} ($c=0.125$ мг/мл)

$\mu(\text{FeCl}_3) = 0,105$ моль/л

Таблица 1. Характеристика полос спектра КР гемопорфирина Hb

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма Hb	Интенсивность, отн.ед.				
					C _{Hb} =0.025 мг/мл			C _{Hb} =0.125 мг/мл	
					Сухой Hb	Hb	Hb+FeCl ₃	Hb	Hb+FeCl ₃
1355	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	Симметричные колебания пиррольных полуколец	Ферро-состояние железа (Fe ²⁺), наличие лиганда	Δ-ГБ	115	370	255	59	
1375			Ферри-состояние железа (Fe ³⁺), наличие лиганда	о-ГБ	113	360		58	36
1552	C _a C _m , C _a C _m H	Асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Высокоспиновое состояние железа (Fe ²⁺)	Δ-ГБ	105	330	235	57	34
1580			Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺)	о-ГБ	112				
1618	CaCb, CbCb	ν(C=C)	Редокс и спиновое состояние железа, наличие лиганда	НО-ГБ	103	312	225	53	33

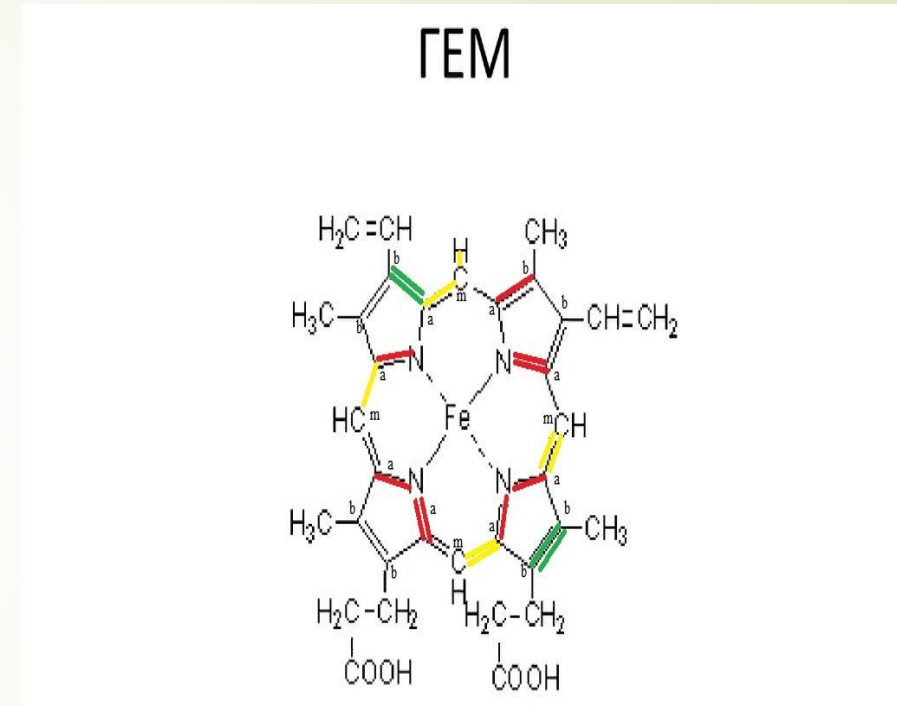


Рисунок 2. Структурная формула гемопорфирина Hb

ВЫВОДЫ

1) Получены соотношения интенсивностей КР-полос:

- ▶
- ▶ А) Таким образом (таблица 2), относительное содержание комплексов ГБНО (I типа) в эритроците относительно суммарного Hb клетки составляет примерно 0.5. Содержание комплексов ГБНО остается также в 2 раза ниже суммарного Hb клетки при повышении концентрации белка в растворе.
- ▶ Б) $\frac{I_{1375}}{I_{1580}} = 1.01$
- ▶ Относительная способность Hb эритроцитов связывать лиганды составляет примерно 1.1 (таблица 3), как в растворе с меньшей (0.025 мг/мл), так и большей (0.125 мг/мл), концентрацией белка.
- ▶ Однако относительная способность Hb сбрасывать лиганды получена только для спектра сухого белка (поскольку пиков на частоте 1580 см⁻¹ обнаружено не было), и составляет примерно 1.

Таблица 2. Соотношение

интенсивностей $\frac{I_{1618}}{I_{1355}+I_{1375}}$

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1618}}{I_{1355} + I_{1375}}$
сухой Hb	0.45
Hb (с=0.025 мг/мл)	0.43
Hb (с=0.125 мг/мл)	0.45

Таблица 3. Соотношение

интенсивностей $\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$
сухой Hb	1.10
Hb (при с=0.025 мг/мл)	1.12
Hb (при с=0.125 мг/мл)	1.04

ВЫВОДЫ

- 2) В растворах с наименьшей концентрацией белка ($c=0.025$ мг/мл) были получены более высокие значения интенсивности (примерно в 3-4 раза), чем в спектре сухого Hb и растворов с большей концентрацией ($c=0.125$ мг/мл), что хорошо согласуется с литературными данными. Это может быть связано с ослаблением аминокислотными остатками водородных связей.
- 3) В каждом спектре (и растворов белка, и белка с солью) наблюдаются характерные пики, соответствующие частотам колебаний в молекулах Hb и дезоксигемоглобина. Таким образом, сделан вывод о типе симметрии колебаний и форме Hb (табл. 1). Пики 1355 и 1375 см⁻¹ свидетельствуют о симметричных колебаниях пиррольных колец, а частота 1618 см⁻¹, наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, указывает на образование гексакоординированных комплексов I типа ГbNO в эритроците.
- 4) Обнаружено, что при добавлении в раствор белка соли, интенсивность уменьшается примерно в 1.5 раза. На сравнительном КР спектре (рис.19,22) также наглядно видно, что при добавлении в раствор соли, пики интенсивности несколько сглаживаются и смещаются по оси частот, что, вероятно, связано с конформацией белка.



Спасибо за внимание!

