



Применение спектроскопии ЯМР в биохимии и структурной биологии

к.х.н. Марьясина Софья Семеновна

Лаборатория Магнитной
Томографии и Спектроскопии
ФФМ МГУ, н.с.

Химический факультет МГУ, н.с.

Москва, 2023

Лаборатория Магнитной Томографии и Спектроскопии ФФМ МГУ

Лабораторный корпус Б, к. 125-135



I. МРТ-томограф



II. Твёрдотельный ЯМР-спектрометр



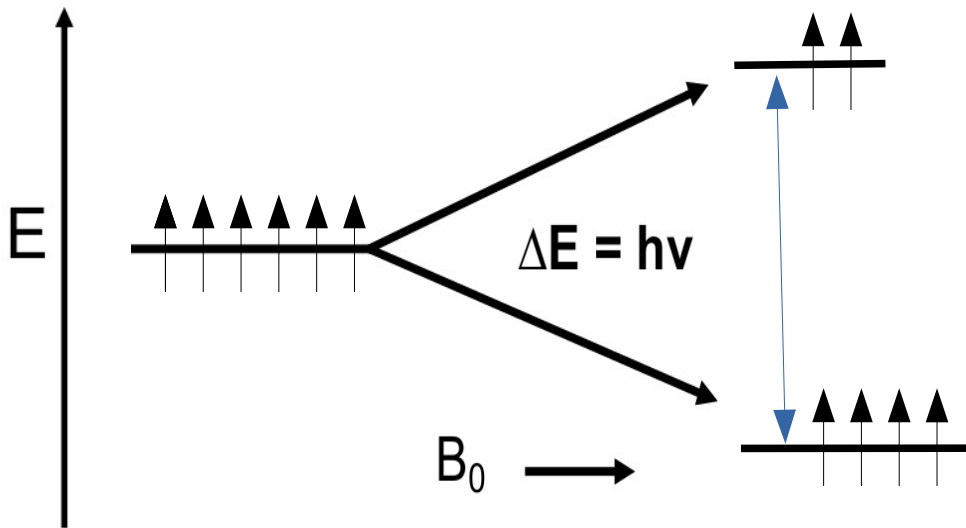
III. Жидкостной
ЯМР-спектрометр



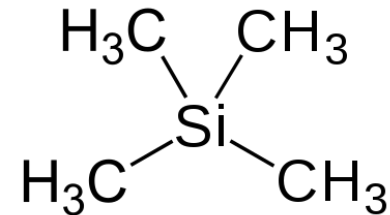
Ядерный магнитный резонанс: природа явления

Нет магнитного поля:
энергетические уровни
ядра вырождены
(т. е. одинаковы по энергии)

В магнитном поле энергетические уровни
различаются
(«снятие вырождения»).



Тетраметилсилан (стандарт)



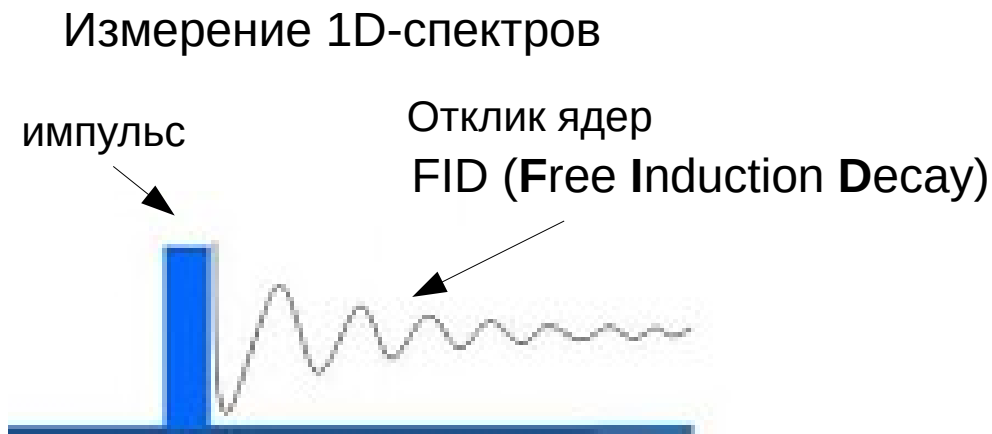
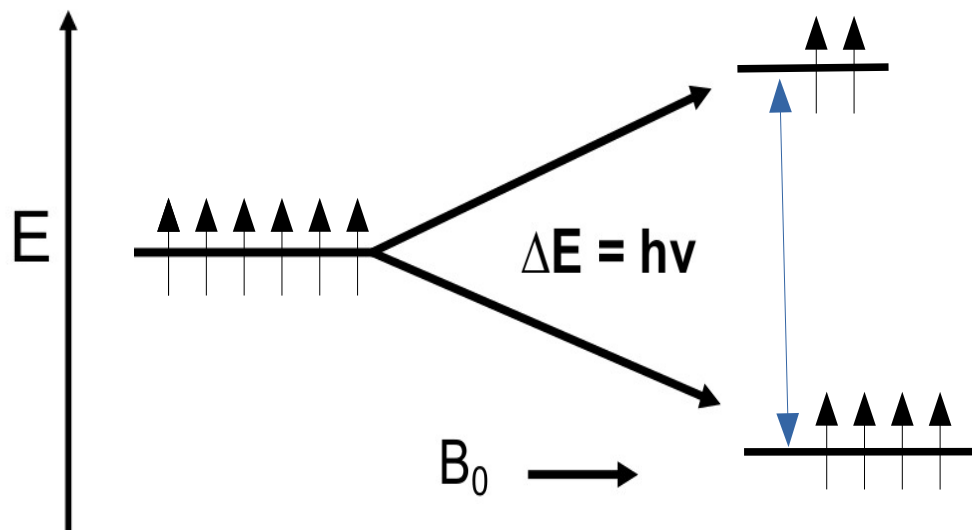
$\nu_{\text{H}} = 600 \text{ МГц}$
(для прибора 600 МГц)

ΔE зависит от химического окружения ядер (какие атомы рядом).

Больше магнитное поле — больше ΔE для всех ядер, больше разрешение

Основная характеристика ЯМР-спектрометра — резонансная частота поглощения ядер H в TMS

Ядерный магнитный резонанс: природа явления

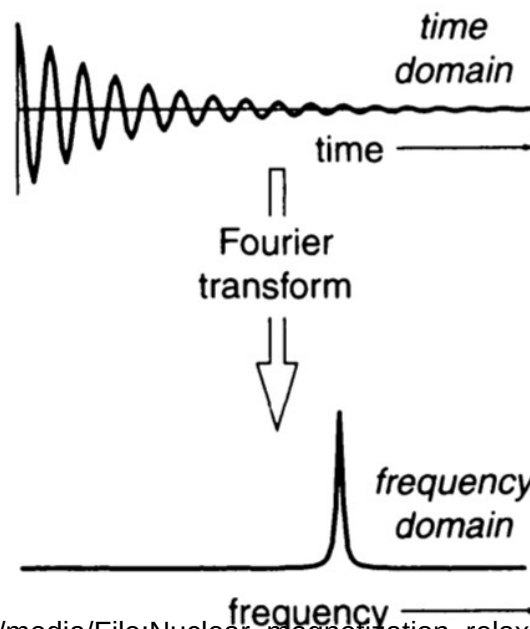


Раньше:

- изменяют частоту
- измеряют поглощение

Сейчас (импульсная спектроскопия ЯМР):

- облучают на всех длинах волн
- измеряют излучение
- преобразование Фурье

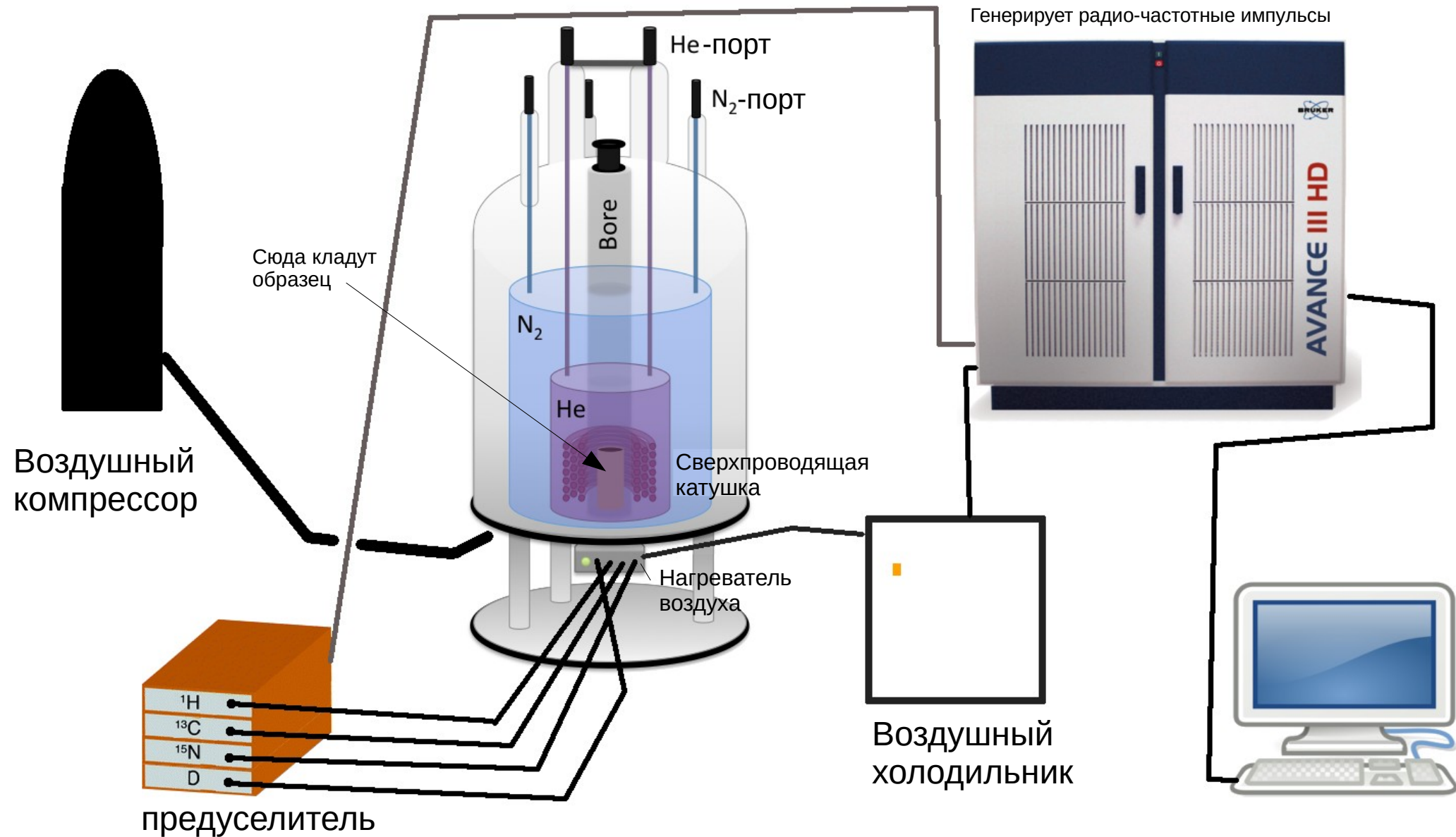


ЯМР-спектрометр

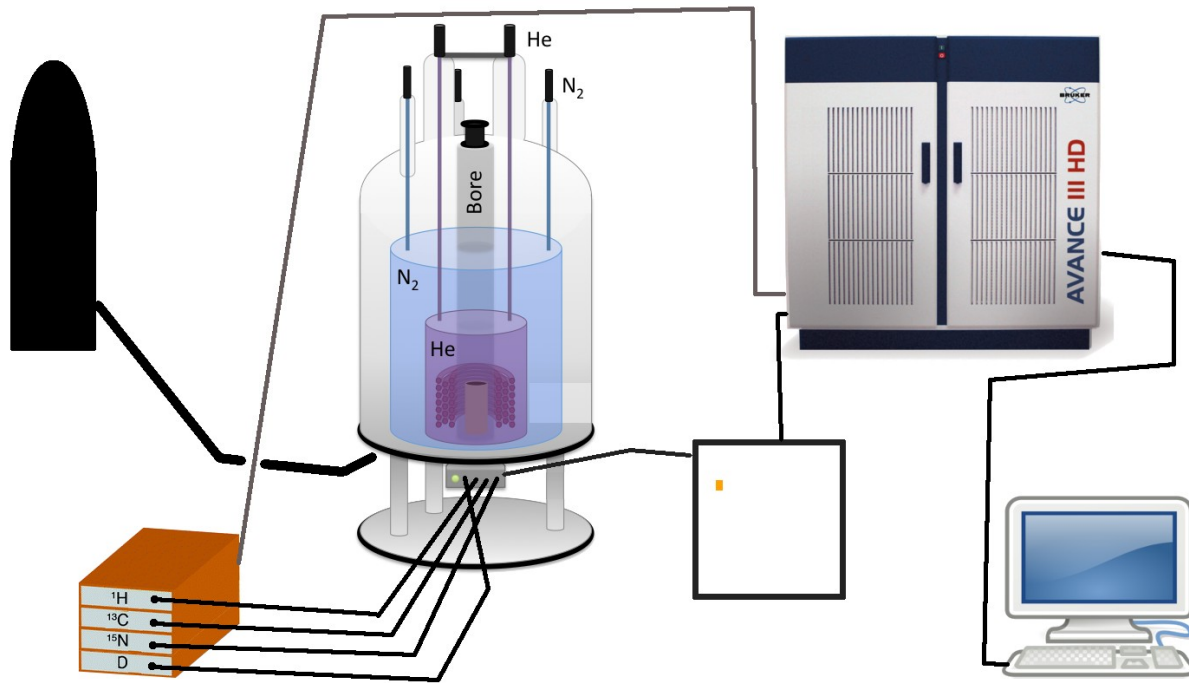
Магнит

Консоль

Генерирует радио-частотные импульсы



ЯМР-спектрометр



ЯМР-магнит



Ядра, которые видно в ЯМР

1A ^1H																					
^2H	2A															3A ^{10}B ^{11}B	4A ^{13}C	5A ^{15}N	6A ^{17}O	7A ^{19}F	8A
^6Li ^7Li	^7Be															^{27}Al	^{29}Si	^{31}P			
^{23}Na		3B ^{37}Sc	4B	5B ^{51}V	6B	7B ^{55}Mn	8B ^{59}Co		1B ^{63}Cu ^{65}Cu	2B	^{69}Ga ^{71}Ga	^{27}Al	^{29}Si	^{31}P	^{75}As	^{77}Se	^{79}Br ^{81}Br				
^{57}Rb				^{93}Nb		^{99}Tc				^{111}Cd ^{113}Cd	^{113}In ^{115}In	^{117}Sn ^{119}Sn	^{121}Sb ^{123}Sb	^{123}Te ^{125}Te	^{127}I	^{129}Xe					
^{133}Cs	^{137}Ba	^{139}La		^{151}Ta		^{155}Re ^{157}Re		^{195}Pt		^{199}Hg		^{207}Pb	^{209}Bi								
		^{141}Pr		^{159}Tb		^{151}Eu ^{153}Eu				^{165}Ho			^{171}Yb	^{175}Lu							

	Природное содержание (%)	Применение
^1H	99.98	
^{13}C	1.1	
^{15}N	0.365	Белки
^{31}P	100	Нуклеиновые кислоты
^{19}F	100	Аналог H, малые молекулы
$^{111}\text{Cd} / ^{113}\text{Cd}$	12.8 / 12.2	Аналог Zn в белках

Применение спектроскопии ЯМР в биохимии и структурной биологии

I. ЯМР малых молекул

- определение формулы
- определение состава смесей
- исследование путей протекания реакций
- определение констант связывания
- конформации субстрата на активном центре
- ЯМР-метаболомика

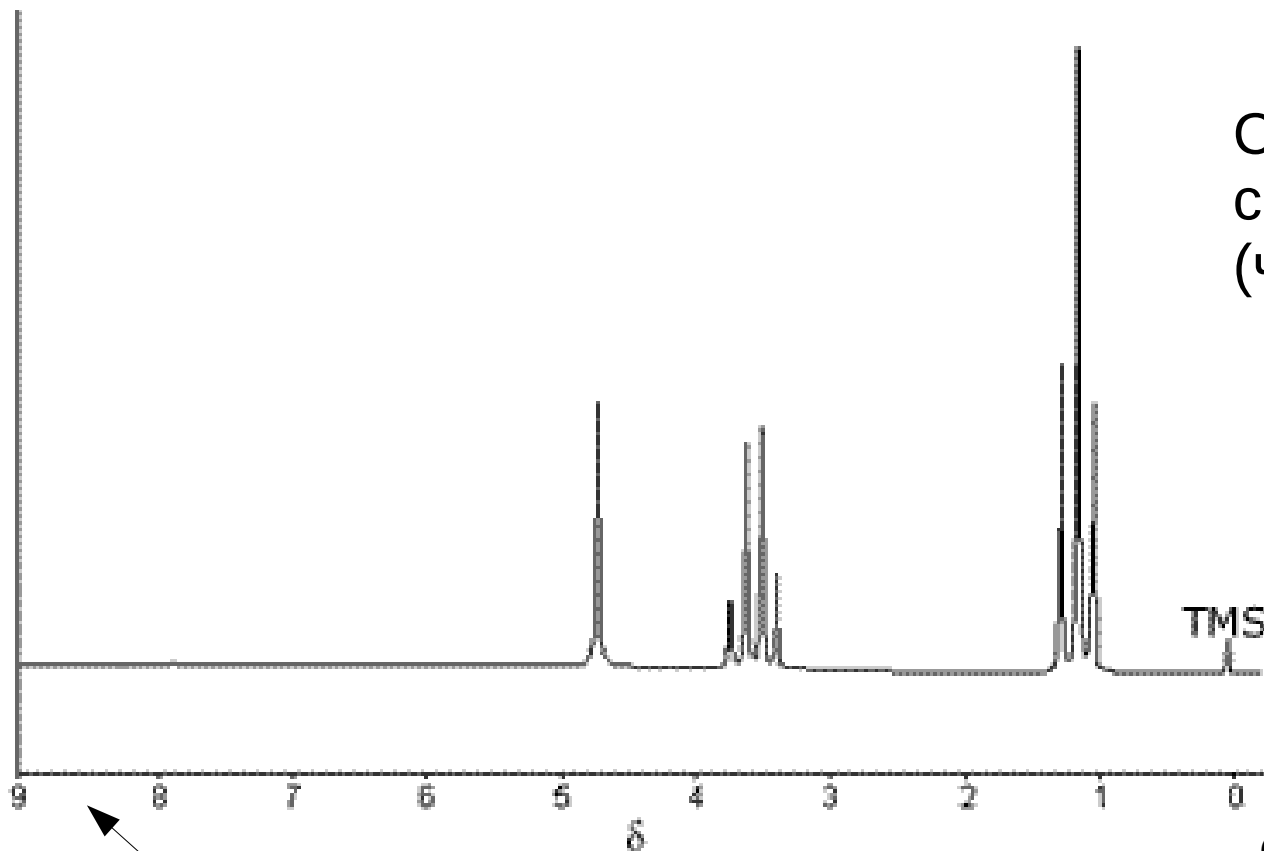
II. ЯМР макромолекул

- определение пространственного строения
- взаимодействие с малыми молекулами
- изменение под влиянием внешних воздействий
- взаимодействие с другими макромолекулами
- изучение динамических свойств

ЯМР: типы спектров

- 1D на разных ядрах
- 2D

1D ЯМР-спектр



Спектр измеряют на ядрах с «ненулевым спином» (чаще всего ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P)

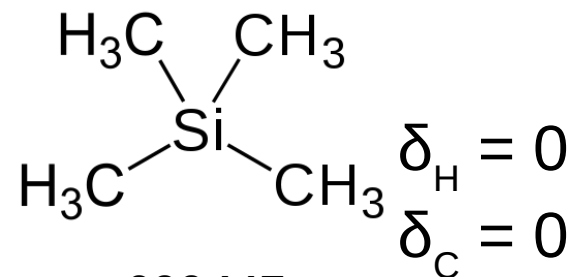
«Химический сдвиг» (δ).

Размерность: «миллионные доли» (м.д. или ppm)

$$\delta = (\nu_{\text{вещество}} - \nu_{\text{стандарт}}) / \nu_0 * 10^6 \text{ (м.д.)}$$

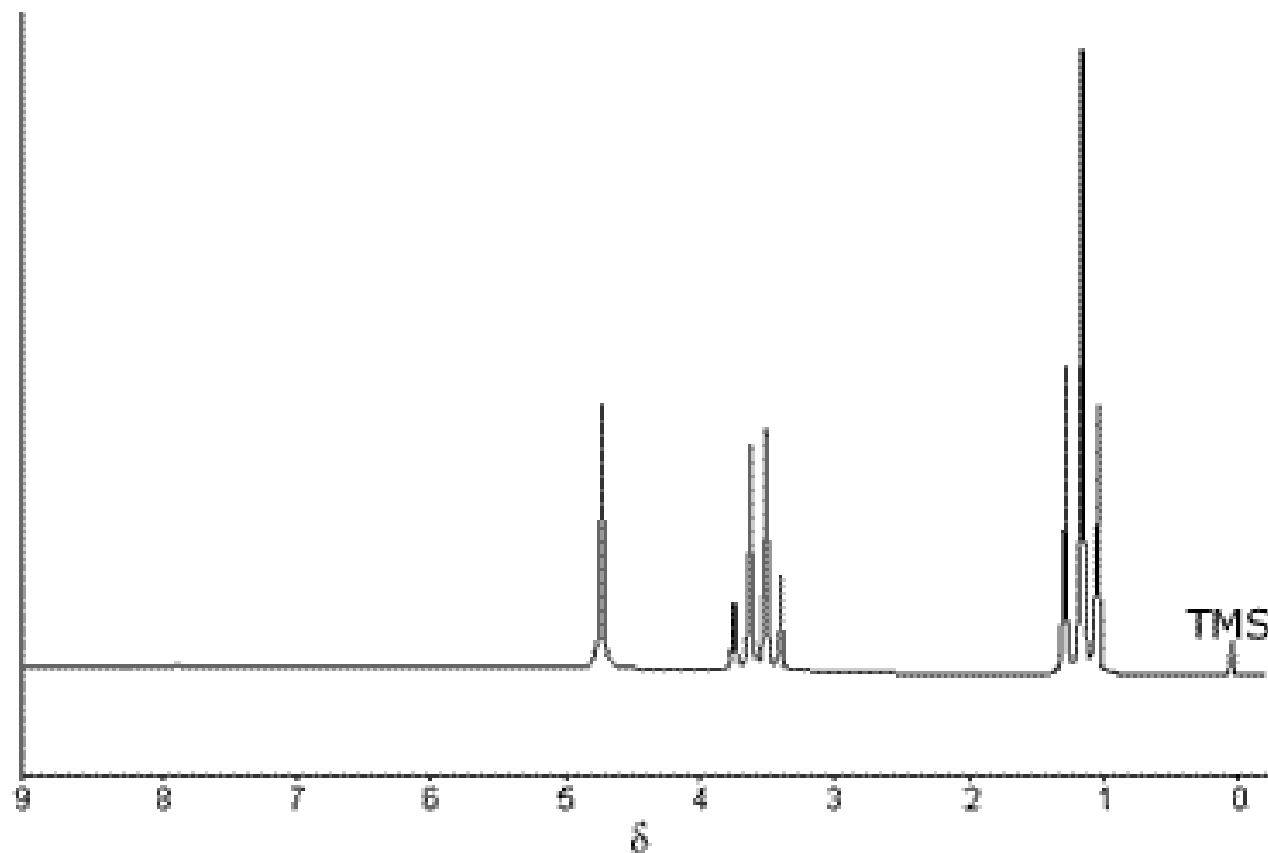
ν — частота поглощения ядра, помещенного в магнитное поле.
 $E = h\nu$

Стандарт: TMS (тетраметилсилан)



$\nu_{\text{H}} = 600 \text{ МГц}$
 (для прибора 600 МГц)

Определение формулы вещества

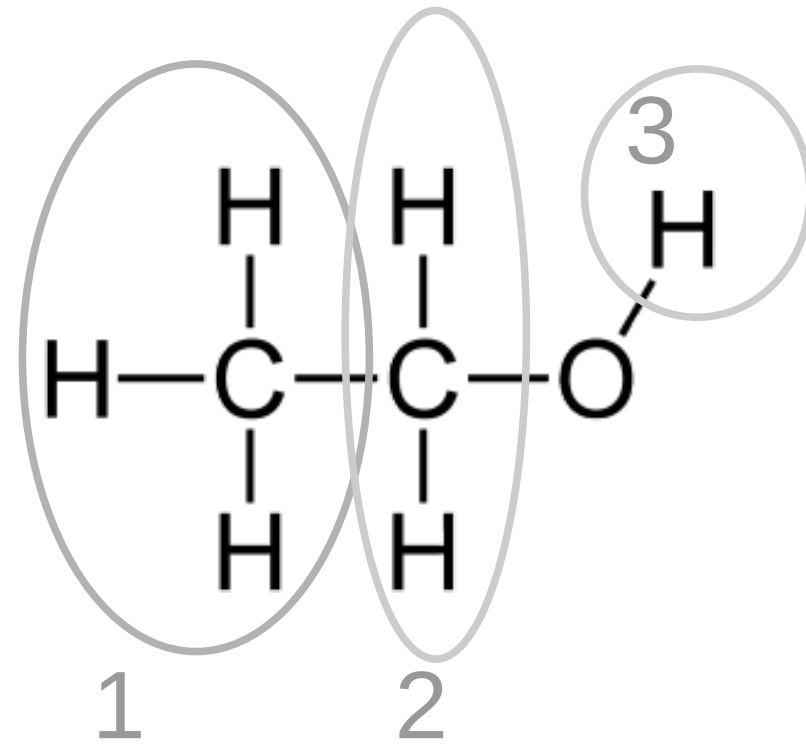
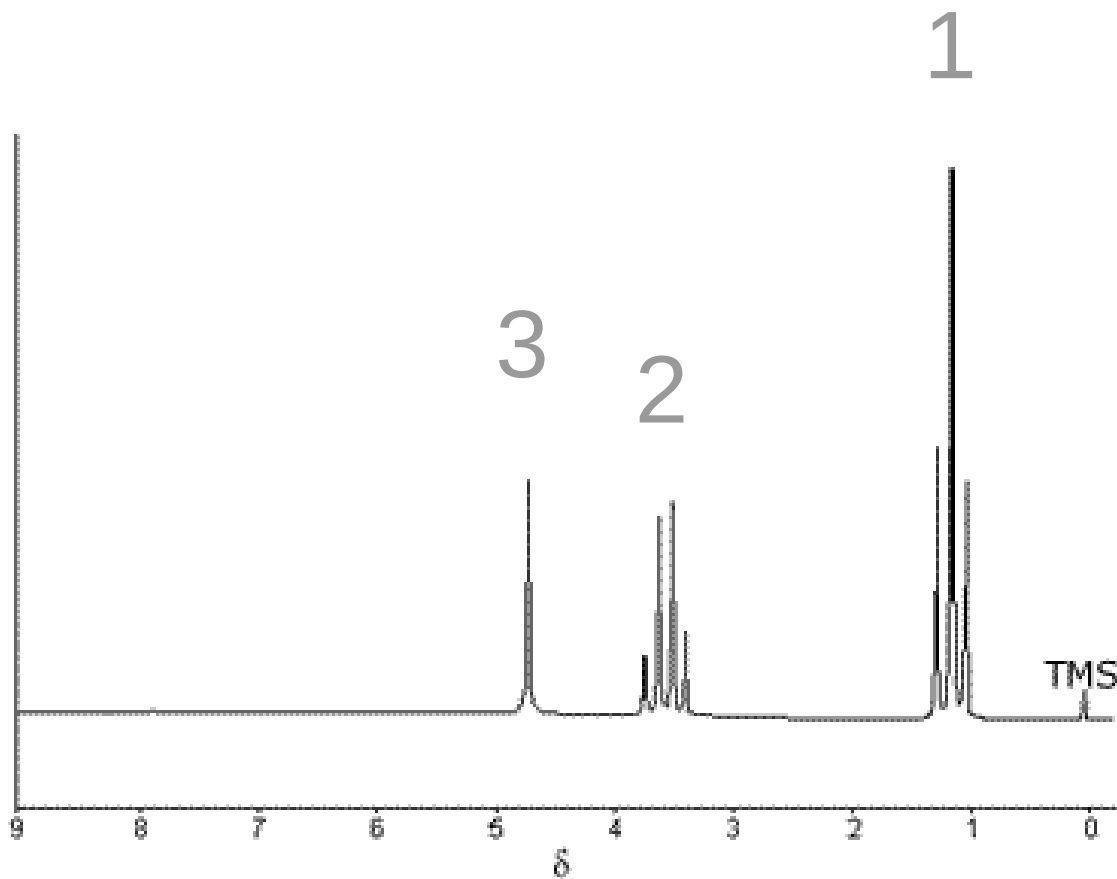


ЯМР-спектр

- ЧИСЛО СИГНАЛОВ → ЧИСЛО НЕЭКВИВАЛЕНТНЫХ АТОМОВ
- ИНТЕНСИВНОСТЬ СИГНАЛА → КОЛИЧЕСТВО АТОМОВ
- ФОРМА СИГНАЛОВ → ХИМИЧЕСКОЕ ОКРУЖЕНИЕ
- ПОЛОЖЕНИЯ СИГНАЛОВ → ХИМИЧЕСКОЕ ОКРУЖЕНИЕ

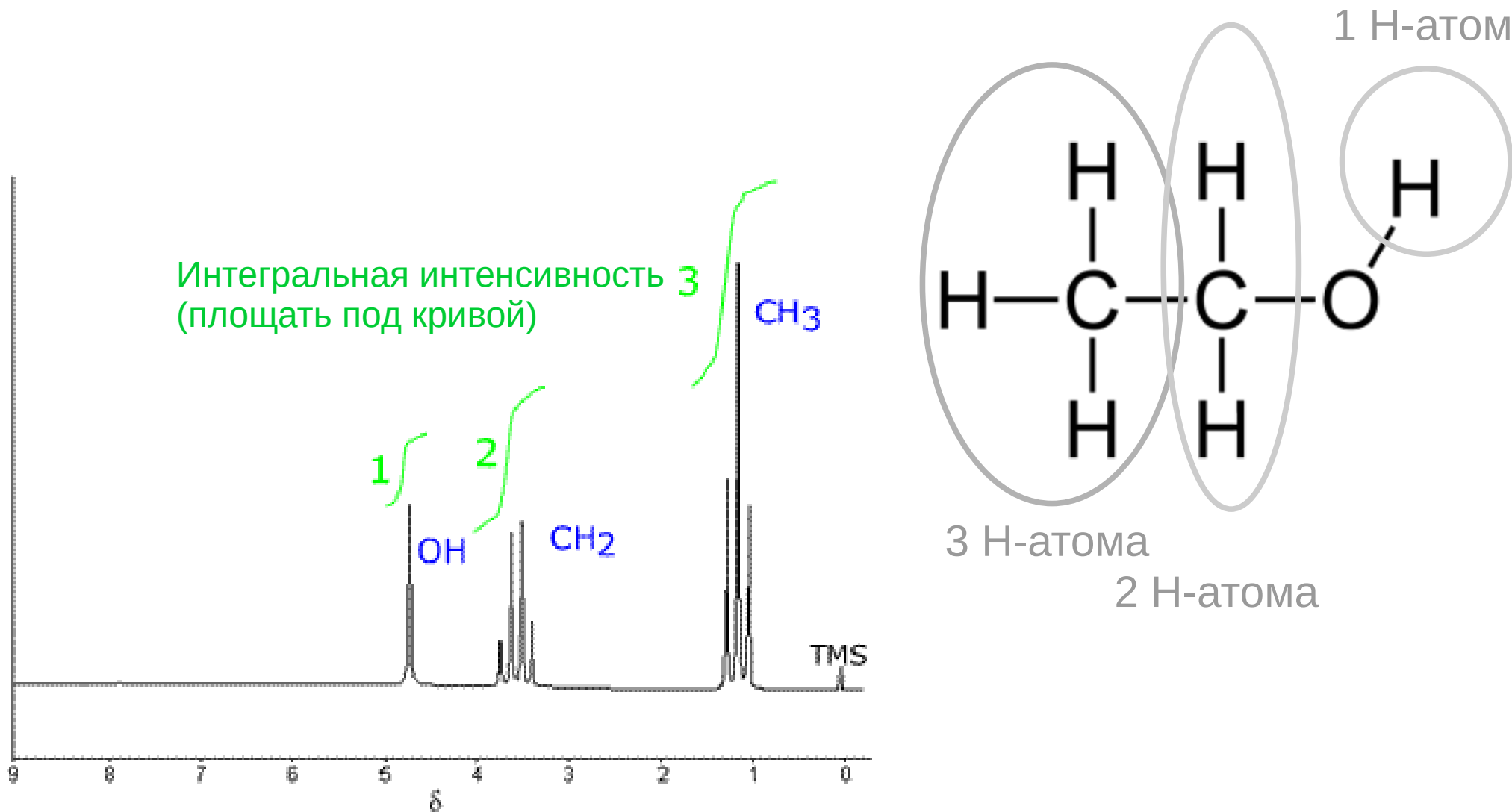
Определение формулы вещества

Число сигналов = число неэквивалентных атомов



Определение формулы вещества

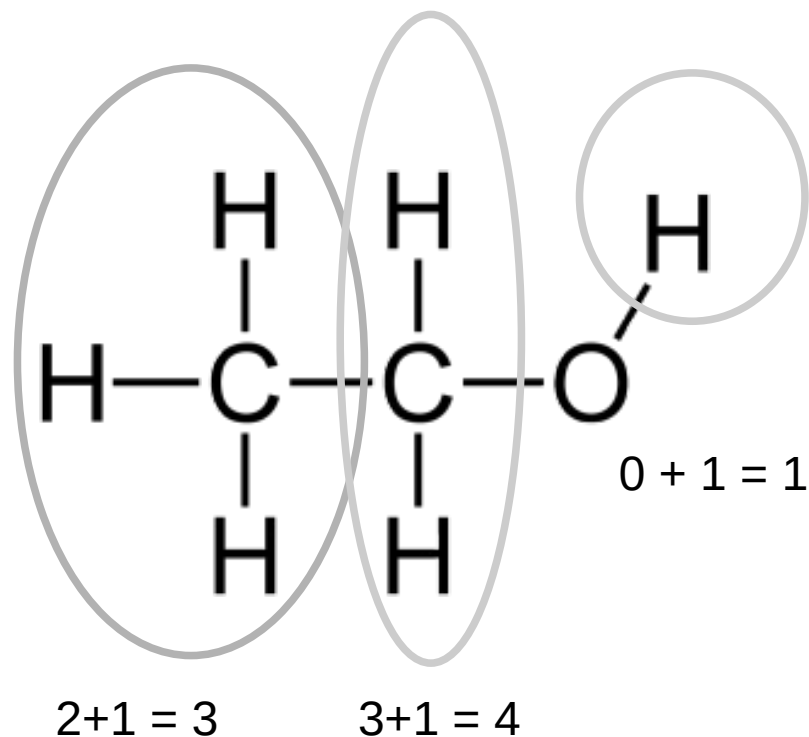
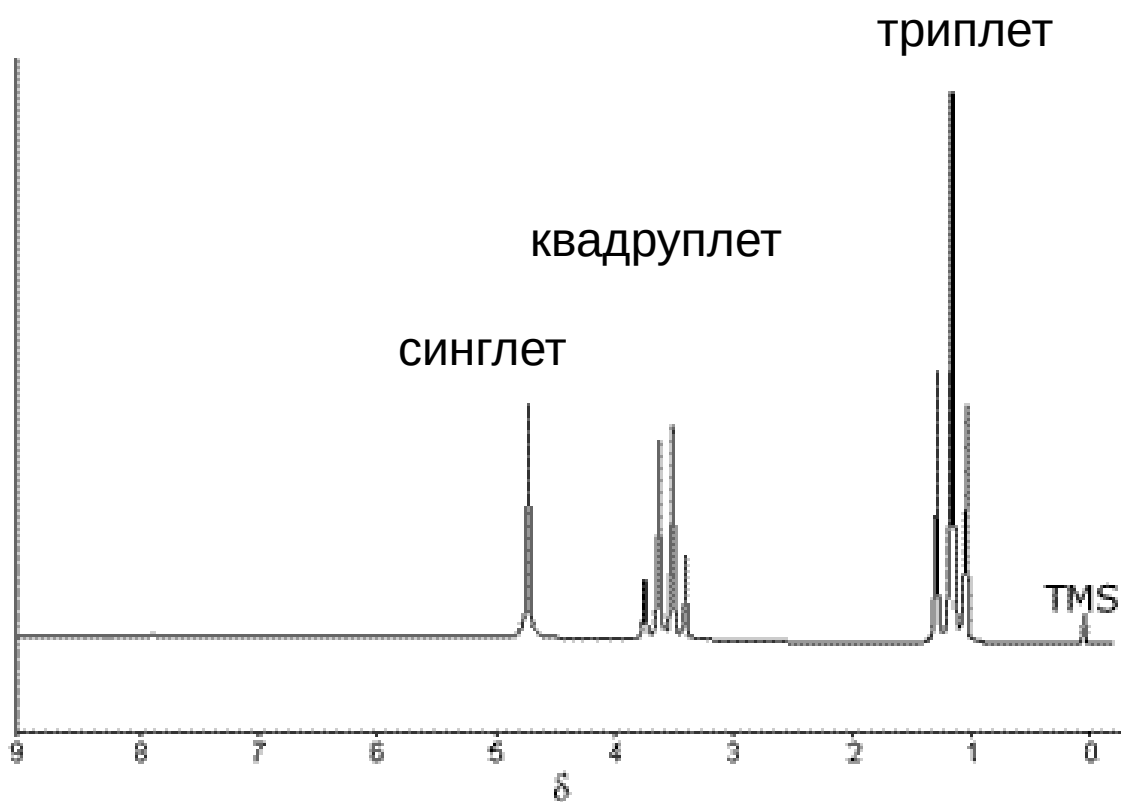
Интенсивность сигналов ~ число эквивалентных атомов



Определение формулы вещества

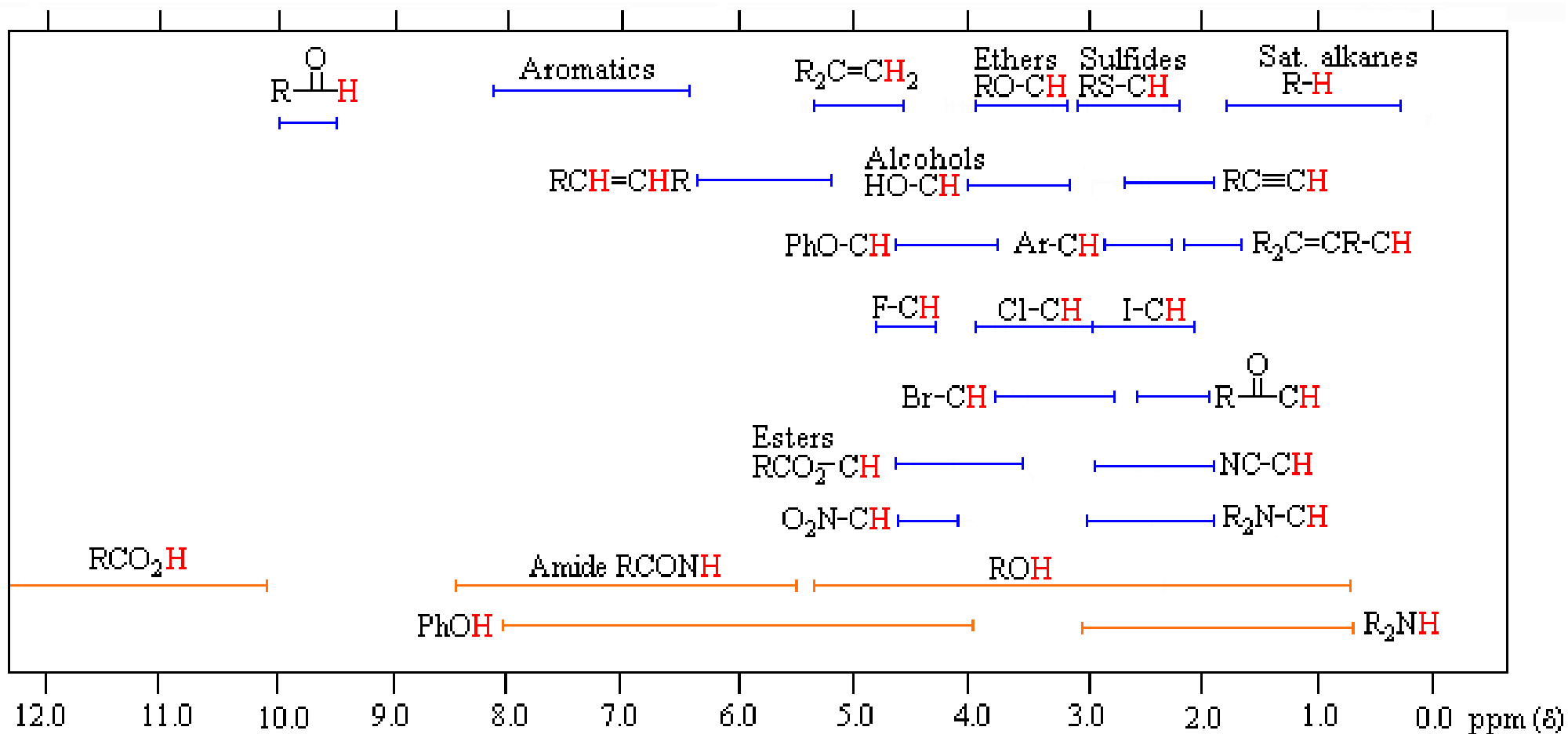
Форма сигналов → химическое окружение

Мультиплетность = количество H при соседних C + 1



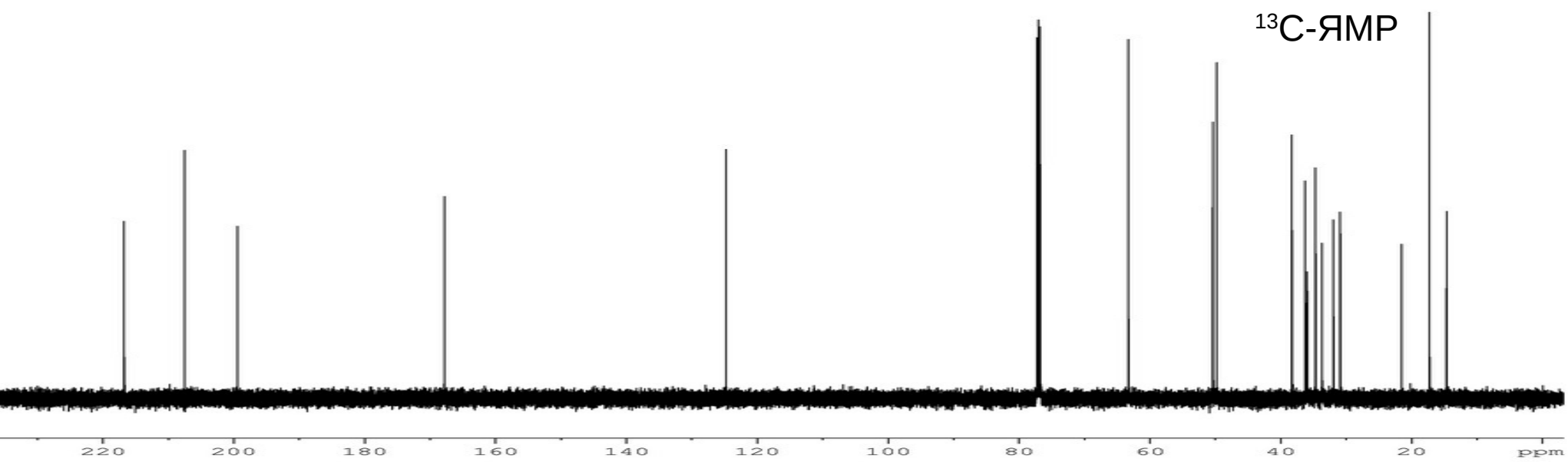
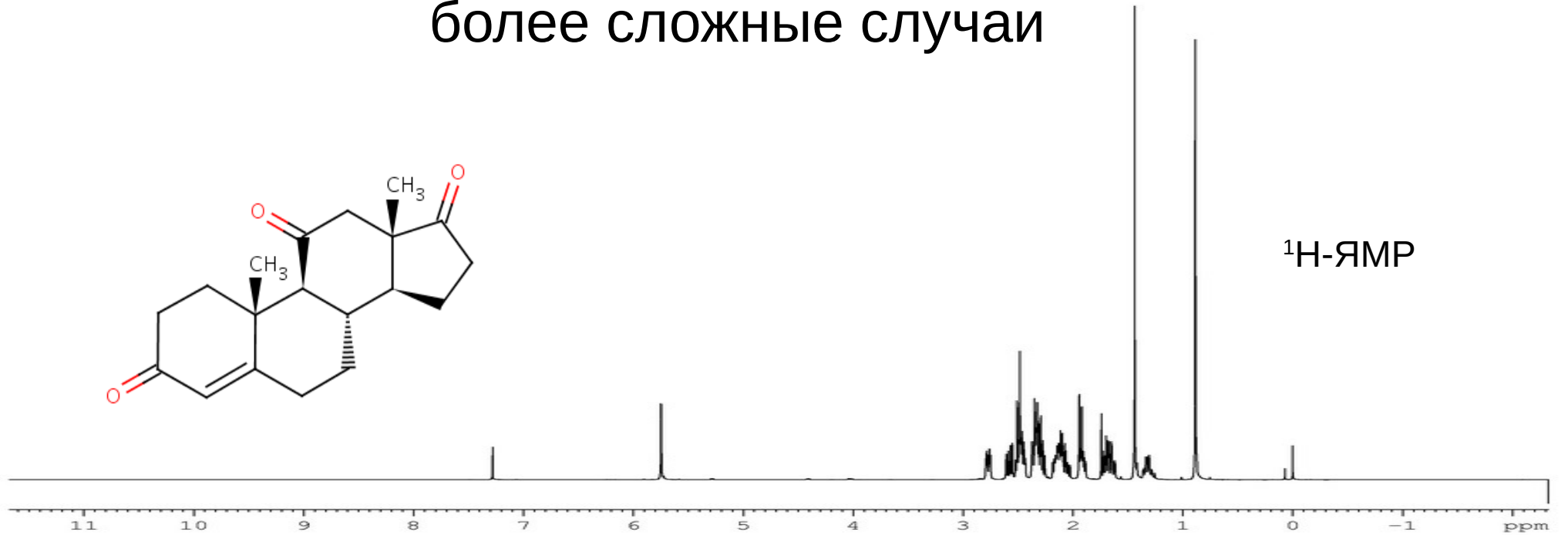
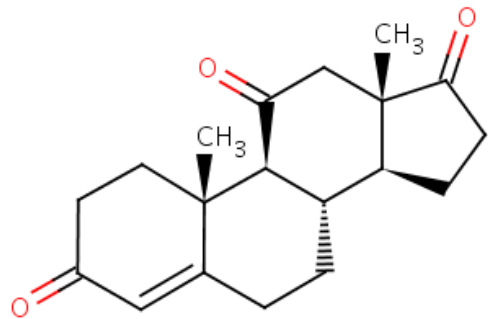
Определение формулы

положения сигналов → химическое окружение

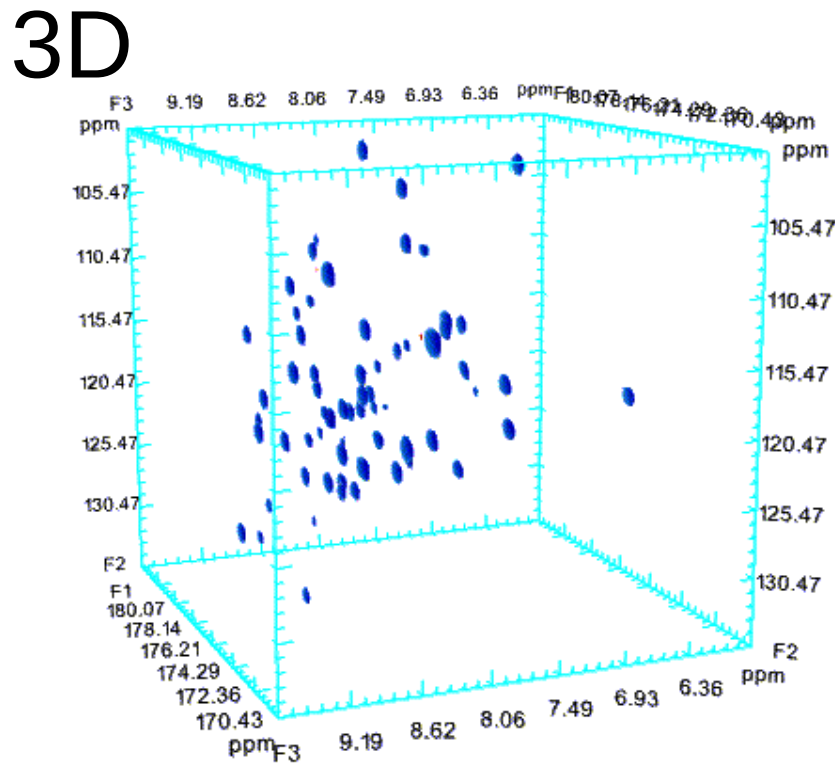
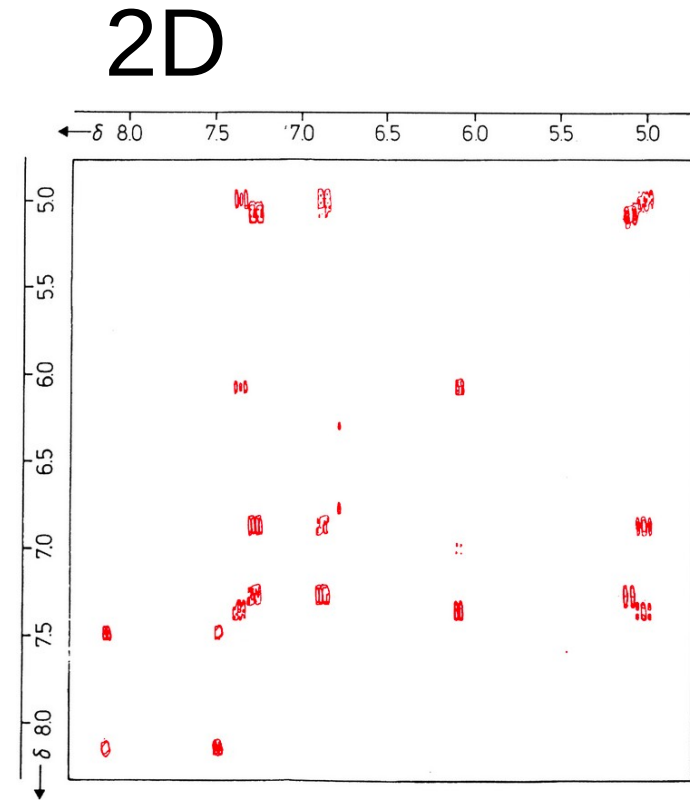
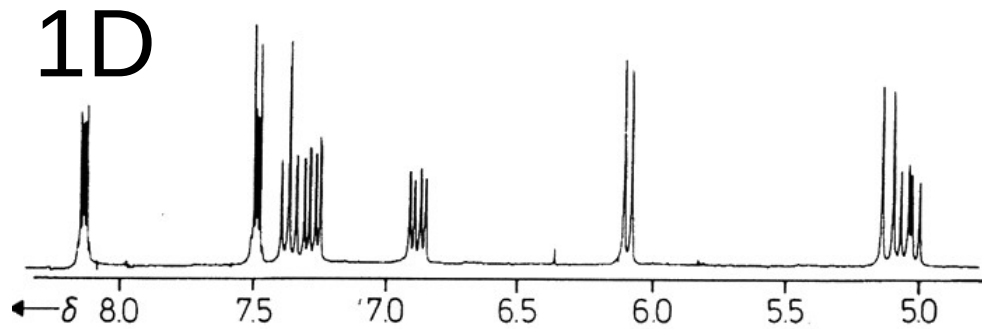


← Близость электроотрицательных атомов или ароматических колец

Определение формулы: более сложные случаи



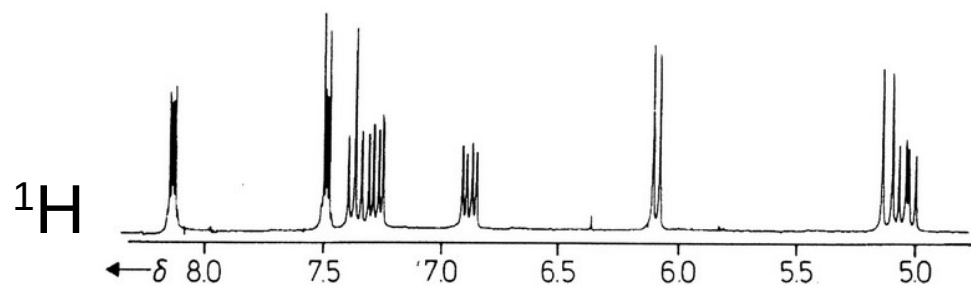
Размерность спектров ЯМР



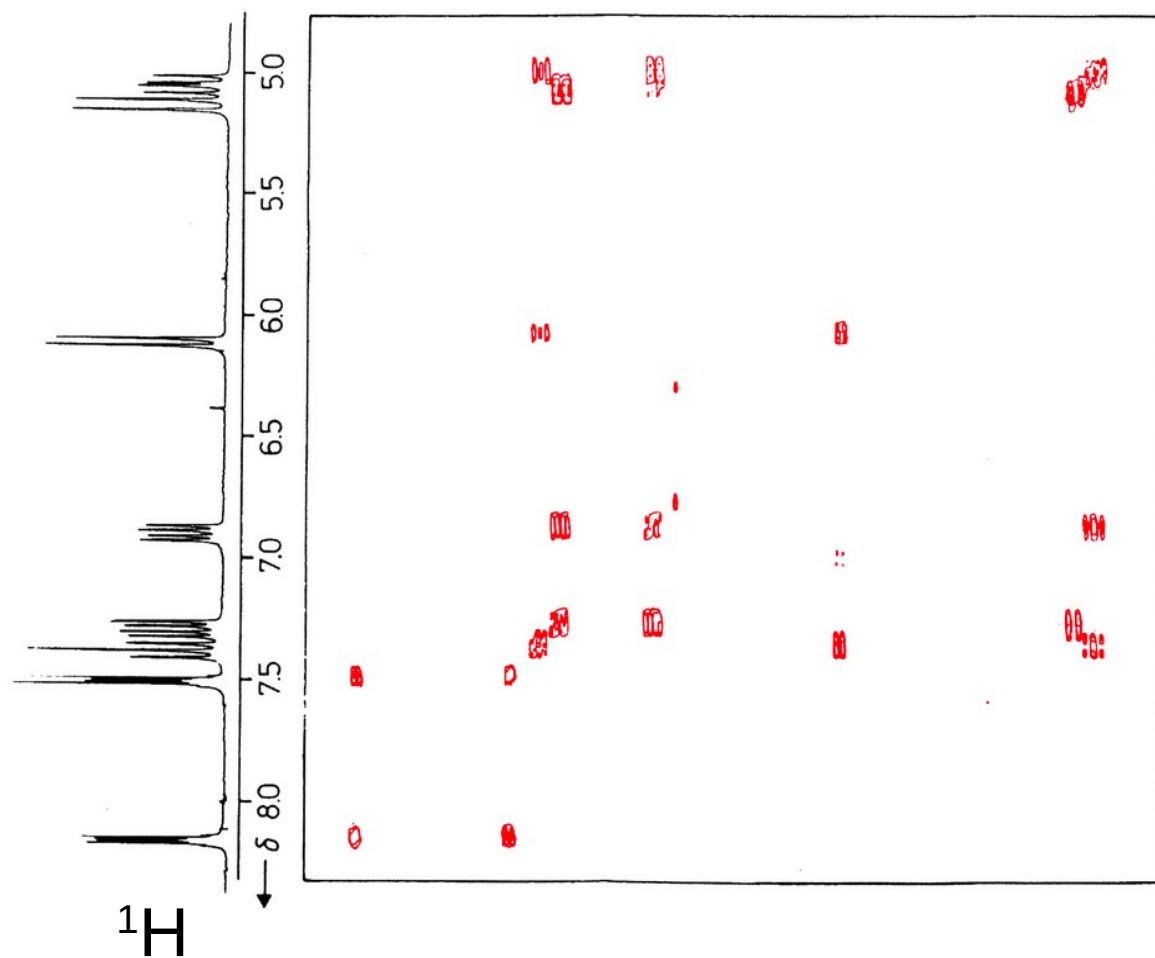
4D, 5D, 6D, 7D, ...

Оси на 2D спектре: δ (ppm)

Магнитно-активные ядра:
 ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ...



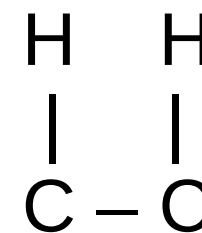
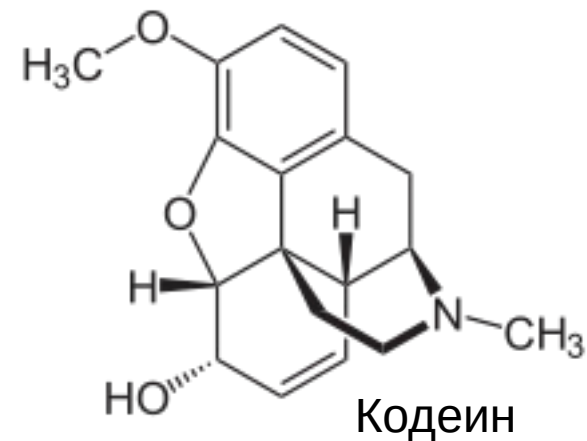
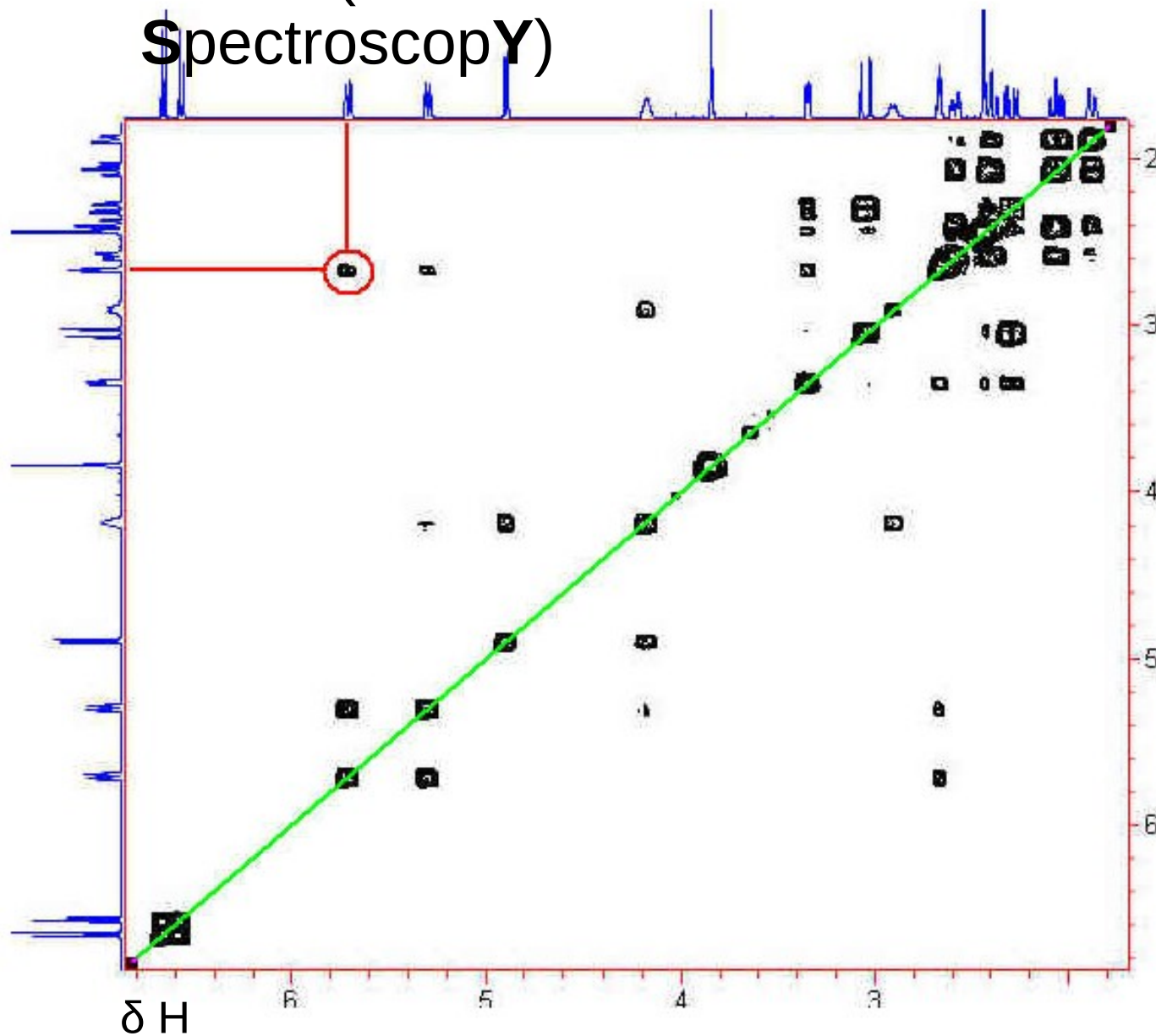
1D спектр



Определение формулы: отнесение сигналов

2D-ЯМР

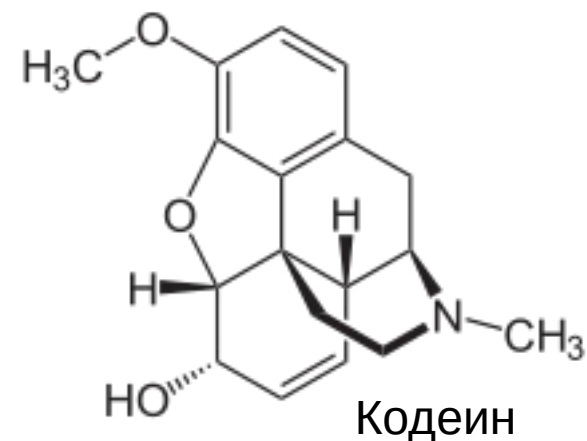
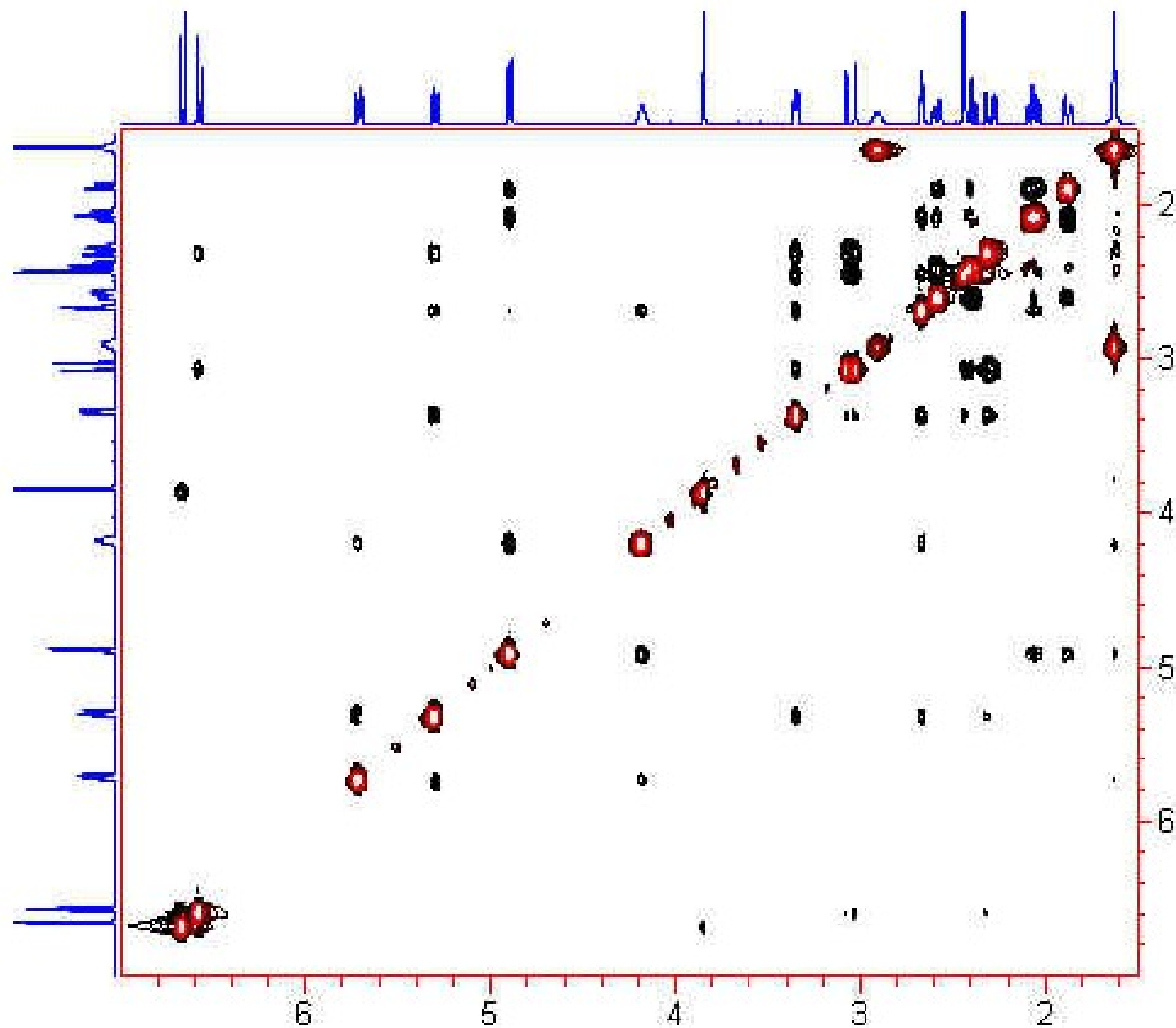
COSY (CORrelation SpectroscopY)



Кросс-пики для атомов, разделенных < 4 хим. связями

δ H

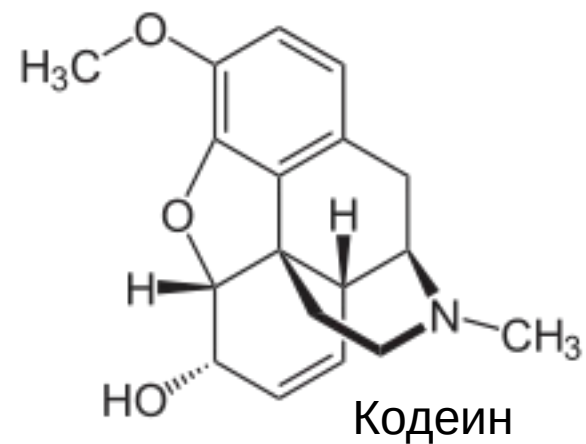
Определение пространственного строения: NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)



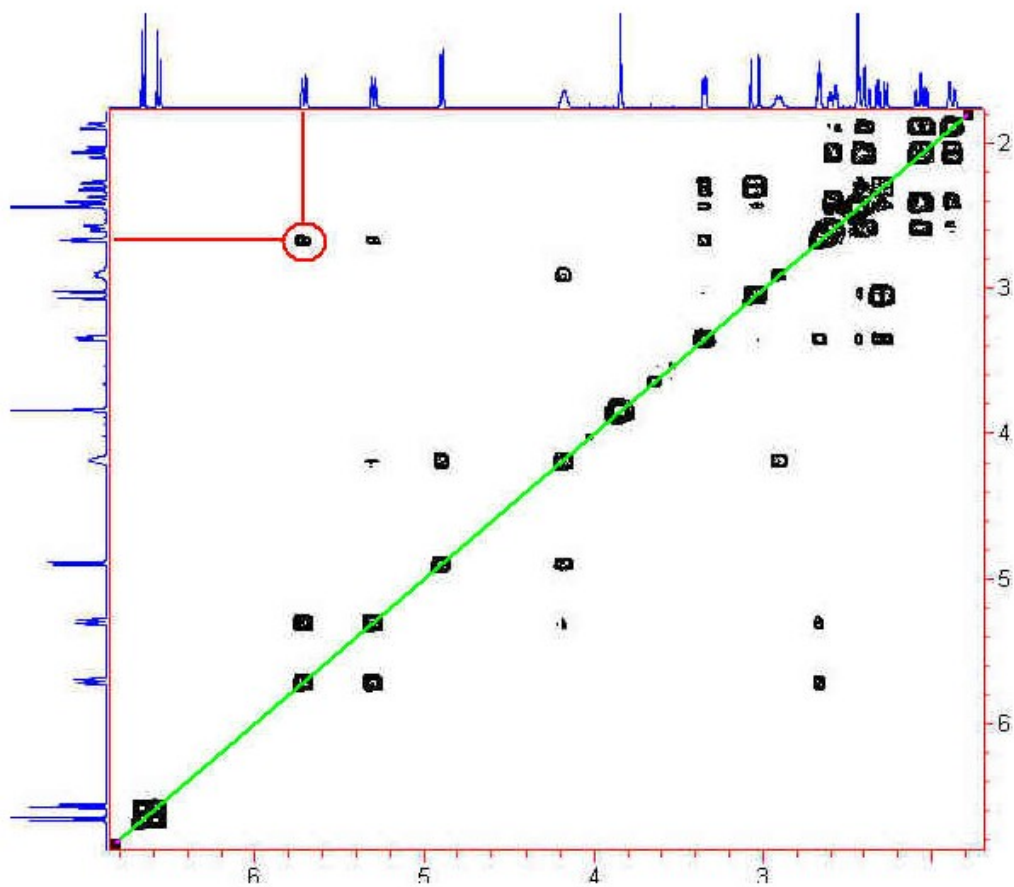
Видим кросс-пики
близко расположенных
атомов в пространстве

до 5 Å
R - H H - R

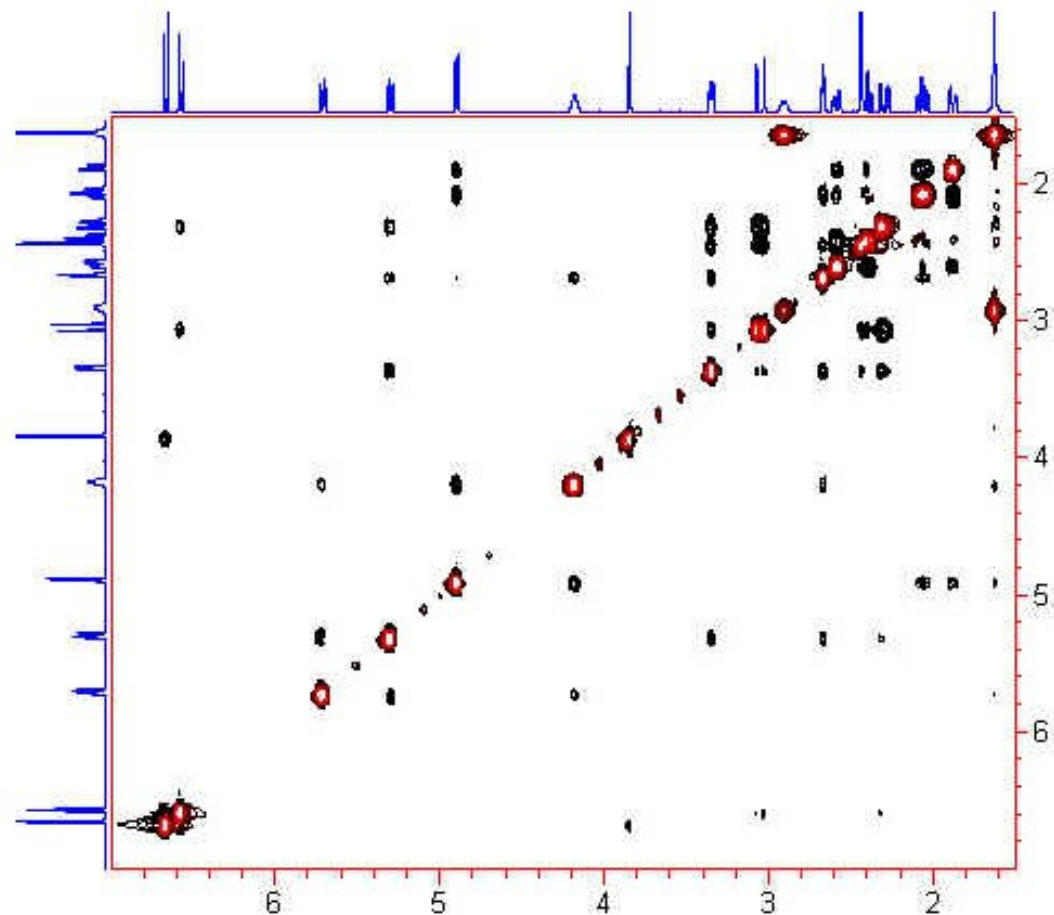
Определение формулы: COSY vs NOESY



COSY vs NOESY

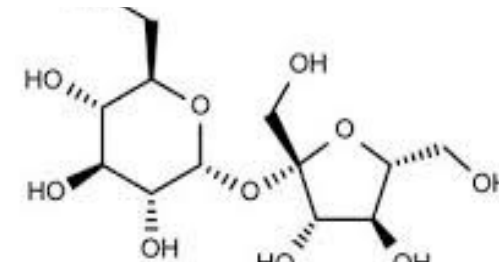
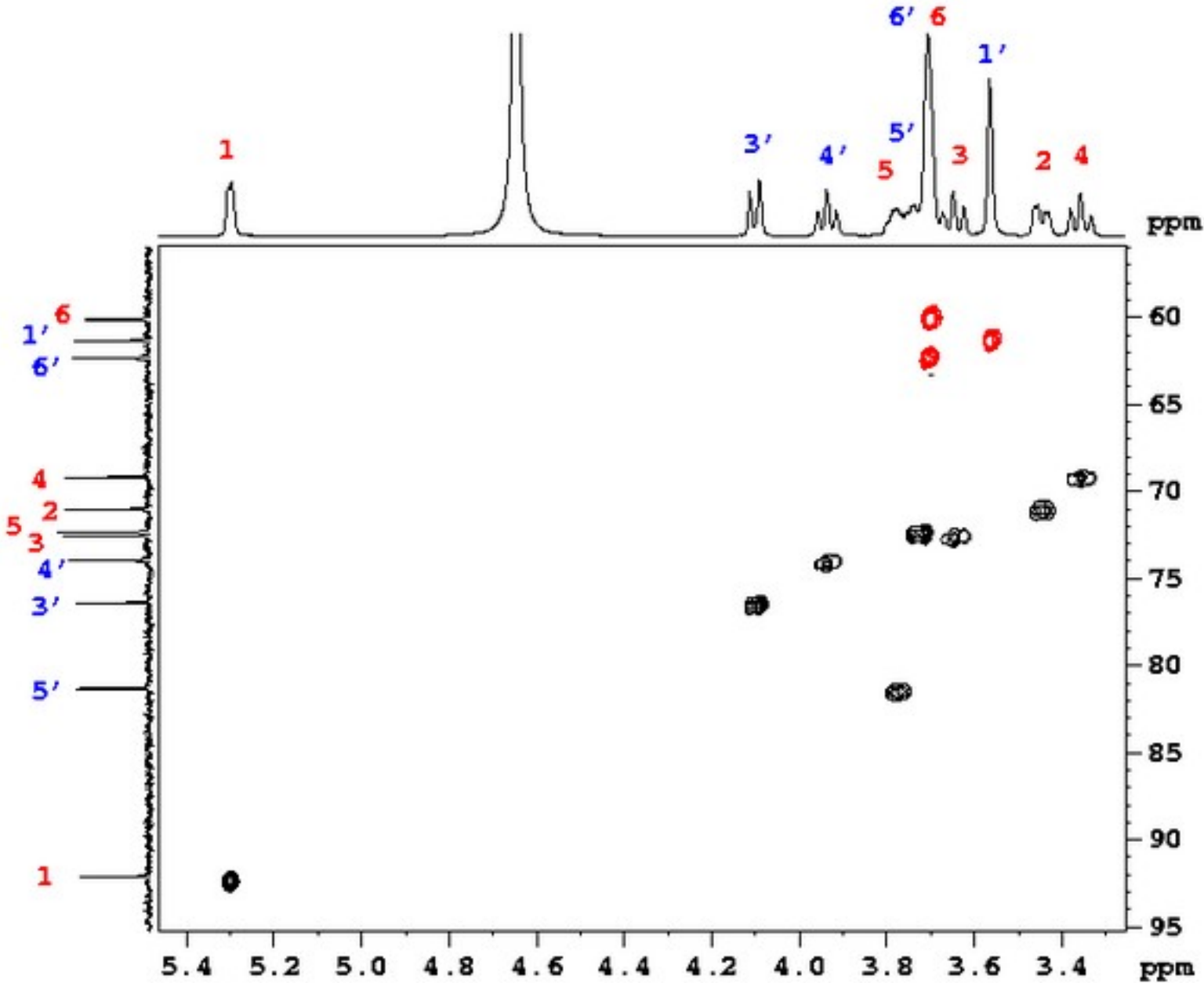


Кросс-пик: $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{C} - \text{C} \end{array}$ близкие по хим. связям

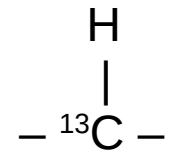


Кросс-пик: Н...Н, близкие в пространстве

Определение формулы: ¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy)



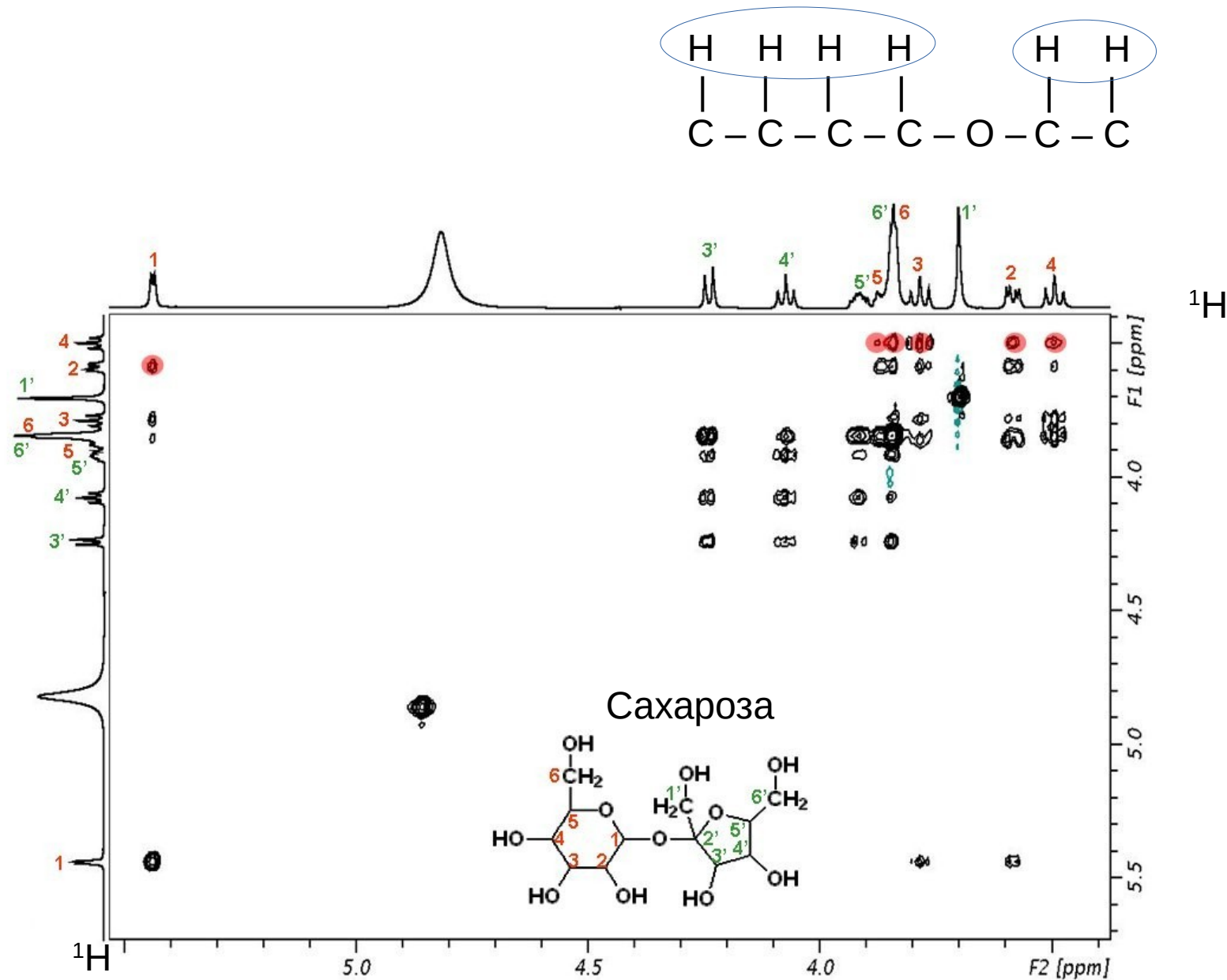
Сахароза



TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)

Взаимодействие по углеводородной цепочке

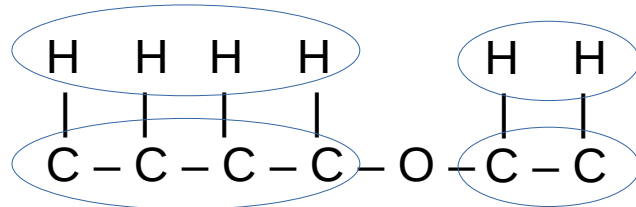
Видны кросс-пики между всеми H-атомами в углеводородном фрагменте



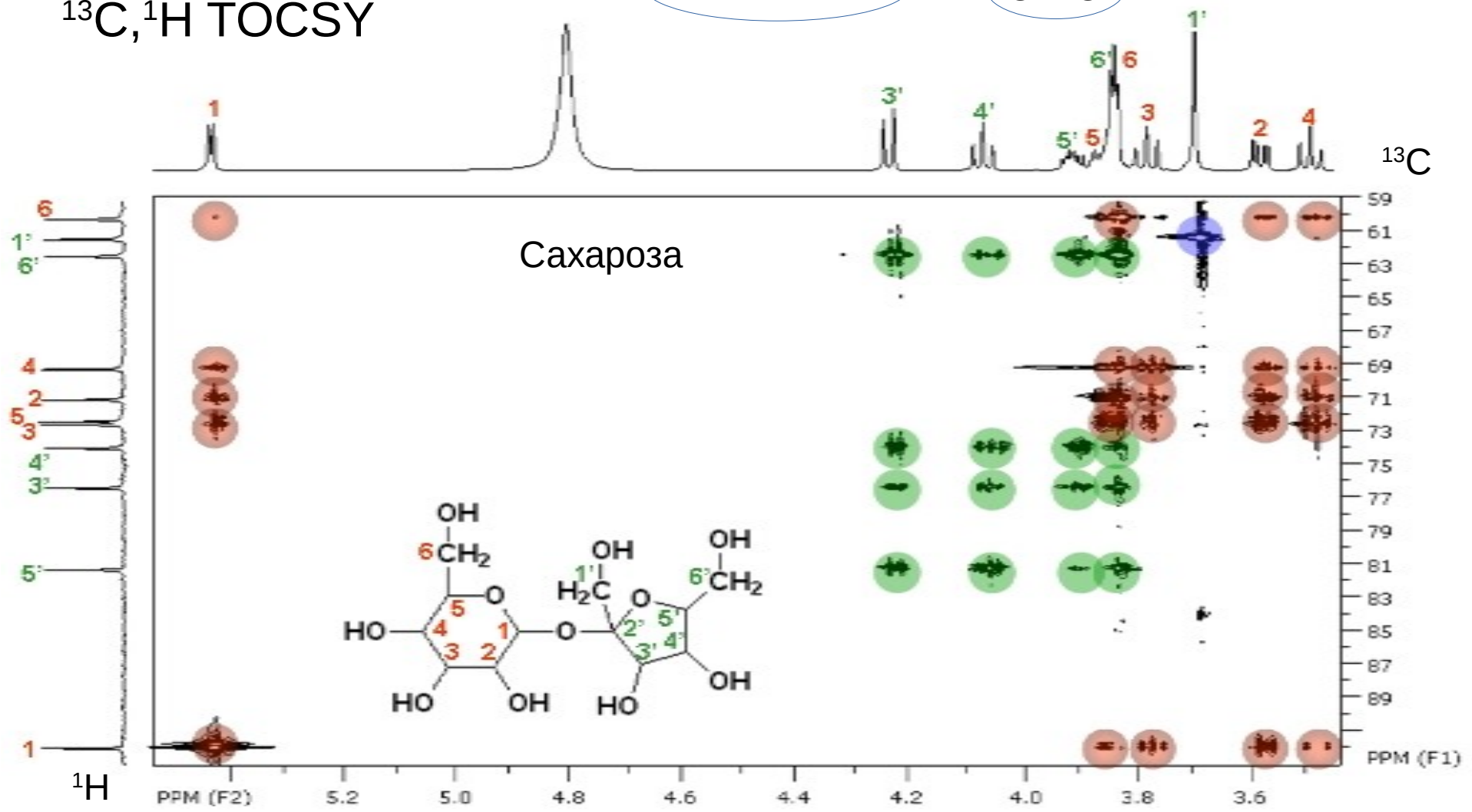
HSQC-TOCSY

Взаимодействие по углеводородной цепочке

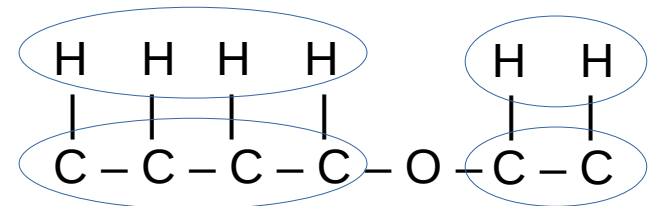
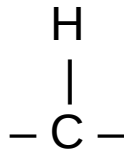
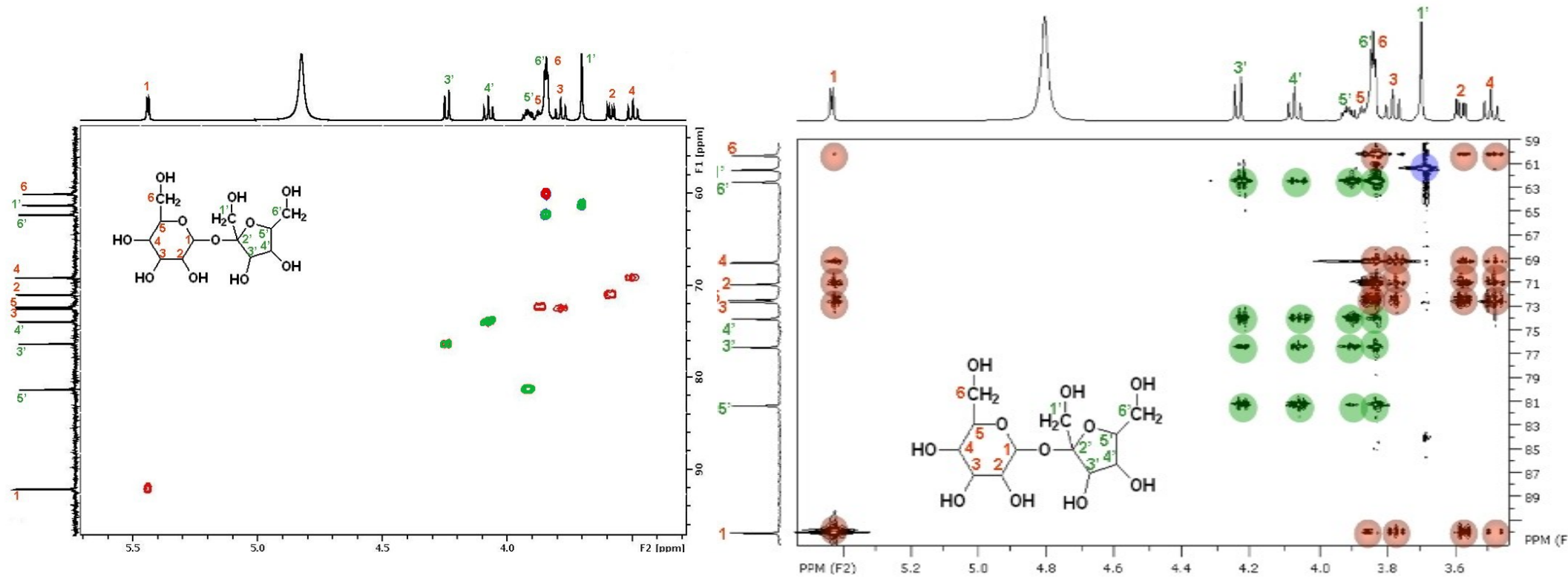
Видны кросс-пики между всеми C- и всеми H-атомами в углеводородном фрагменте



$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ TOCSY

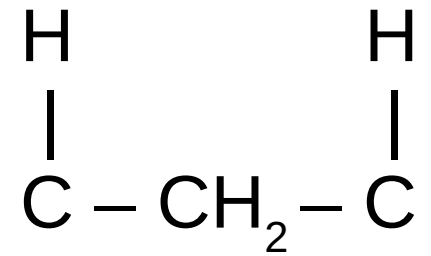
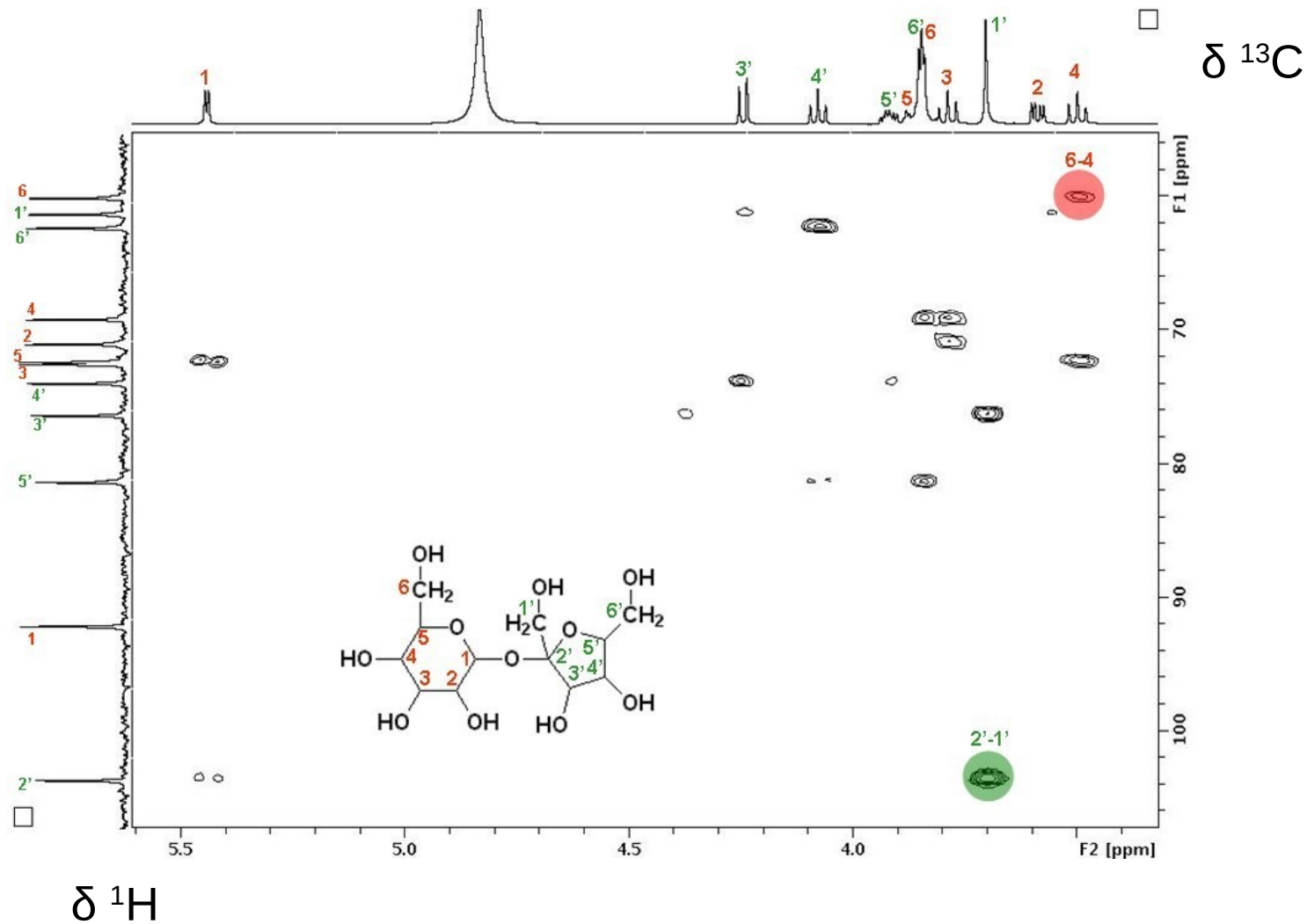


HSQC vs HSQC TOCSY

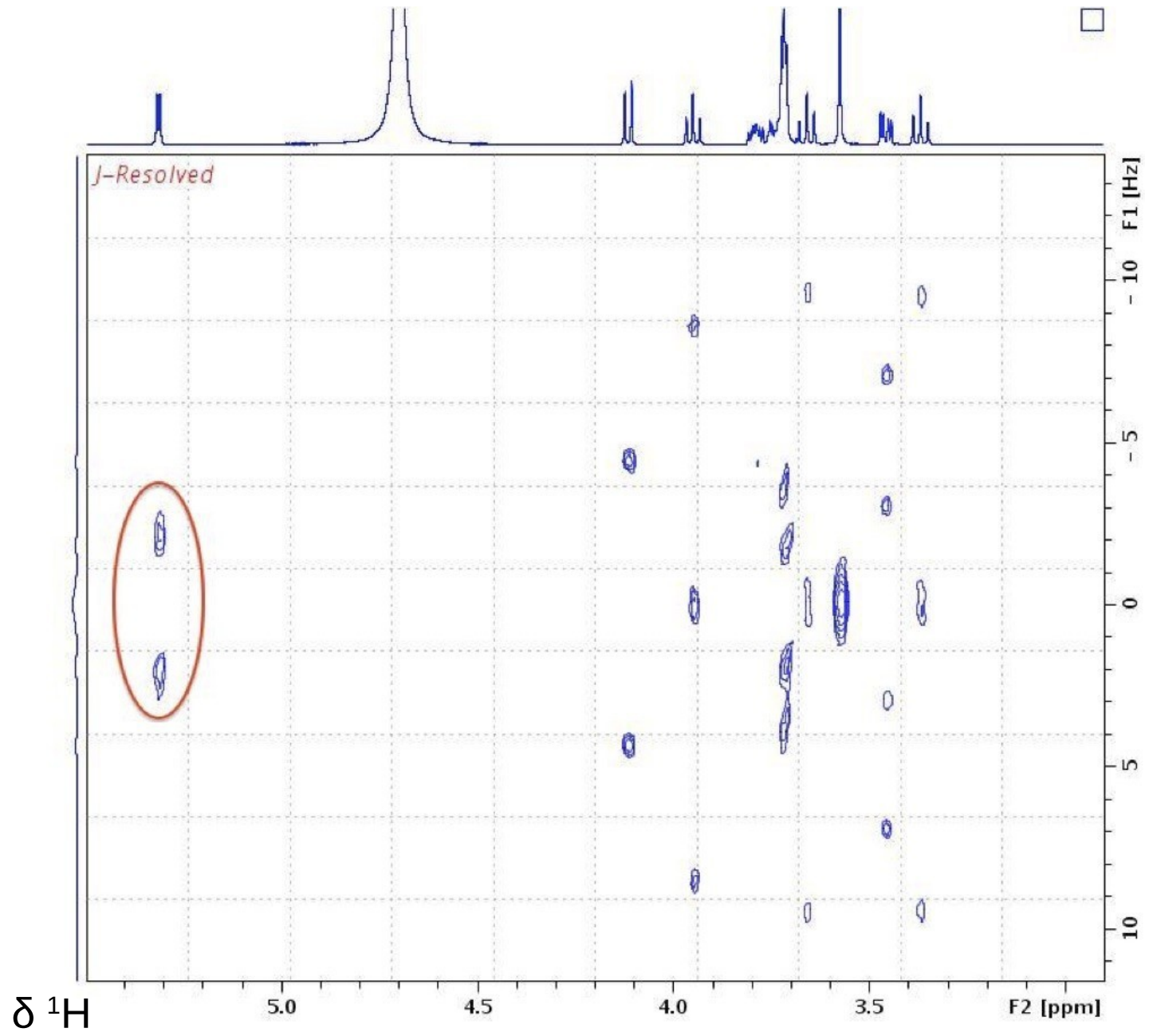


Отнесение сигналов боковых групп аминокислот

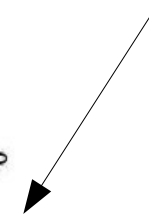
HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) взаимодействие через 4-5 хим. связи



J-resolved

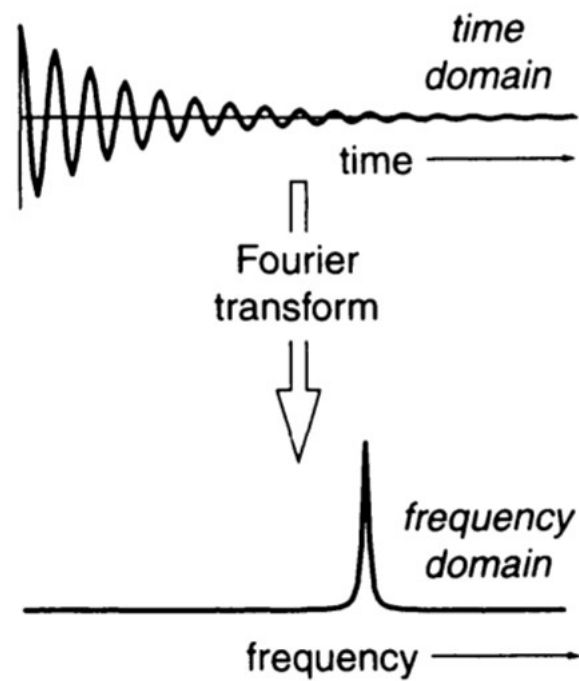
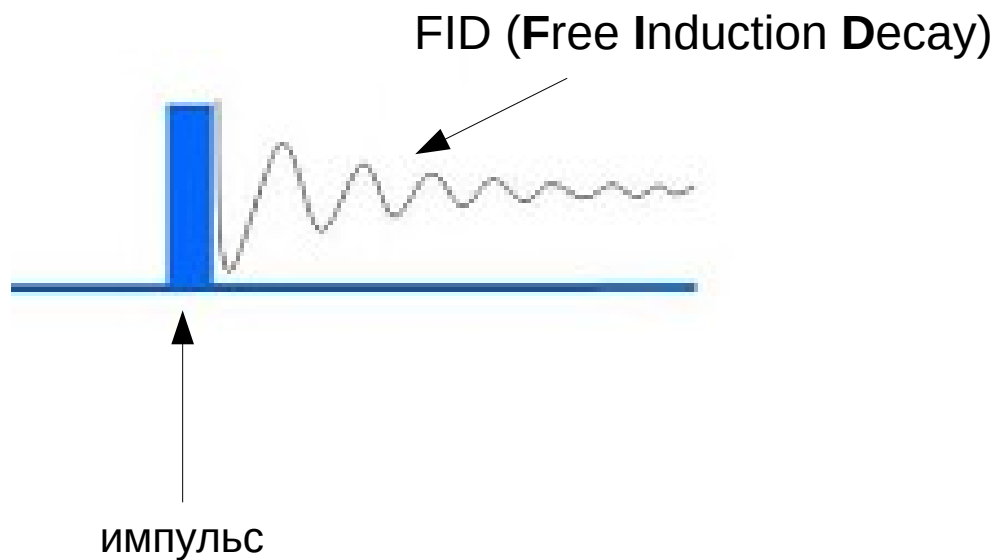


По этой оси J-coupling

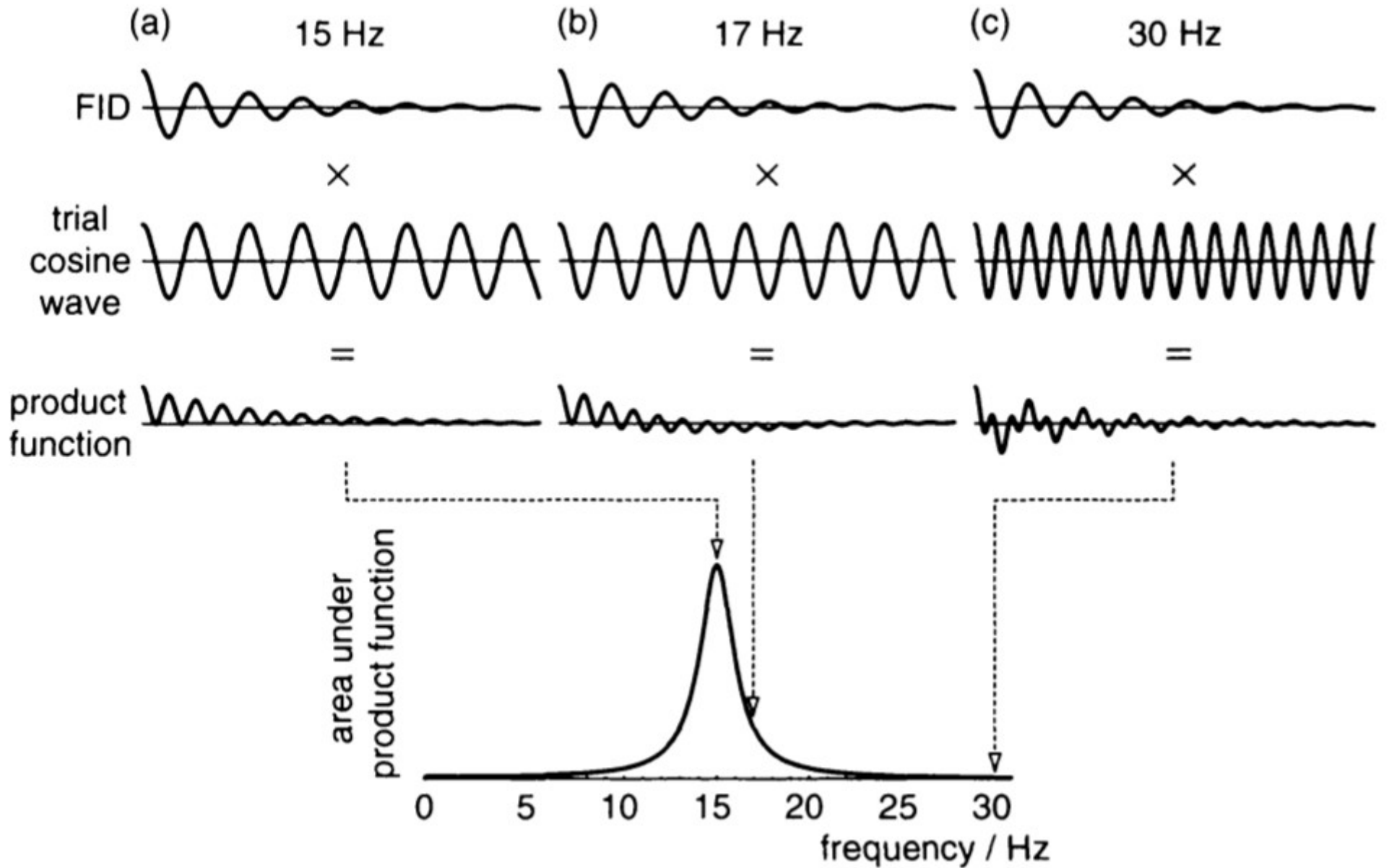


Как получают 2D спектр?

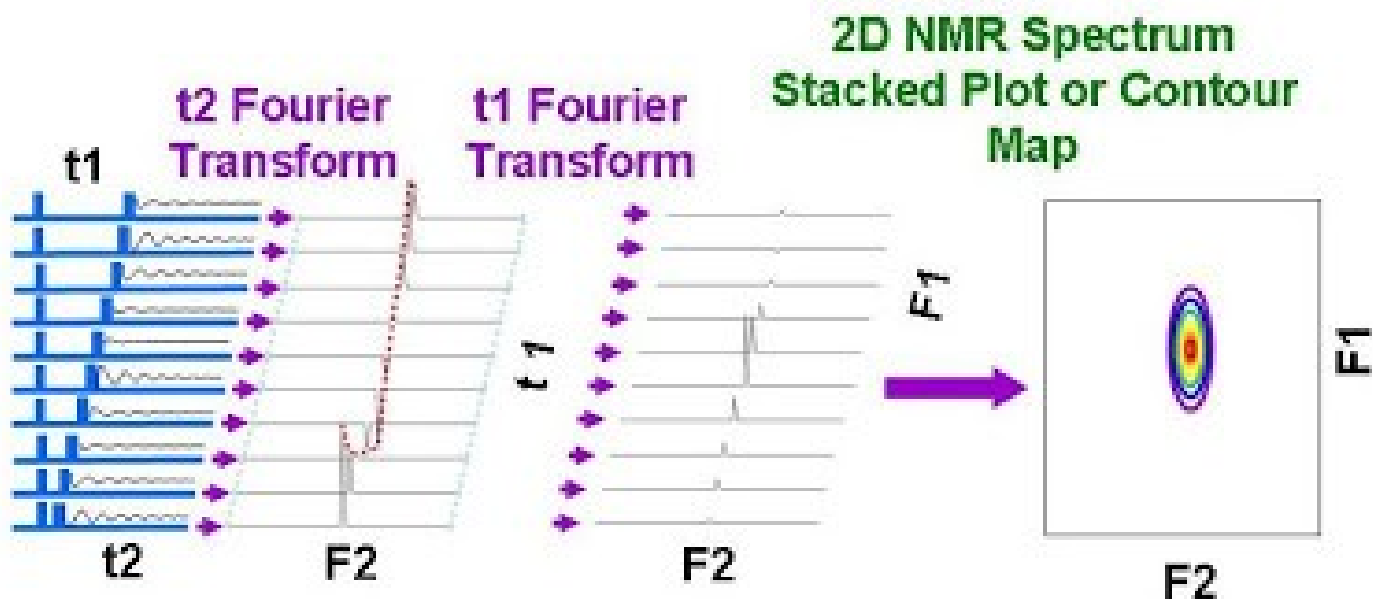
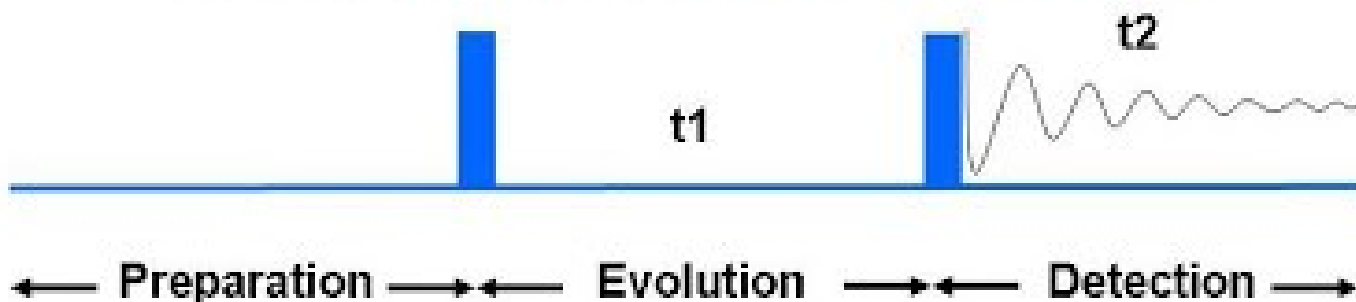
Измерение 1D-спектров



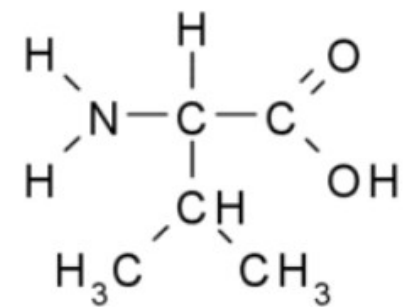
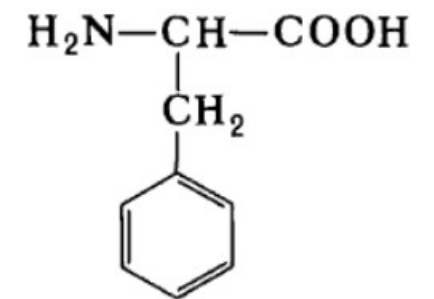
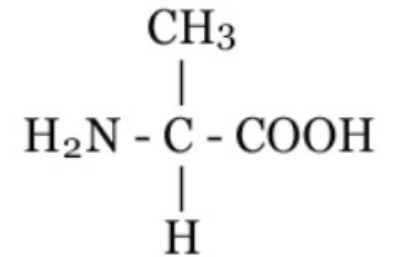
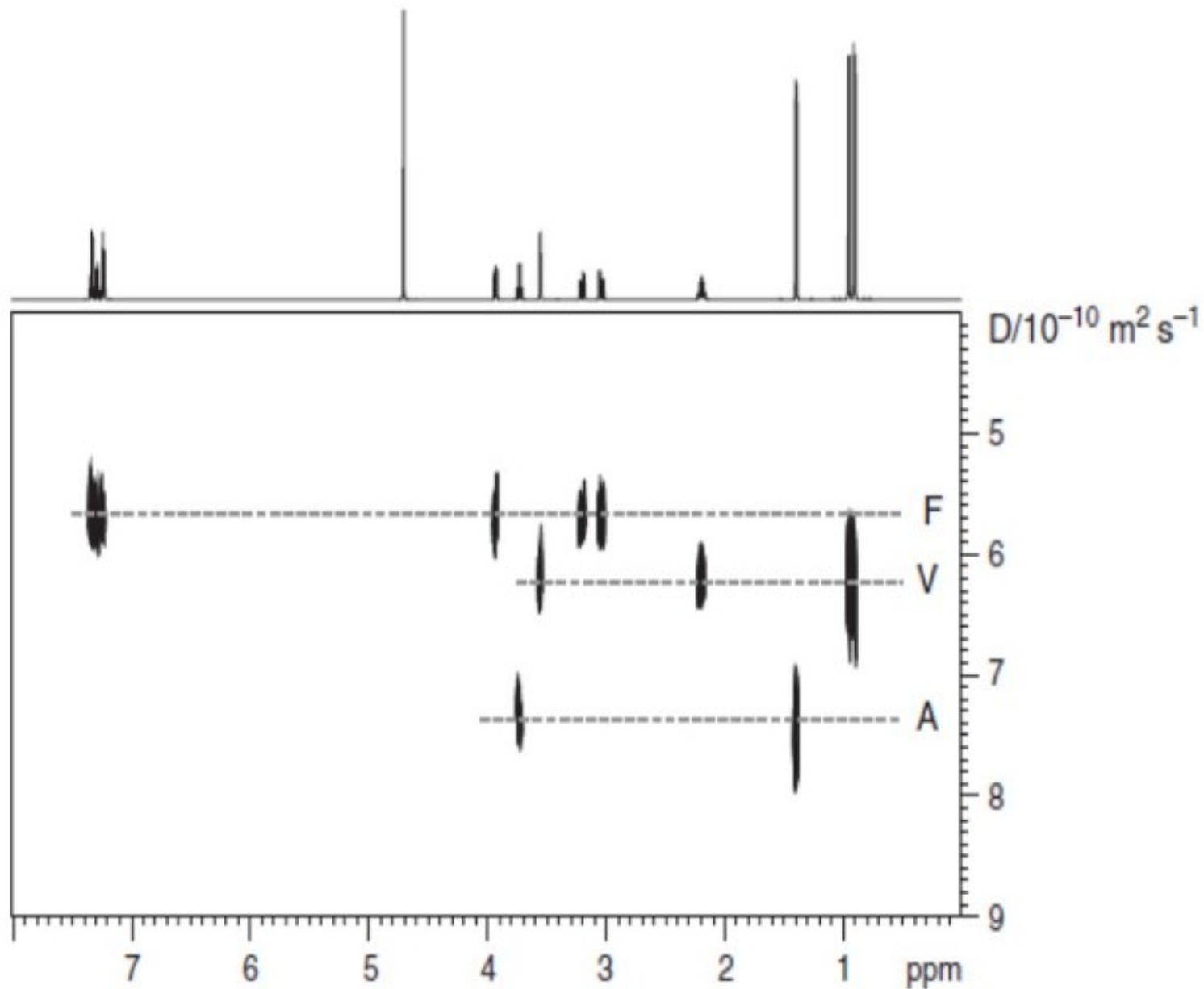
Преобразование Фурье



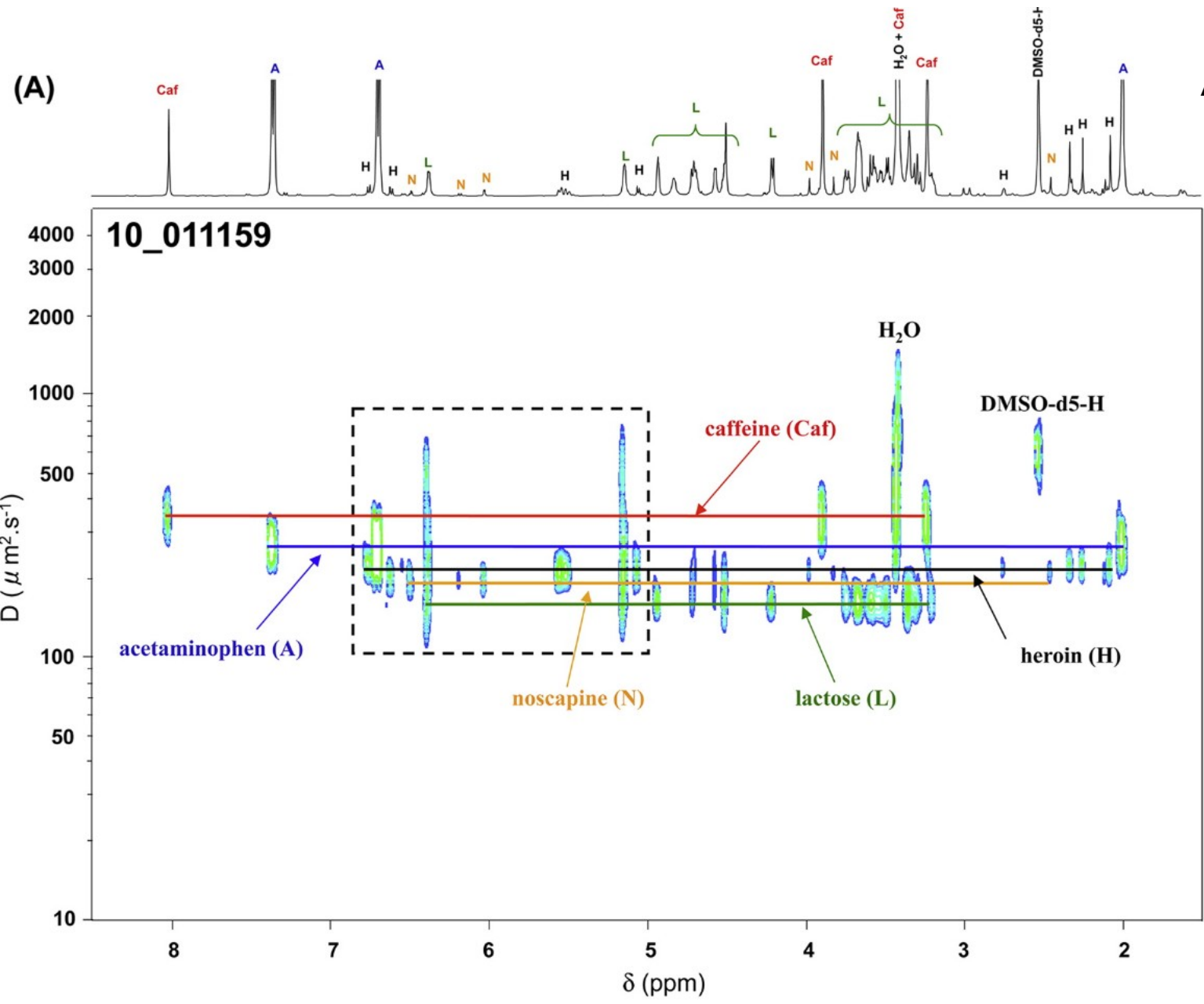
Как получают 2D спектр?



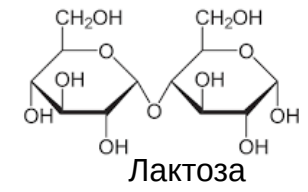
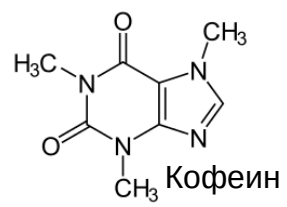
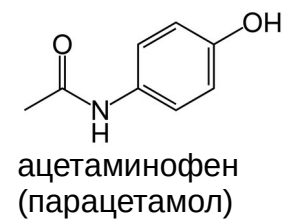
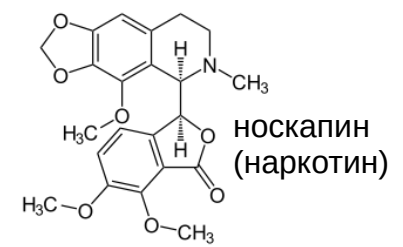
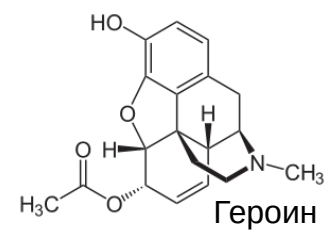
Определение состава смесей: DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)



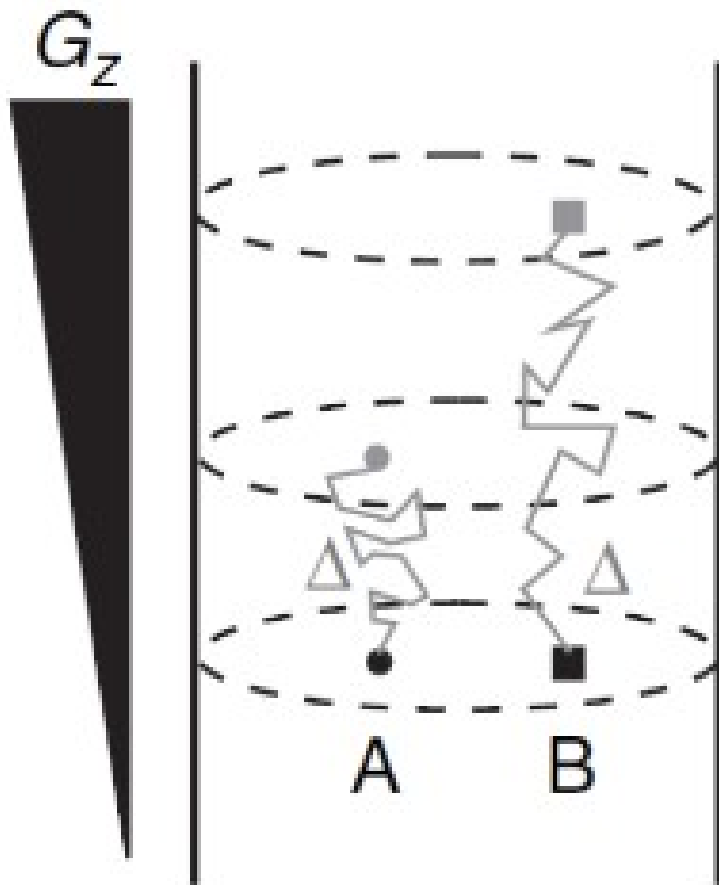
Определение состава смесей: DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)



Анализ образца героина



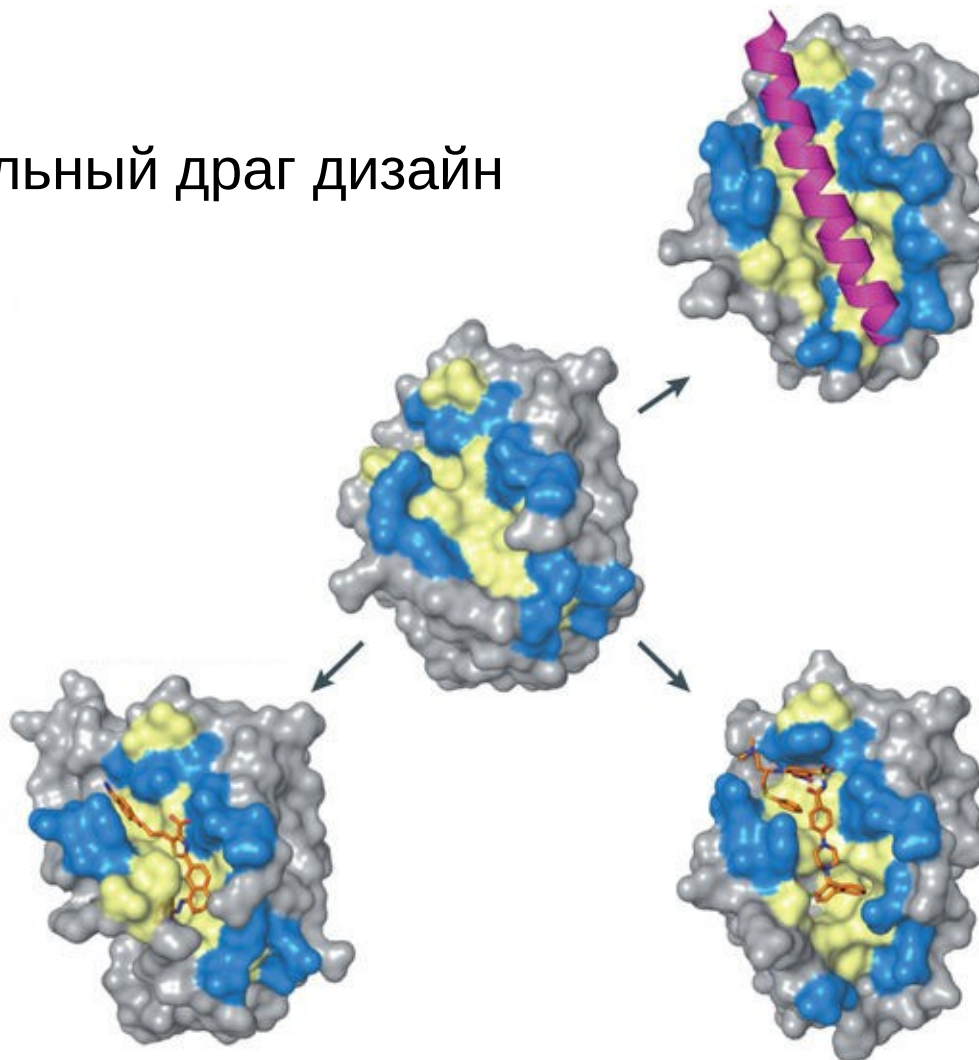
Определение состава смесей: DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)



$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

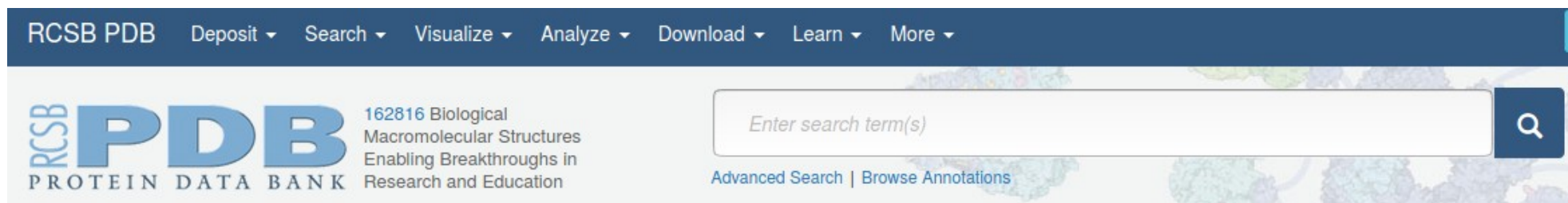
Определение структуры (пространственного строения) биомакромолекул

- Зачем?
- Докинг, рациональный драг дизайн



Пространственное строение: координаты атомов в 3D-пространстве

Определение структуры (пространственного строения) биомакромолекул



Protein Data Bank: банк данных структур биомакромолекул

Метод	Белки	НК	Белок/НК комплексы	Другое	Всего
Рентген	135170	2097	6945	4	144216
ЯМР	11337	1325	264	8	12934
КриоЭМ	3475	35	1136	0	4646
Гибридные	155	5	3	1	164
Другие	286	4	6	13	309
Всего	150423	3466	8354	26	162269
Доля ЯМР (%)	7,5	38,2	3,2	30,8	8,0

Статистика на 1 апреля 2020 г

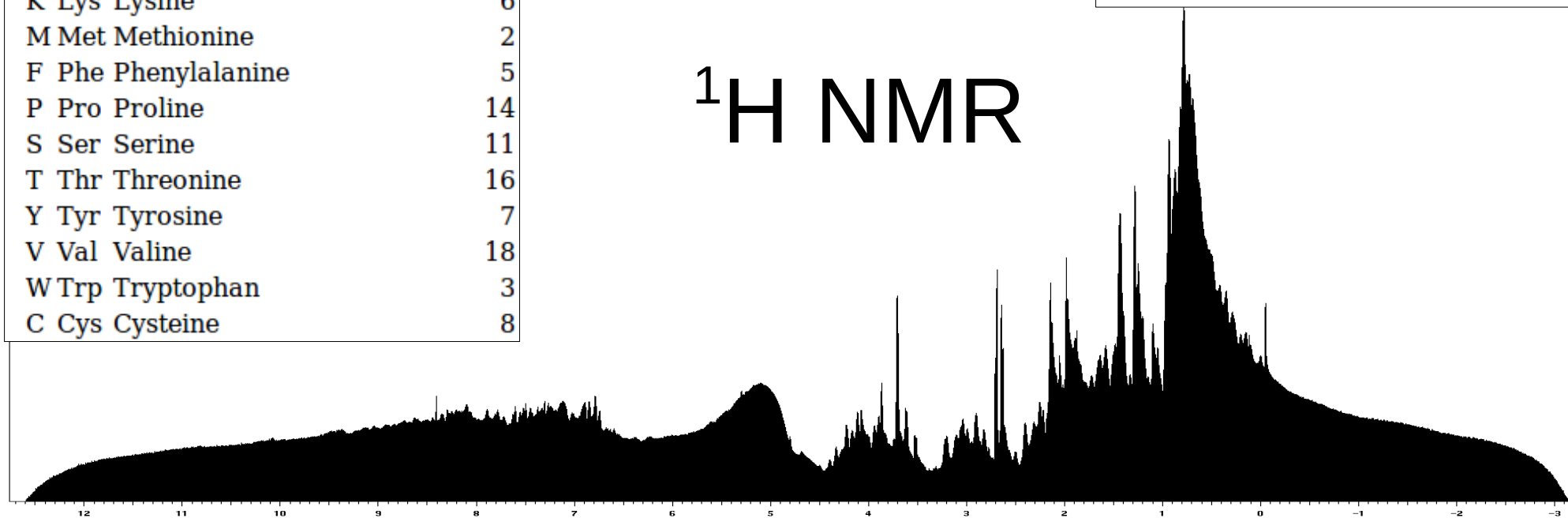
ЯМР биомакромолекул: ^1H -спектр белка

Белок WBSCR27
(240 аминокислот, 27 кДа)

Residue	Number Found
A Ala Alanine	24
R Arg Arginine	14
N Asn Asparagine	3
D Asp Aspartate	14
Q Gln Glutamine	12
E Glu Glutamate	17
G Gly Glycine	22
H His Histidine	5
I Ile Isoleucine	8
L Leu Leucine	31
K Lys Lysine	6
M Met Methionine	2
F Phe Phenylalanine	5
P Pro Proline	14
S Ser Serine	11
T Thr Threonine	16
Y Tyr Tyrosine	7
V Val Valine	18
W Trp Tryptophan	3
C Cys Cysteine	8

Type	Number Found
Carbon	1145
Nitrogen	316
Oxygen	352
Sulfur	10
Hydrogen	1818

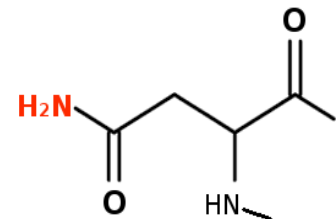
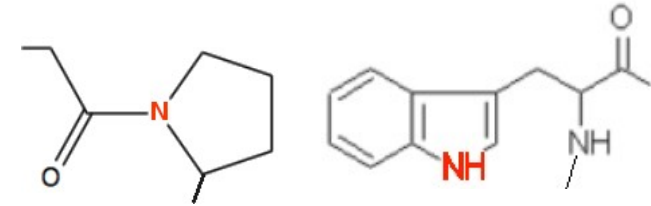
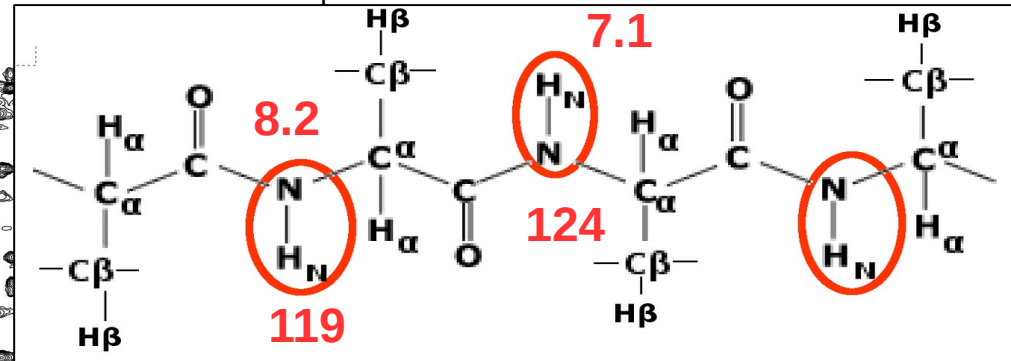
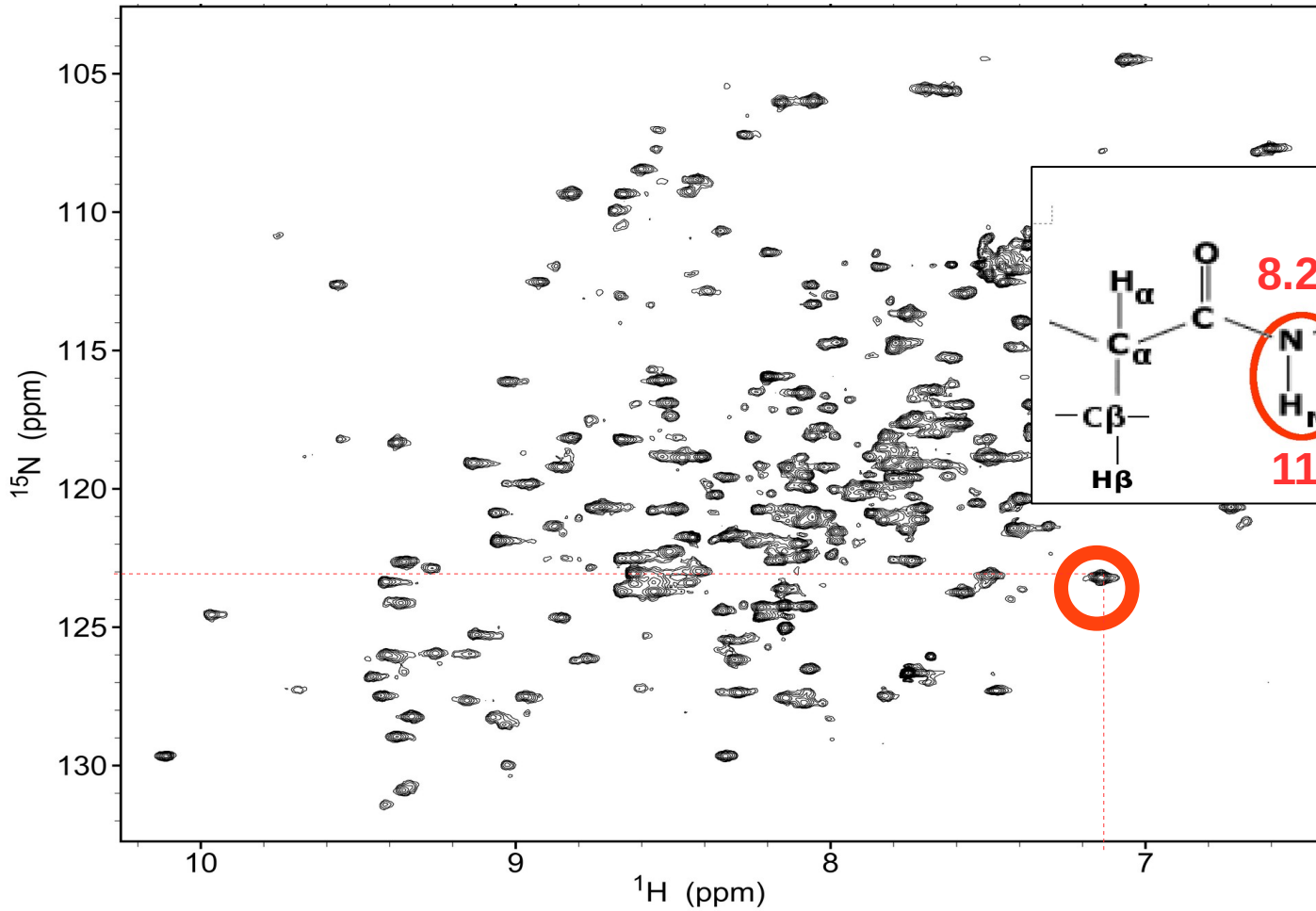
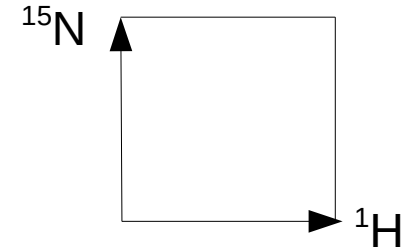
^1H NMR



ЯМР биомакромолекул: 2D-спектр белка

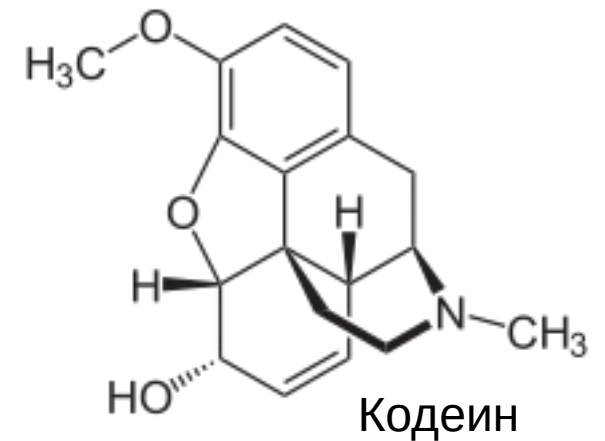
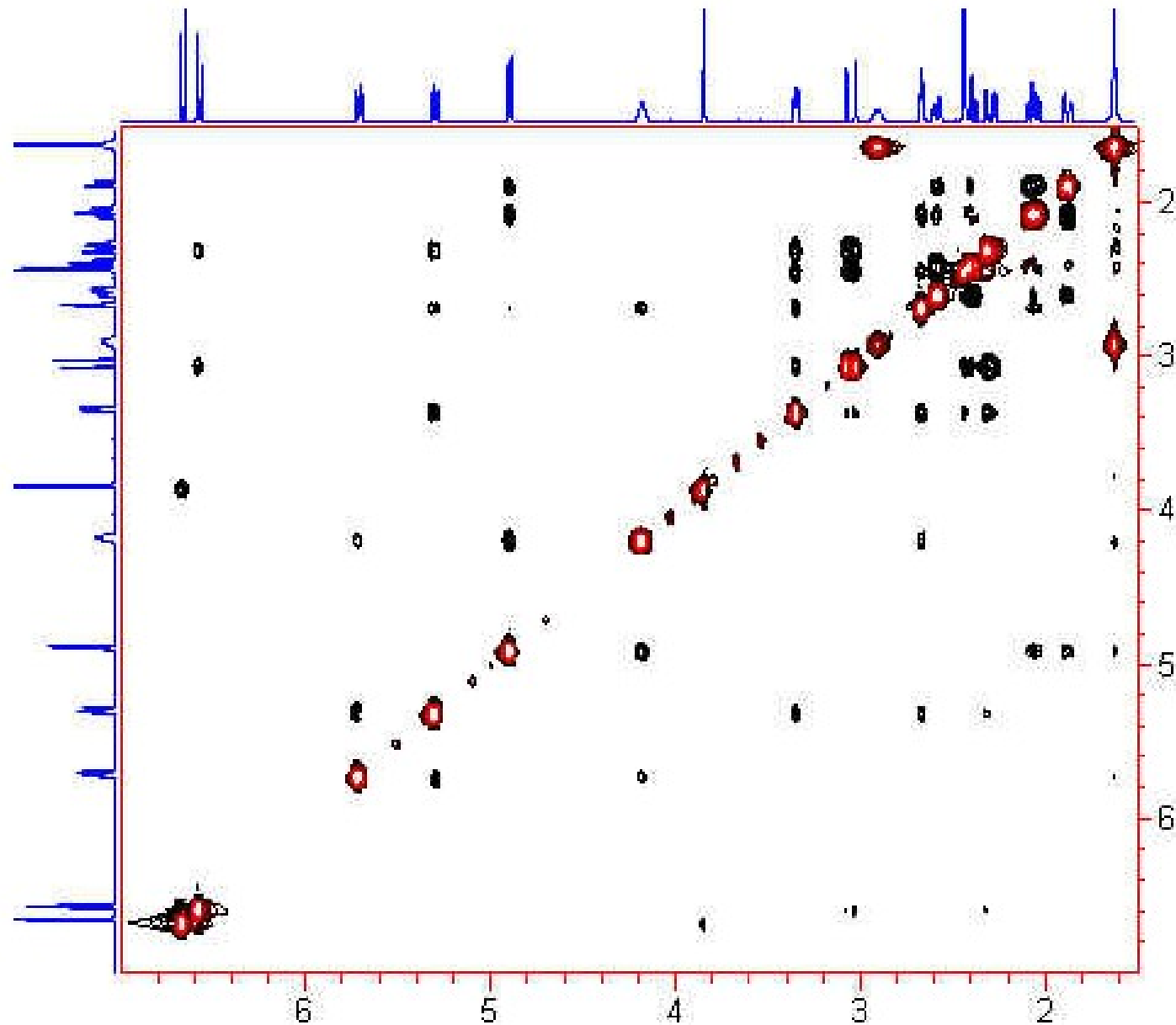
$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC

Двухмерный спектр



“Отпечаток пальца”

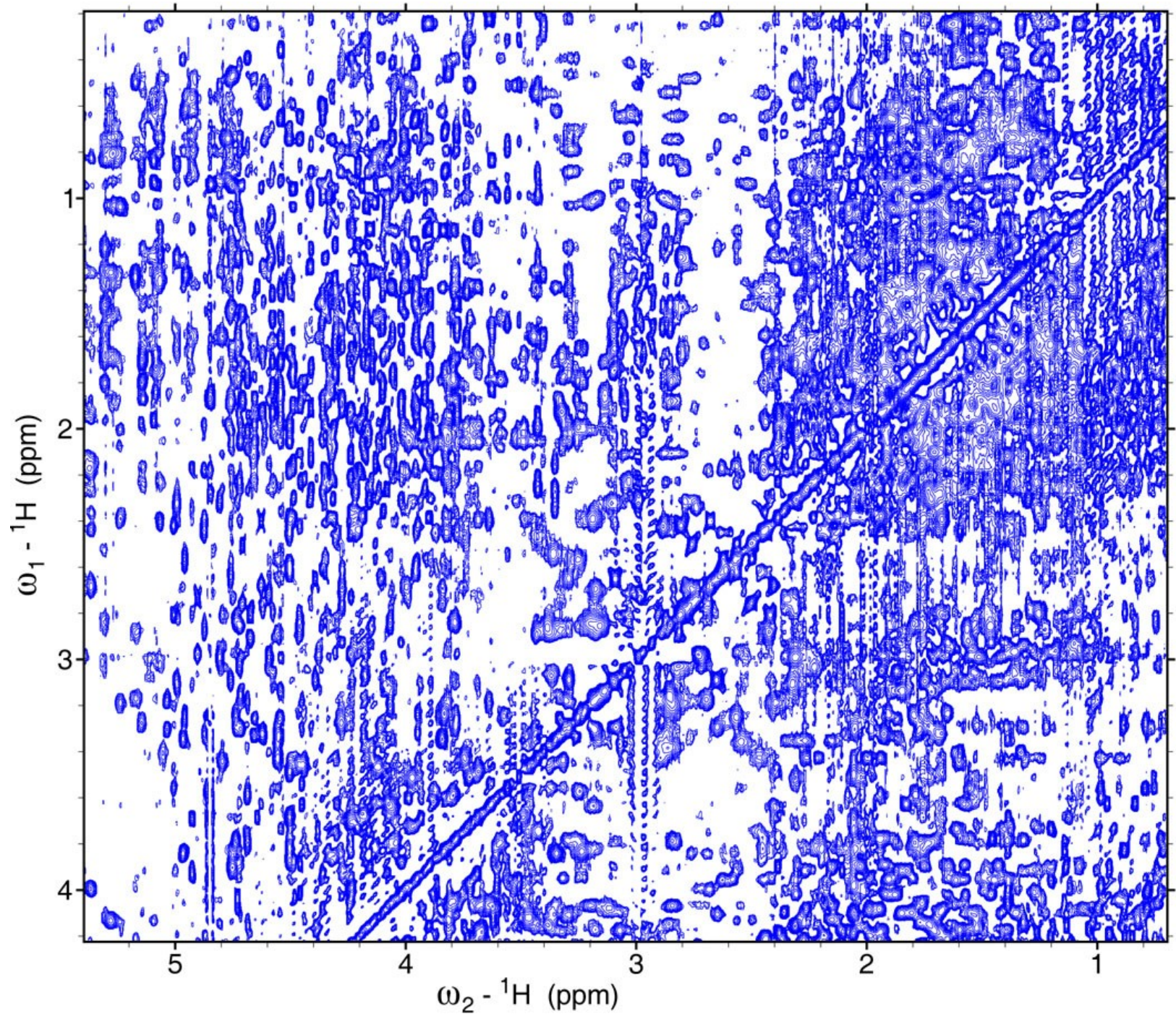
Определение пространственного строения: NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)



Видим кросс-пики
близко расположенных
атомов в пространстве

до 5 Å
R – H H – R

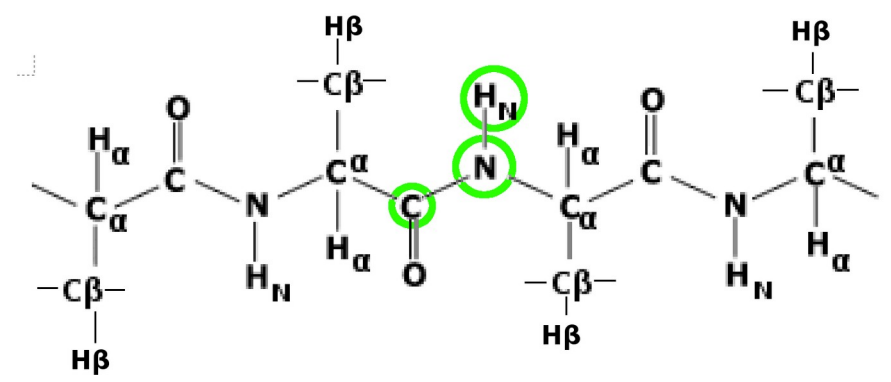
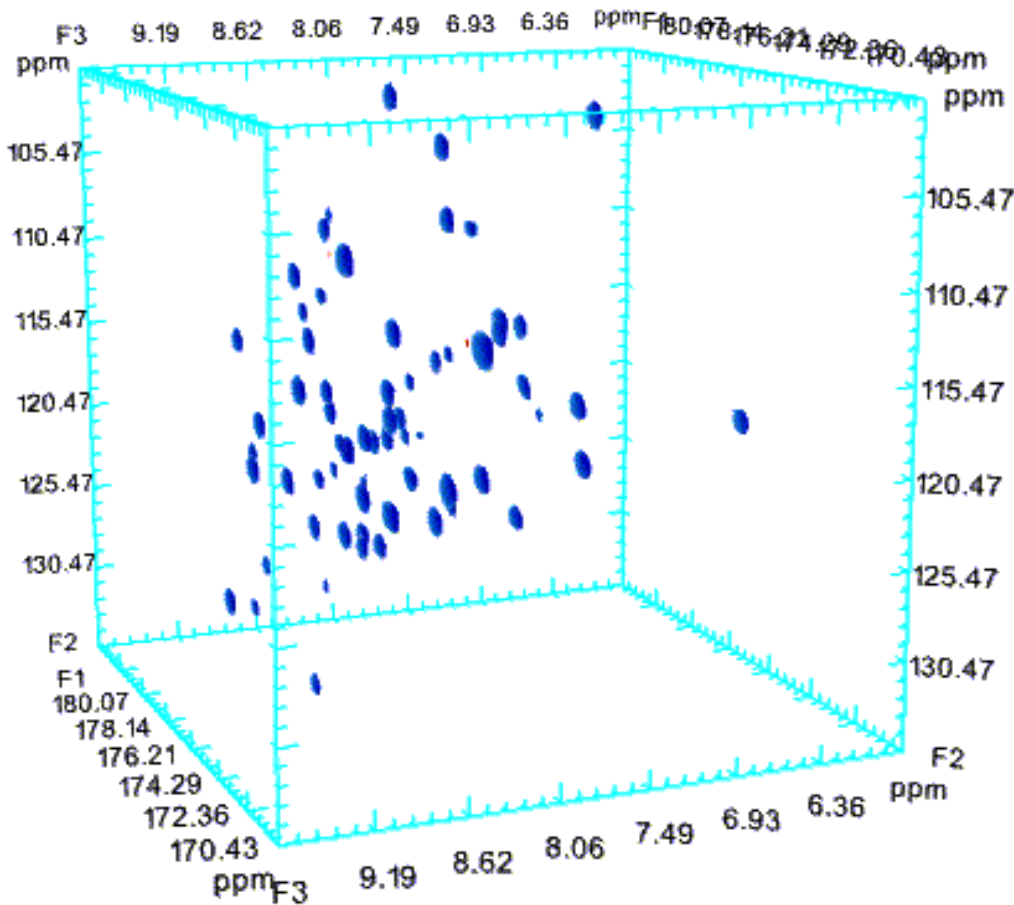
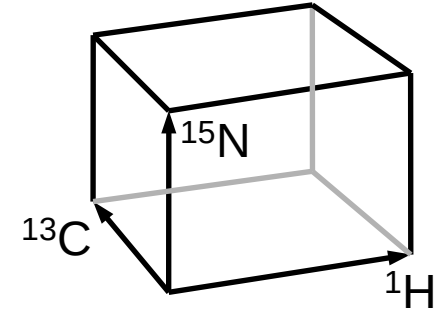
Фрагмент 2D спектра NOESY белка 18 кДа



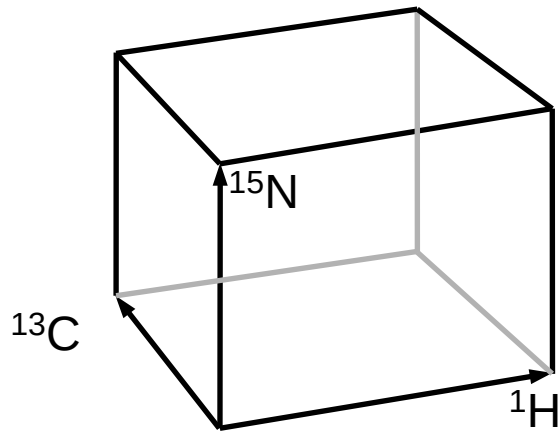
ЯМР биомакромолекул: 3D-спектр белка

Трёхмерный спектр

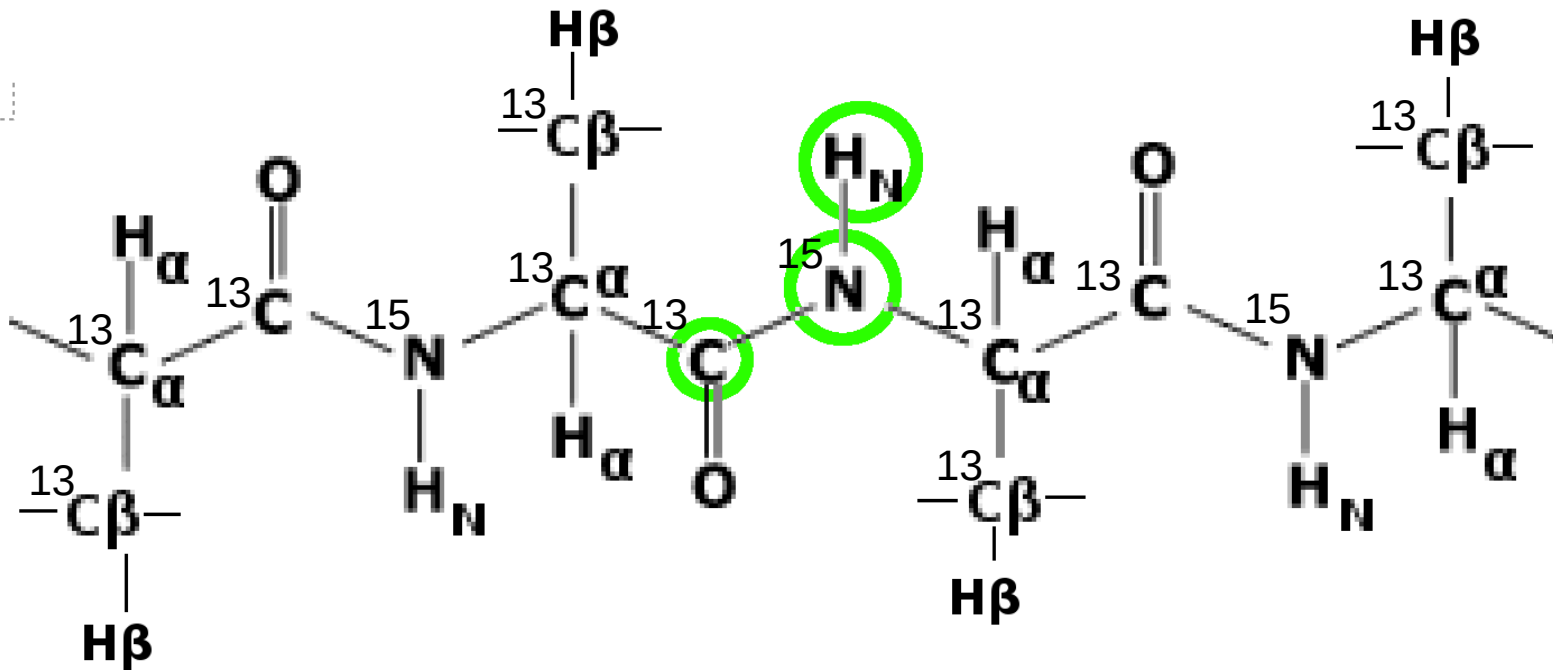
HNCO



ЯМР биомакромолекул: изотопный состав

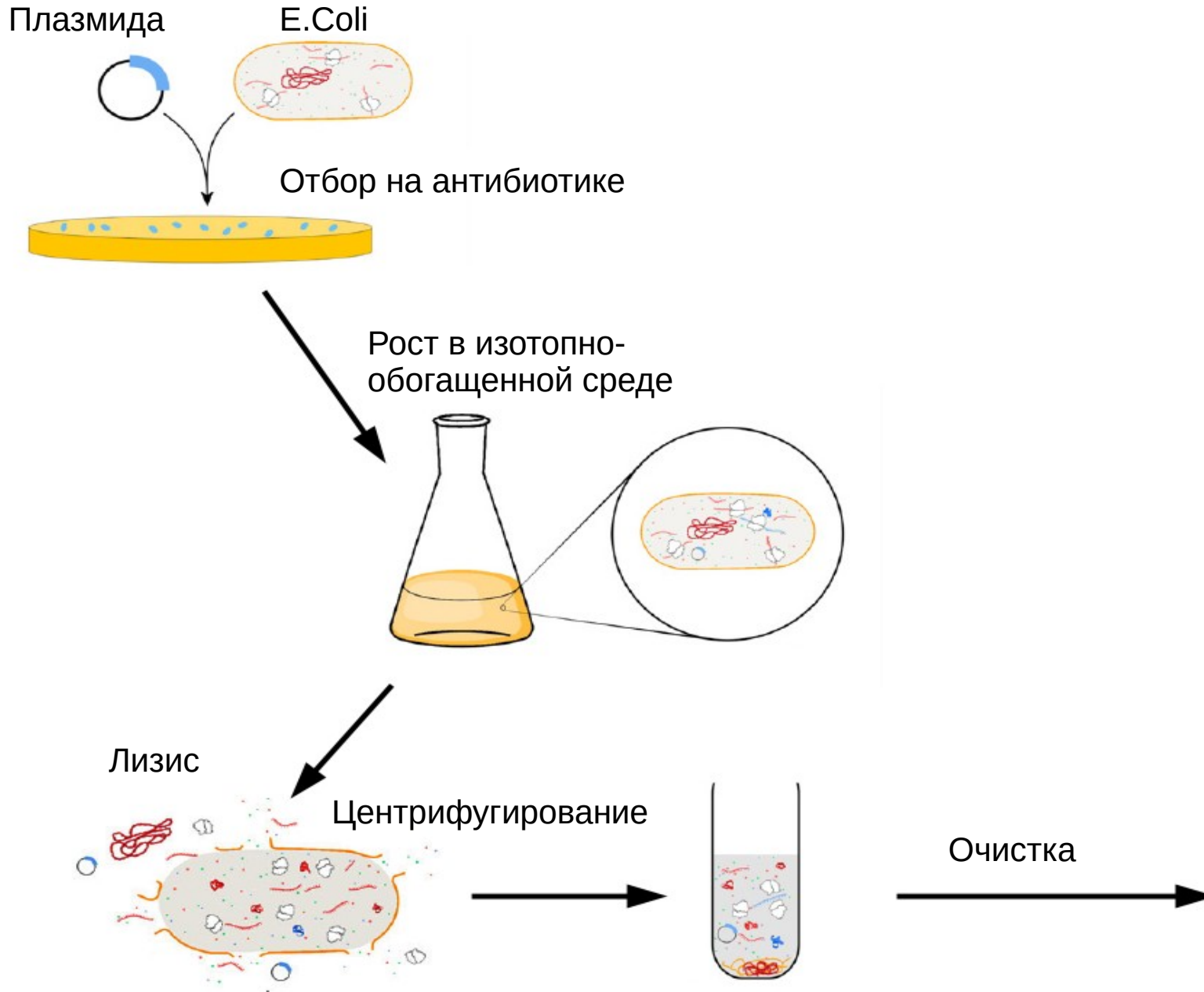


	Природное содержание (%)
^1H	99.98
^{13}C	1.1
^{15}N	0.365



Получение изотопнообогащенных белков

Экспрессия изотопнообогащенных сред



Получение изотопнообогащенных белков

Экспрессия в изотопнообогащенных средах

Среда «M9»

Источники компонентов среды «M9»:

- Источник N: $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Источники ^{13}C и энергии: ^{13}C -глюкоза
- Источники P; pH: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4
- Источники ионов: NaCl , MgSO_4 , CaSO_4 , FeSO_4
- Витамин: тиамин
- Антибиотик: канамицин

Состав среды «M9»:

- H_2O
- $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- глюкоза
- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- NaCl
- MgSO_4
- CaSO_4
- FeSO_4
- тиамин
- канамицин

Состав среды «M9»:

- H_2O
- $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ^{13}C -глюкоза
- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- NaCl
- MgSO_4
- CaSO_4
- FeSO_4
- тиамин
- канамицин

Состав среды «M9»:

- D_2O
- $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ^{13}C -глюкоза
- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- NaCl
- MgSO_4
- CaSO_4
- FeSO_4
- тиамин
- канамицин

$\{^{15}\text{N}\}$ -белок $\{^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}\}$ -белок $\{^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, \text{D}\}$ -белок

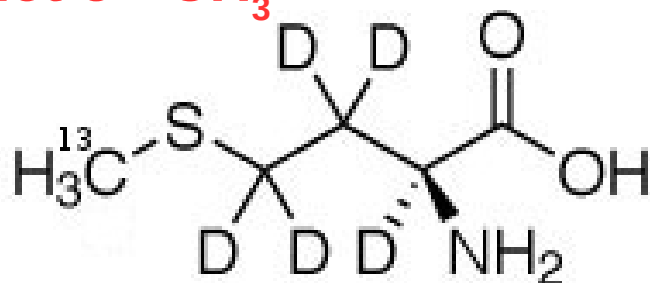
Получение изотопнообогащенных белков

Экспрессия в изотопнообогащенных средах

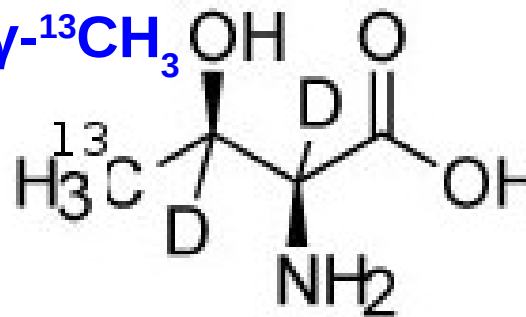
- Молекулярная масса белка
 - до ~10 кДа – только ^1H
 - 5 – 15 кДа – обогащение ^{15}N
 - 10 – 25 кДа – обогащение ^{15}N и ^{13}C
 - 20 – 45 кДа – ^{15}N , ^{13}C , ^2D + высокие поля (800 МГц и выше)
 - 35 – 55 кДа – специальные методики мечения + высокие поля

Метилспецифическое мечение:

Met- ϵ - $^{13}\text{C}\text{H}_3$



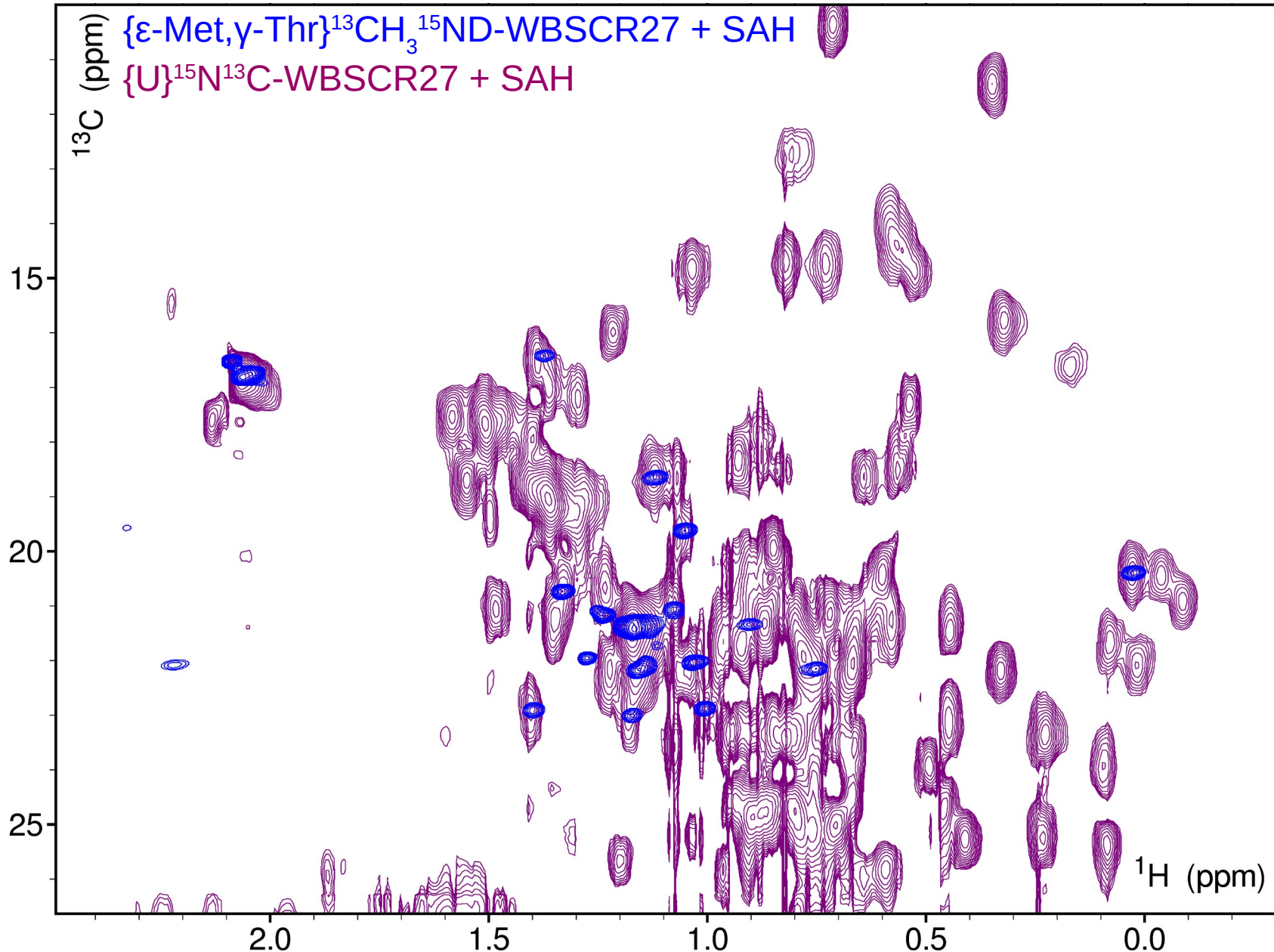
Thr- γ - $^{13}\text{C}\text{H}_3$



GAMAEAGRLPQVLARVGTSHGITDLACKLRFYDDWAPEYDQDVAALKYRAPRLAVDCLSRFRGSPHDALILDVACGT
 GLVAVELQARGFLQVQGVDSPEMLKQARARGLYHHLSLCTLGQEP LPDPEGTFDAVIIVGALSEGQVPCSAIPELLRVT
 KPGGLVCLTTRTNP SNLPYKETLEATLDSL ERAGVWECLV TQPVDHWELATSEQETGLGT CANDGFISGI IYLYRKQETV

Получение изотопнообогащенных белков

Специфическое мечение



Получение изотопнообогащенных белков

Экспрессия в изотопнообогащенных средах

E.coli

Дрожжи

Клетки насекомых

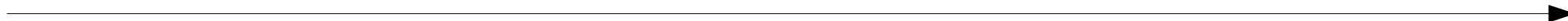
Клетки млекопитающих



Простота культивирования



Стоимость среды

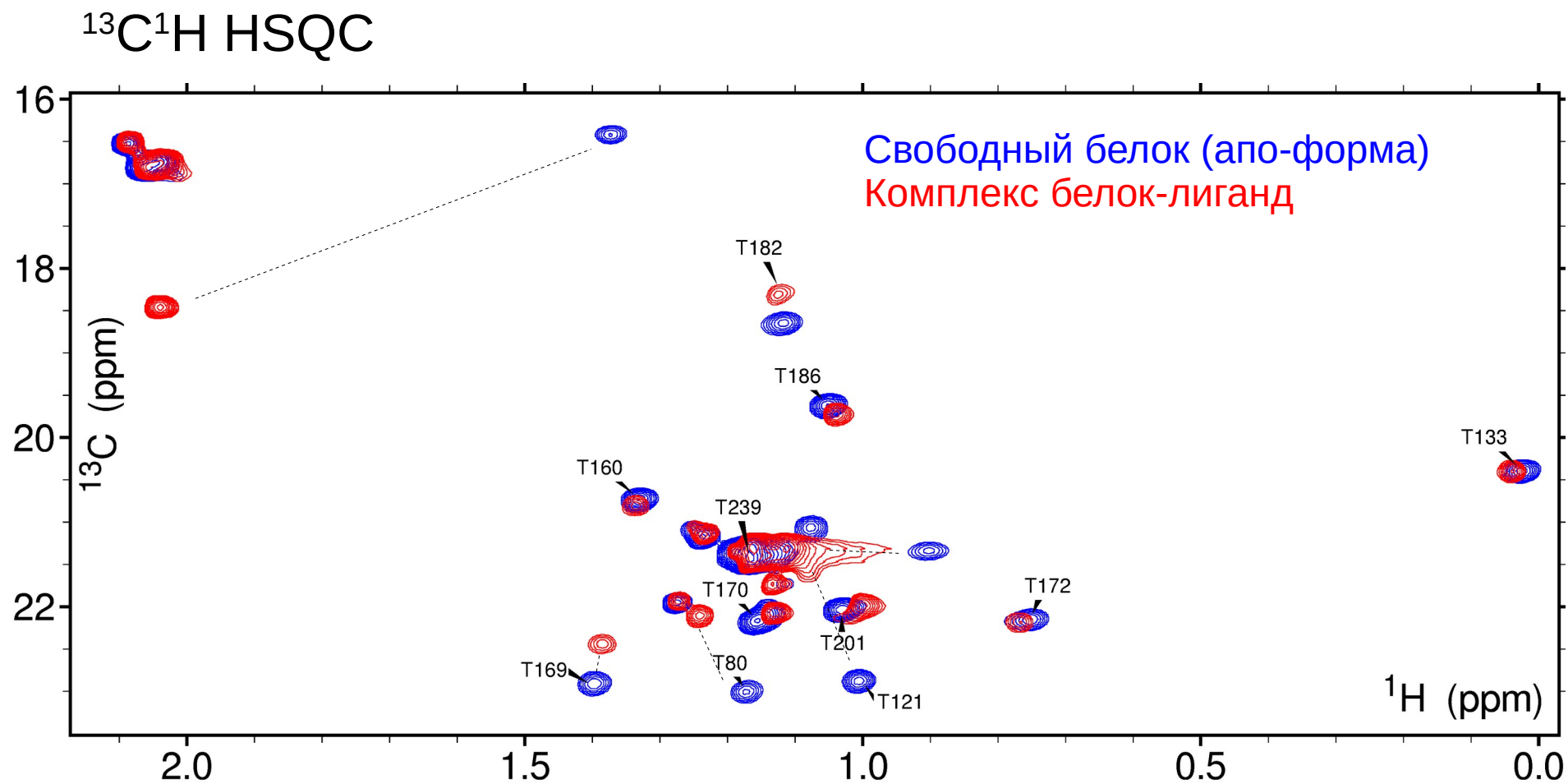


Посттрансляционные модификации

Требования к объекту для структурных исследований методом ЯМР

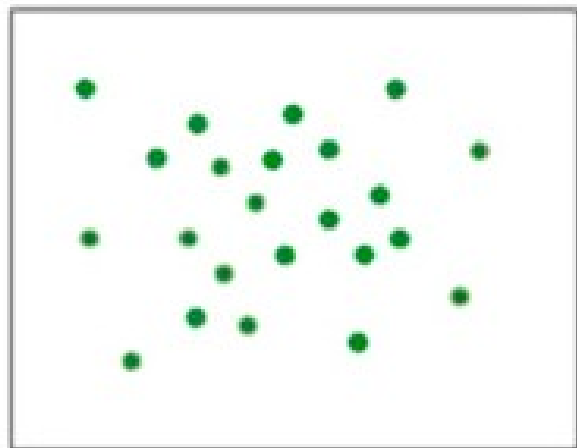
- Размер (чем меньше, тем проще)
- Высокая растворимость
 - ~1 mM => 20 мг/мл для 20 кДа
- Стабильность
 - несколько дней при 10 – 30°C
- Высокая чистота и отсутствие агрегации
- Значительные количества
 - 1 образец 320 мкл; C ~ 1 mM
 - ~ 5-8 мг для одного образца 20 кДа
- Высокий уровень экспрессии белка

Взаимодействия с малыми молекулами

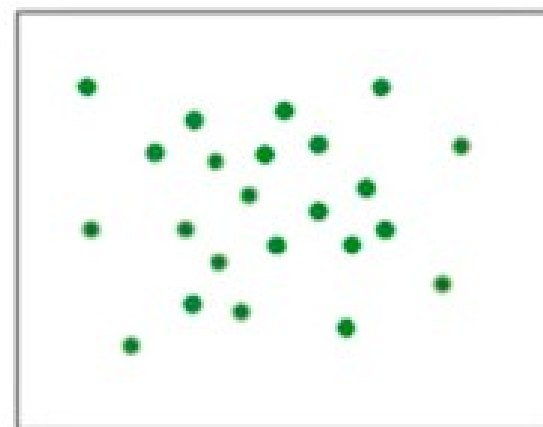
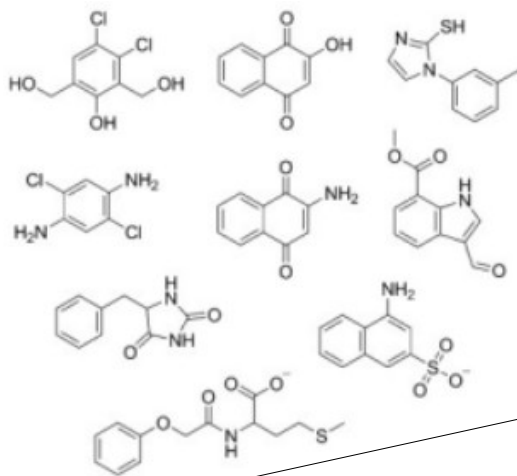


По изменению химических сдвигов можно определить —
какие аминокислоты, участвуют во взаимодействии

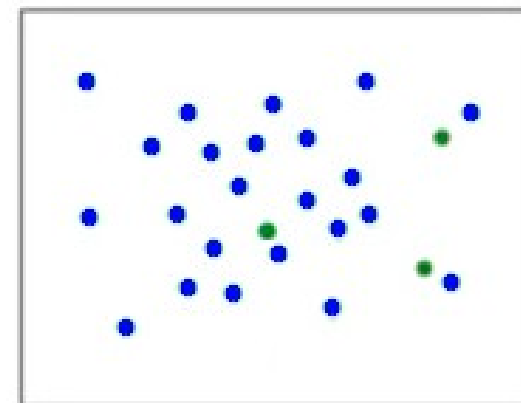
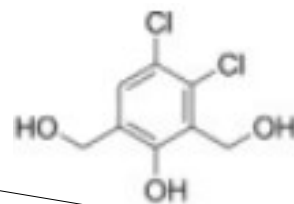
Взаимодействие с малыми молекулами ЯМР-скрининг



HSQC



HSQC

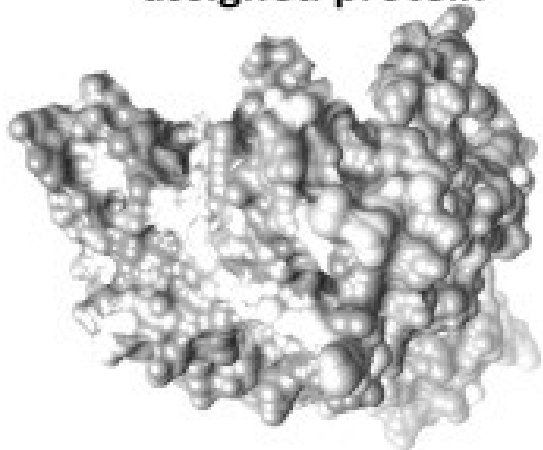


HSQC

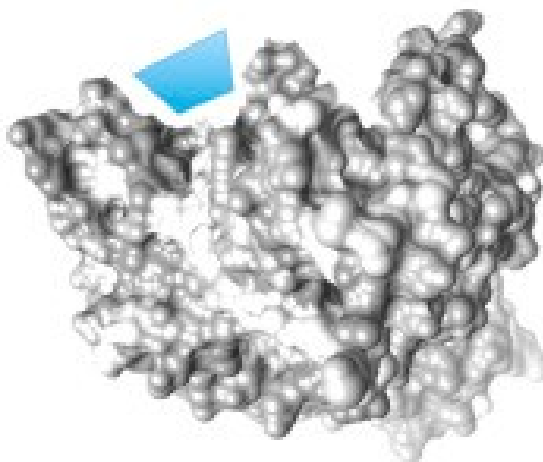
Взаимодействие с малыми молекулами

Создание высокоаффинного лиганда из фрагментов
(фрагментный дизайн)

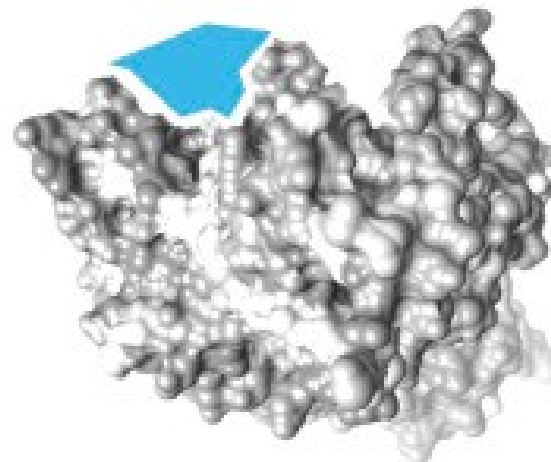
¹⁵N labeled and
assigned protein



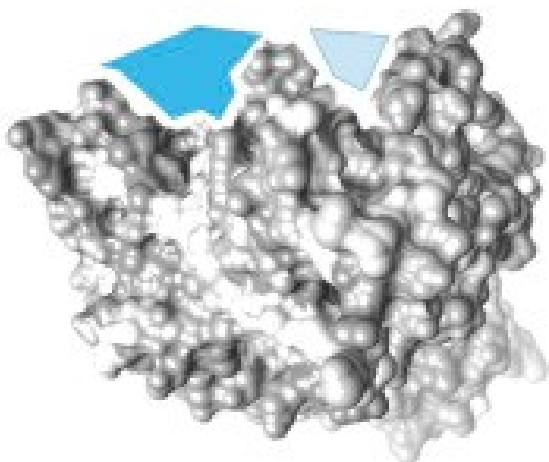
Screen for first ligand



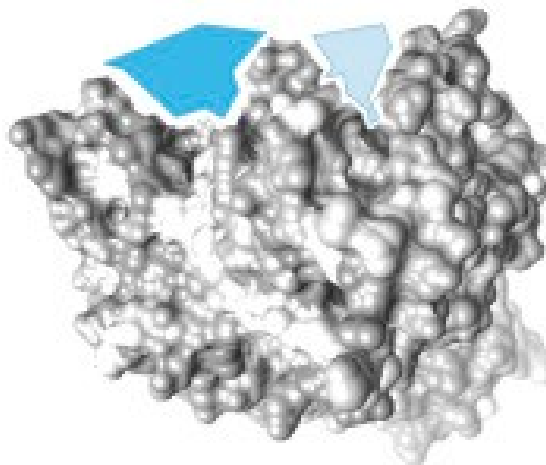
Optimize first ligand



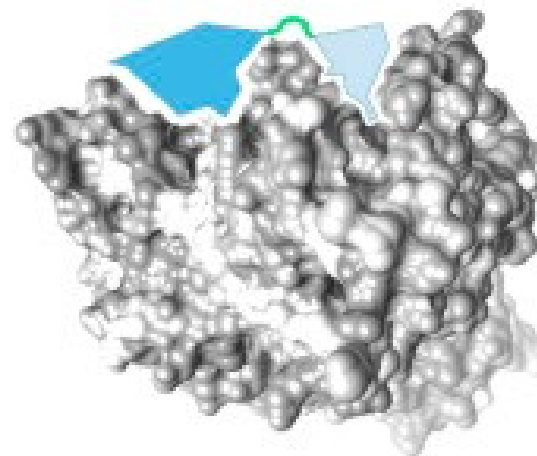
Screen for second ligand



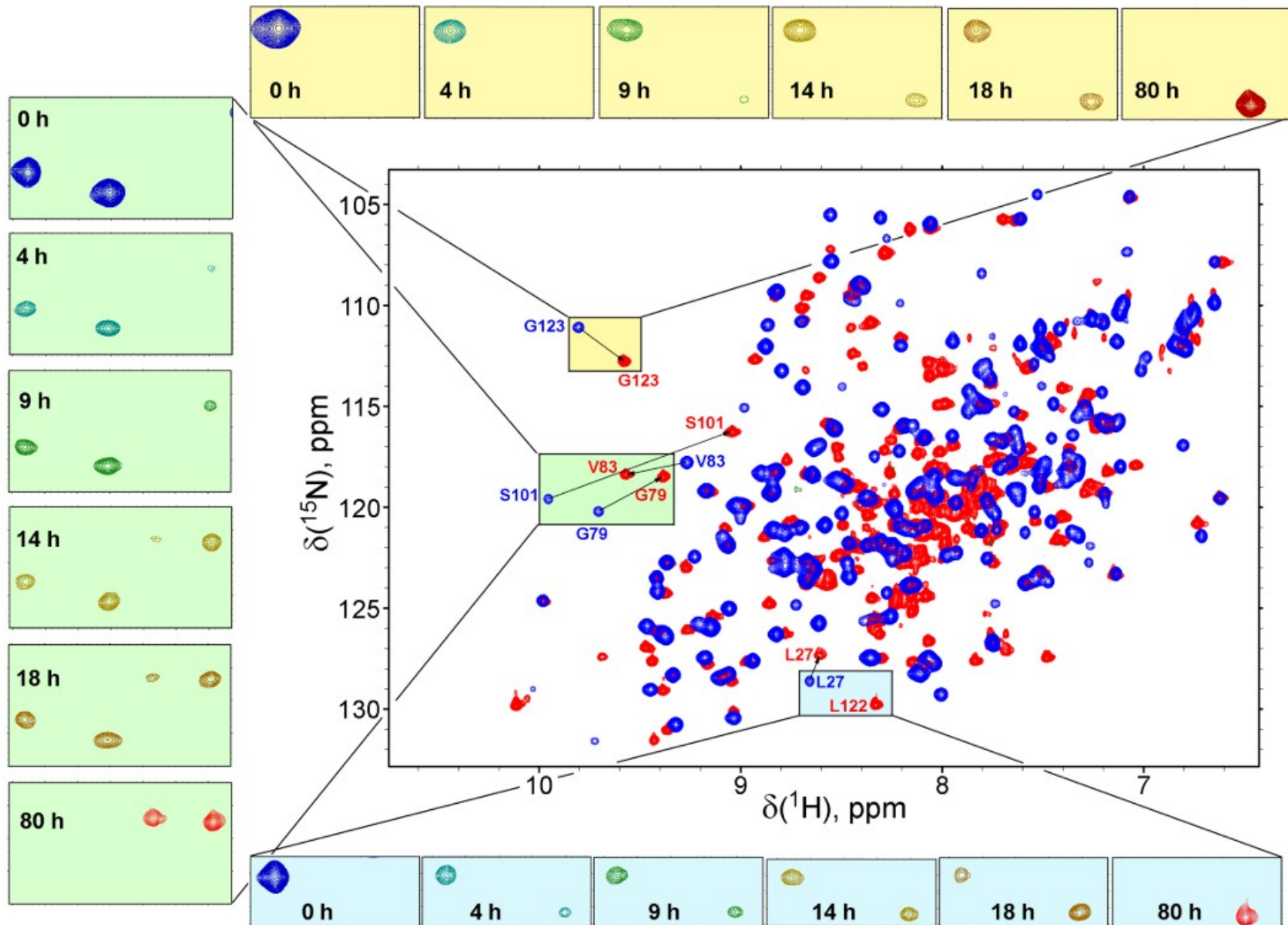
Optimize second ligand



Link ligands

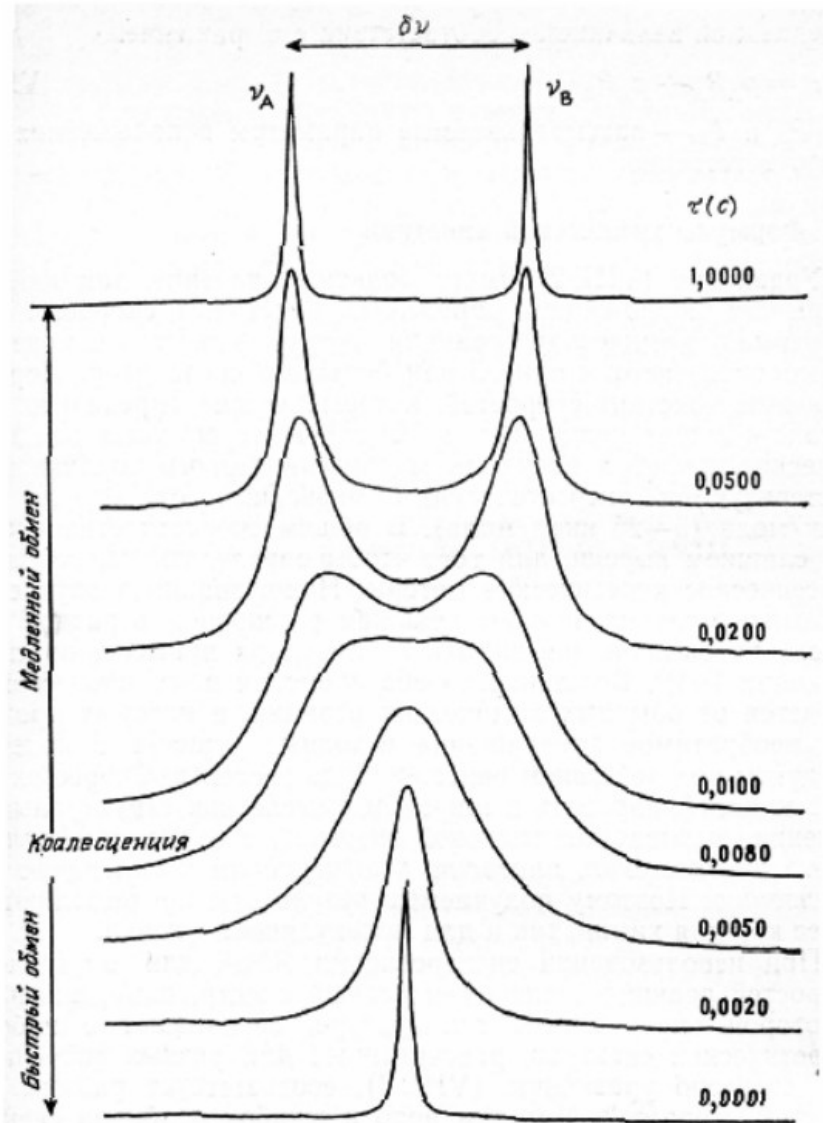


Отслеживание изменений, происходящих с белком во времени

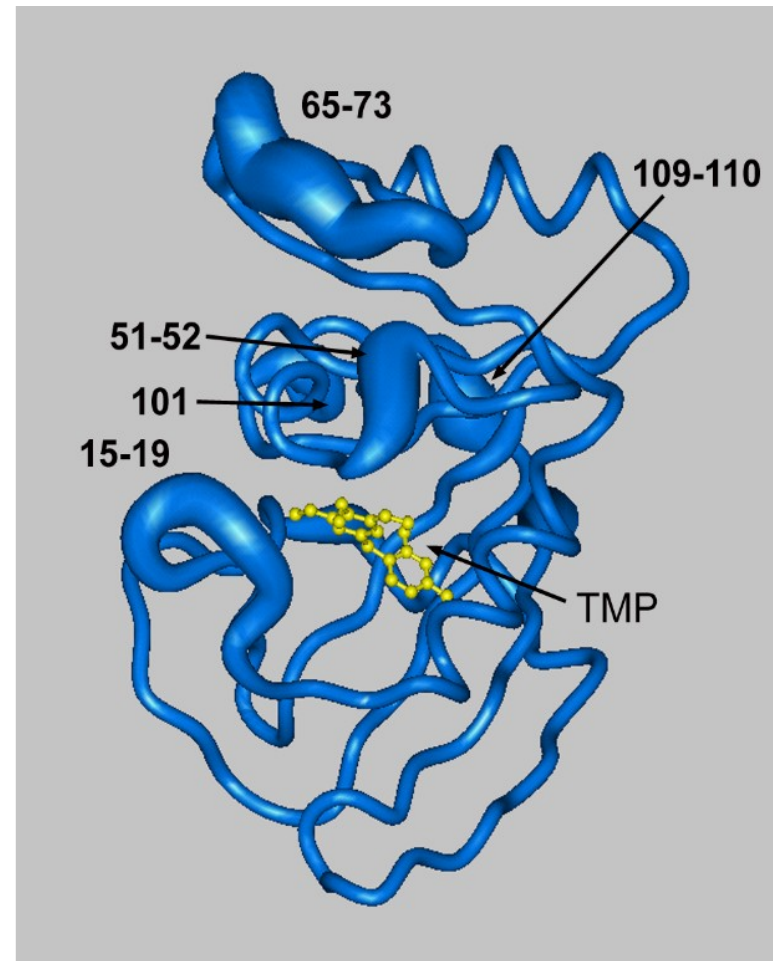


Изучение динамики биомакромолекул

ЯМР — единственный экспериментальный метод, позволяющий измерять динамику молекул



Относительные амплитуды движения белковой цепи, рассчитанные по данным ЯМР



ЯМР-метабомика

Геном: совокупность генов

Транскриптом: совокупность РНК

Протеом: совокупность белков

Метаболом: совокупность всех метаболитов в клетке, ткани, органе или организме.

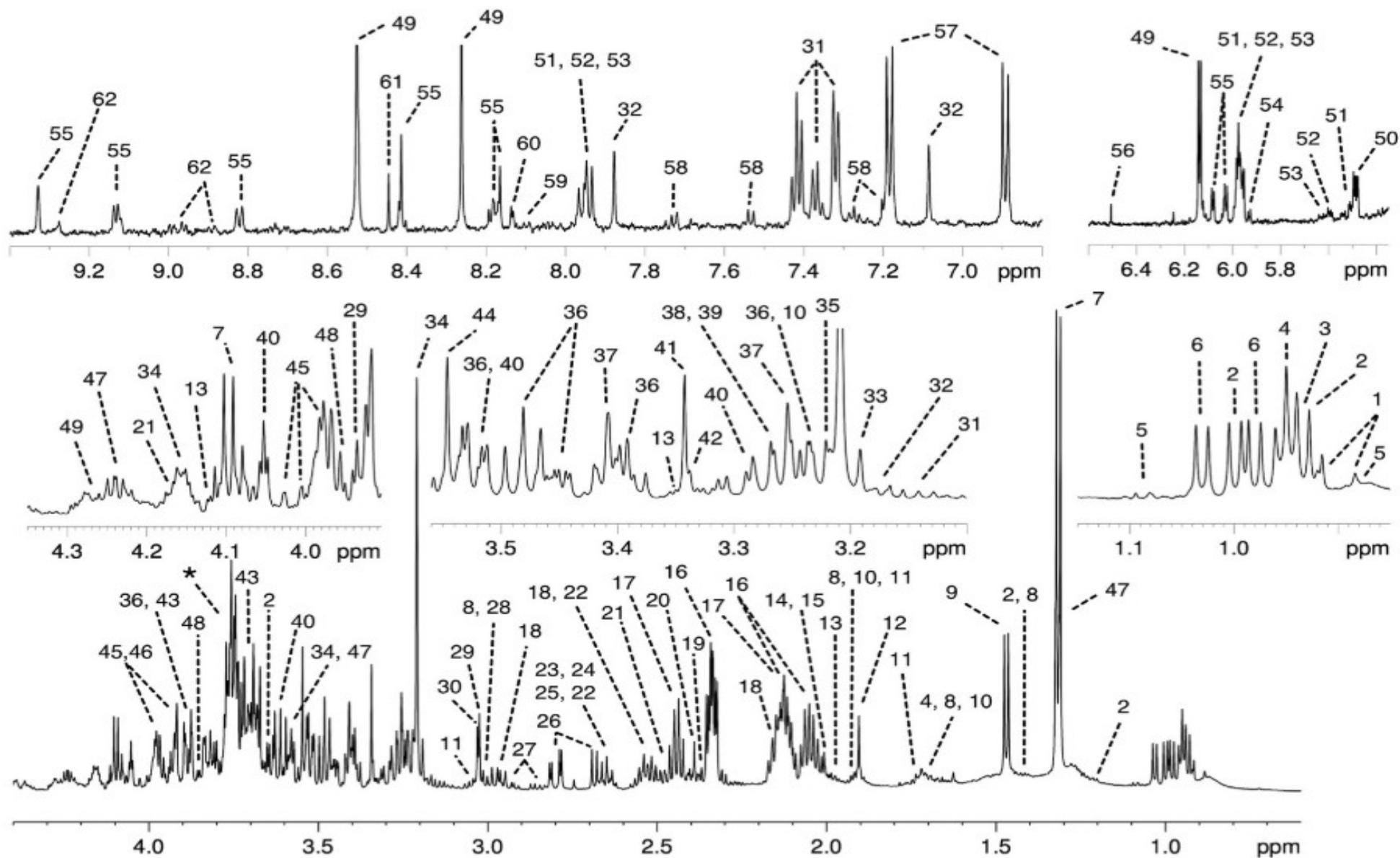
Метаболиты — промежуточные и конечные продукты обмена веществ

Объекты исследований:

- Клетки
- Органы и ткани
- Биологические жидкости людей или лабораторных животных

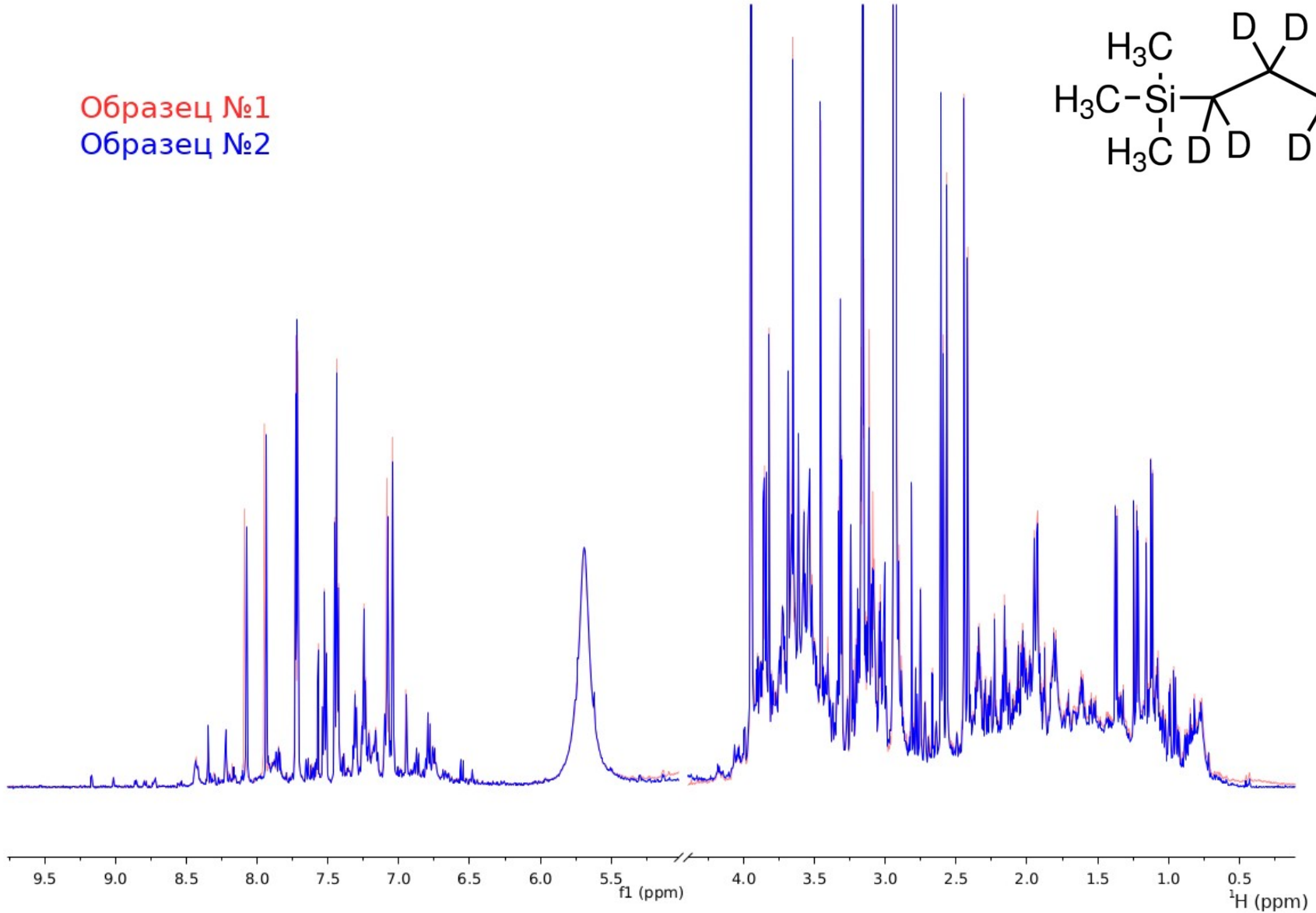
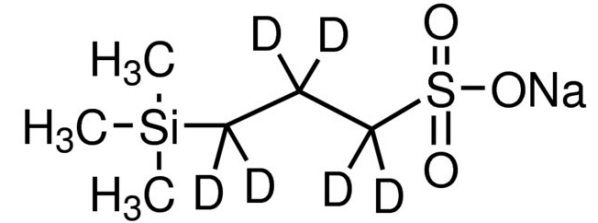
ЯМР-метабомика

Фрагменты ^1H ЯМР-спектра экстракта клеток эукариот



ЯМР-метабомика

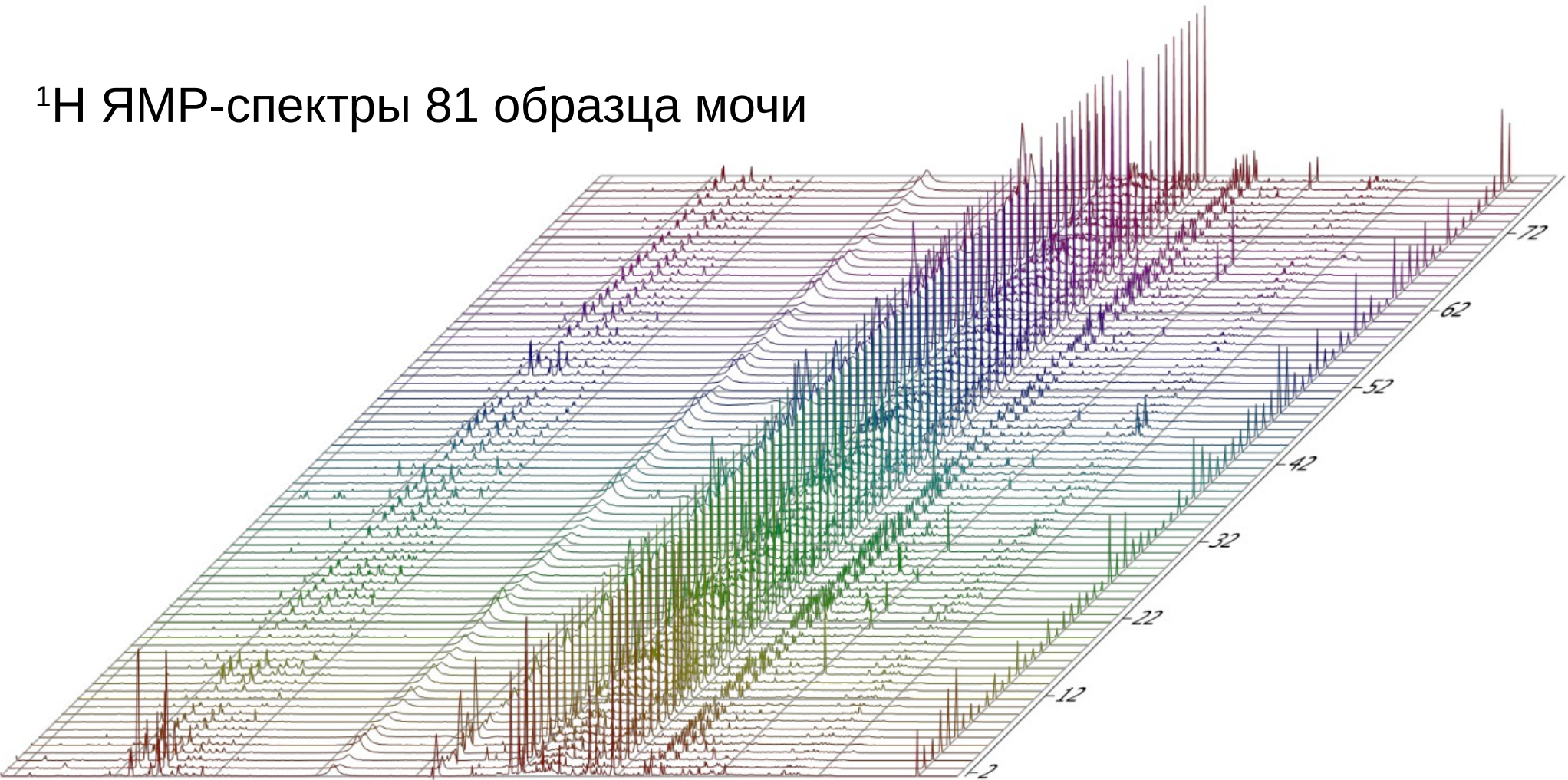
Образец №1
Образец №2



¹H-спектр мочи. Можно полуколичественно определить до 70 метаболитов.

ЯМР-метаболомика

^1H ЯМР-спектры 81 образца мочи



Сравнение спектров можно проводить **без** отнесения сигналов

Спасибо за внимание!

Приглашаем на выполнение дипломной работы в области структурного ЯМР

Вопросы?

sm1024sm@yandex.ru