УДК 547.541.2
DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.1.13

ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕИНОВ

© А. Я. Меликова

Азербайджанский государственный университет нефти и промышленности
Азербайджан, AZ1010 г. Баку, пр. Азадлыг, 20.

Email: fidanqurbanzadeh@gmail.com

Инфро-красная спектроскопия изучает взаимодействие вещества с инфро-красным излучением. При пропускании инфро-красного излучения через вещество происходит возбуждение колебательных движений молекул или их отдельных фрагментов. При этом наблюдается ослабление интенсивности излучения, прошедшего через образец. Экспериментальным результатом этой спектроскопии является ИК-спектры, содержащие ряд полос поглощения, по положению и интенсивности сигналов которых делается вывод о строении изучаемого образца. В этой работе представлены результаты исследований в области применения инфро-красной спектроскопии для определения структуры белковых молекул. Показаны различные варианты метода, а также факторы, оказывающие влияние на эффективность проведенных исследований. Отмечается, что инфро-красная спектроскопия является весьма эффективным методом исследования структуры белков, конформации спирали белковых молекул, а также количественного определения содержания белков в биомолекулах и биосистемах.

Ключевые слова: *инфро-красная спектроскопия, преобразование Фурье, белки, протеины, вторичная, первичная, третичная структуры.*

Протеины (белки) представляют собой высокомолекулярные органические соединения, состоящие из α-аминокислот, соединенных в цепочку пептидной связью. В живых организмах протеины выполняют целый ряд стратегических функций, в частности, каталитическую (ферментативную), структурную, защитную, регуляторную, сигнальную, транспортную, резервную. Для исследования структуры белков используют различные физико-химические методы анализа, среди них спектроскопические методы. Так, в работе [1] представлены рекомендации по использованию стационарной флуоресцентной спектроскопии для количественной оценки белок-белковых взаимодействий. Флуоресценция белка характеризуется спектрами возбуждения и испускания, квантовым выходом и анизотропией. Эти параметры могут изменяться при взаимодействии с другим белком и использоваться для измерения степени образования комплекса. Источником флуоресценции может быть собственный флуорофор, такой как триптофан или тирозин; ковалентно присоединенный флуоресцентный краситель; или партнер по флуоресцентному связыванию, такой как нуклеотид или кофактор, который специфически взаимодействует с комплексом. Авторами предложены методы для определения констант аффинности и значений стехиометрии для белок-белковых взаимодействий с использованием экспериментов по равновесному титрованию. Кроме того, обсуждается флуоресцентное мечение белков, дается введение в анализ данных.

Показано [2], что определение концентрации белка морских водорослей и связанного с ним фенотипа имеет решающее значение для пищевой промышленности, где требуются точные инструменты для сдерживания колебаний концентрации и снижения рисков. Экстракция и профилирование белка водорослей широко исследовались, но определение содержания требует дорогостоящего, трудоемкого и энергозатратного лабораторного метода фракционирования. В этой работе рассматривается потенциал технологии полевой спектроскопии как точного, высокопроизводительного, неразрушающего инструмента для определения концентрации белка красных водорослей на месте. Используя информацию из большого набора данных о *144 Gracilaria sp*. образцах, изученных в наземной культивационной установке, при шести режимах обработки в течение двух культивационных сезонов и искусственной нейронной сети, с помощью алгоритма машинного обучения и спектроскопии отражения диффузного видимого и ближнего инфро-красного диапазонов были получены предсказанные концентрации белка в водорослях. Результаты прогнозирования были очень точными (R_2 = 0.95; RMSE = 0.84), демонстрируя высокую корреляцию с аналитически определенными значениями.

Наиболее интересным и важным из спектроскопических методов исследования структуры белков является применение инфро-красной спектроскопии. В обзорной работе [3] обсуждается применение инфракрасной спектроскопии для изучения белков. Основное внимание уделяется средней инфро-красной области спектра и изучению белковых реакций с помощью индуцированной реакции ИК-разностной спектроскопии.

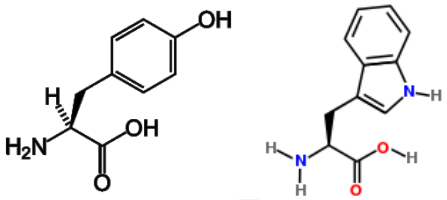
ИК- разностная спектроскопия исследует колебательные изменения белков при их возмущении [4]. По сравнению с другими спектроскопическими методами он выделяется своей чувствительностью к состоянию протонирования, Н-связям и конформации различных групп в белках, включая пептидный

остов, боковые цепи аминокислот, внутренние молекулы воды или кофакторы. В частности, обнаружение изменений протонирования и водородных связей со временным разрешением, которое нелегко получить другими методами, является одним из наиболее успешных применений ИК-разностной спектроскопии. В этом обзоре рассматривается использование возмущений, предназначенных для специфического изменения белка между двумя (или более) функционально значимыми состояниями, стратегия, которую часто называют реакцией ИК-разностной спектроскопии.

Зависимую от температуры вторичную структуру двух моноклональных антител IgG, анти-IGF1R и анти-TSLP, исследовали с помощью ИК- спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) в режиме пропускания [5]. Анти-IGF1R и анти-TSLP представляют собой моноклональные антитела IgG (мАт), направленные против рецептора инсулиноподобного фактора роста человека для противоопухолевой активности и цитокина тимического стромального лимфопоэтина для противоастматической активности соответственно. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) ясно показывает, что оба антитела в своих основных составах имеют более низкотемпературное конформационное изменение белка около 70 °C (T_{m1}) и более высокотемпературное конформационное изменение белка около 85 °C (T_{m2}). Термосканирующее динамическое светорассеяние (TS-DLS) указывает на значительное увеличение размера частиц обоих антител вблизи T_{m2}, что свидетельствует о высоком уровне агрегации белка. Природа этих конформационных изменений белка, связанных с повышением температуры состава и снижением концентрации сахарозы, была определена с помощью ИК-Фурье-спектроскопии с пропусканием и второй производной ИК-спектроскопии водных растворов обоих моноклональных антител с регулируемой температурой. Переход от внутримолекулярных β-слоев к межмолекулярным β-слоям был четко зафиксирован для обоих моноклональных антител с помощью FTIR-спектроскопии. Наконец, ИК-Фурье-спектроскопия смогла показать влияние обычного наполнителя, такого как сахароза, на стабильность каждого моноклонального антитела, что еще раз продемонстрировало полезность ИК-Фурье-спектроскопии для изучения агрегации белков и эффектов состава.

При разработке новых пищевых продуктов или при контроле традиционного процесса функциональность белка играет первостепенную роль [6]. Давно предполагалось, что изменения в структуре белка могут изменить функциональность, но не было надежных методологий для наблюдения за структурными изменениями белка в «реальных» образцах пищи. В этой работе метод определения глобальной вторичной структуры белков с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) в H_2O вместо D_2O оценивается и сравнивается с другими методологиями структурных определений. Представлена количественная методика подготовки и анализа FTIR-спектров белков для определения их глобальных вторичных структурных компонентов. В качестве примера представлен анализ FTIR-спектров лизоцима яичного белка, который коррелируется со значениями глобальной вторичной структуры, рассчитанными на основе его рентгеноструктурного анализа. Другие примеры FTIR-анализа пищевых белков представлены с учетом качественных процедур для более быстрого структурного анализа обработанных образцов.

Взаимная интерференция между полосами второго производного тирозина и триптофана в белках оценивалась по отношению *r* между двумя расстояниями между пиками [7]. Было обнаружено, что значения *r* связаны не только с соотношением тирозин/триптофан, но также зависят от полярности среды, в которую встроены остатки тирозила. Было обнаружено, что результаты, полученные на очищенных белках, согласуются с доступной рентгеновской информацией и с существующими данными о возмущении растворителя.



тирозин триптофан

Сообщается [8], что спектроскопия все чаще используется при разработке биофармацевтических составов для характеристики структуры белка и реакции структуры на конфигурацию состава. Применение спектроскопии для разработки составов обычно основано на предположении, что стабильные конформации белков обеспечивают высокую физическую стабильность в реальном времени. Проблемы применения спектроскопических исследований к характеристике белков связаны с интерпретацией и количественным определением результатов. Интерпретация данных затруднена, поскольку белковые спектры представляют собой свертку нескольких перекрывающихся компонентов, присвоение которых основано на сравнении с модельными соединениями и теоретических расчетах. Отсутствие разрешения спектральных характеристик требует использования методов деконволюции для улучшения деталей спектра. Хотя они могут быть успешными для увеличения спектральных характеристик, одна только деконволюция не решает проблему количественного анализа. Без адекватного количественного определения применение спектроскопии для оценки составов/конфигураций неэффективно. В этой статье исследуется использование разностных спектров для характеристики и количественной оценки изменений в структуре белка при-

менительно к разработке состава. Объясняется метод расчета разностных спектров и применение ИК- и УФ-разностных спектров для разработки рецептур.

Флуоресцентная спектроскопия и ее многочисленные применения в науках о жизни претерпели быстрое развитие [9]. Это связано с многочисленными техническими достижениями как в области приборов, так и в методах анализа данных, а также с широким распространением основных методов. Применение флуоресцентной спектроскопии для анализа белков и пептидов определяется тремя основными факторами: динамической природой сигнала, его локализованной природой и его избыточностью. Хотя эти особенности могут усложнить интерпретацию экспериментального результата, их также можно использовать для получения уникальной структурной и динамической информации. Доступность и простота сбора и анализа основных данных являются важными практическими особенностями, лежащими в основе популярности флуоресценции по сравнению с другими спектроскопическими методами. Тем не менее эта простота, по-видимому, не ставит под угрозу его преимущества. Эта статья призвана, во-первых, дать обзор явления флуоресценции в белках, а во-вторых, проиллюстрировать применение флуоресцентной спектроскопии в передовых (но не обязательно высокотехнологичных) исследованиях. Три области исследования белков, а именно – взаимодействия белок-лиганд, укладка белков и исследования мембранных белков, были выбраны для демонстрации ключевых преимуществ флуоресцентной спектроскопии: она чувствительна, универсальна и легко поддается быстрому сбору данных.

Инфро-красный (ИК) спектроскопический анализ структуры белка включает использование инфро-красного излучения для оценки колебательных мод, возникающих от атомов внутри белковых молекул и связывающих их с первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурой белка. Частота инфро-красной спектральной полосы, интенсивность полосы и ширина полосы могут использоваться для определения структуры и динамики белка. Колебания амидных связей белка наиболее широко используются для анализа структуры белка с помощью ИК-спектроскопии [10]. В этой статье приведены примеры того, как можно использовать ИК-спектроскопию для исследования различных уровней структуры белка как в качественном, так и в количественном отношении. Особое внимание уделяется обсуждению таких систем, как белковые агрегаты и белково-липидные комплексы, которые не могут быть легко проанализированы с помощью других методов анализа.

Содержание белка и белковый состав считаются очень важными факторами, влияющими на характеристики приготовления и обработки риса. В настоящем исследовании изучалась возможность использования спектроскопии отражения в ближней инфракрасной области спектра (NIRS) для измерения белкового состава (проламин, глобулин и глютелин) рисовой муки. NIR-спектры (1 100-2 500 нм) в общей сложности 119 образцов рисовой муки с различным белковым составом и размером частиц были получены с помощью NIR-спектрометра. Впоследствии была проверена точность прогнозирования содержания белка, которая показала аналогичную точность (стандартная ошибка прогнозирования (SEP) 0.22%) с предыдущими исследованиями. Калибровочные модели NIR для определения белкового состава также были исследованы с использованием метода частичной регрессии наименьших квадратов (PLS). Наилучшие модели были созданы с использованием предварительно обработанных спектров с мультипликативной коррекцией рассеяния, что дало SEP 0.18%, 0.06% и 0.25% для проламина, глобулина и глютелина соответственно. Полученные данные показывают, что NIR-спектроскопия может служить быстрым методом прогнозирования белкового состава рисовой муки.

Содержание белка и белковый состав считаются очень важными факторами, влияющими на характеристики приготовления и обработки риса. В работе [11] изучалась возможность использования спектроскопии отражения в ближней инфро-красной области спектра (NIRS) для измерения белкового состава (проламин, глобулин и глютелин) рисовой муки. NIR-спектры (1 100–2 500 нм) в общей сложности 119 образцов рисовой муки с различным белковым составом и размером частиц были получены с помощью NIR-спектрометра. Впоследствии была проверена точность прогнозирования содержания белка, которая показала аналогичную точность (стандартная ошибка прогнозирования (SEP 0.22%) с предыдущими исследованиями. Калибровочные модели NIR для определения белкового состава также были исследованы с использованием метода частичной регрессии наименьших квадратов (PLS). Наилучшие модели были созданы с использованием предварительно обработанных спектров с мультипликативной коррекцией рассеяния, что дало SEP 0.18%, 0.06% и 0.25% для проламина, глобулина и глютелина соответственно. Полученные данные показывают, что NIR-спектроскопия может служить быстрым методом прогнозирования белкового состава рисовой муки.

Отмечается [12], что ИК-спектроскопия является хорошо зарекомендовавшим себя методом изучения структуры как простых, так и сложных молекул. Он имеет широкое применение как для качественного, так и для количественного определения белков в различных образцах. Он дает четкое представление о первичной, вторичной или третичной структуре белка. Инфро-красное излучение используется для оценки различных режимов колебаний, возникающих в результате изменений структурных компонентов белка. В этой работе были собраны

различные исследовательские отчеты из поисковых систем, таких как *Sciencedirect, Pubmed, Researchgate* и *Google Scholar*. Они были дополнительно тщательно изучены, и важные выводы/данные были собраны и представлены в виде таблиц и рисунков. Полученные данные, включающие полосу пропускания, частоту и интенсивность, использовались для выяснения структуры белка. Из различных отчетов было обнаружено, что ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR) широко использовалась для предсказания вторичной структуры белка в последние несколько лет. FTIR имеет возможность отслеживать различные структурные модификации в структуре белка, возникающие из-за взаимодействия с другими материалами. Также очевидно, что его можно использовать для количественного определения белков в различных образцах.

Инфро-красная (ИК) спектроскопия – это неинвазивный метод, не требующий использования меток, который исследует колебательные моды молекул, тем самым обеспечивая структурно-специфический спектр [13]. Развитие подходов к ИК-спектроскопии, которые позволяют собирать ИК-спектр из выбранной области образца с латеральным разрешением от микро- до наномасштаба, позволило расширить их применение на более сложные биологические системы, такие как интактные клетки и ткани. В этой статье авторы представили недавние работы, иллюстрирующие, в частности, применение ИК-спектроскопии для исследования *in situ* характеристики конформационных свойств белковых агрегатов и других биомолекул, окружающих амилоиды. Кроме того, авторы обсудили потенциал ИК-спектроскопии для мониторинга клеточных возмущений, вызванных белковыми агрегатами.

Метод ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье был разработан для анализа вторичной структуры белка с использованием спектральной области амида III (1 350–1 200 $см^{-1}$) [14]. Было показано, что преимущества использования области амида III являются существенными. Интерференции от колебаний воды (~ 1 640 $см^{-1}$) в области амида I можно избежать, если использовать полосу амида III; кроме того, область амида III также представляет собой более охарактеризованную спектральную характеристику, которая дает легко разрешаемые и более четкие полосы для количественного анализа. Оценки вторичной структуры выполняются с использованием самодеконволюции Фурье, вторичной дериватизации и подгонки кривой на исходных белковых спектрах. Были получены окна частот вторичной структуры (α-спирали, 1 328–1 289 $см^{-1}$; неупорядоченные, 1 288–1 256 $см^{-1}$; и β-листы, 1255–1224 $см^{-1}$), и оценки вторичного структурного содержания согласуются с данными рентгеновской кристаллографии для модельных белков и параллельными результатами, полученными с использованием области амида I.

Еще в одной работе [15] сообщается, что ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) стала одним из основных методов структурной характеристики белков, пептидов и белок-мембранных взаимодействий. Хотя этот метод не позволяет получить точную молекулярную структуру с атомарным разрешением, он чрезвычайно чувствителен к конформационным изменениям, происходящим в белках при функциональных переходах или межмолекулярных взаимодействиях. Чувствительность колебательных частот к атомным массам привела к развитию ИК-Фурье-спектроскопии с «редактированием изотопов», где структурные эффекты в двух белках, один немеченый, а другой меченый более тяжелым стабильным изотопом, таким как ^{13}C, разрешаются одновременно на основе спектрального сдвига вниз (разделения) полосы амида I меченого белка. Тот же самый изотопный эффект используется для идентификации сайт-специфических конформационных изменений в белках с помощью сайт-направленного или сегментарного мечения изотопов. Незначительное рассеяние света в ИК-области дает возможность изучать межмолекулярные взаимодействия между крупными белковыми комплексами, взаимодействия белков и пептидов с липидными везикулами или взаимодействия белок-нуклеиновая кислота без проблем со светорассеянием, часто встречающихся в ультрафиолетовой спектроскопии. FTIR с ослабленным полным отражением (ATR-FTIR) – это поверхностно-чувствительная версия ИК-спектроскопии, которая оказалась полезной при изучении мембранных белков и липидов, белок-мембранных взаимодействий, механизмов межфазных ферментов, структурных особенностей мембранных порообразующих белков и пептидов и многое другое. Цель состояла в том, чтобы предоставить практическое руководство по анализу структуры белков и взаимодействий белок-мембрана методами FTIR и ATR-FTIR, включая процедуры подготовки образцов, измерений и анализа данных. Также представлена основная справочная информация о FTIR-спектроскопии, а также о некоторых относительно новых разработках в области структурной и функциональной характеристики белков и пептидов в липидных мембранах.

Способность двумерной инфро-красной (2D-IR) спектроскопии измерять полосу амида I белков в H_2O, а не в растворителях на основе D_2O, избегая мешающих сигналов воды, позволила исследовать белки *in vivo* в физиологических условиях и в биологических жидкостях [16]. Однако дальнейшее использование 2D-IR в аналитических условиях, от диагностики до скрининга белков, потребует сравнения нескольких наборов данных, что потребует контроля методов сбора данных для минимизации несоответствий между измерениями. Вдохновленные приложениями аналитической спектроскопии в других дисциплинах, авторы работы описывают рабо-

чий процесс для предварительной обработки данных 2D-IR, который направлен на упрощение спектральных перекрестных сравнений. В нашем подходе используется сигнал термальной воды, который собирается одновременно с реакцией амида I, но временно отделен от нее, чтобы направлять пользовательские стратегии коррекции базовой линии и спектральной нормализации перед их объединением с инструментами шумоподавления основного компонента. Тематические исследования показывают, что применение элементов рабочего процесса предварительной обработки к ранее опубликованным данным позволяет повысить точность количественного определения и пределы обнаружения. Впоследствии авторы применяют весь рабочий процесс в новом экспериментальном исследовании, проверяя способность прототипа метода 2D-ИК-спектров количественно определять четыре основных белковых компонента сыворотки крови в одном измерении без использования меток. Эти достижения показывают прогресс в разработке надежных стратегий обработки данных, которые потребуются для будущих приложений 2D-IR для решения фармацевтических или биомедицинских задач.

ИК-спектроскопия является полезным методом для определения конформации и ориентации связанных с мембраной белков и липидов [17]. Этот метод особенно эффективен для обнаружения конформационных изменений путем регистрации спектральных различий до и после возмущений в физиологическом растворе. Измерения в поляризованном ИК-диапазоне на образцах ориентированных мембран позволили получить ценную информацию об ориентации химических группировок и субструктур внутри мембранных молекул, которую трудно получить другими методами. Применение ИК-спектроскопии к статической и динамической структуре белков и пептидов в липидных бислоях рассмотрено с некоторым акцентом на важности пробоподготовки. Также обсуждаются ограничения метода в отношении абсолютного определения вторичной структуры и ориентации, а также новые стратегии структурных назначений.

Показано [18], что химические и структурные свойства биомолекул определяют их взаимодействие и, следовательно, их функции в самых разнообразных биохимических процессах. Были разработаны инновационные методы визуализации для описания биомолекулярных структур вплоть до ангстремного уровня. Однако получение спектров колебательного поглощения на уровне одной молекулы, что является эталоном для определения характеристик объемных образцов, остается труднодостижимым. В этой работе авторы представляют внерезонансную ИК-наноспектроскопию с малой мощностью и короткими импульсами (ORS-nanoIR), чтобы позволить получать спектры ИК-поглощения и химические карты на уровне одной молекулы, с высокой пропускной способностью во второй временной шкале и с высоким сигналом. Эта высокая чувствительность позволяет точно определять вторичную структуру отдельных белковых молекул с более чем в миллион раз меньшей массой, чем обычная объемная колебательная спектроскопия. Эти результаты открывают путь к непосредственному изучению химических и структурных свойств отдельных биомолекул, а также их взаимодействий в широком диапазоне химических и биологических систем.

В работе [19] сообщается, что ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) является признанным инструментом для структурной характеристики белков. Однако для неосторожного исследователя существуют множество потенциальных ловушек. В этом обзоре авторы критически оценивают применение ИК-Фурье-спектроскопии для определения структуры белка путем (1) описания принципов, лежащих в основе определения вторичной структуры белка с помощью ИК-Фурье-спектроскопии, (2) выделения ситуаций, в которых ИК-Фурье-спектроскопию следует считать предпочтительным методом, (3) обсуждение того, как следует проводить эксперименты для получения как можно большего количества физиологически значимой информации, (4) описание современных методов определения вторичной структуры по инфро-красным спектрам белков.

Таким образом, представленный анализ результатов научных исследований в области исследования структуры белковых молекул методом ИК-спектроскопии показывает, что этот метод является наиболее важным методом изучения конформации, внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул, а также конфигурации белковых спиралей. Анализ показывает, что исследования в этой области продолжают интенсивно развиваться, и количество работ, посвященных этим исследованиям, ежегодно возрастает [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Groemping Y., Heilmann N. Spectroscopic methods for the determination of protein interactions // Curr. Protoc. Protein Sci. 2005. Vol. 20. N 8. P. 39–52.
2. Shalev N. T., Ghermandi A., Tchernov D., Shemesh E. Phenotyping technology for assessing protein content in seaweed by field spectroscopy and a machine learning algorithm // Biorxiv. 2022. No 5. P. 1–39.
3. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 2007. Vol. 1767. No 9. P. 1073–1101.
4. Lorenz-Fonfina V. A. Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds // Chem. Rev. 2020. Vol. 120. No 7. P. 3466–3576.
5. Baird G., Farrell C., Cheung J., Semple A. FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular β-Sheet Formation Above the High Temperature T_m for Two Monoclonal Antibodies // Protein Journal. 2020. Vol. 39. No 4. P. 318–327.
6. Kumosinski T., Farrell H. Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy // Trends in Food Science and Technology. 1993. Vol. 4. N 6. P. 169–175.

7. Ragone R., Colonna G., Balestrieri C., Servillo L. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy // Biochemistry. 1984. Vol. 23. No 8. P. 1871–1875.
8. Vrettos J., Affleck R., Guo J., Spitznagel D. Application of Difference Spectroscopy to Biopharmaceutical Formulation Development // American Laboratory. 2006. No 5. P. 1–13.
9. Ladokhin A. S. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis // Peptides and Proteins. 2006. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation. 137 p.
10. Haris P. I. Infrared Spectroscopy of Protein Structure // Encyclopedia of Biophysics. 2011. P. 1095–1106.
11. Chen J. Y., Miao Y., Sato S., Zhang H. Near Infrared Spectroscopy for Determination of the Protein Composition of Rice Flour // Food Science and Technology Research. 2008. Vol. 14. No 2. P. 132–138.
12. Verma K., Semwai A., Soni P., Bhatia R. Perspectives of Infrared Spectroscopy in Quantitative Estimation of Proteins // Current Analytical Chemistry. 2021. Vol. 17. No 5. P. 689–707.
13. Diletta A., Mereghetti P., Natalello A. Contribution of Infrared Spectroscopy to the Understanding of Amyloid Protein Aggregation in Complex Systems // Front. Mol. Biosci. 2022. Vol. 9. No 8. P. 822852–822859.
14. Fen-Ni F., DeOliveira D. B., Trumble W., Sarkar H. Secondary Structure Estimation of Proteins Using the Amide III Region of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Application to Analyze Calcium-Binding-Induced Structural Changes in Calsequestrin // Applied Spectroscopy. 1994. Vol. 48. No 11. P. 1432–1441.
15. Tatulian S. A. FTIR Analysis of Proteins and Protein-Membrane Interactions // Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 2003. P. 281–325.
16. Rutherford S., Greetham G., Parker A., Nordon A. Measuring proteins in H_2O using 2D-IR spectroscopy: pre-processing steps and applications toward a protein library // J. Chem. Phys. 2022. Vol. 157. No 20. P. 205102–205110.
17. Tamm L. K., Tatulian S. A. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers // Q. Rev. Biophys. 1997. Vol. 30. No 4. P. 365–429.
18. Ruggeri F. S., Mannini B., Schmid R., Vendruscolo M. Single molecule secondary structure determination of proteins through infrared absorption nanospectroscopy // Nat. Commun. 2020. Vol. 11. No 1. P. 2945–2952.
19. Jackson M., Mantsch H. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1995. Vol. 30. No 2. P. 95–120.
20. Меликова А. Я. Применение метода флуоресцентной спектроскопии в биомедицине // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2022. №6. С. 73–81.

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.
После доработки – 21.02.2023 г.

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.1.13

IR SPECTROSCOPIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF PROTEINS

© A. Ya. Melikova

Azerbaijan State University of Oil and Industry
20 Azadlig Avenue, AZ1010 Baku, Republic of Azerbaijan.

Email: fidanqurbanzadeh@gmail.com

Protein molecules play an indispensable role in the life of living organisms. In living organisms, proteins perform a number of strategic functions, in particular, catalytic (enzymatic), structural, protective, regulatory, signaling, transport, reserve. Proteins are an important part of animal and human nutrition (main sources: meat, poultry, fish, milk, nuts, legumes, cereals; to a lesser extent: vegetables, fruits, berries and mushrooms), as all essential amino acids come with protein food. During digestion, enzymes break down ingested proteins into amino acids, which are used to biosynthesize the body's own proteins or are further broken down for energy. To study the structure of proteins, various physicochemical methods of analysis are used, among which spectroscopic methods should be highlighted. Infrared spectroscopy studies the interaction of matter with infrared radiation. When infrared radiation goes through a substance, molecules or their individual fragments start to vibrate. In this case, a decrease in the intensity of the radiation transmitted through the sample is observed. The experimental result of this spectroscopy is IR spectra containing a number of absorption bands, from the position and signal intensity of which a conclusion is made about the structure of the sample under study. This author of the paper presents the results of research in the field of infrared spectroscopy for determining the structure of protein molecules. Various variants of the method are shown, as well as factors influencing the effectiveness of the studies. It is noted that infrared spectroscopy is a very effective method for studying the structure of proteins, the conformation of the helix of protein molecules, as well as the quantitative determination of the content of proteins in biomolecules and biosystems.

Keywords: infrared spectroscopy, Fourier transform, proteins, primary, secondary, tertiary structures.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

1. Groemping Y., Heilmann N. Curr. Protoc. Protein Sci. 2005. Vol. 20. N 8. Pp. 39–52.
2. Shalev N. T., Ghermandi A., Tchernov D., Shemesh E. Biorxiv. 2022. No 5. Pp. 1–39.
3. Barth A. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 2007. Vol. 1767. No 9. Pp. 1073–1101.
4. Lorenz-Fonfina V. A. Chem. Rev. 2020. Vol. 120. No 7. Pp. 3466–3576.
5. Baird G., Farrell C., Cheung J., Semple A. Protein Journal. 2020. Vol. 39. No 4. Pp. 318–327.
6. Kumosinski T., Farrell H. Trends in Food Science and Technology. 1993. Vol. 4. N 6. Pp. 169–175.
7. Ragone R., Colonna G., Balestrieri C., Servillo L. Biochemistry. 1984. Vol. 23. No 8. Pp. 1871–1875.
8. Vrettos J., Affleck R., Guo J., Spitznagel D. American Laboratory. 2006. No 5. Pp. 1–13.
9. Ladokhin A. S. Peptides and Proteins. 2006. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.
10. Haris P. I. Encyclopedia of Biophysics. 2011. Pp. 1095–1106.
11. Chen J. Y., Miao Y., Sato S., Zhang H. Food Science and Technology Research. 2008. Vol. 14. No 2. Pp. 132–138.
12. Verma K., Semwai A., Soni P., Bhatia R. Current Analytical Chemistry. 2021. Vol. 17. No 5. Pp. 689–707.
13. Diletta A., Mereghetti P., Natalello A. Front. Mol. Biosci. 2022. Vol. 9. No 8. Pp. 822852–822859.
14. Fen-Ni F., DeOliveira D. B., Trumble W., Sarkar H. Applied Spectroscopy. 1994. Vol. 48. No 11. Pp. 1432–1441.
15. Tatulian S. A. Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 2003. Pp. 281–325.
16. Rutherford S., Greetham G., Parker A., Nordon A. J. Chem. Phys. 2022. Vol. 157. No 20. Pp. 205102–205110.
17. Tamm L. K., Tatulian S. A. Q. Rev. Biophys. 1997. Vol. 30. No 4. Pp. 365–429.
18. Ruggeri F. S., Mannini B., Schmid R., Vendruscolo M. Nat. Commun. 2020. Vol. 11. No 1. Pp. 2945–2952.
19. Jackson M., Mantsch H. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1995. Vol. 30. No 2. Pp. 95–120.
20. Melikova A. Ya. Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2022. No. 6. Pp. 73–81.

Received 29.12.2022.
Revised 21.02.2023.