

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ РАСТВОРА В РЕАКЦИИ ПРОТЕОЛИЗА БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПЕПСИНОМ

© 2017 г. Р.М. Саримов, Т.А. Матвеева, А.Л. Васин, В.Н. Бинги

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38*

*E-mail: rusa@kapella.gpi.ru*

Поступила в редакцию 22.04.16 г.

Обнаружено увеличение показателя преломления раствора белка на  $8 \cdot 10^{-6}$  в ходе реакции протеолиза бычьего сывороточного альбумина (4 мг/мл) пепсином (2,2 мг/мл). Ранее считалось, что показатель преломления раствора белка зависит только от его концентрации и аминокислотной последовательности и в ходе гидролиза белка не меняется. Рост показателя преломления раствора белка при протеолизе обнаружен при помощи оригинального лазерного интерферометра повышенной чувствительности. Интерферометр позволяет проводить измерения разности показателя преломления растворов в двух кюветах с точностью  $\sim 6 \cdot 10^{-7}$ .

*Ключевые слова: лазерная интерферометрия, ферментативный протеолиз, рефрактометрия.*

Показатель преломления или его инкремент (производная показателя преломления раствора по концентрации вещества,  $dn/dc$ ) – один из необходимых параметров для определения размера и веса частиц в растворе в таких широко известных методах, как эксклюзионная хроматография и динамическое светорассеяние. При исследовании белковых растворов обычно используют усредненный для белков показатель преломления  $\sim 0,18 \text{ см}^3/\text{г}$  [1]. Усреднение показателя преломления ухудшает точность методов, поэтому предпринимаются попытки численных расчетов показателя преломления белков в зависимости от их аминокислотного состава [2].

С другой стороны, существуют интерферометрические методы, в которых измеряется показатель преломления растворов белков. Как правило, при помощи этих методов исследуется градиент концентрации, возникающий, например, в процессе кристаллизации белков [3,4] или растворения веществ [5]. В последнее время получил распространение метод интерферометрии обратного рассеяния (backscattering interferometry). Обычно в таких экспериментах используют малые объемы растворов, что позволяет избежать проблем, связанных с нестабильностью интерференционного паттерна из-за флуктуаций температуры, механических воздействий и т.д. Так, в работе [6] объем исследуе-

мого раствора составлял  $\sim 350 \text{ пл}$ , а точность определения показателя преломления  $n$  составила  $\sim 10^{-6}$ . В более поздних исследованиях других авторов точность достигает  $2 \cdot 10^{-7}$  [7]. В вышеупомянутых работах метод интерферометрии обратного рассеяния использовали для изучения связывания белков друг с другом.

Дифференциальные рефрактометры и интерферометры обладают высокой чувствительностью и точностью, однако их использование для изучения кинетики биохимических реакций осложнено малыми объемами проб, загружаемых в прибор – это не позволяет осуществлять реакцию непосредственно в кювете прибора и исследовать ее кинетику.

На сегодняшний день интерферометрические методы измерения  $n$  ограничены устройствами, сочетающими либо высокую точность с микрообъемами проб, либо стандартные объемы с низкой точностью. По-видимому, именно этим объясняется тот факт, что, как полагают, показатель преломления раствора белка зависит только от его концентрации и аминокислотной последовательности и, таким образом, в ходе гидролиза белка не меняется.

Разработанный нами лазерный интерферометр позволяет измерять  $n$  в режиме реального времени с повышенной точностью  $\sim 6 \cdot 10^{-7}$  в стандартной кювете, где протекает исследуемая реакция.

В данной работе ставилась цель обнаружить изменение показателя преломления раствора

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин, ТХУ – трихлоруксусная кислота.

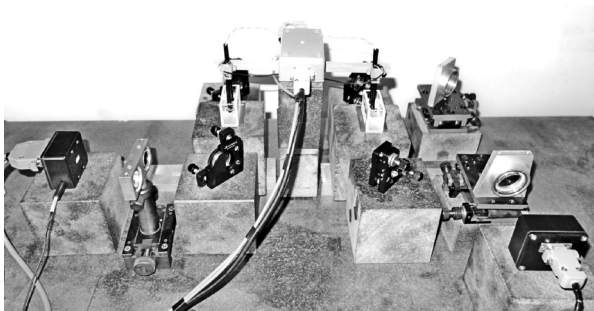


Рис. 1. Кюветы и оптические элементы внутри интерферометра.

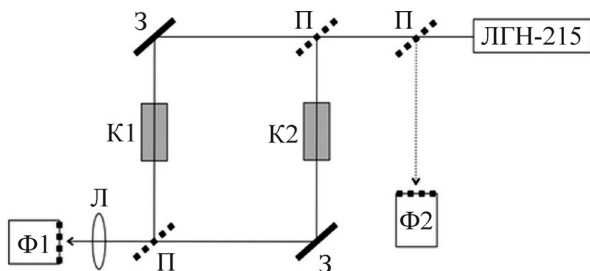


Рис. 2. Схема интерферометра (описание в тексте).

белка в ходе реакции протеолиза бычьего сывороточного альбумина (БСА) пепсином и тем самым продемонстрировать возможность применения интерференционного рефрактометрического метода повышенной чувствительности в исследованиях реакций протеолиза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лазерный рефрактометр повышенной чувствительности.** Лазерный рефрактометр построен на основе интерферометра Маха–Цендера (рис. 1). Схема установки показана на рис. 2. Компоненты интерферометра – гелий-неоновый лазер ЛГН-215 с длиной волны 632,8 нм и мощностью излучения <math>< 1</math> мВт, оптическая система из двух полупрозрачных (П) и двух непрозрачных зеркал (З) и линзы (Л) для масштабирования интерференционной картины. Отличие интерферометра от большинства аналогичных установок – это прохождение разделенных лучей через кюветы с исследуемыми опытными (К1) и контрольным (К2) образцами. Изменения в интерференционной картине в процессе эксперимента следуют из предполагаемых различий в показателях преломления в опытной и контрольной кюветах. Использование двух образцов также позволяет исключить синхронные долговременные релаксационные процессы



Рис. 3. Датчик температуры (справа) и трехлопастная пластиковая мешалка (слева) в одной из кювет.

(температурные вариации, химическая релаксация и др.).

Разнесение кювет на такое расстояние обычно приводит к нестабильной интерференционной картине из-за внешних вибраций и деформации базы интерферометра. Для увеличения чувствительности интерферометра посредством снижения нестабильности все оптические элементы и датчики закреплены на массивных подставках и практически недеформируемой каменной плите. Вес установки около 400 кг.

Для оцифровки интерференционного паттерна применяется фотодиодная линейка из четырех элементов  $2,4 \times 1,1$  мм с зазором между ними 0,4 мм. Для контроля интенсивности излучения лазера используется дополнительный фотодиод (Ф2), на который луч лазера попадает до разделения в интерферометре (рис. 2). Сигнал с фотодиодной линейки Ф1 оцифровывается на 16-битном АЦП-ЦАП NI USB-6251 (National Instruments, США) и нормируется на сигнал с фотодиода Ф2.

Интерференционная картина чувствительна к изменению температуры в кюветах, поэтому для уменьшения помех, связанных с флуктуациями температуры, а также светового потока, сделан термостатический экран по периметру установки. Для измерения температуры в обеих кюветах используются платиновые датчики температуры HEL-705 (Honeywell, США). Датчики цилиндрической формы имеют малый размер  $2 \times 5$  мм и перед экспериментом опускаются непосредственно в раствор (рис. 3). Расчетная температура самонагрева термодатчиков  $< 0,001^\circ\text{C}$ . Термодатчики позволяют фиксировать небольшие дрейфы температуры в кюветах во время эксперимента и учитывать их при вычислении показателя преломления.

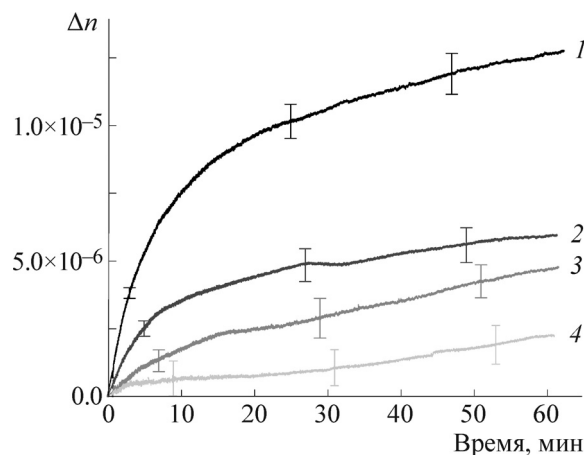
В ходе эксперимента возникают градиенты плотности и температуры внутри каждой из кювет, поэтому для создания однородного распределения вещества и температуры в объеме кюветы они оснащены пластиковыми трехлопастными мешалками с частотой вращения около 50 об/мин (рис. 3).

Разница в температуре между опытной и контрольной кюветами в течение эксперимента не превышала  $0,05^{\circ}\text{C}$ . Температурные тренды растворов в течение экспериментов учитывались при вычислении  $n$ . Точность измерения различий между  $n$  в 50-мм кюветах составила  $\sim 6 \cdot 10^{-7}$  и на данный момент ограничена в основном долговременной нестабильностью термодатчиков (изменения разницы температуры между кюветами за час  $\sim 0,005^{\circ}\text{C}$ ) и флуктуациями температуры растворов в кюветах. Более подробное описание интерферометра имеется в работе [8].

**Протеолиз бычьего сывороточного альбумина пепсином.** В день эксперимента из порошкообразных БСА (BSA.0025, Merck, Германия) и пепсина (P7125-100, Sigma, США; активность  $\sim 1100$  ед/мг, содержание белка 5,1%) готовили водные растворы белков. Эксперименты проходили следующим образом. В контрольную и опытную кюветы помещали раствор БСА и доводили растворы до pH  $\sim 1,5$  соляной кислотой. Затем в опытную кювету добавляли раствор пепсина, а в контрольную – воду и перемешивали растворы. Объем растворов составлял 18 мл. Концентрация БСА в кюветах равнялась 2 или 4 мг/мл, пепсина – 2,2 мг/мл. После добавления протеазы начинали измерения сдвига интерференционной картины.

**Самогидролиз пепсина.** Контрольную и опытную кюветы заполняли водой и доводили до pH  $\sim 1,5$  соляной кислотой. Далее эксперимент выполняли аналогично предыдущему: перед началом эксперимента в опытную кювету добавляли раствор пепсина, а в контрольную – воду и перемешивали. Объем растворов составлял 18 мл. Концентрация пепсина в кювете равнялась 2,2 мг/мл. После добавления пепсина начинали измерения сдвига интерференционной картины.

**Контроль протеазной активности пепсина.** Для контроля протеазной активности пепсина использовали осаждение белков трихлоруксусной кислотой (ТХУ), электрофорез продуктов протеолиза в полиакриламидном геле и метод динамического рассеяния света. Во всех методах использовали концентрацию БСА 4 мг/мл и пепсина 2,2 мг/мл. После эксперимента в каждую кювету добавляли 2 мл 20% ТХУ. Для электрофореза были взяты пробы из начального



**Рис. 4.** Изменения показателя преломления в реакции гидролиза альбумина пепсином (2,2 мг/мл): 1 – 4 мг/мл БСА + пепсин, pH 1,5; 2 – 2 мг/мл БСА + пепсин, pH 1,5; 3 – пепсин, pH 1,5; 4 – 4 мг/мл БСА + пепсин, pH 7,0.

раствора БСА и раствора БСА через 1, 7 и 50 мин после добавления пепсина.

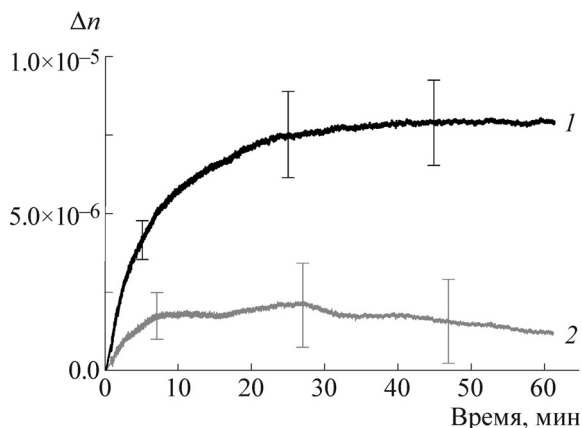
Исследование кинетики обсуждаемой реакции методом динамического рассеяния света проводили непосредственно в кювете прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

В экспериментах использовали дистиллированную и деионизованную воду. Удельное сопротивление деионизованной воды составляло  $>5$  МОм/см. Во всех экспериментах осуществляли контроль pH, предел погрешности pH-метра составлял  $\pm 0,1$  pH. Кинетические кривые построены по результатам пяти экспериментов, в качестве погрешности отложены стандартные ошибки среднего.

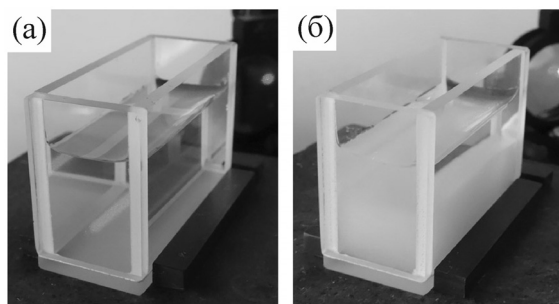
## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 4 показаны результаты экспериментов, в которых были зафиксированы изменения показателя преломления раствора альбумина после добавления пепсина. Из рисунка видно, что в первые 5–10 мин происходит резкий рост показателя преломления (кривые 1 и 2). Через 10 мин после добавления пепсина рост замедляется, причем скорость изменения показателя преломления практически одинакова как для раствора пепсина с альбумином в концентрации 2 мг/мл (кривая 2) и 4 мг/мл (кривая 1), так и отдельно для раствора пепсина (линия 3).

Известно, что оптимальная физиологическая кислотность для работы пепсина – pH 1,5–2,0. При pH  $\sim 7,0$  (в экспериментах без добавления HCl) и сохранении всех остальных па-



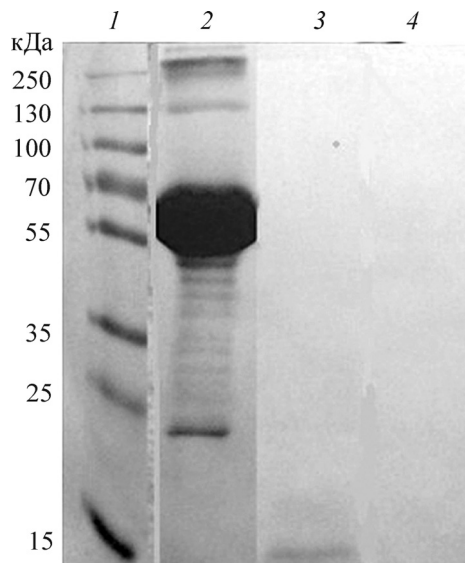
**Рис. 5.** Изменения показателя преломления в реакции гидролиза альбумина пепсином (2,2 мг/мл) с учетом автогидролиза пепсина: 1 – 4 мг/мл БСА + пепсин, рН 1,5; 2 – 2 мг/мл БСА + пепсин, рН 1,5.



**Рис. 6.** Добавление трихлоруксусной кислоты в кювету с БСА после 40-минутной обработки пепсином (а) и в кювету с БСА без добавления пепсина (б).

раметров (концентрация БСА – 4 мг/мл, пепсина – 2,2 мг/мл) реакция протеолиза практически не шла. Показатель преломления за один час изменился приблизительно на  $2 \cdot 10^{-6}$  (рис. 4, кривая 4).

Показатель преломления для раствора пепсина растет примерно на  $4 \cdot 10^{-6}$  за час (рис. 4, кривая 3). Это связано с автогидролизом пепсина [9]. Вычитая данные по автогидролизу пепсина (рис. 4, кривая 3) из данных по протеолизу БСА (рис. 4, кривые 1 и 2), получили кинетические кривые с учетом самогидролиза пепсина (рис. 5). При добавлении пепсина в раствор БСА с концентрацией 4 мг/мл показатель преломления раствора альбумина за 40 мин вырос на  $8 \cdot 10^{-6}$  (рис. 5, кривая 1). Показатель преломления раствора после добавления пепсина к раствору БСА с концентрацией 2 мг/мл увеличился на  $2 \cdot 10^{-6}$  (кривая 2). Характерно, что реакция выходит на плато через 30–40 мин для раствора БСА с концентрацией



**Рис. 7.** Электрофорез в полиакриламидном геле: 1 – маркеры, 2 – нативный БСА, 3 – через 1 мин после добавления пепсина, 4 – через 7 мин после добавления пепсина.

БСА 4 мг/мл и через 10–20 мин для раствора БСА с концентрацией 2 мг/мл.

Средняя температура раствора в опытной кювете для пяти экспериментов в каждом из режимов с рН 1,5 составляла  $24,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$ , для экспериментов с рН 7,0 –  $26,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . В течение часа после добавления пепсина к раствору БСА изменений рН выявлено не было.

После измерений показателя преломления для контроля протеазной активности пепсина в каждую из кювет добавляли ТХУ. Реакция протеолиза альбумина пепсином протекала до продуктов, не осаждающихся ТХУ (рис. 6а). Напротив, в контрольной кювете, где был только раствор БСА, после добавления ТХУ наблюдали выпадение осадка (рис. 6б).

Контроль ферментативной активности также проводили с помощью электрофореза продуктов протеолиза в полиакриламидном геле. Показано, что через одну минуту после добавления пепсина в растворе наблюдаются фрагменты размером ~15 кДа (рис. 7, дорожка 3). Линия пепсина на электрофореграммах не просматривается (рис. 7, дорожки 3 и 4). Скорее всего, это связано с малой концентрацией целых молекул пепсина в приобретенном ферментном препарате (около 5,1%). В то же время увеличение показателя преломления при автогидролизе пепсина (рис. 4, кривая 3), одновременно с сохранением его активности (нет выхода на плато кривых 1–4 на рис. 4), скорее всего обу-

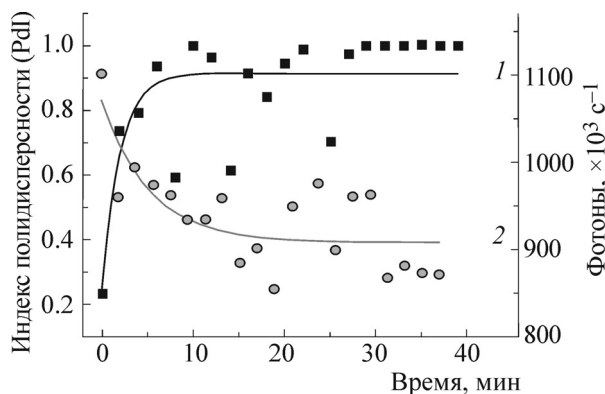
словлено большим количеством фрагментов пепсина в препарате (~95%).

Методом динамического рассеяния света в ходе реакции наблюдали изменения индекса полидисперсности и количества рассеянных фотонов (рис. 8) [10,11]. Рост индекса полидисперсности характеризует увеличение неоднородности частиц по размеру, а уменьшение количества рассеянных фотонов указывает на уменьшение размеров частиц в растворе. Большая величина полидисперсности при измерениях динамического рассеяния света не позволила вычислить размер частиц в растворе.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расщепление альбумина на мелкие пептиды <15 кДа подтверждается данными электрофореза (рис. 8) и реакцией осаждения в ТХУ (рис. 7). По результатам электрофореза также можно оценить время реакции в целом. Если через одну минуту наблюдаются фрагменты в 15 кДа, следовательно, за это время в среднем произошло не менее четырех актов гидролиза на одну молекулу БСА (масса БСА 66,5 кДа). Исходя из данных программы «Peptidemass» [10], после завершения протеолиза БСА пепсином образуется 89 пептидов размером от 1 до 23 аминокислотных остатков, со средней массой примерно 765 Да. Следовательно, при сохранении скорости протеолиза реакция должна идти примерно 20 мин. Оценка времени реакции по данным электрофореза близка ко времени, полученному в интерферометрическом исследовании (~30 мин), при котором показатель преломления раствора выходит на плато и в дальнейшем практические не меняется (рис. 5, кривая 1). Расхождение по времени может быть вызвано уменьшением скорости реакции в конечной стадии процесса, когда субстрата становится мало. Данные, полученные методом динамического светорассеяния, также указывают на то, что реакция длится около 30 мин (рис. 8).

Таким образом, надежно установлено, что во время реакции протеолиза БСА пепсином происходит увеличение показателя преломления, а время выхода показателя преломления на плато совпадает с оценками времени реакции, полученными в электрофорезе и в динамическом светорассеянии. Ранее в рефрактометрических исследованиях не наблюдали изменений в показателе преломления при протеолизе [11]. Видимо, это связано с тем, что экспериментаторы использовали рефрактометрические методы с низкой разрешающей способностью измерителей показателя преломления (~10<sup>-5</sup>).



**Рис. 8.** Результаты применения метода динамического светорассеяния: 1 – индекс полидисперсности, 2 – количество рассеянных фотонов в реакции протеолиза БСА пепсином.

Обнаруженный нами эффект увеличения показателя преломления в ходе протеолиза показывает, что существующие теоретические оценки показателя преломления растворов белков, которые основываются только на показателях преломления аминокислот, входящих в состав белка [2,12,13], не являются полными. В них не учитывается структура белка, не рассматривается вклад гидратных оболочек белков, не объясняются различия в инкременте *n* в различных растворителях [14]. Последнее существенно, поскольку есть данные о широком диапазоне изменений инкремента показателя преломления белка в разных растворителях. В работе [14] инкремент показателя преломления лизоцима изменялся в большом диапазоне: от 0,153 см<sup>3</sup>/г для Н<sub>2</sub>О до 0,272 см<sup>3</sup>/г в буфере (10 мМ NaSCN, 10 мМ HEPES), для большинства других буферов инкремент имел ожидаемую величину в области 0,18–0,19 см<sup>3</sup>/г [2]. Столь сильные изменения указывают на важность влияния ионного окружения на оптические свойства белка. Это позволяет использовать измерение *n* для исследования структуры белков в растворе, например, в ходе протеолиза. Существующие оценки показателя преломления растворов белков требуют внесения качественных изменений с учетом вышеупомянутых факторов.

Описанная методика демонстрирует возможность использования показателя преломления для изучения кинетики протеолиза. Для применения данной методики не требуется спектральных различий в компонентах реакции или использования красителей, а также забора проб в ходе реакции. Благодаря специально разработанному программному обеспечению для преобразования сдвигов интерференционной картины в показатель преломления, а также некоторым особенностям конструкции интерферо-

метра (применение фотодиодной линейки, двух кювет, использование платиновых термодатчиков, наличие термоизоляции, массивного основания, мешалок) экспериментальная установка обладает точностью измерения показателя преломления  $\sim 6 \cdot 10^{-7}$  при достаточно большом объеме кюветы и может быть использована для исследования процессов, незначительно меняющих показатель преломления растворов (порядка  $\sim 10^{-6}$ ).

Авторы выражают благодарность ООО «КД Системы и Оборудование» – официальному представителю Malvern Instruments Ltd в России – за оказанную поддержку в проведении исследований на приборе Zetasizer Nano ZS.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Zhao, P. H. Brown, M. T. Magone, et al., *J. Mol. Biol.* **411** (3), 680 (2011).
2. H. Zhao, P. H. Brown and P. Schuck, *Biophys. J.* **100** (9), 2309 (2011).
3. D. C. Yin, Y. Inatomi, H. M. Luo, et al., *Meas. Sci. Technol.* **19** (045303), 1 (2008).
4. E. Snell, J. Helliwell, T. Boggon, et al., *Acta Crystallogr. D* **52** (3), 529 (1996).
5. T. Cole, A. Kathman, S. Koszelak, et al., *Anal. Biochem.* **231** (1), 92 (1995).
6. D. J. Bornhop, J. C. Latham, A. Kussrow, et al., *Science* **317** 1732 (2007).
7. S. T. Jepsen, T. M. Jørgensen, W. Zong, et al., *Analyst* **1** (2012).
8. В. Н. Бинги и Р. М. Саримов, *Биофизика* **59** (4), 629 (2014).
9. V. N. Ingram, *Nature* **4237** 83 (1951).
10. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)
11. R. Barer and S. Joseph, *Q. J. Microsc. Sci.* **95** (4), 399 (1954).
12. T. L. McMeekin, M. Wilensky, and M. L. Groves, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7** (2), 151 (1962).
13. T. L. McMeekin, M. L. Groves, and N. J. Hipp, in *Amino Acids and Serum Proteins*, Ed. by J. Stekol (American Chemical Society, Washington DC, 1964).
14. V. Ball and J. J. Ramsden, *Biopolymers* **46** (7), 489 (1998).

## Changes in the Refractive Index of Solution during Proteolysis of Bovine Serum Albumin by Pepsin

R.M. Sarimov, T.A. Matveyeva, A.L. Vasin, and V.N. Binhi

*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

The protein refractive index increment per  $8 \cdot 10^{-6}$  was observed during proteolysis of BSA (4 mg/ml) by pepsin (2 mg/ml). It was previously believed that the refractive index of a protein solution depends only on protein concentration and amino acid composition and it remains unchanged during protein hydrolysis. The increase in the refractive index in proteolysis of the protein solution was detected using the original laser interferometer with enhanced sensitivity. The interferometer provides the possibility of measuring the difference between the refractive indices of solutions in two cells with an accuracy of about  $\sim 6 \cdot 10^{-7}$ .

*Key words: laser interferometry, enzymatic proteolysis, refractometry*