

## ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

© Меликова Афаг Ярдым гызы

Азербайджанский Государственный Университет Нефти и Промышленности Азербайджана, г. Баку; кандидат химических наук, преподаватель кафедры «Химия и технология неорганических веществ», afaq61@mail.ru

**Аннотация.** Белковые молекулы играют незаменимую роль в процессе жизнедеятельности живых организмов. В живых организмах протеины (белки) выполняют целый ряд стратегических функций, в частности, каталитическую (ферментативную), структурную, защитную, регуляторную, сигнальную, транспортную, резервную. Для исследования структуры белков используют различные физико-химические методы анализа, среди которых особо следует выделить спектроскопические методы. В представленной работе автором осуществлен анализ результатов научных исследований в области определения структуры белковых молекул методами спектроскопии. Показано, что для определения белков, количественной оценки их содержания в составе различных органических субстратов, а в ряде случаев определения типа конформации белков спектроскопические методы исследования играют очень важную роль. В работе описано применение спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, спектрофотометрии, УФ- и рамановской спектроскопии и других видов спектроскопического анализа для определения белковых молекул. Отмечены факторы, оказывающие влияние на протекание аналитических исследований, а также назначение каждого отдельного типа спектроскопического анализа.

**Ключевые слова:** спектроскопия, белковые молекулы, протеины, ядерно-магнитный резонанс, спектрофотометрия, круговой дихроизм.

## APPLICATION OF SPECTROSCOPIC METHODS TO STUDY PROTEIN MOLECULES

© Melikova Afag Yardym

Azerbaijan State University of Oil and Industry, Azerbaijan, Baku; doctor of philosophy in chemistry, Lecturer at the Department of Chemistry and Technology of Inorganic Substances,

**Abstract.** Protein molecules play an indispensable role in the life of living organisms. In living organisms, proteins (proteins) perform a number of strategic functions, in particular, catalytic (enzymatic), structural, protective, regulatory, signaling, transport, reserve. To study the

structure of proteins, various physicochemical methods of analysis are used, among which spectroscopic methods should be highlighted. In the presented work, the author analyzed the results of scientific research in the field of determining the structure of protein molecules by spectroscopy methods. It has been shown that spectroscopic research methods play a very important role in determining proteins, quantifying their content in various organic substrates, and in some cases determining the type of protein conformation. The paper describes the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy, spectrophotometry, UV and Raman spectroscopy and other types of spectroscopic analysis for the determination of protein molecules. The factors influencing the course of analytical studies, as well as the purpose of each individual type of spectroscopic analysis, are noted.

**Key words:** spectroscopy, protein molecules, proteins, nuclear magnetic resonance, spectrophotometry, circular dichroism.

Спектроскопические методы исследования играют очень важную, а иногда и незаменимую роль для определения структуры органических соединений, и в частности, белковых молекул. С помощью этих методов удается осуществить анализ конформации белков, определить их количественное содержание, а также выявить тип спирали белковых молекул. В этой работе нами показаны результаты исследований в области определения структуры белков посредством спектроскопических методов анализа

### 1) спектрофотометрия

Этот метод основан на изучении спектров поглощения молекул в ультрафиолетовой (200—400 нм), видимой (400—760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Так, в работе [1] представлен сравнительный анализ методик спектрофотометрического определения общего белка с различными органическими красителями бромкрезоловым зеленым, бромфеноловым синим и пирогаллоловым красным в биологических жидкостях. Показано, что результаты определения с различными красителями могут различаться из-за особенностей взаимодействия реагентов с компонентами биологических жидкостей. Предложен новый органический реагент бромпирогаллоловый красный, обладающий равной чувствительностью к разным белковым фракциям (альбуминам и глобулинам) и обеспечивающий минимальную погрешность определения общего белка при клинических исследованиях с использованием градуировочных растворов различного состава. Разработана и апробирована на реальных образцах мочи и сыворотки крови методика определения общего белка в биологических жидкостях.

Разработка сенсорных методов анализа белковых образцов представляет большой интерес для биотехнологии, фармакологии и диагностики [2]. Доступные традиционные биохимические анализы имеют ограничения по времени и экономической эффективности. Напротив, оптические методы, такие как спектрофотометрия, могут предложить интересную возможность неинвазивного и непрерывного мониторинга. В этой работе предлагается основанный на спектрофотометре метод идентификации различных конформационных состояний р53, редокс-чувствительного белка, участвующего в нескольких патофизиологических процессах. Образцы, содержащие три различных структурных состояния р53 (р53 дикого типа, денатурированный р53 и окисленный р53), исследовали с помощью спектрофотометра в диапазоне длин волн от 185 до 1400 нм. для обнаружения различий в поглощении

света. Состояние разворачивания окислительно-восстановительных продуктов р53 было дополнительно изучено с помощью вольтамперометрии с удалением серебра на основе метки. Результаты спектрофотометрического анализа показали разные пики поглощения на разных длинах волн для каждой конформации, что указывает на возможность использования этого метода для различения различных протестированных окислительно-восстановительных продуктов р53. Кроме того, эти результаты, по-видимому, хорошо подтверждаются тестом на основе метки аффинности связывания. В целом исследование позволило заявить о возможности идентифицировать различные конформационные состояния р53 с помощью этого простого и неинвазивного метода, тем самым уменьшив сложность процедур, используемых в обычных методах.

## 2) ультрафиолетовая спектроскопия

Показано [3], что гем служит простетической группой многочисленных белков, участвующих в окислительном метаболизме. В результате различных патологических состояний, связанных с гемолизом или повреждением тканей, большое количество гемопротеинов и гема может высвободиться внеклеточно. Внеклеточный гем оказывает выраженное патогенное действие при гемолитических заболеваниях, опосредованное его прооксидантной и провоспалительной активностью. Патогенный потенциал гема наиболее выражен, когда молекула находится в несвязанной с белком форме. Патологическое значение свободного гема считает необходимым разработать надежные подходы к его оценке. В этой работе авторы разработали метод, основанный на спектроскопии поглощения в УФ-видимой области, где цистеин использовался в качестве спектроскопического зонда, чтобы отличить гем, связанный с белками плазмы, или гемоглобин от свободного гема. Этот метод позволил оценить гем-связывающую способность сыворотки человека, определенных белков, удаляющих гем (альбумин, гемопексин), или иммуноглобулинов. Основное преимущество предлагаемого подхода заключается в том, что он позволяет отличить свободный гем от гема, связанного с белками с широким диапазоном сродства. Описанная стратегия может быть использована для оценки гем-связывающей способности плазмы или сыворотки человека после внутрисосудистого гемолиза или для оценки стехиометрии взаимодействия гема с данным белком.

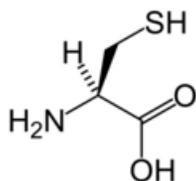


Рис.1. Цистеин

В работе [4] отмечается, что ученые больше не привязаны к трудоемкому и подверженному ошибкам использованию коэффициентов разбавления и измерений с фиксированной длиной оптического пути при определении концентрации белка в растворе. Используя метод наклонной спектроскопии, система *Solo VPE* предлагает новый метод определения концентрации белкового анализата, основанный на законе Бера-Ламберта и наклоне, полученном из измерений поглощения, выполненных на нескольких длинах оптического пути.

Измерение концентрации солюбилизованного белка в растворе является важным анализом в биохимических научно-исследовательских лабораториях для приложений, варьирующихся от ферментативных исследований до предоставления данных для выпуска биофармацевтических партий [5]. Спектрофотометрические количественные анализы белка — это методы, в которых используется УФ и видимая спектроскопия для быстрого определения концентрации белка по отношению к стандарту или с использованием заданного коэффициента экстинкции. Если необходимо измерить несколько образцов и/или объем и концентрация образца ограничены, можно использовать препараты красителя *кумасси*, обычно известные как анализ Бредфорда.

### 3) рамановская спектроскопия

Этот метод используется для определения колебательных мод молекул и вибрационных мод в твёрдых телах, а также для определения вращательных и другие низкочастотных мод систем. Спектроскопию комбинационного рассеяния использовали для изучения термической денатурации трех различных белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА), лизоцима, овальбумина; и температуры разложения трех аминокислот, L-глутамина, L-цистеина и L-аланина; все они использовались в виде лиофилизированных порошков. Все наблюдаемые в полученных спектрах полосы КР регистрировались и анализировались при заданных температурах нагрева. Результаты, полученные как для температуры денатурации белка  $T_D$ , так и для температур разложения аминокислот  $T_{M-dc}$ , сравнивали с данными, измеренными с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Результаты ДСК и КР были дополнительно подтверждены термогравиметрическим анализом (ТГА) в случае белков. Это исследование показало почти полное совпадение в определении этих температур перехода между тремя методами, что свидетельствует о применимости рамановской спектроскопии при изучении температур денатурации и разложения белков и аминокислот.

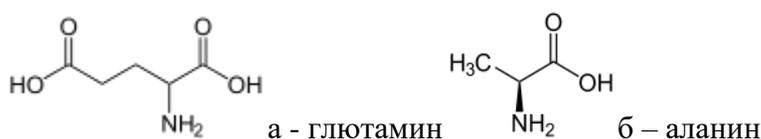


Рис. 2. а – глутамин; б – аланин

В работе [8] 26 белков различной структуры, функции и свойств исследованы с помощью рамановской спектроскопии с лазерными линиями 488, 532 и 1064 нм. Линии возбуждения были выбраны в ближнем ИК и видимом диапазонах как наиболее распространенные и демонстрирующие разницу за счет нормального и резонансного эффекта, иногда сопровождаемого флуоресценцией. Отобранные белки были разделены в соответствии со структурной классификацией белков на четыре класса в соответствии с их вторичной структурой, т. е.  $\alpha$ -спиральные ( $\alpha$ ),  $\beta$ -листовые ( $\beta$ ), смешанные структуры ( $\alpha/\beta, \alpha + \beta, s$ ) и другие. Для всех соединений представлены FT-Raman и два видимых спектра вместе с подробным распределением полос. Авторы сообщают, что это первый обзор, показывающий потенциал рамановской спектроскопии для измерения и анализа такой большой коллекции отдельных белков.

Рамановская спектроскопия с усилением поверхности (SERS) является мощным инструментом для структурной характеристики биомолекул в физиологических условиях [9]. Благодаря своей высокой чувствительности и селективности SERS полезен для исследования внутренней структурной информации белков и привлекает все большее внимание в биофизике, биоаналитической химии и биомедицине. Этот обзор начинается с краткого введения теории SERS и методологии SERS для структурной характеристики белков. SERS-активные материалы, связанные с ними синтетические подходы и стратегии сборки белковых материалов изложены и обсуждены, после чего следует подробное обсуждение SERS-спектроскопии белков с кофакторами и без них. Затем освещаются недавние применения и достижения белка SERS в обнаружении биомаркеров, анализе клеток и распознавании патогенов, а также критически обсуждаются спектральная воспроизводимость и ограничения. Обзор завершается подведением итогов и обсуждением актуальных проблем и перспектив передовых направлений.

Показано [9], что белки являются неотъемлемой частью организмов и участвуют практически во всех процессах внутри клеток. Рамановская спектроскопия может быть мощным инструментом для характеристики модифицированных аминокислот и белков. В дополнение к возможности получения количественных результатов, он предлагает то преимущество, что не требует какой-либо пробоподготовки. Этот обзор посвящен приложениям для анализа белков, опубликованным в период 2010–2014 гг.

Способность современной биотехнологии производить новые или модифицированные белки опережает современное понимание взаимосвязи между структурой белка и функцией белка [10]. Инфракрасная спектроскопия с улучшенным разрешением и спектроскопия комбинационного рассеяния — превосходные неразрушающие методы исследования вторичной структуры белков в самых разных условиях. Методы дают быстрые и надежные оценки доли спиральной структуры,  $\beta$ -цепей и поворотов белков в растворе, в виде гелей или твердых веществ. Эти методологии также могут обнаруживать тонкие изменения в конформации белка, которые часто возникают при изменении биомолекулярного окружения. В частности, можно изучать структурные изменения, возникающие в результате изменений pH, ионной силы, природы растворителя и взаимодействия с другими молекулами или ионами. В первой части этой статьи кратко рассмотрены различные важные аспекты этих методов. В следующей части описывается применение к структурным проблемам казеина и других пищевых белков.

Еще одна обзорная работа [11] посвящена применению рамановской спектроскопии в процессе изучения структуры белков.

#### **4) терагерцовая спектроскопия**

Терагерцовая спектроскопия во временной области (ТГц-TDS) развивалась с конца 1980-х годов, когда были успешно генерированы и обнаружены импульсы электромагнитного излучения на терагерцовых частотах во временной области. Это изобретение позволило исследовать область  $3\text{--}50\text{ см}^{-1}$  ( $0,1\text{--}1,5\text{ ТГц}$ ). Раньше эту часть электромагнитного спектра было трудно исследовать с помощью спектроскопии дальнего инфракрасного диапазона, поскольку мощность обычных источников света в этой области слаба. THz-TDS использует фемтосекундные импульсные лазеры видимого диапазона в сочетании с полупроводниковым материалом, таким как арсенид галлия, для генерации терагерцового им-

пульса, который позволяет проводить анализ дальнего инфракрасного диапазона с временным пикосекундным разрешением и определение показателя преломления. Эта технология была широко принята сообществом физической химии, и в 2000 г. были предприняты первые попытки анализа белков и ДНК. Первоначальные результаты для белков характеризовались монотонным увеличением поглощения с увеличением частоты, что можно было интерпретировать ансамбль инфракрасных активных коллективных мод. Эти ранние терагерцовые спектры, хотя и не содержащие дискретных пиков, побудили исследовательские группы по всему миру попытаться найти применение этой новой технологии в области химии белков. Более старая область дальней ИК- спектроскопии также оживилась, поскольку она перекрывала спектральный диапазон ТГц-ТДС (от  $50\text{ см}^{-1}$  до  $100\text{ см}^{-1}$ ) и обеспечивала детализацию спектров, следующую за спектрами, проанализированными ТГц-ТДС. В этой статье [12] рассмотрены последние исследования белков и пептидов с использованием THz-TDS, р-германиевых лазеров ( $75\text{--}85\text{ см}^{-1}$ ) и дальней инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье ниже  $350\text{ см}^{-1}$ .

### 5) масс-спектрометрия

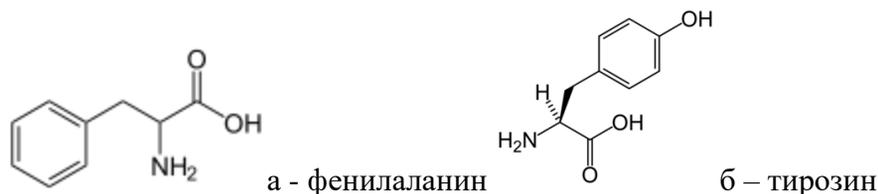
В этом методе основой для измерения служит ионизация компонентов, позволяющая физически различать компоненты на основе характеризующего их отношения массы к заряду и, измеряя интенсивность ионного тока, производить отдельный подсчёт доли каждого из компонентов. В работе [13] описан метод «мягкой» ионизации: EESI накапливает заряды на нативных белках, которые отделены от любого сильного электрического поля. Таким образом, нативные белки могут быть охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии даже из сырых биологических образцов без существенных конформационных изменений или снижения активности. EESI-MS - это чувствительный инструмент для высокопроизводительного анализа следовых количеств белков в нативных условиях.

Сообщается [14], что масс-спектрометрия является незаменимым инструментом для анализа пептидов и белков благодаря своей скорости, чувствительности и универсальности. Его можно использовать для определения аминокислотных последовательностей пептидов и для характеристики широкого спектра пост-трансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и гликозилирование. Масс-спектрометрию также можно использовать для определения абсолютных и относительных количеств белков, а также для идентификации и количественного определения тысяч белков из сложных образцов, что делает ее чрезвычайно мощным инструментом для исследований системной биологии. Основные цели этой работы — познакомить химиков и биологов, занимающихся пептидной и белковой химией, с типами масс-спектрометров, которые подходят для большинства их аналитических задач, описать виды экспериментов, которые можно проводить с этими приборами на регулярной основе.

### 6) спектроскопия ядерно-магнитного резонанса

Белковые полимеры присутствуют в каждом препарате клеточных стенок растений, и они мешают характеристике и количественному определению лигнина. В этой работе [15] сообщается о структурной характеристике пиков остаточного белка в спектрах 2D ЯМР в образцах початков кукурузы и кенафа и отмечается, что ароматические аминокислоты широко распространены и проявляются в спектрах различных других растений и тканей. Корреляции ароматических аминокислотных остатков были идентифицированы и обозначены

как фенилаланин и тирозин. Пик корреляции фенилаланина 3/5 наложен на пик от типичного лигнина р-гидроксифенильные (Н-звенья) структуры, вызывающие переоценку Н-звеньев. Белковое загрязнение происходит также при использовании целлюлаз для получения ферментативных лигнинов из практически не содержащих белков образцов древесины. Авторы использовали протеазу для удаления белковых остатков из клеточных стенок, измельченных в шаровой мельнице, и смогли более четко выявить структуры Н-единиц в лигнинах в 2D-ЯМР-спектрах, что обеспечило лучшую основу для их оценки.



**Рис. 3.** а – фенилаланин; б – тирозин

В работе [16] сообщается, что структурная биология прошла долгий путь с момента первого появления многомерного ЯМР. Диполь-дипольное взаимодействие между двумя пространственно замкнутыми спинами обеспечивает мощный инструмент для исследования трехмерной (3D) структуры макромолекул, таких как белки. Однако основной задачей для макромолекул является определение химических сдвигов ЯМР всех сигналов исследуемого белка. В этой работе представлены различные эксперименты трехмерного ЯМР с тройным резонансом, посвященные отнесению сигналов ЯМР к структуре белкового остова. Кроме того, эксперименты по корреляции в пространстве, а именно NOESY, ROESY и HOESY, представлены с подробной информацией о преимуществах и ограничениях каждого из них. Основная сила ЯМР заключается в получении молекулярных структур в естественных условиях и подробной информации о молекулярной динамике в различных временных масштабах. Подробная характеристика субнаносекундных сегментарных движений в белках была охарактеризована задолго до появления первой структуры раствора с помощью ЯМР. Представлена основная концепция определения структуры и объяснения динамики белка в разных временных масштабах. Также авторами освещены методологии ЯМР, касающиеся описания конформаций белков и переходных состояний, жизненно важных для макромолекулярных функций. представлена основная концепция определения структуры и объяснения динамики белка в различных временных масштабах.

В еще одной работе [17] сообщается, что ЯМР-спектроскопия играет важную роль в определении структуры и динамики белков и других биологических макромолекул. Химические сдвиги являются наиболее легко и точно измеряемыми параметрами ЯМР, и они с большой специфичностью отражают конформации нативных и ненативных состояний белков. Авторы показывают 11 примеров белков, представляющих основные структурные классы и содержащих до 123 остатков, что можно использовать химические сдвиги в качестве структурных ограничений в сочетании с обычным силовым полем молекулярной механики для определения конформаций белков с разрешением 2 ангстрем или выше.

#### 7) другие виды спектроскопии

В работе [18] представлены методы разработки спектроскопических факторов непосредственно из спектров кругового дихроизма белков с использованием разложения по син-

гулярным числам в небольшой базе данных. Для характеристики базы данных выбраны четыре спектра максимальной спектральной изменчивости. Эти выбранные белковые спектры затем факторизуются по сингулярным значениям в составные спектры, которые собираются как сравнительные векторные характеристики, используемые в качестве факторных фракций. Необходимая стандартизация для сравнения достигается с помощью нормированных на единицу спектров. Эти спектры используются для количественной оценки неопределенностей параметров в качестве средства сравнения. Разница между спектром подгонки и спектром данных для каждого белка анализируется методом наименьших квадратов, чтобы получить неопределенности параметров из-за модели.

Описан высокочувствительный и избирательный по молекулярному размеру метод обнаружения белков с использованием гетеролигандных наносторожков золота и локализованного поверхностного плазмонного резонанса (LSPR). Два разных гетеролиганда с разной длиной цепи (3-меркаптопионовая кислота и декантиол) были использованы при изготовлении наносторожков для размерно-зависимого разделения белка по сравнению с его агрегатом. Их соотношения на золотых наносторожках были оптимизированы для чувствительного обнаружения супероксиддисмутазы (SOD1). Этот белок вовлечен в патологию бокового амиотрофического склероза (БАС). При воздействии на оптимизированный наносторожок золота раствора SOD1 и его агрегатов наблюдались изменения в спектрах LSPR, которые объясняются селективным по размеру и ковалентным химическим связыванием SOD1 с наносторожками. При нижнем пределе обнаружения 1,0 нг/мл метод может быть использован для селективного обнаружения SOD1 в присутствии агрегатов на молекулярном уровне.

Таким образом, из приведенного обзора результатов исследований в области применения спектроскопических методов исследования для определения структуры белковых молекул можно сделать вывод о том, что эти методы являются весьма эффективными методами анализа белковых молекул и ежегодный рост сообщений и исследовательских работ в этой области свидетельствует о высокой значимости спектроскопических методов анализа для химии белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anisimovich P.V., Pochinok T.B., Tokareva F.V. Spectrophotometric determination of proteins in biological fluids // *Journal of Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 72. Pp. 1212-1218.
2. Abdullah S., Serpelloni M., Tonello S., Sardini E. Spectrophotometer measurements to characterize conformational state of the proteins: p53 analysis // *IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications*. 2018. Pp.73-75.
3. Noe R., Bozinovic N., Lecerf M., Lacroix-Desmazes S. Use of cysteine as a spectroscopic probe for determination of heme-scavenging capacity of serum proteins and whole human serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. Vol. 172, N 5. Pp. 311-319.
4. Huffman S., Soni K., Ferraiolo J. UV-vis based determination of protein concentration: Validating and implementing slope measurements using variable pathlength technology // *BioProcess International*. 2014. Vol. 12, N 8. Pp. 123-128.
5. Noble J. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes // *Methods Enzymol.* 2014. Vol. 536. Pp. 17-26.

6. Ojeda-Galvan H.J., Hernandez-Arteaga A.C., Rodriquez-Aranda M.C., Toro-Vasquez J.F. Application of Raman spectroscopy for the determination of proteins denaturation and amino acids decomposition temperature // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. Vol. 285, N 1. Pp. 121941-121953.
7. Riquela A., Maizner K., Marzec K., Kaczor A. Raman spectroscopy of proteins: a review // *Journal of Raman Spectroscopy.* 2013. Vol. 44, N 8. pp. 1061-1076
8. Linjun C., Fang C., Tang J., Cheng Q. Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Proteins: Advances and Applications // *Inter. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, N 22. Pp. 13868-13879.
9. Bunaciu A.A., Aboul-Enein H.Y., Hoang V.D. Raman Spectroscopy for Protein Analysis // *Applied Spectroscopy Reviews.* 2015. Vol. 50, N 5. Pp. 377-386.
10. Byler D.M., Susi H. Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins // *Journal of Industrial Microbiology.* 1988. Vol. 3, Pp. 73-88.
11. Mungicar A., Kamat M. Use of in-line Raman spectroscopy as a non-destructive and rapid analytical technique to monitor aggregation of a therapeutic protein // *American Pharmaceutical Review.* 2010. Vol. 13, N 7. Pp. 78-83.
12. Falconer R. Terahertz spectroscopy's application to protein chemistry // *Spectroscopy Europe/World.* 2012. Vol. 24, N 2. Pp. 12-14.
13. Huanwen C., Shuiping Y., Ming L., Bin H. Sensitive Detection of Native Proteins Using Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry // *Angewandte Chemie International Edition.* 2010. Vol. 49, N 17. Pp. 3053-3056.
14. Zhang G., Annan R.S., Carr S., Neubert T. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2010. Vol. 16, N 1. Pp. 16-23.
15. Hoon K., Padmakshan D., Rencoret J. Hatfield R. Characterization and Elimination of Undesirable Protein Residues in Plant Cell Wall Materials for Enhancing Lignin Analysis by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // *Biomacromolecules.* 2017. Vol. 18, N 12. Pp. 4184-4195.
16. Chandra K., Emwas A.H., Al-Harathi S., Zeyad A-T. Theory and Applications of NMR Spectroscopy in Biomolecular Structures and Dynamics of Proteins // *NMR Spectroscopy for Probing Functional Dynamics at Biological Interfaces.* 2022. N 3. Pp. 1-28.
17. Cavalli A., Salvatella X., Dobson C., Vendruscolo M. Protein structure determination from NMR chemical shifts // *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104, N 23. Pp. 9615-9620.
18. Haner D. Selection and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra Using an Expansion of Spectral Factors // *Open Access Library Journal.* 2020. Vol. 7, N 12. Pp. 1-17.
19. Hong S., Suseung L., Jongheop Y. Sensitive and molecular size-selective detection of proteins using a chip-based and heteroliganded gold nanoisland by localized surface plasmon resonance spectroscopy // *Nanoscale Res Lett.* 2011. Vol. 6, N 1. Pp. 336-342.

#### REFERENCES

1. Anisimovich P.V., Pochinok T.B., Tokareva F.V. Spectrophotometric determination of proteins in biological fluids // *Journal of Analytical Chemistry.* 2017. Vol. 72. Pp. 1212-1218.

2. Abdullah S., Serpelloni M., Tonello S., Sardini E. Spectrophotometer measurements to characterize conformational state of the proteins: p53 analysis // *IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications*. 2018. Pp.73-75.
3. Noe R., Bozinovic N., Lecerf M., Lacroix-Desmazes S. Use of cysteine as a spectroscopic probe for determination of heme-scavenging capacity of serum proteins and whole human serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. Vol. 172, N 5. Pp. 311-319.
4. Huffman S., Soni K., Ferraiolo J. UV-vis based determination of protein concentration: Validating and implementing slope measurements using variable pathlength technology // *BioProcess International*. 2014. Vol. 12, N 8. Pp. 123-128.
5. Noble J. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes // *Methods Enzymol.* 2014. Vol. 536. Pp. 17-26.
6. Ojeda-Galvan H.J., Hernandez-Arteaga A.C., Rodriquez-Aranda M.C., Toro-Vasquez J.F. Application of Raman spectroscopy for the determination of proteins denaturation and amino acids decomposition temperature // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spec-trosc.* 2022. Vol. 285, N 1. Pp. 121941-121953.
7. Riquela A., Maizner K., Marzec K., Kaczor A. Raman spectroscopy of proteins: a review // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2013. Vol. 44, N 8. pp. 1061-1076
8. Linjun C., Fang C., Tang J., Cheng Q. Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Proteins: Advances and Applications // *Inter. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, N 22. Pp. 13868-13879.
9. Bunaciu A.A., Aboul-Enein H.Y., Hoang V.D. Raman Spectroscopy for Protein Analy-sis // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2015. Vol. 50, N 5. Pp. 377-386.
10. Byler D.M., Susi H. Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins // *Journal of Industrial Microbiol-ogy*. 1988. Vol. 3, Pp. 73-88.
11. Mungicar A., Kamat M. Use of in-line Raman spectroscopy as a non-destructive and rapid analytical technique to monitor aggregation of a therapeutic protein // *American Pharmaceutical Review*. 2010. Vol. 13, N 7. Pp. 78-83.
12. Falconer R. Terahertz spectroscopy's application to protein chemistry // *Spectroscopy Europe/World*. 2012. Vol. 24, N 2. Pp. 12-14.
13. Huanwen C., Shuiping Y., Ming L., Bin H. Sensitive Detection of Native Proteins Using Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry // *Angewandte Chemie International Edition*. 2010. Vol. 49, N 17. Pp. 3053-3056.
14. Zhang G., Annan R.S., Carr S., Neubert T. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2010. Vol. 16, N 1. Pp. 16-23.
15. Hoon K., Padmakshan D., Rencoret J. Hatfield R. Characterization and Elimination of Undesirable Protein Residues in Plant Cell Wall Materials for Enhancing Lignin Analysis by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // *Biomacromolecules*. 2017. Vol. 18, N 12. Pp. 4184-4195.
16. Chandra K., Emwas A.H., Al-Harathi S., Zeyad A-T. Theory and Applications of NMR Spectroscopy in Biomolecular Structures and Dynamics of Proteins // *NMR Spectroscopy for Probing Functional Dynamics at Biological Interfaces*. 2022. N 3. Pp. 1-28.
17. Cavalli A., Salvatella X., Dobson C., Vendruscolo M. Protein structure determination from NMR chemical shifts // *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104, N 23. Pp. 9615-9620.

18. Haner D. Selection and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra Using an Expansion of Spectral Factors // Open Access Library Journal. 2020. Vol. 7, N 12. Pp. 1-17.
19. Hong S., Suseung L., Jongheop Y. Sensitive and molecular size-selective detection of proteins using a chip-based and heteroliganded gold nanoisland by localized surface plasmon resonance spectroscopy // Nanoscale Res Lett. 2011. Vol. 6, N 1. Pp. 336-342.