

Прецизионная интерферометрия как новый метод исследования конформационного состояния белка и его взаимодействия с растворителем

© Т.М. Матвеева, Р.М. Саримов, В.Н. Бинги

Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва, Россия

e-mail: matveevata@kapella.gpi.ru

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.

В окончательной редакции 30.01.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Разработан новый метод исследования конформационного состояния белка и его взаимодействия с растворителем. Метод основан на измерении показателя преломления белкового раствора с помощью прецизионного лазерного интерферометра с погрешностью 10^{-7} . Произведена калибровка интерферометра на основе известных зависимостей изменения показателя преломления при изменении температуры воды и изменения показателя преломления раствора NaCl при изменении концентрации. С помощью интерферометра впервые зафиксированы изменения в показателе преломления в ходе процессов протеолиза (увеличение на $9 \cdot 10^{-6}$ и $2.4 \cdot 10^{-6}$ показателя преломления растворов бычьего сывороточного альбумина и яичного лизоцима при гидролизе, катализируемом пепсином) и денатурации (увеличение показателя преломления на $4.5 \cdot 10^{-5}$ в ходе реакции яичного лизоцима с гуанидин гидрохлоридом и дитиотрептолом). На основе прямых интерферометрических измерений опровергнуто широко распространенное предположение, что показатель преломления белковых растворов определяется только концентрацией белка и его аминокислотным составом и не зависит от состояния фрагментации белка. Повышенная точность интерферометра позволяет изучать инкремент показателя преломления (dn/dc) при низких концентрациях растворенных соединений ($\ll 1\%$), а также исследовать процессы, приводящие к изменениям конформации макромолекул в растворе.

Ключевые слова: лазерная интерферометрия, оптические методы в биохимии, ферментативный протеолиз, денатурация, гидратные оболочки белков.

DOI: 10.21883/OS.2020.06.49409.28-20

Введение

В последние десятилетия произошло значительное развитие методов биофотоники. Помимо общепринятых оптических методов: спектроскопии, метода кругового дихроизма, люминесцентных и флуоресцентных методов анализа и т.п., появились и за последние десять лет стали общепринятыми новые неинвазивные методы оптического анализа, такие как метод динамического рассеяния света (dynamic light scattering), поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance). Однако совершенствование техники и компьютерных технологий позволяет модернизировать уже существующие методы исследований и получать качественно новую информацию о биологически значимых макромолекулах (белков, ДНК) в растворе. Один из таких методов — рефрактометрия. Использование интерферометрических методов для измерения показателя преломления позволило на несколько порядков (с 10^{-4} – 10^{-5} у современных рефрактометров до 10^{-7} – 10^{-8} у интерферометров) увеличить точность измерения показателя преломления растворов.

Интерферометрические исследования растворов можно условно разделить на те, в которых объемы исследуемых растворов порядка одного миллилитра и

больше, и те, где объемы порядка одного микролитра или меньше — вплоть до мономолекулярных слюв. В первом случае измерения показателя преломления проводятся, главным образом, для контроля равновесных концентраций веществ [1] или для динамического контроля во время роста кристаллов [2]. Как правило, погрешность измерения показателя преломления в таких исследованиях выше, порядка 10^{-4} .

В исследованиях с микрообъемами растворов обычно изучаются взаимодействия белков и белковых комплексов с поверхностями или иммобилизованными веществами. Например, работа [3] оценивала адсорбцию различных белков на гидрофобных и гидрофильных поверхностях. В работах [4,5] показатель преломления смеси белков был измерен методом интерферометрии обратного рассеяния. Объемы растворов, использующихся в интерферометрии обратного рассеяния — сотни пиколитров, а погрешность определения показателя преломления может достигать $\sim 10^{-7}$. Разрешение приборов, измеряющих показатель преломления, созданных на основе поверхностного плазмонного резонанса с объемом раствора десятки пиколитров, достигает $4 \cdot 10^{-8}$ [6]. Однако эти чувствительные тонкопленочные сенсоры ограничены исследованием реакций, которые могут проходить только на поверхности сенсора.



Рис. 1. Интерферометр (слева) и его схема (справа). М — зеркало, ТМ — полупрозрачное зеркало, Р — фотодиодные датчики А и В, IP — интерференционная картина, PL — фотодиод для нормирования интенсивности излучения, L — линзы, C1 и C2 — опытная и контрольная кюветы, Т — термодатчик, I — пластиковый импеллер.

В настоящей работе предложен прецизионный интерферометрический метод, с помощью которого исследуется конформационное состояние белка в растворах с большим объемом (~ 20 ml), а также взаимодействие белка с растворителем. В настоящее время считается, что показатель преломления белковых растворов зависит от концентрации и аминокислотного состава белка и не зависит от состояния фрагментации данного белка [7–9]. Это утверждение, главным образом, основано на экспериментальных данных [10], где не было зафиксировано изменений показателя преломления в ходе процесса гидролиза белка. Однако это утверждение, как и теоретические оценки [9,11] показателя преломления растворов белков, основано на экспериментальных данных, полученных в основном с использованием рефрактометрии.

Важно также то, что такие оценки не берут в расчет взаимодействие белка с растворителем. Существуют эксперименты, в которых показано, что инкремент показателя преломления раствора белка dn/dc зависит от природы растворителя [12]. Эти различия, очевидно, не связаны с аминокислотным составом белков. Они могут быть вызваны только взаимодействием белков с растворителем, в частности путем изменения оптических свойств растворителя вблизи поверхности белка. Влияние площади соприкосновения белка с растворителем на показатель преломления белкового раствора также отмечалось в работе [13], где на примере нескольких белков показаны различия между расчетным показателем преломления белков и измеренным экспериментально. Выявленные различия больше тогда, когда больше площадь соприкосновения белка с растворителем.

В настоящее время показатель преломления растворов не используется для изучения кинетики ферментативных реакций или параметров гидратных оболочек белков. Это связано с тем, что измерение показателя преломления в больших объемах растворов с необходимым разрешением порядка 10^{-6} и меньше — технически сложная проблема. В представленной работе оригинальный лазерный интерферометр используется для дифференциального измерения показателя преломления двух

растворов, контрольного и экспериментального, в пятисантиметровых кюветах, используемых в исследованиях некоторых биохимических реакций. Порог чувствительности к изменениям показателя преломления составил около 10^{-7} , что сопоставимо с разрешением измерения показателя преломления сенсорами поверхностного плазмонного резонанса [14]. Достижение такого разрешения стало возможным благодаря использованию стабилизированного по току и температуре полупроводникового лазера, использованию в качестве базы интерферометра четырехсоткилограммового гранитного основания, использованию двух кювет для опытного и контрольного образцов, оснащению кювет импеллерами и платиновыми датчиками температуры и разработке оригинального программного обеспечения.

Измерения в режиме реального времени с использованием прецизионного интерферометра позволили наблюдать изменения показателя преломления растворов белков в ходе реакций протеолиза и денатурации.

Лазерный интерферометр

Лазерный интерферометр сконструирован в соответствии со схемой интерферометра Маха–Цендера (рис. 1). В качестве источника излучения использован полупроводниковый лазер Sharp GH06311A2GC CW 185 mW с длиной волны 638 nm. Интенсивность излучения, проходящего через кювету с исследуемым раствором, < 1 mW. Оптическая система состоит из двух полупрозрачных зеркал, двух непрозрачных зеркал и линзы для масштабирования интерференционной картины. Лазерный луч разделяется на два луча, один из которых проходит через контрольную кювету, другой через кювету с опытным раствором. Использование такого разделения позволяет нивелировать долговременные общие для обоих образцов изменения, связанные прежде всего с температурными изменениями в ходе эксперимента. Изменения в интерференционной картине в ходе эксперимента возникают в связи с различием показателей преломления растворов в экспериментальной и контрольной кюветах. Для измерения интенсив-

ности интерференционной картины использованы четыре фотодиодных датчика, расположенные в разных ее участках. Сигналы от фотодиодов оцифрованы на 16-битном АЦП-ЦАП NI 6251 (National Instruments) и нормированы на интенсивность лазерного излучения.

Интерференционная картина чувствительна к флуктуациям температуры в кюветах. Для уменьшения температурных флуктуаций, а также флуктуаций фонового светового потока интерферометр закрыт термостатическим экраном (рис. 1, слева), кюветы расположены прямо на массивном основании интерферометра, которое также действует как термостат.

При проведении экспериментов внутри кювет возникают градиенты плотности и температуры. Для их устранения внутри кювет помещены пластиковые трехлопастные импеллеры, вращающиеся с частотой ~ 1 Hz. Для измерения температуры использованы платиновые датчики температуры Honeywell HEL-705. Разность температур между экспериментальной и контрольной кюветами не превышала 0.05°C в течение часового эксперимента. Общие для обоих образцов изменения температуры растворов были автоматически учтены при вычислении показателя преломления. Подробное описание интерферометра доступно в [15].

Точность измерения показателя преломления растворов белков интерферометром определялась, главным образом, флуктуациями показателей преломления самих растворов. Стандартное отклонение этих флуктуаций в часовом эксперименте было $\sim 10^{-7}$.

Обработка сигналов с фотодиодов, калибровка интерферометра с помощью изменений показателя преломления воды при изменении ее температуры

Алгоритм для конвертирования сигналов с датчиков интерферометра А и В (рис. 1, справа) в изменение разности показателей преломления растворов в экспериментальной и опытной кюветах показан на примере изменения температуры воды в одной из кювет. Такая калибровка была выполнена потому, что существуют точные данные, связывающие температуру воды и показатель преломления [16,17].

Перед началом измерений одна из кювет была охлаждена примерно на $5\text{--}12^\circ\text{C}$ (в зависимости от эксперимента) относительно комнатной температуры. Затем вода в кювете медленно нагревалась до комнатной температуры вследствие естественного теплообмена с окружающей средой. Сдвиг интерференционной картины фиксировали с помощью датчиков А и В. Ее ширина была выбрана такой, чтобы максимум сигнала на одном из датчиков соответствовал половине максимума на другом, т.е. фазы сигналов $a(t)$ и $b(t)$ отличались на $\pi/2$. Это сделало возможным определять зависимость

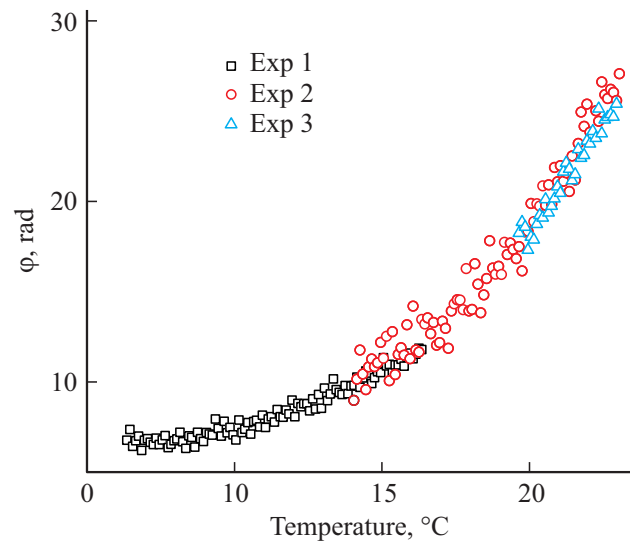


Рис. 2. Сдвиг интерференционной картины φ при нагреве до комнатной температуры первоначально охлажденной кюветы с водой. Три независимых эксперимента. Частота снятия данных 100 Hz. Каждая точка — усреднение значений — в температурном диапазоне 0.1°C .

фазы от времени $\varphi(t)$ интерференционной картины с помощью формулы

$$\varphi(t) = \arctg \left[\frac{a(t)}{b(t)} \right].$$

Поскольку арктангенс имеет разрывы в значениях, кратных $\pi/2$, функцию $\varphi(t)$ в данных точках „сшивали“. На рис. 2 показано изменение $\varphi(t)$ при медленном нагревании опытной кюветы относительно контрольной в трех независимых экспериментах. Для перевода $\varphi(t)$ в $\Delta n(t)$ — разность показателей преломления опытной и контрольной кювет — использовалась полученная аппроксимацией формула:

$$\Delta n(t) = [-6.4 \cdot 10^{-6} + 1.2 \cdot 10^{-7} T(t)] \times \varphi(t),$$

где T — температура в опытной кювете в $^\circ\text{C}$. Множитель для $\varphi(t)$ подбирался таким образом, чтобы изменение показателя преломления воды в температурном интервале $15\text{--}30^\circ\text{C}$ соответствовало известным литературным [16,17]. При комнатной температуре охлаждение или нагрев на 1°C примерно соответствует изменению показателя преломления на 10^{-4} . Реальный алгоритм перевода сигналов $a(t)$ и $b(t)$ в $\Delta n(t)$ немного отличался от рассмотренной выше иллюстрации в том, что ширина интерференционной картины отклонялась от идеального варианта, когда разность фаз сигналов $a(t)$ и $b(t)$ достигала $\pi/2$, и программа учитывала это отклонение.

Калибровка интерферометра с помощью концентрационной зависимости показателя преломления NaCl

Помимо температурной зависимости показателя преломления воды в литературе хорошо описана зависимость показателя преломления растворов от концентрации различных веществ, в частности, для растворов NaCl [18–22]. В связи с этим было интересно проверить точность калибровки интерферометра, полученной по изменению температуры в воде, с помощью концентрационной зависимости показателя преломления водного раствора NaCl.

Измерения инкремента показателя преломления для NaCl обычно выполняются при достаточно больших концентрациях NaCl: 1–30%. Это связано прежде всего с тем, что такие исследования проводятся в основном с помощью рефрактометров, предел погрешности которых лежит в диапазоне 10^{-4} – 10^{-5} [22]. Для растворов с концентраций соли < 1% экспериментальных работ по измерению показателя преломления практически нет. В одной из редких работ наблюдались различия инкрементов показателей преломления растворов NaCl для концентраций < 0.1% и для концентраций > 0.1%. Однако авторы связали эти изменения с особенностями метода интерферометрии пористых кремниевых наноструктур [23].

Для исследования концентрационной зависимости показателя преломления водного раствора NaCl использовали систему автоматической заливки растворов. Система позволяла фиксировать скорость добавления раствора в кювету. Аналогичные системы применяются в медицине для продолжительных инъекций. Готовился один 30%-раствор NaCl (131659, PanReac), далее из него

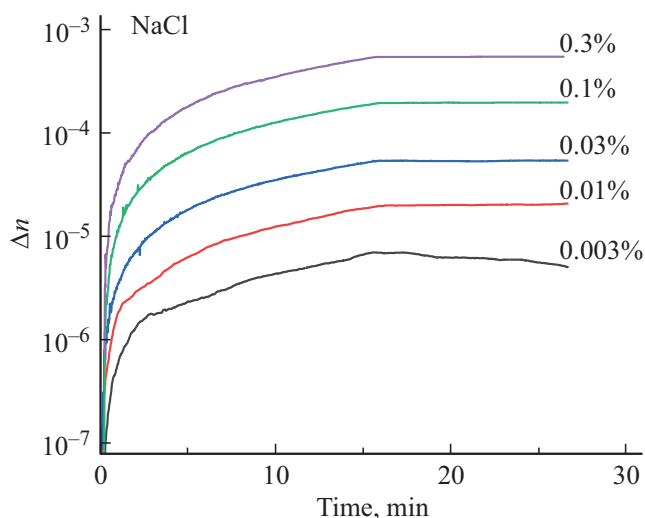


Рис. 3. Изменение показателя преломления в кювете при добавлении 2 ml раствора NaCl (0.03%–3%) к 18 ml воды (Milli Q). Справа показаны финальные концентрации NaCl в кювете.

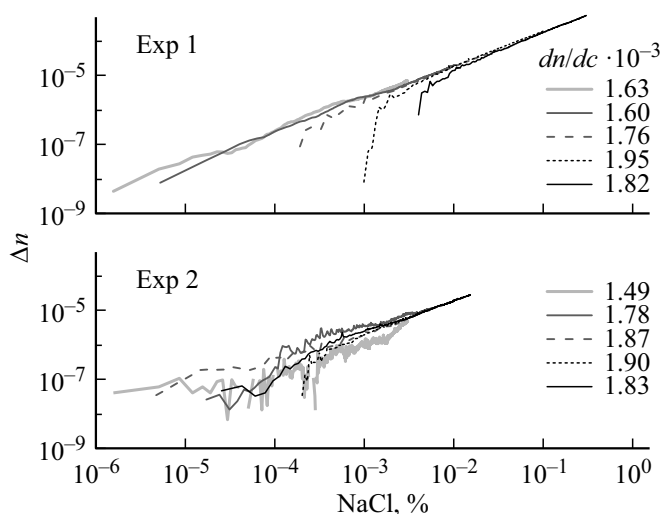


Рис. 4. Изменение показателя преломления при заливке в кювету с 18 ml воды (Milli Q) 2 ml раствора NaCl: от 0.03% до 3% — первый эксперимент (вверху), от 0.03% до 0.3% — вторая серия экспериментов (внизу). Справа показаны инкременты показателя преломления NaCl, получившиеся для различных концентраций.

получали растворы с концентрацией от 0.03% до 3% для первой серии экспериментов и от 0.03% до 0.3% для второй серии экспериментов. В каждом эксперименте к 18 ml воды (Milli Q) в кюветы добавляли 2 ml приготовленных растворов. В опытную кювету заливали раствор NaCl, в контрольную — воду. Таким образом, в ходе эксперимента происходило разбавление исходных растворов NaCl в 10 раз. Скорость заливки подбирали таким образом, чтобы залить 2 ml раствора в течение 16 min.

На рис. 3 показано изменение показателя преломления в кювете с водой при добавлении растворов NaCl в различных концентрациях. Поскольку добавление осуществлялось с помощью системы автоматической заливки, то рассчитав в каждый момент времени концентрацию NaCl, можно вместо временной зависимости построить концентрационную зависимость изменений Δn . Таким образом, для каждого эксперимента можно найти инкремент dn/dc по огромному массиву данных (измерения проводились с частотой 100 Hz).

На рис. 4 показаны концентрационные зависимости для первой серии экспериментов (вверху) и второй серии экспериментов (внизу). Начальные точки с минимальными концентрациями у некоторых графиков смещены вниз. Это связано с тем, что в данных экспериментах игла у системы заливки не была погружена в кювету с раствором, раствор NaCl добавлялся дискретно, образуя капли, что сказалось в начальной стадии эксперимента. На рис. 4 кривые Exp 1 иллюстрируют точность измерений: начиная со значений $\Delta n = 10^{-7}$, графики изменения показателя преломления при разных dn/dc практически совпадают (не считая начальных

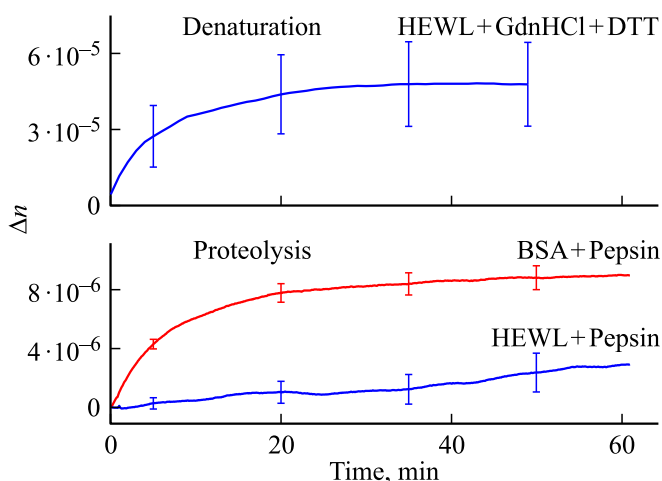


Рис. 5. Вверху: изменение показателя преломления раствора HEWL (4 mg/ml) в ходе денатурации в буфере 50 mM Tris-HCl (pH = 8.0) с добавлением 6 M GdnHCl и 30 mM DTT при комнатной температуре. Усреднение и стандартные ошибки среднего по шести экспериментам. Внизу: изменение показателя преломления в ходе протеолиза BSA или HEWL (4 mg/ml) пепсином (2.2 mg/ml) при pH 1.5. Усреднение и стандартные ошибки среднего по десяти экспериментам для BSA и шести экспериментам для HEWL.

точек, соответствующих артефактам заливки). Справа на графиках показаны значения инкрементов, полученные для каждого эксперимента. Известно [24], что инкремент показателя преломления линейно зависит от длины волны:

$$\frac{dn}{dC} = \frac{\lambda}{2d} \frac{\Delta m}{\Delta C},$$

λ — длина волны, $2d$ — оптический путь внутри исследуемого раствора, Δm — сдвиг интерференционной картины, ΔC — изменение концентрации. По литературным данным пересчет инкремента показателя преломления для длины волны 589 nm [18,21,22], а также непосредственные измерения для длины волны 632.8 nm [19] показали, что инкремент показателя преломления раствора NaCl лежит в диапазоне $1.8-1.9 \cdot 10^{-3}$, что согласуется с полученными данными. Интересно, что для каждой серии эксперименты с наименьшими концентрациями имели наименьший инкремент. Однако для окончательного установления факта нелинейности показателя преломления при малых концентрациях NaCl нужны дополнительные эксперименты.

Денатурация и протеолиз белков

Химическую денатурацию лизоцима (HEWL, 0663, VWR Life Science, активность > 20.000 U/mg) проводили с использованием раствора 50 mM Tris-HCl (A1087, PanReac), pH 8.0, содержащего 6M гуанидина гидрохлорида GdnHCl (100005172, Dia-m) и 30 mM дитиотреитола DL-Dithiothreitol (DTT, D3483123, Dia-m).

Эксперименты в интерферометре проводились шесть раз в разные дни. Объем раствора для денатурации составил 15 ml. Денатулирующие растворы подобраны таким образом, чтобы можно следить за денатурацией белка в течение 1 h.

Эффективность денатурации проверяли с помощью ферментативной активности белка при лизисе клеток *Micrococcus lysodeikticus* (M0508, Sigma-Aldrich). Ферментативная активность лизоцима в растворе GdnHCl и DTT резко уменьшается в течение первых 10 min до 10% от исходной и далее через 30–60 min становится < 1% (данные не представлены). Исследования денатурации, так же как и протеолиза, проводили при комнатной температуре 21–23°C. Вода для растворов была получена путем дистилляции и деионизации, удельное электрическое сопротивление воды превышало 5 MΩ/cm.

Эксперимент в интерферометре, в котором исследовалась денатурация HEWL, проходил следующим образом. В опытную и контрольные кюветы добавлялись растворы Tris-HCl с денатулирующими агентами GdnHCl и DTT. Далее в экспериментальную кювету добавлялся HEWL, а в контрольную — вода, после чего растворы перемешивались. Объем растворов составил 15 ml. Концентрация HEWL 4 mg/ml. После добавления HEWL измеряли сдвиг интерференционной картины и рассчитывали Δn .

В реакции лизоцим HEWL + DTT + GdnHCl было зафиксировано увеличение показателя преломления раствора лизоцима (рис. 5, вверху). Показатель преломления растет в первые 20–25 min после начала денатурации на $\sim 4.5 \cdot 10^{-5}$.

В экспериментах с протеолизом в день эксперимента приготавливались водные растворы белков из порошка бычьего сывороточного альбумина (A4919, Sigma-Aldrich), лизоцима (HEWL, 0663, VWR Life Science, активность > 20.000 U/mg) и пепсина (P7125, Sigma-Aldrich, содержание белка 5.1%, активность ~ 1100 U/mg). В контрольную и экспериментальную кюветы был добавлен раствор HCl для смещения кислотности раствора до pH $\sim 1.5 \pm 0.1$, это оптимальная кислотность для пепсина. Для того чтобы протестировать протеолитическую активность пепсина, были повторены эксперименты без добавления HCl. В этих условиях реакция протеолиза практически не шла: показатель преломления за один час увеличился менее чем на $2 \cdot 10^{-6}$ (данные не представлены).

Для контроля протеиназной активности пепсина были использованы электрофорез продуктов протеолиза в полиакриламидном геле, метод динамического рассеяния света и спектрофотометрия в УФ области спектра. Данные по электрофорезу и светорассеянию представлены в [25], по спектрофотометрии — в [26].

Эксперимент в интерферометре, в котором исследовался протеолиз белков, проходил следующим образом. Ранее растворенный белок, BSA или лизоцим, помещался в обе кюветы. Перед началом измерений в экспериментальную кювету был добавлен раствор

пепсина, а в контрольную — вода, после чего растворы были перемешаны. Объем растворов составил 18 ml. Концентрации BSA 4 mg/ml или лизоцима 4 mg/ml в контрольной и экспериментальной кюветах были одинаковы, концентрация пепсина в экспериментальной кювете была 2.2 mg/ml. После добавления пепсина измеряли сдвиг интерференционной картины и рассчитывали Δn . При добавлении пепсина к раствору BSA показатель преломления увеличивается на $9 \cdot 10^{-6}$ за час и 95% эффекта достигается в первые 30 min после добавления пепсина (рис. 5, внизу). Увеличение показателя преломления в процессе протеолиза лизоцима за час составило $2.4 \cdot 10^{-6}$.

В предыдущей работе [26] была предложена модель изменения показателя преломления в ходе реакции протеолиза, основанная на предположениях об изменениях в гидратации белка в ходе протеолиза. Изменение показателя преломления раствора происходит, главным образом, из-за того, что локальная плотность воды около или внутри молекулы белка отличается от средней плотности воды в объеме. За счет притяжения диполей воды к поверхности белка плотность воды в слое, близком к поверхности белка, выше, чем в объемной воде. В ходе гидролиза белка суммарная площадь поверхности фрагментов белка увеличивается примерно в 3.5 раза для BSA и 1.5–2 раза для лизоцима [26]. Таким образом, количество воды с высокой плотностью возрастает и показатель преломления раствора увеличивается. Модель показывает, что наблюдаемый рост показателя преломления соответствует увеличению плотности воды в гидратной оболочке на 1% по сравнению с объемной водой при ширине гидратной оболочки в один молекулярный слой воды.

Различие в степени протеолиза между BSA и HEWL, возможно, связано с сохранением структуры HEWL, близкой к нативной, даже при низких pH и как результат недоступность участков, в которых происходит порезка белка пепсином. Изменение показателя преломления в ходе протеолиза показывает, что показатель преломления раствора белка зависит не только от концентрации и аминокислотного состава белка, но также от его взаимодействия с растворителем. Такое предположение было сделано ранее в [12] на основе косвенных данных, где было показано, что инкремент dn/dc раствора лизоцима зависит от природы растворителя. Это указывает на то, что молекулы растворителя оказывают влияние на показатель преломления не только напрямую, но и косвенно, посредством взаимодействия белок–растворитель.

Наблюдаемый в случае денатурации эффект роста показателя преломления $\Delta n \sim 4.5 \cdot 10^{-5}$ в несколько раз больше эффекта, наблюдаемого при протеолизе. Это кажется странным, поскольку при денатурации, так же как и при протеолизе, происходит двукратное увеличение площади, что должно приводить к сопоставимому по величине увеличению показателя преломления. Здесь возможно следующее объяснение. Во-первых, реакция протеолиза для HEWL в течение часа не заканчивается,

а продолжается длительное время. Это видно по отсутствию выхода на плато (рис. 5, внизу). Расчетная величина изменения показателя преломления близка к наблюдаемому Δn для BSA. Во-вторых, реакция денатурации проходит в концентрированном растворе 6M GdnHCl, и в растворе на четыре молекулы воды приходится одна молекула GdnHCl, что может существенным образом повлиять на структуру воды в области, граничащей с белковой поверхностью. В публикации [12] изучалась зависимость инкремента показателя преломления лизоцима от выбора буферного раствора. Оказалось, что инкремент показателя преломления изменяется в широком диапазоне от $0.153 \text{ cm}^3/\text{g}$ для H_2O до $0.272 \text{ cm}^3/\text{g}$ в буфере (NaSCN 10 mM HEPES 10 mM); для большинства других буферов инкремент имеет величину, близкую к расчетной для большинства белков $0.18\text{--}0.19 \text{ cm}^3/\text{g}$ [9].

На примере денатурации и протеолиза белка нами было показано, что рост показателя преломления в ходе реакций зависит от изменения площади соприкосновения поверхности пептидов и белков с растворителем. Этот вывод подтверждает ранее наблюдавшиеся в работе [13] различия между расчетным показателем преломления белков как суммы аминокислот и показателем преломления, измеренным экспериментально. Обобщая проделанную работу, можно сделать вывод, что прецизионная лазерная интерферометрия — новый метод для изучения изменений конформационного состояния белков по их гидратным оболочкам в режиме реального времени.

Заключение

С помощью прецизионного лазерного интерферометра впервые зафиксированы изменения в показателе преломления в ходе процессов протеолиза (увеличение на $(9 \pm 0.8) \cdot 10^{-6}$ и $(2.4 \pm 1.3) \cdot 10^{-6}$ показателя преломления растворов BSA и HEWL при гидролизе, катализируемом пепсином) и денатурации (увеличение показателя преломления на $(4.8 \pm 1.7) \cdot 10^{-5}$ в ходе реакции HEWL с GdnHCl и DTT). На основе прямых интерферометрических измерений опровергнуто широко распространенное предположение, что показатель преломления белковых растворов определяется только концентрацией белка и его аминокислотным составом и не зависит от состояния фрагментации белка.

Особенности конструкции интерферометра обеспечивают погрешность $\sim 10^{-7}$ в измерении показателя преломления растворов в относительно большом объеме (до 20 ml). Это позволяет изучать инкремент показателя преломления (dn/dc) даже при низких концентрациях растворенных соединений ($\ll 1\%$), а также изучать процессы, приводящие к изменениям конформации макромолекул в растворе. Наличие вышеприведенных эффектов указывает на возможность использования показателя преломления для исследования конформационного состояния белка и его взаимодействия с растворителем.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках исследовательского проекта № 0024-2019-0004 Российской академии наук.

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Cole T., Kathman A., Koszelak S., McPherson A. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 231. N 1. P. 92. doi 10.1006/abio.1995.1507
- [2] Yin D.C., Inatomi Y., Luo H.M., Li H.S., Lu H.M., Ye Y.J., Wakayama N.I. // *Meas. Sci. Technol.* 2008. V. 19. N 045303. P. 1. doi 10.1088/0957-0233/19/4/045303
- [3] Vörös J. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. N 1. P. 553. doi 10.1529/biophysj.103.030072
- [4] Jepsen S.T., Jørgensen T.M., Zong W., Trydal T., Kristensen S.R., Sørensen H.S. // *Analyst* 2015. V. 140. N 3. P. 895. doi 10.1039/c4an01129e
- [5] Markov D.A., Swinney K., Bornhop D.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. N 50. P. 16659. doi 10.1021/ja047820m
- [6] Kabashin A., Nikitin P. // *Opt. Commun.* 1998. V. 150. N 1–6. P. 5. doi 10.1016/s0030-4018(97)00726-8
- [7] McMeekin T.L., Groves M.L., Hipp N.J. // *In Amino Acids and Serum Proteins* / Ed. by Stekol J. Washington DC: Am. Chem. Soc. 1964. P. 54. doi 10.1021/ba-1964-0044.ch004
- [8] McMeekin T.L., Wilensky M., Groves M.L. // *Biochem. Biophys. Res.* 1962. V. 7. N 2. P. 151. doi 10.1016/0006-291X(62)90165-1
- [9] Zhao H., Brown P.H., Schuck P. // *Biophys. J.* 2011. V. 100. N 9. P. 2309. doi 10.1016/j.bpj.2011.03.004
- [10] Barer R., Joseph S. // *Quarterly J. of Microscopical Science.* 1954. V. 95. N 4. P. 399.
- [11] Zhao H., Brown P.H., Magone M.T., Schuck P. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 411. N 3. P. 680. doi 10.1016/j.jmb.2011.06.007
- [12] Ball V., Ramsden J.J. // *Biopolymers.* 1998. V. 46. N 7. P. 489. doi 10.1002/(SICI)1097-0282(199812)46:7<489::AID-BIP6>3.0.CO;2-E
- [13] Khago D., Bierma J.C., Roskamp K.W., Kozlyuk N., Martin R.W. // *J. Phys. Condens. Mat.* 2018. V. 30. N 43. doi 10.1088/1361-648X/aae000
- [14] Homola J. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. N 2. P. 462. doi 10.1021/cr068107d1
- [15] Binhi V., Sarimov R. // *Biophys.* 2014. V. 59. N 4. P. 515. doi 10.1134/S0006350914040058
- [16] Bashkatov A.N., Genina E.A. // *Saratov Fall Meeting 2002: Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV.* Saratov. Proc. SPIE. 2003. V. 5068. P. 393. doi 10.1117/12.518857
- [17] Lide D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 3rd electronic ed. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- [18] Shippy B.A., Burrows G.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1918. V. 40. N 1. P. 185. doi 10.1021/ja02234a019
- [19] Neto R.B.S., de Mendonça J.P.R.F., Lesche B. // *Revista de Física Aplicada e Instrumentação* 2004. V. 17. N 2.
- [20] Barbosa E., Silva D., Preto A., Verzini R. // *Rev. Sci. Instrum.* 2011. V. 82. N 1. P. 013103. doi 10.1063/1.3523049
- [21] Schmidt S., Flueckiger J., Wu W., Grist S.M., Fard S.T., Donzella V., Khumwan P., Thompson E.R., Wang Q., Kulik P. // *Biosensing and Nanomedicine VII.* San Diego, California, USA. Proc. SPIE. 2014. V. 9166. P. 91660M. doi 10.1117/12.2062389
- [22] Tan C.-Y., Huang Y.-X. // *J. of Chemical & Engineering Data* 2015. V. 60. N 10. P. 2827. doi 10.1021/acs.jced.5b00018
- [23] Mariani S., Strambini L.M., Barillaro G. // *ACS Sensors* 2018. V. 3. N 3. P. 595. doi 10.1021/acssensors.7b00650
- [24] Mahdieh M.H., Nazari T. // *Optik-International J. for Light and Electron Optics* 2013. V. 124. N 20. P. 4393. doi 10.1016/j.ijleo.2013.01.059
- [25] Sarimov R.M., Matveyeva T.A., Vasin A.L., Binhi V.N. // *Biophysics (Russian Federation)* 2017. V. 62. N 2. P. 177. doi 10.1134/S0006350917020221
- [26] Sarimov R.M., Matveyeva T.A., Binhi V.N. // *J. Biol. Phys.* 2018. V. 44. N 3. P. 345. doi 10.1007/s10867-018-9494-7