

Исследование конформации гемопорфирина гемоглобина с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния

Браже Надежда Александровна, Чуринов Анатолий Александрович

Теоретическое введение

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР, англ. Raman spectroscopy) используется для изучения колебательных движений атомов в молекулах. Эффект комбинационного рассеяния света было открыто в 1928 г. советскими физиками Г.С.Ландсбергом и Л.И.Мандельштамом при исследовании рассеяния света в кристаллах, и несколькими неделями позже — индийскими физиками Ч. В. Раманом и К. С. Кришнаном при исследовании рассеяния света в жидкостях. Комбинационное рассеяние света – это рассеяние света веществом, сопровождающееся изменением частоты рассеиваемого света. В основе метода лежит взаимодействие монохроматического излучения (лазерного) с веществом, частицы которого испытывают периодические изменения, например, колебания длин связей и валентных углов, вращения вокруг каких-либо осей (Кери, 1985; Соловьев и др. 1985). Действующий свет приводит к возбуждению молекул, что обозначают как переход молекулы на некий виртуальный уровень m с исходного уровня n (рис.1). При обычном, релеевском, рассеянии молекула возвращается на исходный энергетический уровень. При комбинационном рассеянии молекула переходит в другое колебательное состояние i , обладающее иной энергией. Вероятность комбинационного рассеяния равна $P=M_{nm}M_{mi}$, где M_{nm} и M_{mi} – дипольные моменты перехода с исходного уровня n на виртуальный уровень m , а затем с уровня m на конечный уровень i , соответственно. Переходы из состояния n в возбужденное состояние i , с энергией, большей, чем в состоянии n , получили название стоксовских, а переходы из возбужденного состояния n в состояние i , основное или возбужденное, но обладающее меньшей энергией, чем исходное – название антистоксовских. Стоксовское КР света всегда сопровождается анти-Стоксовским КР, однако анти-Стоксовское КР намного менее интенсивное, чем Стоксовское КР. В стоксовской области более вероятны переходы из основного состояния в первое возбужденное. Они обладают большей интенсивностью, чем антистоксовские переходы и стоксовские переходы во второе и следующие возбужденные состояния. Любое КР света обладает относительно слабой интенсивностью по сравнению, например, с флуоресценцией, поэтому оно наблюдается только при использовании монохроматических и когерентных источников возбуждающего света

(лазеров). Спектр КР света всегда представляет собой не одну полосу, как у лазера, а несколько полос, центральная из которых соответствует длине волны лазера, а по бокам на равном удалении от нее располагаются полосы анти-Стоксовского и Стоксовского КР света.

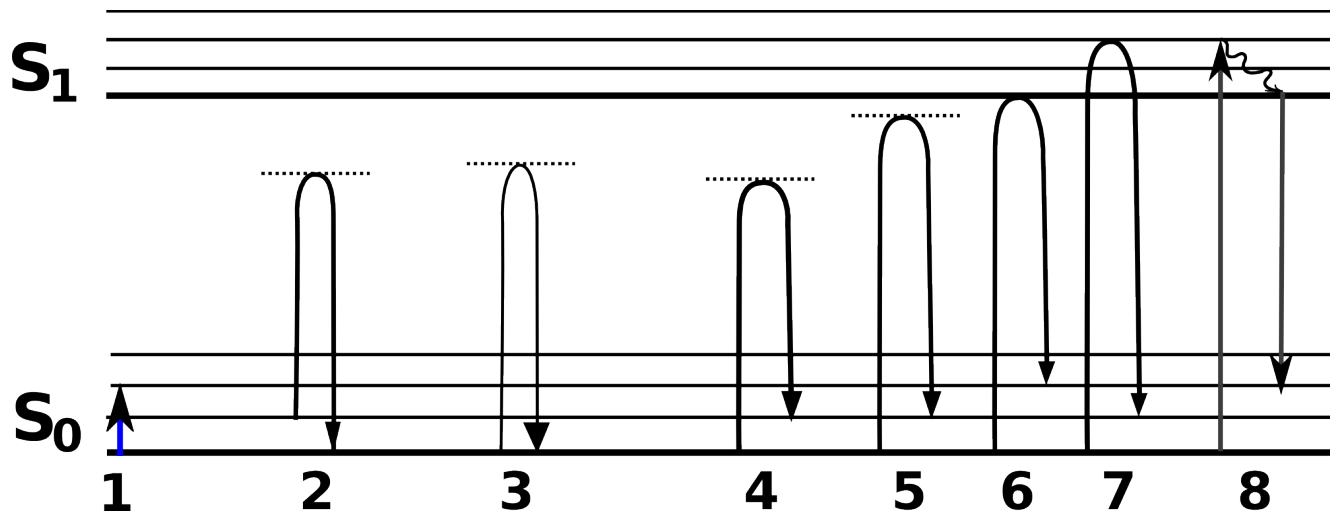


Рис. 1. Схема переходов между колебательными подуровнями и электронными уровнями молекулы при инфракрасном поглощении света (1), комбинационном рассеянии света (2-7) и флуоресценции (8). S_0 и S_1 — основной и первый возбужденный электронные уровни. Горизонтальными пунктирными прямыми показаны виртуальные энергетические уровни. Цифрой 2 обозначен переход молекулы между колебательными подуровнями при анти-Стоксовском КР света, цифрой 3 — при Релеевском рассеянии света, цифрами 4-7 — при Стоксовском КР света. Цифрой 8 показано поглощение света с последующим испусканием кванта флуоресценции и возвращением молекулы на уровень S_0 . Переход 4 — нерезонансное КР света, 5 — предрезонансное КР света, 6 и 7 — резонансное КР.

В случаях, когда длина волны возбуждающего света попадает в область поглощения вещества, то сначала осуществляется переход молекулы на возбужденный электронный (а не виртуальный) уровень, а потом — переход молекулы отсюда на другой колебательный подуровень основного электронного уровня (рис. 1). Такое рассеяние света носит название резонансного комбинационного рассеяния света (РКР), интенсивность которого на несколько порядков превосходит интенсивность нерезонансного КР. В связи с этим, в спектроскопии РКР могут исследоваться растворы веществ в концентрациях ниже, чем в КР. Обычно это 10^{-4} - 10^{-6} М.

В случаях, если энергия возбуждающего кванта света близка к той, которая необходима для электронного перехода молекулы, наблюдается предрезонансное КР. Интенсивность предрезонансного КР ниже интенсивности РКР, однако выше, чем интенсивность нерезонансного КР.

Энергия колебания равна разности энергий возбуждающего (лазерного) кванта света и квантов КР света: $E_{\text{кол}} = E_{\text{возб}} - E_{\text{КР}} = h\nu_{\text{возб}} - h\nu_{\text{КР}}$. Разность этих энергий ($\nu_{\text{возб}} - \nu_{\text{КР}}$) носит название частотного сдвига или волнового числа и, в простейшем случае, соответствует частоте колебаний исследуемой связи. Однако для сложных многоатомных молекул частотный сдвиг характеризует частоту так называемого нормального колебания – взаимосвязанных колебаний трех и более связанных атомов в молекуле, при которых атомы, участвующие в колебаниях, одновременно проходят положение равновесия.

Спектр КР исследуемого вещества — это зависимость интенсивности КР от частотного сдвига. Изменение положения максимума пика в спектре КР или изменение относительной интенсивности пика связаны с изменением параметров связи/связей в молекуле и, следовательно, свидетельствуют об изменении конформации молекулы. Важными преимуществами КР спектроскопии являются ее высокая чувствительность к незначительным изменениям в структуре исследуемых веществ, а также ее использование не только для твердых веществ и газов (как ИК-спектроскопия), но и растворов, поскольку КР воды не мешает регистрировать сигнал КР от веществ, растворенных в воде. Однако недостатком спектроскопии КР является относительно небольшая вероятность явления КР и конкуренция РКР с более вероятными событиями, в частности, флуоресценцией. Отметим, что явление РКР, тем не менее, наблюдается поскольку характерное время процессов КР и РКР составляет порядка 10^{-11} с, а время процесса флуоресценции — 10^{-9} с.

Применение спектроскопии КР для исследования конформации гемопорфирина гемоглобина

Гемоглобин (Гб) (а также миоглобин и цитохром *c*, как и другие белки, содержащих металлопорфирины) является одной из наиболее хорошо изученных с помощью спектроскопий КР и РКР макромолекул. Данный факт объясняется тем, что гемопорфирин обладает довольно интенсивным КР света вследствие наличия в гемопорфирине гетероциклов с сопряженными связями (рис. 2). Спектр Гб представляет собой совокупность полос, вызванных нормальными колебаниями связей в гемопорфирине (рис. 3). В областях 410-430 нм и 520-560 нм гемоглобин

поглощает свет, соответственно, при использовании лазеров с длинами волн, лежащими в этих областях, будет наблюдаться РКР. Спектры КР и РКР цельной крови являются совокупностью спектров КР и РКР всех форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина), присутствующих в крови (рис.3).

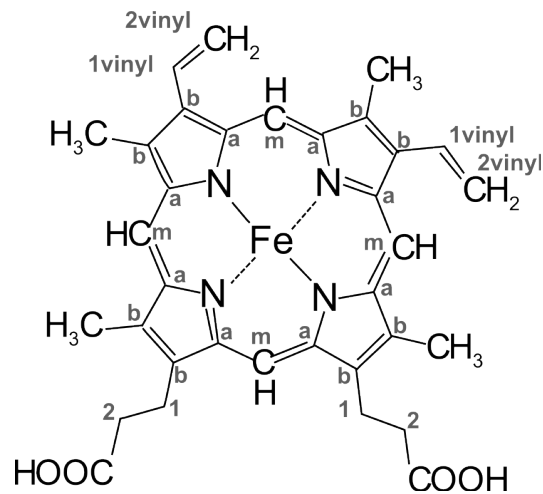


Рисунок 2. Структурная формула гемопорфирина гемоглобина с нумерацией атомов С.

Смещение полос в спектрах КР крови, происходящее при изменении газового состава крови, происходит вследствие вытеснения кислорода азотом из пробы с эритроцитами и переходом о-Гб в д-Гб. Аналогичные изменения в структуре спектра наблюдаются при химической дезоксигенации эритроцитов с использованием дитионита натрия — вещества, взаимодействующего с кислородом в любой среде: воздухе, воде и в белках, в том числе, с O₂, связанном на Гб. Пики 1355 и 1375 см⁻¹ связаны с симметричными колебаниями пиррольных колец (связи C_aC_b, C_aN и C_aNC_a, см. рис. 2, 3) в молекулах дезоксигемоглобина и гемоглобина, связанного с лигандами, соответственно (wood et al., 2007; Brazhe et al., 2009). Поскольку количество O₂ в крови на 3-4 порядка превосходит содержание NO или CO, то интенсивность полосы 1375 см⁻¹ определяется, в основном, содержанием о-Гб. Таким образом, соотношение интенсивностей $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ является характеристикой относительного количества о-Гб в крови или суспензии эритроцитов. Пики 1548-1552 см⁻¹ и 1580-1588 см⁻¹ связаны с колебанием метиновых мостиков между пирролами (связи C_aC_m, C_aC_mH, см. рис. 2, 3) в молекулах Гб, в которых гемопорфирин растянут и деформирован (1548-1552 см⁻¹) и в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию (1580-1588 см⁻¹).

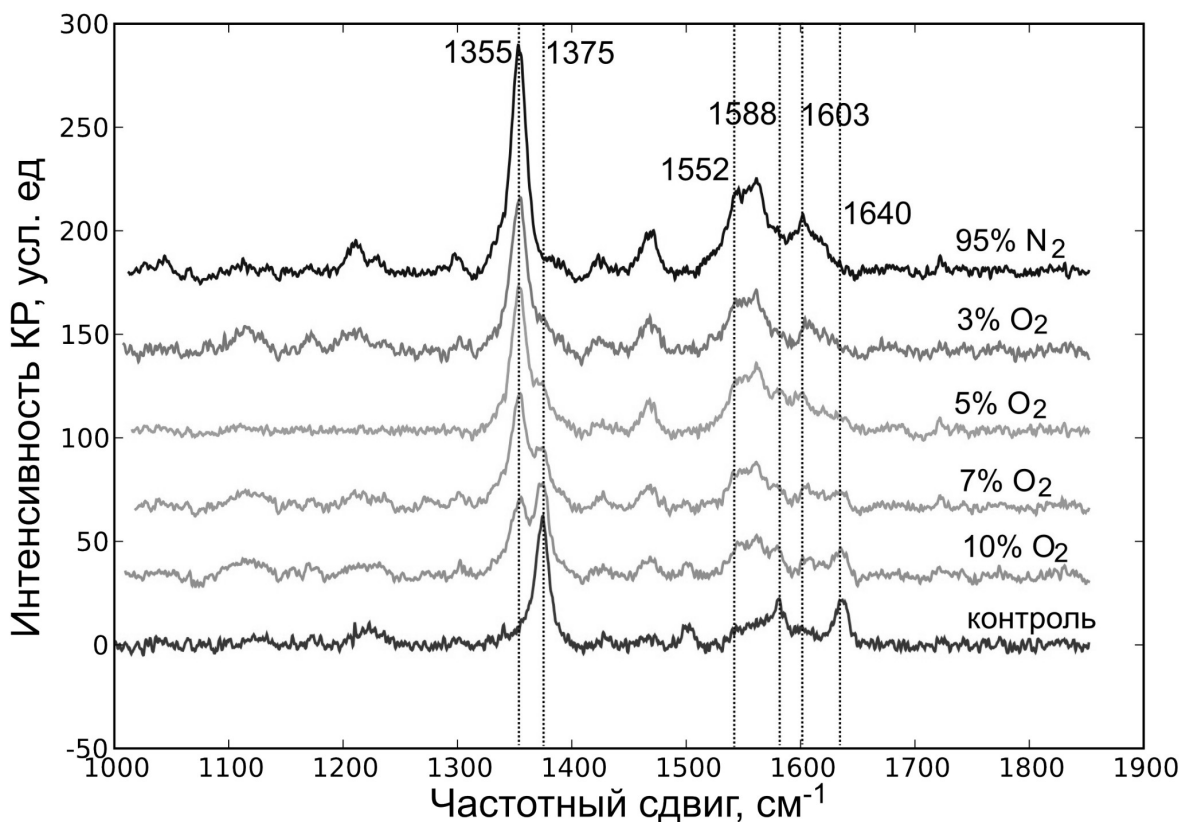


Рис. 3. Спектры КР (возбуждение лазером 473 нм) образца крови при разных парциальных давлениях кислорода.

Экспериментальная часть

Цель работы

Освоить метод спектроскопии комбинационного рассеяния для изучения конформации гемопорфирина гемоглобина.

Описание установки

В работе используется КР-спектрометр с лазером 473 нм (Ciel, Eurolase), системой регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сделанной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония) с фильтром LPO2-473RS-50 (Shemrock, USA). Мощность лазера на образце составляет 10 мВт.

Порядок выполнения работы

Раздел 1. Калибровка прибора

Для установления диапазона и шага матрицы (в см⁻¹), регистрирующей КР, необходимо выполнить калибровочные эксперименты. Для этого следует снять спектры КР от бензола и циклогексана при следующих параметрах — время регистрации 10-30 с, одно накопление. На спектрах, выводимых на экран программы, по оси ординат отображается интенсивность КР, а.е., по оси абсцисс — номер пиксела на матрице. Для выполнения калибровки прибора следует использовать литературные данные о положении пиков КР бензола и циклогексана. Для бензола характерны пики с положениями максимумов, см⁻¹: 992, 1178, 1586, 1606; циклогексан: 1029, 1158, 1267, 1348, 1445. В любой из программ Origin, Excel, Matlab, PyLab или др. следует построить спектры бензола и циклогексана, определить положение максимума пиков в пикселах матрицы и построить зависимость значений обратного сдвига (известных из литературы) от номера пиксела. После этого интерполировать зависимость полиномами разной степени и для лучшего случая сделать соотнесение между пикселами матрицы и частотным сдвигом. Качество калибровки проверяется построением спектров циклогексана и бензола с использованием полученного частотного сдвига. При правильной калибровке положения максимумов пиков должны совпадать с литературными данными. В отчете следует предоставить спектры бензола и циклогексана, построенные с использованием полученного частотного сдвига, а также указать положение максимумов пиков.

Раздел 2. Регистрация спектров КР цельной крови

2.1. Для приготовления образца для измерений в пробирку с кровью (ранее герметично закрытую) опустить стеклянный капилляр и подождать, пока туда наберется кровь. Потом с двух сторон герметизировать капилляр с использованием пластилина. Установить капилляр в регистрационную ячейку прибора и сфокусировать лазер на срединной части капилляра. Установки регистрации спектров следующие: мощность лазера 473 нм на выходе не менее 10 мВт, мощность лазера 532 нм 20 мВт. В обоих случаях время накопления спектра – 100 с, количество повторно регистрируемых спектров – 1.

2.2. Разбавить исходный образец крови в 2-3 раза, заполнить капилляр и записать спектр.

2.3. Для того, чтобы на примере продемонстрировать зависимость положения пиков в спектре КР от степени оксигенированности крови следует сделать эксперимент по дезоксигенации гемоглобина. Для этого в пробирку с кровью (примерно на 1 мл крови) добавить на кончике шпателя дитионит натрия. Дитионит натрия реагирует с O₂ в растворе и воздухе, а также с O₂, связанным на о-Гб, в результате чего о-Гб переходит в д-Гб. Проинкубировать образец в течение 5-10 мин, интенсивно перемешав несколько раз кровь. Затем приготовить

пробу для спектроскопии КР и записать спектр. Обратить внимание на то, что исчезает пик 1375 см^{-1} и появляется или увеличивается интенсивность пика 1355 см^{-1} , а также изменяется высокочастотная часть спектра: существенно уменьшаются интенсивности пиков $1580\text{-}1584\text{ см}^{-1}$ и 1640 см^{-1} и увеличиваются интенсивности пиков $1548\text{-}1552\text{ см}^{-1}$ и $1600\text{-}1608\text{ см}^{-1}$. При описании полученных результатов следует объяснить причину наблюдаемого изменения спектров. Для каждой пробы следует сделать не менее трех независимых измерений. Если спектры интенсивные, пики выраженные, то достаточно одного спектра для каждой пробы.

В зависимости от дня практикума, по выбору преподавателя студентам может также предлагаться изолированный гемоглобин, протопорфирин или изолированный цитохром *c*.

2.4. Для каждого эксперимента в отчете должны быть представлены спектры КР с указанием положения максимума основных пиков (необходимо использовать полученную ранее калибровку). В тексте необходимо описать «природу» и «чувствительность» указанных пиков.

Вопросы

1. Для чего необходимо выполнять калибровку матрицы прибора? Какие факторы могут влиять на работу матрицы? Какие вещества предпочтительнее использовать для выполнения калибровки?

2. С чем связаны изменения спектра КР (перечислите, какие), наблюдаемые при разбавлении крови и при добавлении дитионита натрия?

3. Преимущества и недостатки спектроскопии КР при работе с биологическими образцами по сравнению с другими спектральными методами.

Литература

Кэри П., Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии, пер. с англ.. М., 1985.

Соловьев В.Н., Гладков Л.Л., Старухин А.С., Шкирман С.Ф. Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния. Минск: Наука и техника, 1985.

Wood, B.R., P. Caspers, G.J. Puppels, S. Pandiancherri, and D. Mc-Naughton. 2007. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1691–1703.

Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced

Raman Spectroscopy. Biophysical Journal, Volume 97, Issue 12, 3206-3214, 2009.