

УДК 536.629

© Г. В. Котельников, С. П. Моисеева

МОДУЛЯЦИОННЫЙ НАНОКАЛОРИМЕТР В ИССЛЕДОВАНИЯХ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Сделан экспериментальный образец модуляционного нанокалориметра. Прибор имеет следующие характеристики: чувствительность 50 нВт, стабильность базовой линии 50 нВт в течение 3–5 ч, быстродействие 60 с. Нанокалориметр выполняет прецизионные измерения тепловой мощности в разбавленных растворах белков в модуляционном режиме StepScan, основанном на последовательности коротких интервалов нагрева (охлаждения) и изотермических интервалов в заданном диапазоне температур. Приведенная функциональная схема калориметра дополнена экспериментальной оценкой величины температурных перепадов по длине калориметрической камеры при нагреве ее со скоростью 0.2 К/мин. Оценка сделана по данным плавления температурного репера в калориметрической камере. В качестве репера использован 1 мг галлия. Показано, что разность между температурой верхней и нижней частей камер не превышает 0.02 К. Таким образом, экспериментально подтверждено, что используемая система нагрева калориметрических камер обеспечивает их равномерный нагрев по всей длине, поскольку полученный температурный перепад меньше абсолютной погрешности измерения на калориметре температуры образца. Все современные сканирующие микрокалориметры ведущих зарубежных фирм уступают разработанному калориметру, т. к. не обеспечивают работу в модуляционном режиме. Калориметр является компьютеризированным прибором. Для него разработано ПО, обеспечивающее работу калориметра и расчет полного теплового потока, а также кинетической и реверсивной частей полного теплового потока, что подтверждено экспериментальными данными. Выполнено исследование термической денатурации овальбумина и лизоцима. Показано, что модуляционная нанокалориметрия позволяет качественно разграничить различные механизмы термической денатурации белка.

Кл. сл.: тепловая денатурация, кинетика, модуляционная дифференциальная сканирующая нанокалориметрия, капиллярные калориметрические камеры, модуляция StepScan

ВВЕДЕНИЕ

Впервые в мировой практике в ИБП РАН в процессе выполнения исследований "Изучение физических механизмов инактивации ферментов и белков медицинского назначения методом дифференциальной сканирующей модуляционной нанокалориметрии" (грант РФФИ 10-08-00063-а) создан модуляционный нанокалориметр, который обеспечивает измерения кинетических параметров в одном эксперименте по сравнению с измерениями известными методами (круговой дихроизм, оценка убыли содержания мономерной формы белка после охлаждения системы, т. е. не в процессе термической денатурации белка), требующими большого числа экспериментов. Этот прибор позволяет разграничить механизмы термической денатурации белка на примере денатурации лизоцима, где нет кинетического процесса, и денатурации овальбумина, где, напротив, обнаружен только кинетический процесс. Эти качественно новые возможности прибора открывают перспективы применения данного прибора при изучении конформационной энергетики белков [1–3]. Указан-

ные работы в ИБП РАН базируются на ранее созданном в нашей организации первом отечественном капиллярном адиабатном микрокалориметре ДАСМ-1 и выполненных на нем исследованиях [4–6]. Развитие модуляционной калориметрии, отраженное в работах [7–9], показало целесообразность создания модуляционного нанокалориметра для изучения слабых тепловых эффектов в разбавленных растворах белков.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОСТРОЕНИЯ МОДУЛЯЦИОННОГО НАНОКАЛОРИМЕТРА

На рис. 1 представлена функциональная схема модуляционного нанокалориметра, имеющего рабочую 1 и эталонную 2 калориметрические камеры в виде прямых капиллярных трубок с внутренним диаметром 2 мм. Полный объем калориметрической камеры равен 268 мкл, рабочий объем — 156 мкл. Рабочим объемом калориметрических камер является объем части трубок, расположенной между дном камер и границей контакта с пассивным тепловым шунтом 3. Длина капилляров

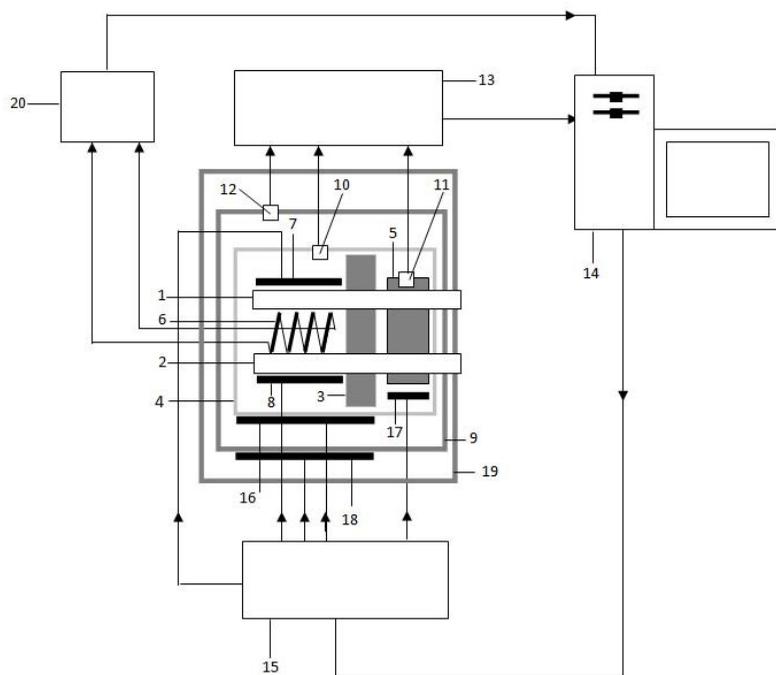


Рис. 1. Функциональная схема модуляционного нанокалориметра.

1, 2 — эталонная и калориметрическая камеры; 3 — пассивный тепловой шунт; 4 — первый экран, в который заключены калориметрические камеры; 5 — активный тепловой шунт; 6 — измерительная термобатарея; 7 и 8 — нагревательные элементы; 9 — второй экран; 10, 11, 12 — датчики температуры; 13 — многоканальный измерительный усилитель; 14 — компьютер; 15 — блок усилителей мощности; 16, 17, 18 — нагреватели; 19 — зона охлаждения; 20 — нановольтметр

рабочего объема камер равна 50 мм. Калориметрические камеры заключены в первый экран 4. На выводных концах капилляров калориметрических камер установлен активный тепловой шунт 5, который исключает теплообмен калориметрических камер и пассивного теплового шунта с внешней средой через выводную часть капиллярных трубок. Калориметрические камеры снабжены измерительной термобатареей 6 и нагревательными элементами 7 и 8. Данные камеры, заключенные в первый экран 4, установлены во второй экран 9. На первом экране установлен датчик температуры 10, а на активном шунте — датчик температуры 11, на втором экране — датчик температуры 12. Датчики температуры 10, 11 и 12 подсоединены через многоканальный измерительный усилитель 13 к компьютеру 14 с многоканальным АЦП и модулем РС-ТЮ-10, содержащим таймеры. Управляющие выходы компьютера 14 связаны с блоком усилителей мощности 15, соединенным с нагревателем 16 первого экрана, нагревателем 17 активного шунта и нагревателем 18 второго экрана, который размещен в экране охлаждения 19. Калориметр снабжен измерителем мощности тепловых процессов, состоящим из термобатареи 6, связанной своим выходом со входом нановольтметра 20, который через интерфейс RS-232 подключен к компьютеру 14. Нагревательные элементы 7 и 8 камер подключены к блоку усилителей мощности 15. Описание работы модуляционного нанокалориметра полно представлено в работах [3, 8].

В данном приборе реализован режим StepScan-модуляции. Температурная модуляция StepScan основана на последовательности коротких интервалов нагрева и изотермических интервалов в заданном интервале температур. Основное уравнение метода StepScan имеет вид:

$$\text{Тепловой поток } P = C_p(dT/dt) + f(T,t),$$

где C_p — теплоемкость образца, dT/dt — скорость нагрева, $f(T,t)$ — кинетическая составляющая теплового процесса. Использование синусоидального сигнала в модуляции менее предпочтительно вследствие того, что $C_p(dT/dt)$ в этом режиме постоянно изменяется, в то время как в StepScan-методе данная составляющая имеет фиксированное значение. Таким образом, StepScan-метод обеспечивает быстрый и понятный результат измерений [10].

В дополнение к теоретическому обоснованию способа линейного нагрева и линейного охлаждения калориметрических камер [2] выполнена экспериментальная оценка температурных перепадов по длине калориметрической камеры при ее нагреве со скоростью 0.2 К/мин по плавлению температурного репера (галлий 1 мг, 29.9 °С) в калориметрических камерах. Пики плавления репера при размещении его на дне камеры, а также в верхней части камеры зарегистрированы модуляционным нанокалориметром при температуре 29.9 °С. Таким образом, температурный перепад по длине камер не превышает 0.1 К, что согласуется с теоретической оценкой, согласно которой

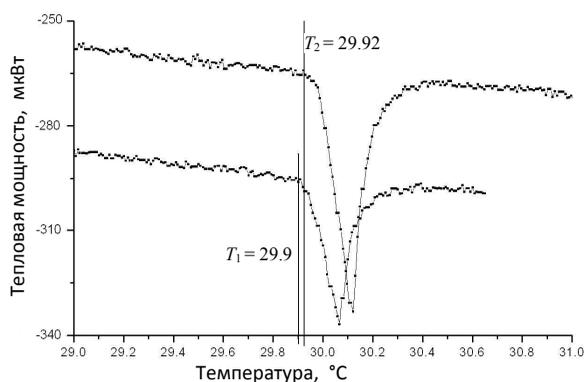


Рис. 2. Термограмма плавления в калориметрических камерах температурного репера (галлий 1 мг, 29.9 °C) на скорости 0.2 К/мин

величина перепада составляет 0.033 К при скорости 0.2 К/мин [2].

Результаты экспериментальной оценки перепада температур представлены на рис. 2. Шкала температур на рисунке взята для узкого диапазона температур, что позволяет оценить разность между температурой верхней и нижней частей камер порядка 0.02 К. Таким образом, экспериментально подтверждено, что используемая система нагрева калориметрических камер обеспечивает их равномерный нагрев по всей длине, поскольку полученный температурный перепад меньше абсолютной погрешности измерения на калориметре температуры образца.

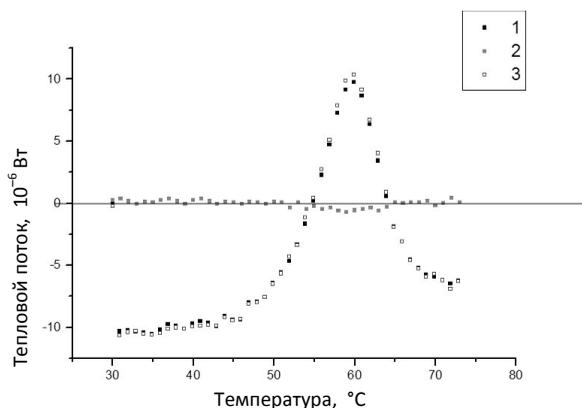


Рис. 4. Тепловая денатурация лизоцима в модуляционном режиме StepScan. 1 — P , 2 — $f(T,t)$, 3 — $C_p(dT/dt)$ для исследуемого процесса

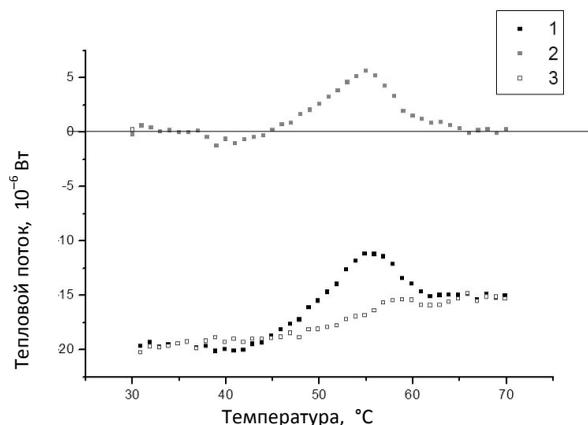


Рис. 3. Тепловая денатурация овальбумина в модуляционном режиме StepScan. 1 — P , 2 — $f(T,t)$, 3 — $C_p(dT/dt)$ для исследуемого процесса

Режим StepScan модуляции в модуляционном нанокалориметре осуществляется путем изменения температуры первого экрана по требуемому закону и повторения данного закона изменения температуры вторым экраном. При этом закон изменения температуры в первом экране воспроизводится в золотых калориметрических камерах, соединение которых с первым экраном выполнено с высокой теплопередачей [2]. Модуляционный нанокалориметр является компьютеризированным прибором. Для него разработано ПО, обеспечивающее работу калориметра в полном объеме требований и расчет полного теплового потока, а также кинетической и реверсивной частей полного теплового потока. В экспериментальном образце модуляционного нанокалориметра обеспечено следующее:

- режим работ изотермический;
- линейный нагрев со скоростью до 0.5 К/мин;
- линейное охлаждение со скоростью до 0.5 К/мин;
- StepScan;
- измерительный объем калориметрических камер 156 мкл;
- калориметрические камеры выполнены из золота;
- диапазон сканирования по температуре от 20 до 70 °C;
- чувствительность 50 нВт.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Проведенные экспериментальные исследования на модуляционном нанокалориметре тепловой денатурации овальбумина показали, что в области

конформационного перехода на термограмме регистрируется только пик кинетического процесса, пик изменения теплоемкости отсутствует (рис. 3). Это обстоятельство принципиально отличает наш модуляционный нанокалориметр от сканирующих калориметров без модуляции, на которых пик кинетического процесса ошибочно регистрируется как тепловой процесс изменения теплоемкости образца. При этом тепловая денатурация лизоцима регистрируется только в виде пика изменения теплоемкости образца (рис. 4), что соответствует литературным данным [11]. Исследуемые образцы овальбумина и лизоцима были подготовлены по методикам, изложенным в [12] и [13] соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные экспериментальные исследования на модуляционном нанокалориметре ингибитора трипсина Кунитца [1], овальбумина и лизоцима показали, что этот прибор позволяет экспериментально разделять механизмы денатурации белков: термодинамический, кинетический и смешанный по данным одного эксперимента. На базе созданного экспериментального прибора может быть разработан конкурентоспособный прибор, важнейшие технические решения которого могут быть запатентованы.

Авторы благодарят Н.В. Гринберг и В.Я. Гринберга за предоставленные исследовательские образцы белков.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ 10-08-00063-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotelnikov G.V., Moiseeva S.P., Burova T.V. et al. High-sensitivity modulation differential scanning calorimetry of protein denaturation. Part 1 Two-state kinetics of thermal denaturation of Kunitz soybean trypsin inhibitor // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2013. Vol. 114. P. 531–536.
2. Kotelnikov G.V., Moiseeva S.P., Mezhiburd E.V. Mod-

- ulated capillary titration calorimeter: Theoretical and experimental studies // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2008. Vol. 92. P. 631–634.
3. Патент РФ № 2347201, 20.02.2009.
4. Патент США N 4112734, 12.09.1978.
5. Кунтер А.И., Котельников Г.В., Эскин В.Е. Метод определения теплоемкости макромолекул в растворе // Высокомолекулярные соединения. 1976. Т. XVIII, № 5. С. 1173–1175.
6. Привалов П.Л., Макурин П.С., Котельников Г.В. и др. Дифференциальный адиабатический сканирующий микрокалориметр ДАСМ-1 // IV Международный биофизический конгресс, секция XVI–XXV: Тезисы секционных докладов 7–14.08.1972. С. 320–321.
7. Патент США N 5224775, 06.07.1993.
8. Котельников Г.В., Моисеева С.П., Гринберг В.Я., Хохлов А.Р. Модуляционный капиллярный дифференциальный титрационный калориметр // Приборы. 2009. № 5. С. 38–44.
9. Европейский патент N 0803061, 07.12.1995.
10. Diamond Differential Scanning Calorimeter (DSC). 2003, PerkinElmer, Inc. Проспект фирмы PerkinElmer. США. URL:(<http://www.perkinelmer.com>).
11. Privalov P.L. Microcalorimetry of proteins and their complexes // Methods Mol. Biol. 2009. Vol. 490. P. 1–39.
12. Grinberg V.Ya., Grinberg N.V., Mashkevich A.Ya. et al. Calorimetric study of interaction of ovalbumin with vanillin // Food Hydrocolloids. 2002. Vol. 16. P. 333–343.
13. Burova T.V., Grinberg N.V., Grinberg V.Ya. et al. Binding energetics of lysozyme to copolymers of n-isopropylacrylamide with sodium sulfonated styrene // Macromolecular Bioscience. 2009. Vol. 9. P. 543–550.

**Институт биологического приборостроения РАН,
г. Пушкино, Московская область**

Контакты: Моисеева Софья Петровна,
spmoiseewa@yandex.ru

Материал поступил в редакцию: 13.04.2015

MODULATION NANOCALORIMETER IN RESEARCH OF THERMAL DENATURATION OF PROTEINS

G. V. Kotelnikov, S. P. Moiseyeva

Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia

The experimental model of the modulation nanocalorimeter has been developed. This nanocalorimeter has the following characteristics: the sensitivity is 50 nW; the base line stability for 3–5 hours is 50 nW; the fast-response is 60 s. In diluted protein solutions the precision measurements of heat flow have been performed with a modulated nanocalorimeter in the StepScan-modulation mode. This mode based on sequences of short intervals of heat (cooling) and isothermal intervals in a given temperature interval. Given functional scheme of the modulated nanocalorimeter is supplemented by an experimental estimation of the value of temperature difference along the length of the calorimetric chamber at its heating at a rate of 0.2 K/min. This estimation is made from the melting data of a test temperature sample in the calorimetric chamber. The test temperature sample is 1 mg Gallium. It is shown, that the difference between temperatures of the chamber top and bottom does not exceed 0.02 K. Thus, it is experimentally confirmed that calorimetric chambers have equal temperature along the whole length, as the obtained temperature difference is less than the absolute error of a sample temperature measurement with modulated nanocalorimeter. All modern scanning microcalorimeters developed by foreign corporations have a disadvantage in comparison with modulated nanocalorimeter, as they do not provide operation in the modulation mode. Modulated nanocalorimeter is a computer aided instrument. For modulated nanocalorimeter we have developed the software, providing the calorimeter operation and calculation of a complete heat flow, and also kinetic and reversible parts of a complete heat flow, which is confirmed by the experimental data. The research of thermal denaturation of ovalbumin and of lysozyme was carried out. It is shown that the modulation nanocalorimetry gives an opportunity to discriminate qualitatively different mechanisms of thermal denaturation of proteins.

Keywords: thermal denaturation, kinetics, temperature-modulation differential scanning nanocalorimetry, capillary calorimetric chamber, stepscan modulation

REFERENCES

1. Kotelnikov G.V., Moiseeva S.P., Burova T.V. et al. High-sensitivity modulation differential scanning calorimetry of protein denaturation. Part I. Two-state kinetics of thermal denaturation of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2013, vol. 114, pp. 531–536.
2. Kotelnikov G.V., Moiseeva S.P., Mezhiburd E.V. Modulated capillary titration calorimeter: Theoretical and experimental studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008, vol. 92, pp. 631–634.
3. Patent RU2347201, 20.02.2009.
4. Patent US4112734, 12.09.1978.
5. Kipper A.I., Kotelnikov G.V., Eskin V.E. [Method of definition of a thermal capacity of macromolecules in solution]. *Vysokomolekulyarnye soedineniya* [High-molecular compounds], 1976, vol. XVIII, no. 5, pp. 1173–1175.
6. Privalov P.L., Makurin P.S., Kotelnikov G.V. et al. [The differential adiabatic scanning DASM-1 microcalorimeter]. *IV Mezhdunarodnyy biofizicheskiy kongress, sekziya XVI–XXV: Tezisy sekzionnykh dokladov* 7–14.08.1972 [IV International biophysical congress, section XVI–XXV: Theses of section reports 7–14.08.1972], 1972, pp. 320–321.
7. Patent US 5224775, 06.07.1993.
8. Kotelnikov G.V., Moiseeva S.P., Grinberg V.Ya., Chochlov A.R. [Modulation capillary differential titrations calorimeter]. *Pribory* [Devices], 2009, no. 5, pp. 38–44.
9. Patent EP0803061, 07.12.1995.
10. Diamond Differential Scanning Calorimeter (DSC). 2003, PerkinElmer, Inc., USA. URL: (<http://www.perkinelmer.com>).
11. Privalov P.L. Microcalorimetry of proteins and their complexes. *Methods Mol. Biol.*, 2009, vol. 490, pp. 1–39.
12. Grinberg V.Ya., Grinberg N.V., Mashkevich A.Ya. et al. Calorimetric study of interaction of ovalbumin with vanillin. *Food Hydrocolloids*, 2002, vol. 16, pp. 333–343.
13. Burova T.V., Grinberg N.V., Grinberg V.Ya. et al. Binding energetics of lysozyme to copolymers of n-isopropylacrylamide with sodium sulfonated styrene. *Macromolecular Bioscience*, 2009, vol. 9, pp. 543–550.

Contacts: Moiseeva Sof'ya Petrovna,
spmoiseewa@yandex.ru

Article received in edition: 13.04.2015