

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Физический факультет

Кафедра общей физики

Калинина Анастасия Вячеславовна

КУРСОВАЯ РАБОТА

**«Применение метода ядерного магнитного резонанса для ус-
тановления термостабильности белков»**

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа 18308

Научный руководитель:

Е. А. Зеленцова

Оценка научного руководителя:

«__»_____2019 г.

**Преподаватель измерительного
практикума:**

Е. И. Солдаткина

Оценка преподавателя:

«__»_____2019 г.

Куратор практикума:

В. Т. Астрелин

Итоговая оценка:

«__»_____2019 г.

Новосибирск, 2019 г.

Аннотация

Целью работы являлось исследование влияния термодегградации белков на уровни концентраций аминокислот в экстракте крови человека.

Образцы экстрактов крови подвергались термическому воздействию (50°C) 30, 60, 120 и 250 минут. Количественные метаболомные измерения проводились при помощи ЯМР-спектрометра AVANCE III HD 700 MHz, поле 16.44 Тесла.

Было обнаружено увеличение концентраций группы аминокислот на 20-70% при увеличении времени нагрева.

Полученные данные могут быть полезны при выборе методов гомогенизации и экстракции биологических образцов для количественных метаболомных исследований.

Оглавление

Аннотация.....	2
Оглавление	3
Введение	4
Теоретическая часть	5
Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	5
Химический сдвиг.....	6
Расщепление сигналов.....	7
Практическая часть	7
Установка.....	7
Постановка эксперимента	8
Приготовление образцов	9
Определение концентрации	10
Обработка данных.....	10
Обсуждение результатов	11
Источники погрешностей.....	11
Анализ данных	12
Выводы	14
Список литературы	15

Введение

Белки – высокомолекулярные органические вещества-полимеры, цепочки которых формируются из 20 стандартных мономеров (аминокислот) посредством пептидной связи. Роль белков в организме живых существ крайне важна. Они отвечают за поддержание формы клеток, химический катализ, моторные функции (мышечные сокращения), транспорт веществ, регуляторные функции (белковые гормоны), хранение и передачу информации о строении клеток и организма в целом [1].

Метаболиты – промежуточные и конечные продукты обмена веществ. Их определяют как любые молекулы размера не более 1 КДа. В том числе, к метаболитам относятся аминокислоты. Метаболомика занимается изучением химических процессов в тканях с участием метаболитов. Количественная метаболомика изучает влияние различных факторов на химические процессы в тканях, отслеживая уровень метаболитов на различных этапах процесса, поэтому для нее крайне важны концентрации веществ, о которых идет речь. Эта наука начала развиваться не так давно, а потому многие методы, которые используются для подготовки образцов, заимствовались из смежной области – протеомики, где концентрации веществ были не так важны.

Так, для получения спектра, по которому можно судить о наличии и количестве метаболитов в данной ткани используется ЯМР-спектроскопия. Прежде чем получить спектры, образцы необходимо подготовить. Первый этап, который проходят образцы при подготовке – гомогенизация, то есть разрушение всех структурных элементов ткани и клетки. Часто используемый для этого метод – шаровые мельницы (bead beating). При данном способе обработки образец с металлическими или стеклянными шариками и твердой матрицей сильно встряхивается в пробирке. Возможные последствия использования данного метода – термическая деградация белка и, как следствие, увеличение концентрации аминокислот, что может сказаться на результатах метаболомного исследования.

В настоящее время существуют работы, в которых описывается процесс деградации белков при нагреве с точки зрения протекания двух процессов: разворачивания третичной структуры [2] и обратного процесса – агрегирования, то есть склеивания белка [3]. В подобных работах отслеживаются изменения концентраций белков, но не аминокислот, которые могли образоваться. Нас же интересует возможность разрушения первичной структуры белка, которая может привести к искусственному «завышению» концентраций аминокислот.

Наша цель – определить степень влияния температурной обработки на концентрацию аминокислот в метаболомном экстракте крови.

Теоретическая часть

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Любая система, в том числе атом или ядро имеет характерное число S – квантовое спиновое число полного момента импульса – либо целое, либо полуцелое, такое что компонента момента импульса L_z по любому фиксированному направлению пространства может иметь только одно из значений $L_z = S\hbar, (S - 1)\hbar, \dots, -S\hbar$, где $\hbar = 6,582 \cdot 10^{-16}$ эВ · с – постоянная Планка. Магнитный момент системы пропорционален моменту импульса с коэффициентом пропорциональности g (гиромагнитным отношением): $m_z = gL_z$. Значит, магнитный момент также может принимать только фиксированные значения. В магнитном поле система с магнитным моментом m_z обладает потенциальной энергией $U = -m_z B$. То есть в магнитном поле энергия атомной системы расщепляется на несколько уровней, разность между которыми $\Delta U = -\Delta m_z B$ пропорциональна полю B .

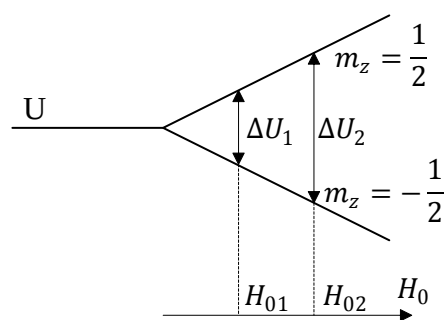


Рис. 1. Расщепление энергетических уровней для ядра атома водорода

Для частицы со спиновым квантовым числом $S = 1/2$ (например, ядра водорода H^1 , в нашей работе используется ЯМР именно на ядрах водорода) расщепление энергетических уровней показано на рис.1.

Разность энергий между энергетическими уровнями можно представить также как $\Delta U = \hbar\omega$, где ω – частота волны, излучаемой или поглощаемой атомом при переходе на низший или высший энергетический уровень.

Так как ядро может принимать только несколько разрешенных значений энергии, можем получить условие резонанса: $\omega = gSB$ – частота, при которой происходит поглощение при данной магнитной индукции (резонансная частота).

Если возбудить все атомы вещества коротким электромагнитным импульсом с частотой, близкой к резонансной, высшие энергетические уровни становятся более заселенными. Система возвращается в исходное равновесное состояние, излучая при этом. Регистрируемый электромагнитный сигнал после преобразования Фурье дает частотную характеристику исследуемого вещества. Каждая молекула на спектре отражается в виде некоторой комбинации пиков (вид сигнала и спектра приведен на рис.2).

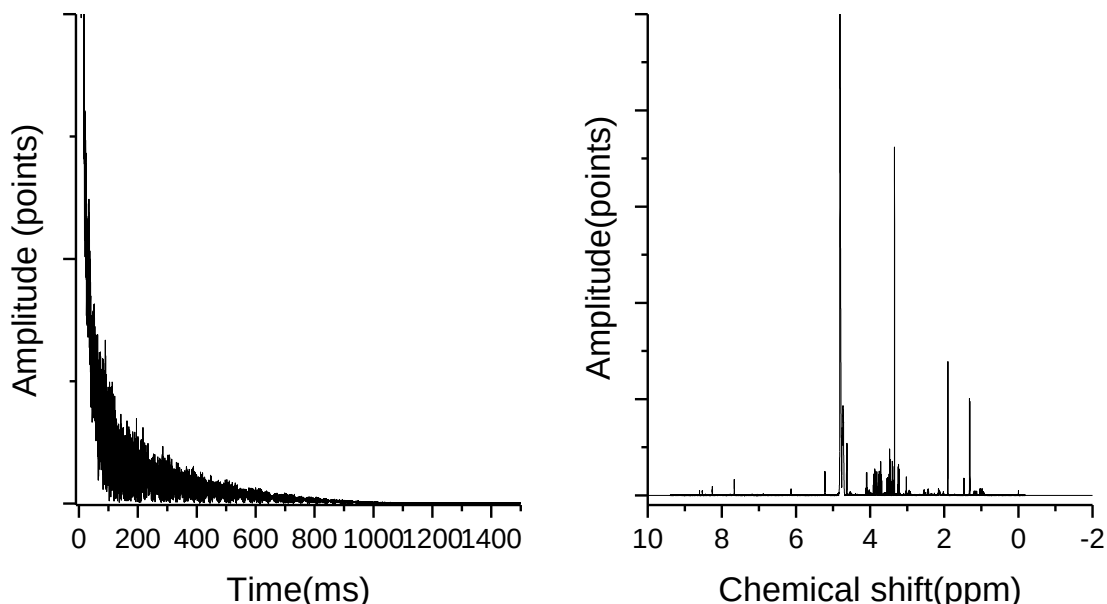


Рис. 2. Получаемый сигнал до (слева) и после (справа) преобразования Фурье

Химический сдвиг

В молекуле атомы располагаются строго определенным образом. При этом ядра атомов экранируются своими и чужими электронными оболочками от внешнего магнитного поля, и в результате резонансная частота ядра смещается.

Это явление называется химическим сдвигом. На спектре наблюдается множество пиков с различными химическими сдвигами, по которым можно судить о взаимном расположении атомов в молекуле. Химический сдвиг измеряется в миллионных долях от рабочей частоты спектрометра: $\delta = \Delta\nu \cdot 10^6/\nu_0$, где ν_0 – рабочая частота, а $\Delta\nu$ – расстояние от интересующего пика до линии эталона (вещества, помещенного с образцом, для которого химический сдвиг равен 0).

Расщепление сигналов

Пусть в некоторой молекуле вблизи резонирующего ядра находится другое ядро с ненулевым спином S . В зависимости от ориентации спина локальное магнитное поле ΔB , создаваемое ядром, может принимать $2S + 1$ значений, и на резонирующее ядро будет действовать поле с магнитной индукцией $B + \Delta B$. При этом на спектре произойдет расщепление линии на $2S + 1$ линий.

Перечисленные особенности ЯМР спектроскопии позволяют по химическому сдвигу и виду сигналов идентифицировать молекулы, то есть вещества, входящие в раствор [4,5].

Практическая часть

Установка

Измерения были проведены на ЯМР-спектрометре AVANCE III HD 700 MHz (Bruker BioSpin, Германия), оборудованном криомагнитом Ascend с полем 16.44 Тесла. Для получения ЯМР-спектра метаболомного экстракта крови ис-



Рис. 3. Внешний вид установки

пользовалось преднасыщение воды и 90-градусный импульс с последующей регистрацией спада свободной индукции. Внешний вид устройства изображен на рис.3.

Образец в ампуле помещается на воздушном лифте в центр цилиндрической установки, где поддерживается постоянная температура около 25°C. Вокруг в теплоизолирован-

ной прослойке располагаются электромагнитные катушки в жидком гелии. Эти катушки поддерживают в центре установки постоянное однородное магнитное поле с высокой точностью. Также в корпусе установлен приемник, регистрирующий сигналы при релаксации возбужденных ядер (см. рис.4)

Настройка установки производится через программное обеспечение. Перед снятием данных необходимо настроить рабочую частоту (делается один раз). Затем для каждого нового образца заново настраивается фаза, однородность магнитного поля. Это важно, так как малейшие различия в неоднородностях ампулы и раствора

нарушают однородность магнитного поля, что приводит к уширению сигналов. Для усреднения неоднородностей ампула постоянно вращается воздушным потоком.

При однократном запуске на спектре некоторые сигналы могут сливаться с шумами из-за относительно низкой чувствительности ЯМР, поэтому съемка происходит несколько раз (в нашем эксперименте – 48) с накоплением, поскольку уровень сигналов растет в N раз, а уровень шумов – в $\sqrt{N}$ раз.

Постановка эксперимента

В качестве исследуемого белкового раствора была выбрана человеческая кровь. 1 мл крови был отобран и разбавлен водой в отношении 1:2, чтобы предотвратить свертывание (образование фибриллярного клубка, препятствующего эффективной экстракции метаболитов в раствор). Чтобы эффективно экстрагировать метаболиты из крови человека, необходимо разрушить все клетки и органеллы. Этот процесс был произведен с использованием метода заморозки. Для этого мы поочередно погружали пробирку с разбавленной кровью в жидкий азот и размораживали при комнатной температуре 3 раза. Далее 3 мл раствора разлили по 0,6 мл в 5 пробирок. Один образец, NB0, отложили в морозильный шкаф в качестве контрольного образца. Остальные образцы подверга-

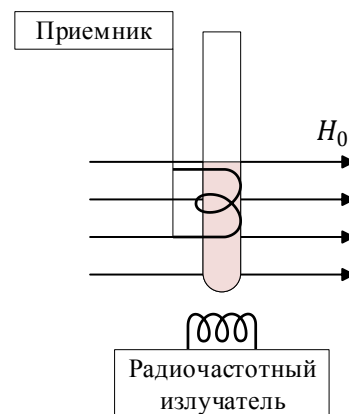


Рис. 4. Схема измерительной части установки

лись нагреву при 50°C на термостатированном шейкере на 30, 60, 120 и 250 минут (соответственно, названия образцов NB30, NB60, NB120, NB250).

Приготовление образцов

В полученных растворах остались белки, липиды и интересующие нас метаболиты. Крупные молекулы белков, а также амфифильные молекулы липидов создали бы в спектре ЯМР большие горбы, из-за чего измерить концентрации метаболитов было бы сложно. Поэтому мы добавили к образцу 600 мкл метилового спирта, чтобы белки выпали в осадок. Далее добавили 600 мкл хлороформа, в котором растворяются гидрофобные участки липидов. Для разделения растворителей в смеси хлорофм/вода/метиловый спирт использовалось центрифугирование при температуре 4°C и ускорении 13,2 kg в течение 25 минут. Как видно из рис.5, белки и липиды формируют плотную пробку на границе раздела двух не-смешиваемых растворителей, это позволяет произвести очистку экстракта крови от данных соединений. В дальнейшем в работе используется только верхний слой (метанол/вода), содержащий водорастворимые метаболиты.



Рис. 5. Вид образца после центрифугирования

Раствор метаболитов был лиофилизирован, после чего метаболиты растворили в буферном растворе (дейтерированный солевой раствор 0.02 M, pH 7.05 с DSS $2 \cdot 10^{-6}$ M). Раствор выбирается таким, чтобы вещества из образца не взаимодействовали с ним, а также удерживал нейтральное значение pH. Водород в воде заменен на дейтерий, поскольку дейтерий не имеет ЯМР сигнала (спин его ядра равен 0). В качестве эталона в ЯМР H_1 используют сигнал тетраметилсилана $(CH_3)_4Si$, который добавляют в раствор с известной концентрацией. Его сигнал на спектре – одна линия в районе нуля (химический сдвиг равен нулю).

Определение концентрации

Мы знаем концентрацию вещества – эталона n_0 , и количество ядер водорода в его молекуле – x_0 , пусть площадь его сигнала равна M_0 . Пусть концентрация некоторого вещества n нам неизвестна, но мы знаем количество атомов водорода в одной его молекуле x и можем посчитать площадь его сигнала M . Кроме того, мы знаем объем раствора V_0 и исходный объем крови V . Наблюдаемые пики имеют площадь, пропорциональную количеству ядер водорода в веществе: $\frac{M}{x} = k$. Тогда можем вычислить концентрацию конкретной аминокислоты на единицу объема крови:

$$n = \frac{Mx_0V}{M_0xV_0} n_0$$

В нашем эксперименте значения констант следующие: $x_0 = 9$, $V_0 = 600$ мкл, $V = 200$ мкл.

Обработка данных

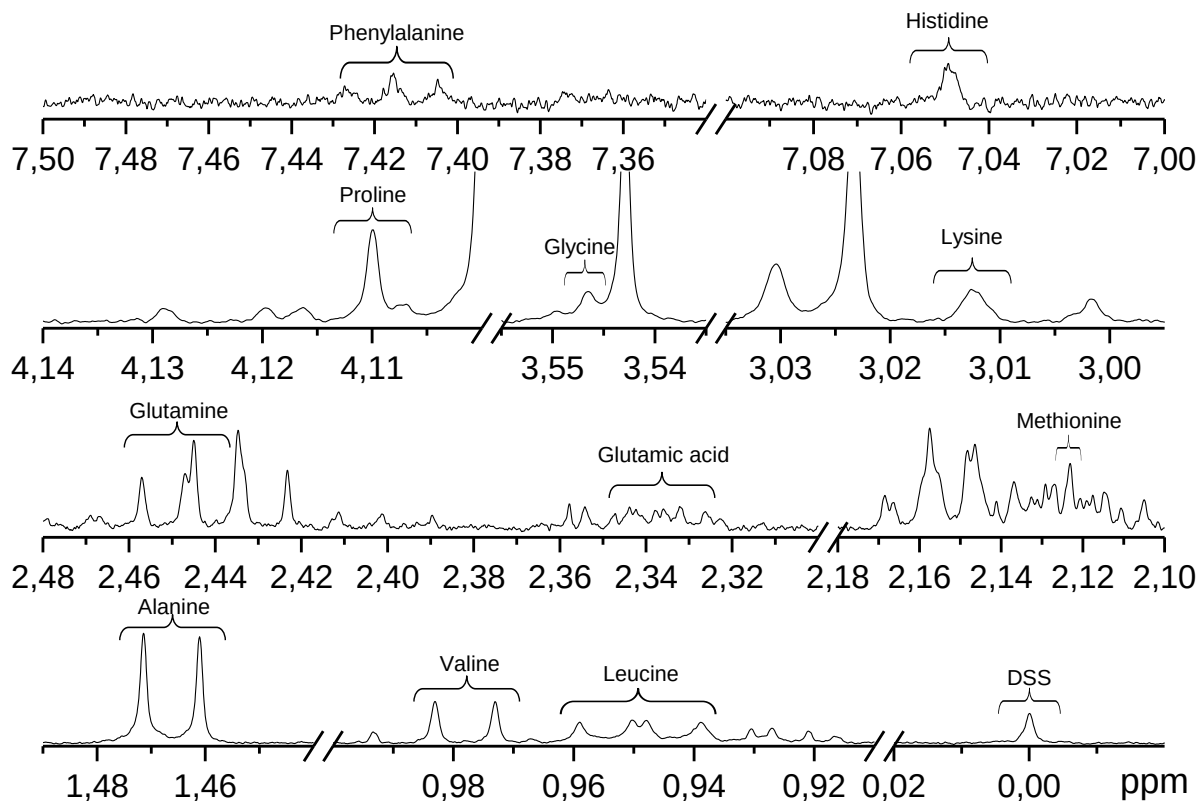


Рис. 6. Сигналы идентифицированных аминокислот на ЯМР спектре

Полученные на ЯМР спектры (см. рис.6) обрабатывались в программном обеспечении MestRENOva. Обработка включает в себя следующие этапы:

1. Выставление эталонного сигнала на нулевой химический сдвиг. После снятия данных весь спектр оказывается несколько смещен относительно нуля, поэтому необходимо сместить его так, чтобы эталон совпадал с нулем.
2. Проведение базовой линии. В отобранном растворе осталось некоторое количество липидов и белков, поэтому в спектре присутствуют большие горбы – их сигналы. Из-за этого уровни сигналов метаболитов поднимаются, и для того чтобы получить реальное значение под площадями их графиков, необходимо опустить уровень оснований пиков до нуля.
3. Интегрирование. При помощи базы данных с химическими сдвигами интересующих нас метаболитов [6] вычисляются интегралы их сигналов, а из них – искомые концентрации. Для подтверждения идентификации используются стандарты.

После этого значения интегралов были занесены в таблицу и далее обрабатывались при помощи программного обеспечения Microsoft Excel. Результаты обработки приведены в таблицах 1, 2.

Обсуждение результатов

Источники погрешностей

При подготовке образцов важно было получить раствор, содержащий минимальное количество посторонних примесей. На этапе отбора раствора с метаболитами (см. рис. 6) пробка, разделяющая две жидкости, повреждалась, и часть хлороформного раствора поднималась. Чтобы исключить попадание липидов из этого раствора к образцам, приходилось оставлять некоторый объем верхнего раствора в пробирке, оценочное значение ошибки не превышает 10%. Погрешность измерения интегралов по спектрам ЯМР много меньше описанной выше, поэтому в работе не учитывалась.

Анализ данных

Во втором столбце таблиц 1, 2 перечислены названия аминокислот, которые удалось идентифицировать в образцах. В таблице 1 приведены концентрации аминокислот в расчете на единицу объема, в моль/мл. В таблице 2 приведены относительные концентрации образцов по сравнению с образцом NB0, который не подвергался термической обработке (то есть полученное число $x_i = n_i/n_0$, где n_i – концентрация метаболита в образце i , n_0 – концентрация метаболита в образце NB0). Таким образом, число меньше 1 указывает на уменьшении концентрации по сравнению с контрольным образцом, а большее 1 – на ее увеличение.

Таблица 1. Концентрации аминокислот по образцам

№	Название аминокислоты	Концентрация аминокислот по образцам, моль/мл				
		NB0	NB30	NB60	NB120	NB250
1	Лейцин	118,5	113,3	118,9	155,6	163,9
2	Валин	133,4	130,9	157,9	173,8	178,6
3	Аланин	177,2	161,4	192,9	210,2	243,6
4	Метионин	58,7	62,4	70,4	78,3	76,3
5	Глутаминовая кислота	384,6	324,1	352,0	470,1	401,6
6	Глутамин	773,6	672,8	719,8	628,6	728,3
7	Лизин	113,1	113,7	121,2	124,4	129,6
8	Глицин	44,3	57,5	59,9	53,6	44,6
9	Пролин	282,7	354,6	286,1	392,9	439,1
10	Гистидин	65,1	68,3	81,4	81,0	95,7
11	Фенилаланин	41,9	51,9	46,2	58,4	73,6

Таблица 2. Относительные концентрации аминокислот по образцам

№	Название аминокислоты	Относительная концентрация по образцам			
		NB30	NB60	NB120	NB250
1	Лейцин	0,96	1,00	1,31	1,38
2	Валин	0,98	1,18	1,30	1,34
3	Аланин	0,91	1,09	1,19	1,37
4	Метионин	1,06	1,20	1,33	1,30
5	Глутаминовая кислота	0,84	0,92	1,22	1,04
6	Глутамин	0,87	0,93	0,81	0,94
7	Лизин	1,01	1,07	1,10	1,15
8	Глицин	1,30	1,35	1,21	1,01
9	Пролин	1,25	1,01	1,39	1,55
10	Гистидин	1,05	1,25	1,25	1,47
11	Фенилаланин	1,24	1,10	1,40	1,76

Данные из таблицы 2 проиллюстрированы на гистограмме на рис.7.

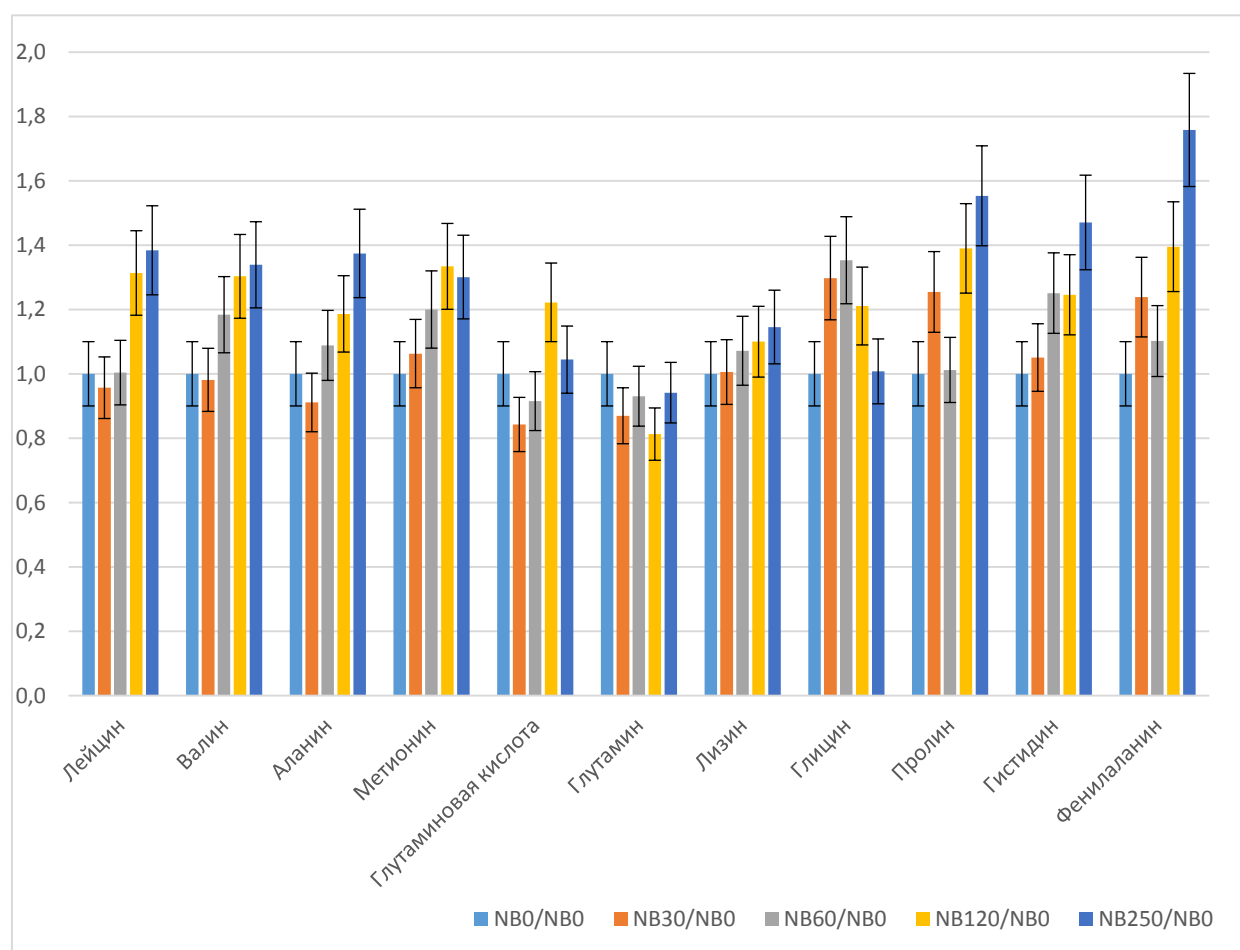


Рис. 7. Гистограмма изменения относительных концентраций в зависимости от времени нагрева образцов

Как видим из графиков, для аминокислот лейцин, валин, аланин, метионин, пролин, гистидин, фенилаланин при увеличении времени нагрева концентрации достоверно растут на 20-70%. Аминокислоты глутаминовая кислота, глутамин, лизин относительно стабильны при нагреве и для них выделенный тренд не обнаружен. Концентрация глицина сначала повышается, но затем спадает. Это может быть объяснено тем, что сначала концентрация растет из-за разрушения белков, а при дальнейшем нагреве уменьшается из-за разрушения структуры глицина. В нашем исследовании использовалась только одна температура нагрева, для более полного анализа термодегградации белков требуется продолжить исследование при более широком диапазоне условий.

Выводы

В ходе работы были изучены основы метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса, устройство ЯМР спектрометра. С его помощью были получены спектры исследуемых образцов, в которых были идентифицированы аминокислоты лейцин, валин, аланин, метионин, глутаминовая кислота, глутамин, лизин, глицин, пролин, гистидин, фенилаланин. Для одной группы аминокислот было отмечено увеличение концентраций при нагреве. Аминокислоты второй группы оказались стабильны при нагреве. Концентрация глицина сначала росла, затем уменьшалась.

Следовательно, нагрев действительно влияет на концентрации аминокислот. Для дальнейшего исследования нужно выявить, какие локальные температуры возникают при ударах матрицы о шарики, и какой средней температуры достигают образцы.

Для количественных метаболомных измерений при подготовке образцов следует тщательно выбирать методы подготовки образцов, при которых термическое воздействие будет минимальным.

Список литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. 1 том. М.: Мир, 1994. С. 16-26.
2. Djikaev YS, Ruckenstein E (2008) Temperature effects on the nucleation mechanism of protein folding and on the barrierless thermal denaturation of a native protein. *Phys Chem Chem Phys* 10:6281–6300.
3. Borzova VA, Markossian KA, Chebotareva NA, et al (2016) Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin. *PLoS One* 11:e0153495.
4. Черкасов В. К., Курский Ю. А., Кожанов К. А., Шавырин А. С., Бубнов М. П., Куропатов В. А. Методы ЭПР и ЯМР в органической и элементорганической химии. Н. Новгород, 2010. С. 37-45.
5. Яковлев В. И. Классическая электродинамика: Часть 1. Электричество и магнетизм. М.; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2016. С. 191-201.
6. Поисковая база метаболитов человека Human Metabolome Database: <http://www.hmdb.ca>