

УДК 577.112.5

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ПРОИЗВОДНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

© 2023 г. А. Ю. Лянгузов^{1, *}, Н. М. Малыгина^{1, 2}, А. М. Иванов², Т. А. Петрова¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*e-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

На примере растворов бычьего сывороточного альбумина и кислородпереносящих белков гемоцианина *Achatina fulica* и гемоглобина быка исследованы особенности применения производной УФ-спектрофотометрии в качестве неразрушающего экспресс-метода при выполнении сравнительного анализа препаратов нативных белков. Установлено, что четвертые производные спектров поглощения белков, позволяющие выделить отдельные полосы ароматических аминокислот, оптимальны для решения практических задач. Экспериментально подобран алгоритм расчета четвертых производных. Для подтверждения работоспособности метода выполнена реконструкция четвертых производных спектров нативных белков путем комбинации четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот в зоне 240–300 нм. Для наглядной демонстрации индивидуальных различий белков предложено использовать коэффициент корреляции четвертых производных спектров в диапазоне 240–300 нм или в области поглощения тирозина и триптофана. Несмотря на то, что в результате нельзя дать точную количественную характеристику содержания отдельных ароматических аминокислот в составе белка, можно сравнивать белки друг с другом. Предложенный подход позволяет представить индивидуальный спектральный “портрет” белка, отличающий его от других белков, который затем можно использовать как стандарт при экспериментальной работе с ним.

Ключевые слова: спектры поглощения белков, производная УФ-спектрофотометрия, бычий сывороточный альбумин, гемоглобин, гемоцианин, фенилаланин, тирозин, триптофан, сравнительный анализ белков

DOI: 10.31857/S0555109923040086, **EDN:** QZJQRP

Необходимость выполнения сравнительного анализа белков возникает регулярно при решении разного рода задач: оценка чистоты препаратов белков в ходе их выделения и очистки, выявление различий в близкородственных белках, поиск структурных аналогов белков и их фрагментов, изучение влияния различных факторов на изменение структуры белков и так далее. Сегодня аналитическая биохимия и молекулярная биология располагают широким арсеналом методов для решения этих проблем. Однако оптимальный выбор заключается в том числе и в необходимости использования неразрушающих методов анализа с сохранением нативной структуры белка, и в учете материальных и временных затрат на выполнение исследований.

Цель работы – разработка быстрого неразрушающего способа сравнительного анализа белков методами производной УФ-спектрофотометрии.

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Sigma-Aldrich”, США), гемоглобин быка с содержанием железа не менее 0.34% (“Reanal”, Венгрия) и гемоцианин из гемолимфы брюхоногого моллюска *Achatina fulica*. Моллюски были любезно предоставлены сотрудниками Ленинградского зоопарка.

Препарат гемоцианина получали методом центрифужной ультрафильтрации плазмы гемолимфы с использованием концентраторов Vivaspin 6 с номинальным порогом отсека 300 кДа (“Sartorius Stedim”, Германия). Дополнительно образец белка дважды промывали деионизированной водой и разводили до объема исходной аликвоты плазмы гемолимфы [1].

Спектральные характеристики растворов белков исследовали в УФ-диапазоне 240–300 нм. Стандартами служили растворы ароматических аминокислот: триптофана (Трп), тирозина (Тир) (“Pan-

reac AppliChem”, США) и фенилаланина (Фен) (“Sigma-Aldrich”, США), все аминокислоты с чистотой выше 99.4%.

Для выполнения экспериментов использовали лабораторную модель спектрофотометра Perkin-Elmer Lambda 35 (США) и программу управления прибором UV WinLab Software 6.0.4 в режиме Scan. Запись исходных спектров производили при установке следующих параметров сканирования: ширина щели 1 нм, скорость сканирования 60 нм/мин, шаг спектра 1 нм. В работе использовали кварцевые кюветы объемом 4 мл с толщиной оптического слоя 1 см.

Концентрации белков подбирались таким образом, чтобы поглощение растворов при 280 нм попадало в диапазон 1.0–1.5 оптических единиц. Концентрации аминокислот подбирали с учетом молярных коэффициентов поглощения. В среднем поглощение аминокислот с учетом максимумов их поглощения находилось в области 0.5 оптических единиц. Все растворы готовили на деионизированной воде.

Сравнительный анализ белков проводили методами производной УФ-спектрофотометрии. Четвертые производные спектров поглощения белков рассчитывали методом численного дифференцирования. Для сравнения четвертых производных использовали коэффициент корреляции.

Для анализа экспериментальных данных и графического представления результатов применяли функции и скрипты библиотеки открытого языка программирования R [2], а также скрипты авторской разработки.

При обработке экспериментальных данных для сглаживания шумов предварительно использовали функцию “spline” языка R, которая увеличивала количество точек в спектре не менее чем в пять раз:

$$ss = \text{spline}(x, y, n = N \times \text{length}(x)),$$

где x — значения длин волн в исходном спектре, y — измеренные значения поглощения, N — кратность увеличения числа точек в спектре.

Далее вычисляли четвертую производную спектра по скользящей центральной пятичленной формуле [3]:

$$y_i^{(4)} = (y_{i-2st} - 4y_{i-st} + 6y_i - 4y_{i+st} + y_{i+2st}) / (h^4),$$

где i — номер точки числового ряда, st — расстояние между узлами дифференцирования, которое выбиралось нами таким образом, что $h = st/N = 2$ нм.

Таким образом, основными этапами выполнения анализа явились: запись спектров поглощения в области 240–300 нм, сглаживание паразитных шумов с использованием функции “spline”, расчет четвертых производных спектров методом численного дифференцирования, расчет коэффициентов корреляции четвертых производных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методы, основанные на спектрофотометрии, позволяют быстро, недорого и, главное, неразрушающим способом изучать растворы нативных белков, а также при необходимости оценивать влияние различных факторов на изменение их структуры.

В настоящей работе выбор белков для сравнительного анализа продиктован следующими соображениями. БСА является “золотым стандартом” в биохимических исследованиях. Гемоцианин ахатины — функциональный аналог гемоглобина, транспортирующего кислород. БСА — простой белок, гемоглобин и гемоцианин — сложные. У гемоглобина протетической группой служит гем — комплекс протопорфирина IX с железом, а у гемоцианина — ионы меди, координированные на имидазолах остатков Гис. Молекула гемоглобина содержит четыре гема, тогда как молекула гемоцианина — несколько сотен ионов меди, попарно формирующих многочисленные центры связывания кислорода [4, 5]. Молекулярная масса БСА составляет 66 кДа [6], гемоглобина — 64.5 кДа [7], а гемоцианина брюхоногих — около 9000 кДа, и это один из самых высокомолекулярных белков, известных в природе [8]. В молекуле БСА одна полипептидная цепь, гемоглобина — четыре, а в молекуле гемоцианина их десятки, сгруппированные по восемь в составе субъединиц, объединенных в дидекамеры [9]. Все три белка количественно доминируют *in situ*: доля БСА составляет порядка 60% общего белка плазмы крови [6], гемоглобина — 90% общего белка эритроцитов [10], а у брюхоногих моллюсков гемоцианином представлено не менее 90% белка плазмы гемолимфы [11].

Спектры поглощения трех белков были проанализированы нами в УФ-диапазоне длин волн. В качестве примера на рис. 1 приведены спектр поглощения БСА и его четвертая производная.

Поглощение света в УФ-зоне обусловлено наличием в составе белков ароматических аминокислот Фен, Тир и Трп с индивидуальными максимумами поглощения при длинах волн 257, 274 и 280 нм, соответственно [12]. На исходных спектрах белков полосы Тир и Трп частично перекрываются, а Фен почти незаметен из-за низкого значения молярного коэффициента его поглощения. В результате наблюдается лишь суммарный широкий размытый пик, поэтому спектры практически любых растворимых белков в области 240–300 нм очень похожи друг на друга, несмотря на различия в аминокислотном составе.

Обычно при проведении спектрального анализа для удаления паразитных шумов используют метод накопления спектров — последовательную многократную запись спектров одного образца в одинаковых условиях. Мы пошли другим путем, используя для обработки спектральных данных

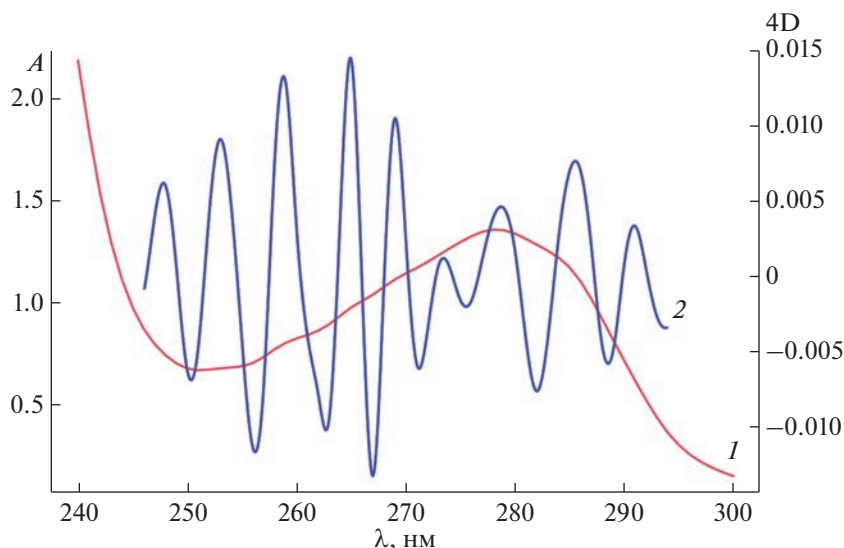


Рис. 1. Спектр поглощения БСА в УФ-диапазоне (1) и его четвертая производная (2).

математическую опцию “spline”, применяемую для сглаживания экспериментальных кривых, которые невозможно описать какой-либо одной определенной математической функцией. Необходимо заметить, что “spline” используется исключительно для сглаживания кривых, никак не повышая разрешающую способность самого экспериментального метода: действительно, эта опция работает так, что сначала увеличивается число точек, описывающих кривую, причем кратность увеличения числа точек подбирается экспериментально. Нами были просмотрены разные варианты, оптимальным оказался вариант с кратностью увеличения числа точек $N \geq 5$. Коэффициент N также включен в формулу численного дифференцирования, которая затем была использована нами при расчете четвертых производных спектров.

Операции “spline” вместо многократной циклической записи накопления спектров оказалось достаточно для решения наших задач. Кроме того, поскольку мы имеем дело с нативными белками, то фактор времени выполнения анализа весьма существен, особенно при работе с термолabile белками.

Методы производной УФ-спектрофотометрии позволяют выделить отдельные полосы хромофоров в исходных спектрах [13]. Выбор четвертой производной оптимален для решения практических задач: в спектре выделяются полосы слагающих его компонентов, максимумы четвертых производных соответствуют максимумам полос самих спектров, причем содержание хромофоров отражается на интенсивности полос четвертых производных, и такие картины более информативны с точки зрения выявления индивидуальных характеристик исследуемых соединений. Несмотря на широкое

использование спектрофотометрии в белковой химии, в доступной нам литературе мы нашли лишь несколько работ, где для исследования белков применялась именно производная спектрофотометрия, причем авторы ограничивались расчетами только вторых производных, сообщая, что использование четвертых производных было бы более эффективным [14, 15].

Конечные результаты численного дифференцирования зависят от величины параметров, включенных в формулы расчетов, и на это требуется обратить особое внимание.

Для вычисления четвертых производных применяли симметричную скользящую пятичленную формулу с экспериментально подобранным нами шагом $st = 2N$, где коэффициент N равен кратности увеличения числа точек спектра. Такой комбинированный подход использования опции “spline” с последующим вычислением четвертой производной позволил оценить положение отдельных ароматических аминокислот в суммарном спектре белка (рис. 1, 2). Следует заметить, что специфика использования скользящей формулы приводила к тому, что значения производной определялись за исключением $2st$ первых и последних членов числового ряда, т.е. производная вычислялась в диапазоне 244–296 нм.

На графике четвертой производной спектра поглощения БСА в зоне 246–273 нм наблюдается четко выраженная “гребенка” из пяти полос, обусловленная наличием в структуре белка Фен, а в области 278–293 нм расположены частично перекрывающиеся полосы Тир и Трп (рис. 1, 2).

Соотношения содержания ароматических аминокислот у разных белков различны. Из базы данных UniProt [16] известно, что в полипептидную цепь

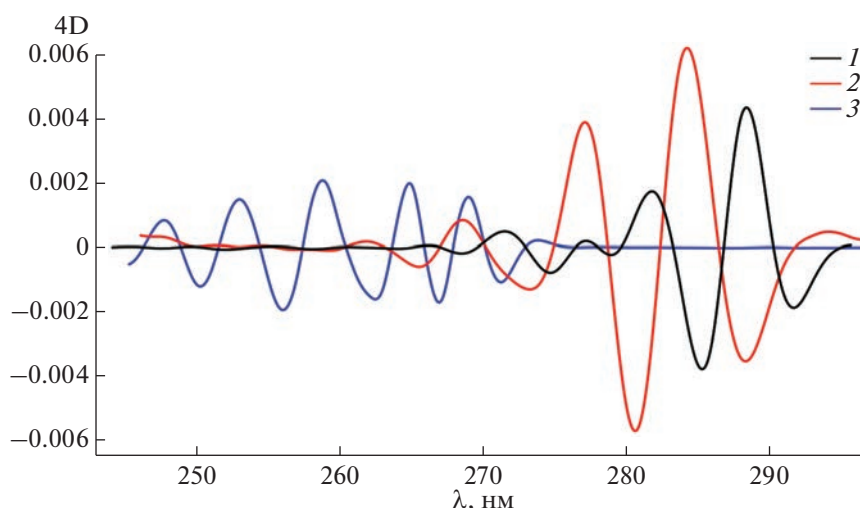


Рис. 2. Четвертые производные спектров поглощения 1 мМ растворов свободных ароматических аминокислот Фен (3), Тир (2), Трп (1) с масштабированием под аминокислотный состав БСА.

зрелой молекулы БСА включены 27 остатков Фен, 20 Тир и 2 Трп. Мы рассчитали четвертые производные спектров поглощения 1 мМ растворов свободных ароматических аминокислот и масштабировали их под аминокислотный состав БСА (рис. 2).

Несмотря на то, что коэффициент молярного поглощения Фен примерно на порядок меньше аналогичных коэффициентов Тир и Трп [12], на четвертых производных спектров Фен идентифицируется отчетливо, поскольку его полосы расположены в более коротковолновой области и практически не перекрываются с частично слившимися полосами Тир и Трп. Кроме того, Фен у большинства белков доминирует количественно [16], что позволяет уверенно констатировать его наличие.

Идея следующего раздела работы заключалась в том, чтобы совместить четвертые производные спектров поглощения нативных белков с комбинацией четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот, то есть искусственно реконструировать картины, полученные в реальных экспериментах, и тем самым под-

твердить работоспособность методов производной УФ-спектрофотометрии. Модельный спектр конструировали из суммы четвертых производных отдельных спектров ароматических аминокислот, взятых в необходимой пропорции.

Исследование показало, что предложенная процедура сравнения требует небольшой корректировки позиционирования четвертых производных спектров аминокислот на шкале длин волн (рис. 3, табл. 1). Спектральные характеристики свободных аминокислот и аминокислот в составе белков немного различаются в силу особенностей структуры белковой глобулы. Кроме того, на спектральный профиль белка может влиять наличие простетической группы. Однако в результате показано хорошее совпадение четвертых производных спектров поглощения нативных белков и их соответствующих реконструкций. Коэффициенты корреляции составили 0.992 для БСА, 0.986 для гемоцианина и 0.909 для гемоглобина, а интенсивность полос ароматических аминокислот в целом отражала количественное их содержание. При этом надо отчетливо понимать, что определение

Таблица 1. Корректировка позиционирования четвертых производных спектров поглощения свободных ароматических аминокислот на шкале длин волн относительно четвертых производных спектров исследованных белков

Белок	Корректировка положения четвертых производных спектров аминокислот на шкале длин волн, нм		
	Фен	Тир	Трп
БСА	1.18	2.24	3.59
Гемоцианин	1.24	2.65	2.59
Гемоглобин	1.00	-0.18	1.82

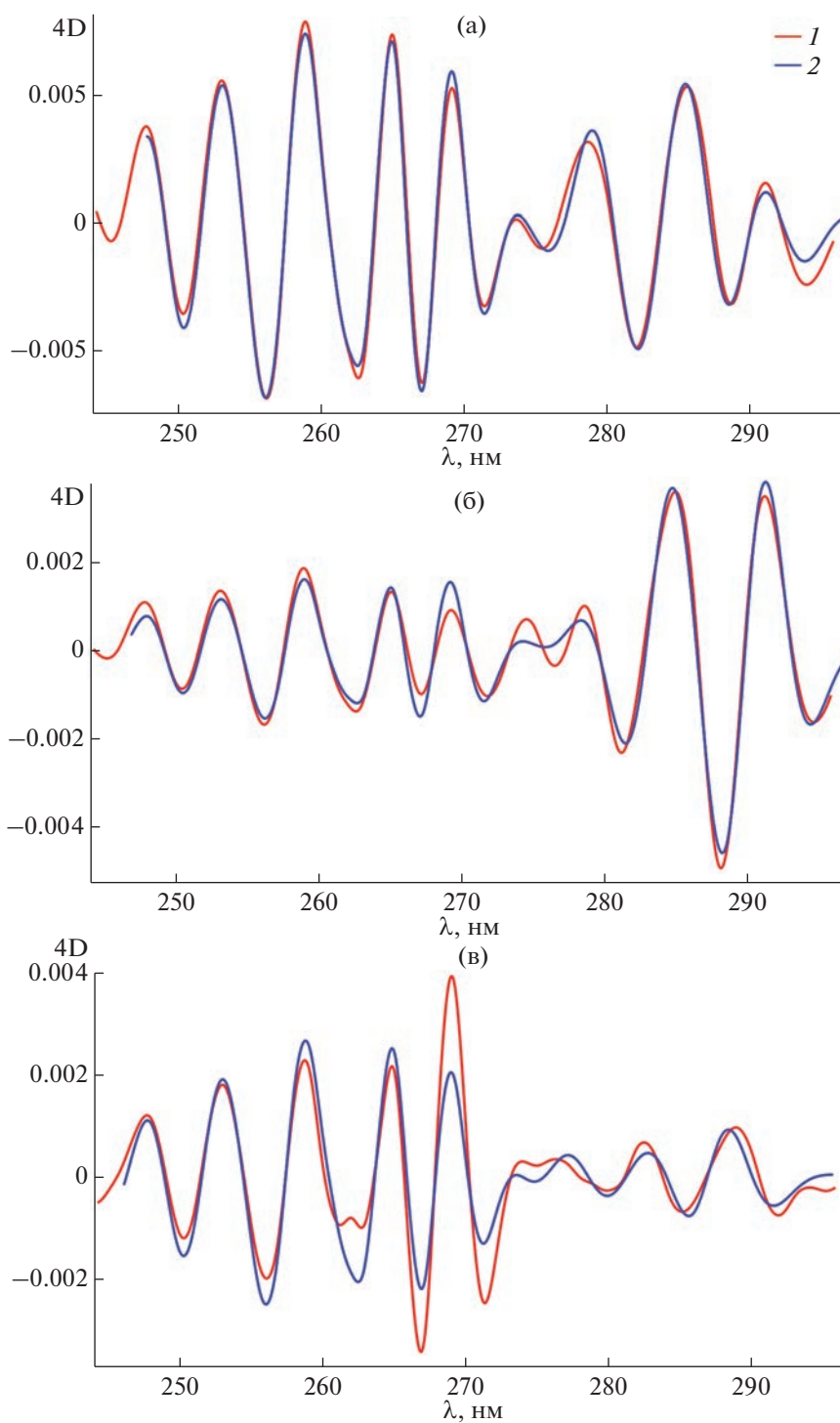


Рис. 3. Сравнение четвертых производных спектров поглощения белков: БСА (а), гемоцианина ахатины (б) и гемоглобина быка (в), и комбинаций четвертых производных спектров свободных ароматических аминокислот. 1 – Четвертая производная спектра поглощения белка, 2 – комбинация четвертых производных спектров ароматических аминокислот.

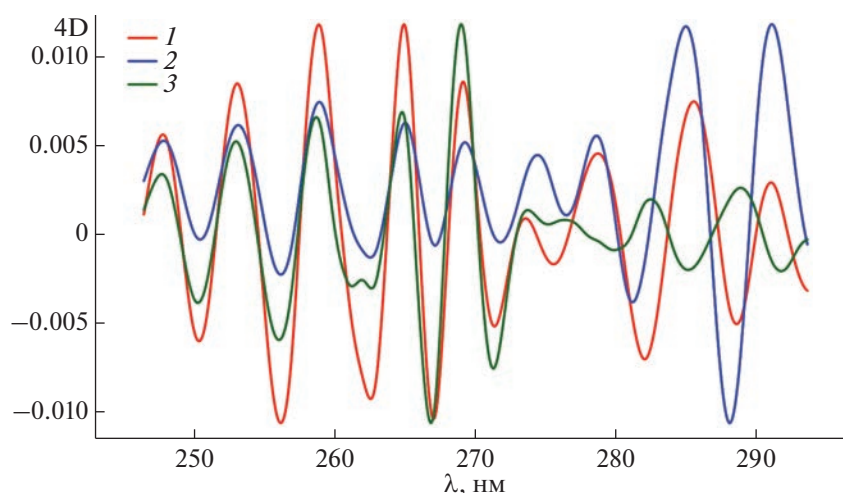


Рис. 4. Сравнение четвертых производных спектров поглощения БСА (1), гемоцианина ахатины (2) и гемоглобина быка (3).

точного аминокислотного состава белков по спектральным данным технически невозможно.

Далее мы попарно сравнили четвертые производные спектров поглощения БСА, гемоцианина и гемоглобина, оценив коэффициенты корреляции для каждой пары белков (рис. 4, табл. 2). Такое сравнение обнаружило существенные расхождения спектральных характеристик всех трех белков в широкой УФ-зоне 240–300 нм. В подвижной частично слившейся зоне поглощения Тир и Трп различия также хорошо заметны. В то же время область поглощения Фен более стабильна, и коэффициент корреляции здесь выше.

Таким образом, нами разработан быстрый неразрушающий способ сравнительного анализа белков методами производной УФ-спектрофотометрии. Экспериментально подобран алгоритм расчетов четвертых производных спектров поглощения белков. На примере растворов БСА, гемоцианина ахатины и гемоглобина быка показана эффективность применения производной УФ-спектрофотометрии при выполнении сравнительного анализа

препаратов нативных белков. Для подтверждения работоспособности метода выполнена реконструкция четвертых производных спектров белков путем комбинации четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот в зоне 240–300 нм. Для наглядной демонстрации различий предложено использовать коэффициент корреляции четвертых производных спектров белков в диапазоне 240–300 нм или в области перекрывания полос поглощения Тир и Трп. Несмотря на то, что в результате нельзя дать точную количественную характеристику содержания отдельных ароматических аминокислот в составе белка, можно сравнивать белки друг с другом, что отвечает поставленной задаче.

Предложенный подход позволяет представить индивидуальный спектральный “портрет” белка, отличающий его от других белков, который затем можно использовать как стандарт при экспериментальной работе с ним.

Таблица 2. Попарное сравнение четвертых производных спектров поглощения БСА, гемоцианина ахатины и гемоглобина быка в разных участках УФ-диапазона

Сравниваемые белки	Диапазоны длин волн, нм		
	246–293 (Фен–Тир–Трп)	246–273 (Фен)	278–293 (Тир–Трп)
	коэффициенты корреляции, r		
БСА/гемоцианин	0.64	0.98	0.61
Гемоцианин/гемоглобин	0.20	0.82	–0.73
Гемоглобин/БСА	0.67	0.87	–0.69

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра “Обсерватория экологической безопасности” Научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrova T.A., Lyanguzov A.Yu., Malygina N.M. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2016. V. 52. P. 37–45.
2. R Project. Reference date: 21.06.2022. <http://cran.r-project.org>
3. Mathews J.H. // Int. J. Math. Educ. Sci. Technol. 2003. V. 34. P. 280–287.
4. Decker H., Hellmann N., Jaenicke E., Lieb B., Meissner U., Markl J. // Integr. Comp. Biol. 2007. V. 47. P. 631–644.
5. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th Edition, N.Y., W.H. Freeman and Company, 2017. 3270 p.
6. Peters T. Jr. All about Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press. 1995. 432 p.
7. EL-Sharif H.F., Aizawa H., Reddy S.M. // Sens. Actuators, B. 2015. V. 206. P. 239–245.
8. van Holde K.E., Miller K.I., Decker H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 15563–15566.
9. Markl J. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 1840–1852.
10. Blanc L., Papoin J., Debnath G., Vidal M., Amson R., Telerman A., An X., Mohandas N. // Am. J. Hematol. 2015. V. 90. P. 235–241.
11. Fox D.L. Biochromy of the Mollusca. in The Mollusca. V. 2. Environmental Biochemistry and Physiology / Ed. Hochachka P.W. N.Y., Academic Press, 1983. 362 p.
12. Boysen R.I., Hearn M.T.W. // Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. V. 5. Analysis and Function of Amino Acids and Peptides. / Ed. by B. Hughes A.B., Weinheim, Wiley-VCH, 2012. 508 p.
13. Talsky G. Derivative spectrophotometry / Ed. T. Magner. Weinheim, Wiley, John & Sons, 1994. 228 p.
14. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. // J. Appl. Spectrosc. 2014. V. 80. P. 899–904.
15. Ojeda C.B., Rojas F.S. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009–2011: a review // Microchem. J. 2013. V. 106. P. 1–16.
16. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2021 // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. D480–D489.

On Particular Regimens of Derivative UV-spectrophotometry for Comparative Analysis of Proteins

A. Y. Lianguzov^{a, *}, N. M. Malygina^{a, b}, A. M. Ivanov^b, and T. A. Petrova^a

^aSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^bKirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

*e-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Bovine serum albumin and two oxygen transport proteins, hemocyanin from the snail *Achatina fulica* and bovine hemoglobin, were used to define what regimens of derivative UV-spectrophotometry are most appropriate for using it as an express technique for nondestructive comparative analysis of native proteins preparations. It was found that the fourth derivatives of proteins absorption spectra make it possible to detect the individual bands of aromatic amino acids in a way optimal for solving certain practical problems. An algorithm for calculating the fourth derivatives was selected experimentally. To verify the approach, the fourth derivatives of the native proteins spectra were reconstructed by combining those of individual aromatic amino acids spectra in the range of 240–300 nm. To demonstrate the individual differences between proteins, it is proposed to use the correlation coefficients of the fourth derivatives of spectra in the range of 240–300 nm or in the wavelength range of tyrosine and tryptophan. Although this approach does not provide for estimating the exact contents of individual aromatic amino acids in proteins, it allows comparing different proteins between each other. The proposed approach makes it possible to obtain an individual spectral “portrait” of a protein, which distinguishes it from other proteins and is useful as a reference for further experimental work with it.

Keywords: proteins absorption spectra, derivative UV-spectrophotometry, bovine serum albumin, hemoglobin, hemocyanin, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, proteins comparative analysis