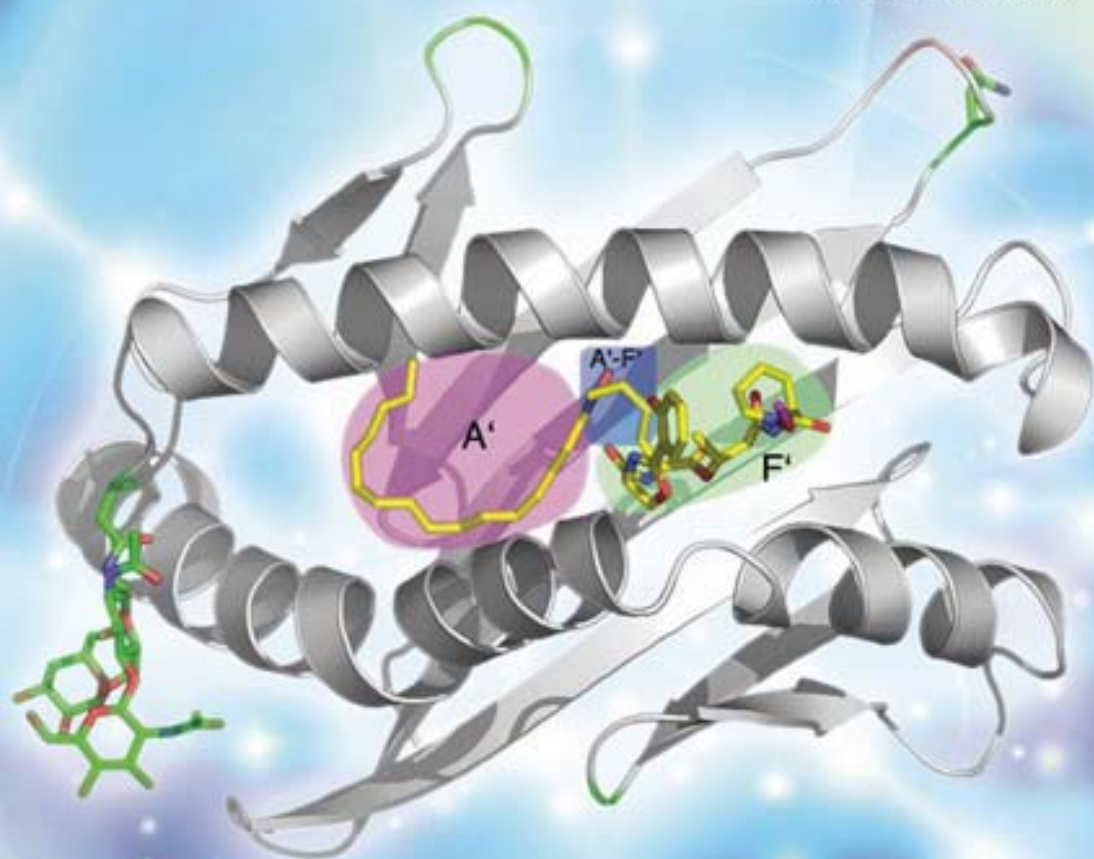


А.Т. Лебедев,
К.А. Артеменко,
Т.Ю. Самгина



Основы масс-спектрометрии белков и пептидов

УДК 543.51

ББК 24.4

Л33

Л33 Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю.

Основы масс-спектрометрии белков и пептидов

Москва: Техносфера, 2012. – 176 с.+ 4 с. цв. вкл.

ISBN 978-5-94836-334-9

Книга представляет собой первое учебное пособие на русском языке по основам масс-спектрометрии белков и пептидов. Цель настоящего издания – заинтересовать молодых исследователей информативной, красивой и востребованной во всем мире дисциплиной, дать возможность более эффективно применять масс-спектрометрию для решения фундаментальных и прикладных научных задач. Книга написана в формате лекций для начинающих, хорошо иллюстрирована и сопровождается представительным списком цитированной литературы.

Издание рассчитано на студентов и аспирантов химических, физико-химических, биологических и медицинских специальностей; будет полезно научным сотрудникам, уже работающим в области исследований белков и пептидов или интересующимся этим научным направлением.

УДК 543.51

ББК 24.4

Рисунок на обложку любезно предоставила
профессор Кетрин Костелло (США).

© 2012, Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю.

© 2012, ВМСО, оригинал-макет

© 2012, ЗАО «РИЦ «Техносфера», оформление

ISBN 978-5-94836-334-9

Оглавление

Предисловие	7
Использованные сокращения	9
Введение	11
Глава 1. Методы ионизации молекул пептидов и белков	14
1.1. Бомбардировка быстрыми атомами, ББА (Fast Atom Bombardment, FAB)	14
1.2. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, МАЛДИ (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)	16
1.3. Ионизация электрораспылением, ИЭР (Electrospray Ionization, ESI)	19
Глава 2. Измерение молекулярной массы пептидов и белков	25
Глава 3. Установление первичной структуры пептидов	34
3.1. Деградация по Эдману	34
3.2. Идентификация пептидов по сиквенсу κДНК	36
3.3. Леддерное секвенирование	37
Глава 4. Масс-спектрометрическое секвенирование	39
4.1. Номенклатура фрагментных ионов пептидов	39
4.2. Масс-спектры отрицательных ионов	45
4.3. Методы инициирования фрагментации молекулярных ионов	46
4.3.1. Диссоциация, активированная соударениями, ДАС (Collisionally Activated Dissociation, CAD)	47
4.3.2. Диссоциация индуцированная столкновениями с поверхностью, ДИП (Surface Induced Dissociation (SID))	56
4.3.3. Диссоциация при захвате электрона, ДЗЭ (Electron Capture Dissociation, ECD)	59
4.3.4. Диссоциация при переносе электрона, ДПЭ (Electron Transfer Dissociation, ETD)	64
4.3.5. Фотоактивация диссоциации	65
4.3.6. Диссоциация, активированная электронами	69

4.3.7. Диссоциация отрицательных ионов при отрыве электрона	70
4.4. Методы секвенирования пептидов на приборах с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией	71
4.4.1. Метод задержанной экстракции. Распад в источнике, РВИ (In Source Decay, ISD)	71
4.4.2. Распад за пределами источника, РПИ (Post Source Decay, PSD)	72
Глава 5. Идентификация белков и пептидов	76
5.1. Идентификация с использованием баз данных	76
5.1.1. Метод идентификации белков «снизу вверх» («Bottom-up»)	76
5.1.2. Метод идентификации белков «сверху вниз» («Top-down»)	91
5.2. Ручная идентификация пептидов	94
Глава 6. Основные сложности масс-спектрометрического секвенирования пептидов и пути их преодоления	97
6.1. Покрытие сиквенса	98
6.2. Аминокислоты с одинаковой целочисленной массой	102
6.2.1. Лизин и глутамин	102
6.2.2. Фенилаланин и окисленный метионин	104
6.3. Изомерные аминокислоты: лейцин и изолейцин	106
6.4. Циклизация коротких пептидов	108
6.5. Пептиды, содержащие дисульфидную связь	116
Глава 7. Использование для секвенирования масс-спектров отрицательных ионов	121
Глава 8. Количественный анализ белков с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии. Количественная протеомика.	126
8.1. Сравнительная (количественная) протеомика	129
8.1.1. Безизотопный метод	129
8.1.2. Изотопные методы	132
8.2. Установление абсолютных количеств	145
Список литературы	149
Приложение. Bruker: Многомерный путь к разгадке протеома.	163

Глава 1 Методы ионизации молекул пептидов и белков

Реальный прорыв в масс-спектрометрии пептидов связан с созданием метода бомбардировки быстрыми атомами в середине 70-х годов XX века (Г.Д. Танцырев, Н.А. Клейменов, 1973; A. Benninghoven et al., 1976). Появилась возможность устанавливать молекулярные массы и последовательность аминокислотных звеньев олигопептидов с массами в тысячу и более Дальтон (D.F. Hunt et al., 1981; C.V. Bradley et al., 1982). Еще через 15 лет с появлением метода ионизации электрораспылением (М.Л. Александров и др., 1984; С.М. Whitehouse et al., 1985) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (М. Karas et al., 1987) масс-спектрометрия стала ключевым методом установления первичной структуры пептидов. Возникает новая наука — протеомика (D.C. Liebler, 2002; R. Aebersold, M. Mann, 2003).

1.1. Бомбардировка быстрыми атомами

Основоположителем метода ионизации бомбардировкой быстрыми атомами (ББА, Fast Atom Bombardment, FAB) считают Беннингховена благодаря работе (A. Benninghoven et al., 1976). Тем не менее, Г.Д. Танцырев опубликовал свои результаты исследований с применением этого метода существенно раньше — в 1973 г. (Г.Д. Танцырев, Н.А. Клейменов, 1973).

Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами представлена на рис. 1.1. Для получения пучка атомов используется «атомная пушка», а в качестве ионизирующих частиц — атомы инертных газов. На выход ионов анализируемого вещества существенно влияет атомная масса разогнанных частиц первичного пучка. Например, пучок атомов ксенона эффективнее, чем атомов аргона и, тем более, атомов неона.

Пучок ускоренных атомов с энергией 7–9 кэВ направляется на раствор анализируемого вещества в матрице, нанесенный на металлическую подложку, расположенную на конце штока прямого ввода. Взаимодействуя с веществом, атомы создают интенсивный локальный разогрев, в результате которого молекулы поверхностных слоев отрываются в виде плотного газа, содержащего положительные и отрицательные ионы, а также нейтральные частицы, которые могут ионизироваться непосредственно над поверхностью образца.

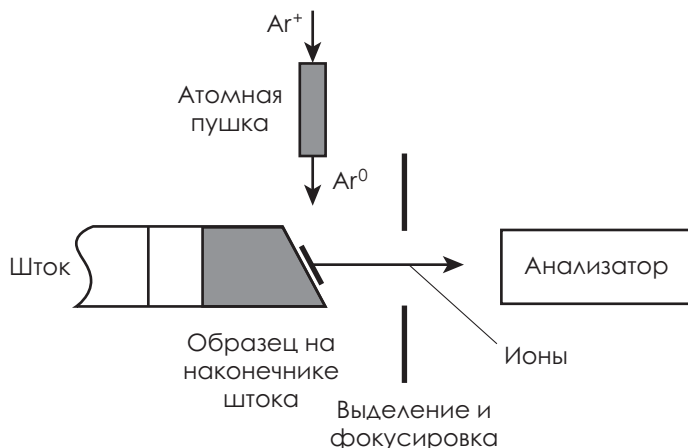


Рис. 1.1. Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами.

Если на шток нанесено сухое вещество, то через короткий промежуток времени наблюдается резкое падение интенсивности пучка генерируемых ионов, так как разрушается поверхностный слой кристаллической решетки вещества. Поэтому используют растворенный образец. Важно, чтобы образец был именно растворен в матрице. Если истинного раствора нет, качество спектров значительно ухудшается. Помочь может добавление солюбилизаторов. Диффузия в жидкой матрице протекает достаточно быстро для того, чтобы обеспечить постоянную концентрацию молекул образца на поверхности. В этом случае пучки ионов образца достаточной интенсивности могут генерироваться в течение длительного времени (> 20 мин). В качестве растворителя (матрицы) используется широкий круг мало летучих соединений; чаще других — глицерин и *м*-нитробензиловый спирт.

Хотя важнейшим достоинством ББА является возможность получать масс-спектры высокомолекулярных соединений, это не такой мягкий метод ионизации, как полевая десорбция или электрораспыление. Бомбардировка образца быстрыми атомами обеспечивает передачу молекулам энергии в широком диапазоне. В результате, наряду с пиками молекулярных ионов в спектре наблюдаются интенсивные пики осколочных и перегруппировочных ионов, что позволяет в ряде случаев не прибегать к тандемной масс-спектрометрии для изучения фрагментации и структуры анализируемых молекул.

Масс-спектры ББА характеризуются четноэлектронными ионами типа MH^+ и $[M-H]^-$, но не M^{2+} и M^- . Отчасти это является результатом ионно-молекулярных реакций, протекающих в плазме над поверхностью образца, отчасти перенос протона происходит еще в жидкой матрице. Использование в качестве растворителя материалов с большей основностью приводит к образованию ионов $[M+матрица]^+$. Качество спектров можно повышать добавка-

ми, вызывающими образование ионов непосредственно в жидкой фазе. Добавки кислот приводят к увеличению интенсивности пиков в спектрах положительных ионов соединений с центрами основности, а добавки щелочей используются для увеличения выхода отрицательных ионов в спектрах соединений с кислотными группами. В частности, полипептиды с избытком основных аминокислот (*K.L. Busch et al., 1982*) характеризуются спектрами положительных ионов с интенсивными пиками MH^+ . В спектрах полипептидов с избытком кислотных групп интенсивность этого пика мала, тогда как пики депротонированных молекул, напротив, весьма интенсивны. Иногда полезно добавлять к образцу неорганические соли. Например, добавка NaCl к образцам полипептидов или олигосахаридов в глицериновой матрице (*M. Barber et al., 1982*) приводит к образованию интенсивных пиков ионов $[M+Na]^+$.

Бомбардировка быстрыми атомами позволяет надежно устанавливать величины m/z молекулярного и фрагментных ионов. Время анализа невелико. Однако поскольку диапазон регистрируемых масс обычно не превышает 2000 Да, а для анализа необходимо иметь не менее 100 пикомолей чистого образца, он может применяться только для анализа олигопептидов, причем предварительно очищенных. *м*-Нитробензиловый спирт оказался наилучшей матрицей для этой цели. В качестве растворителя образца используют смесь воды и ацетонитрила с возможными добавками метанола, уксусной и трифторуксусной кислот. Хотя ББА не является «мягким» методом ионизации, и в обычном масс-спектре наблюдается представительный ряд пиков фрагментных ионов, для целей определения последовательности аминокислотных звеньев в пептиде лучше использовать тандемную масс-спектрометрию. В качестве иона предшественника выбирается протонированная молекула пептида, фрагментация которой инициируется соударениями с атомами инертного газа (см. далее «Методы иницирования фрагментации молекулярных ионов», раздел 4.3). С широким внедрением в практику методов матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и ионизации электрораспылением бомбардировка быстрыми атомами используется все реже, а большинство коммерческих масс-спектрометров выпускается уже без соответствующих опций.

1.2. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) впервые описан во второй половине 80-х годов прошлого века (*M. Karas et al., 1985; M. Karas et al., 1987; K. Tanaka et al., 1988*). Основные достижения в разработке этого метода

принадлежат Ф. Хилленкампу и М. Карасу. В 1988 г. были опубликованы результаты анализа белков с массами до 70 000 Да (*M. Karas, F. Hillenkamp, 1988*), а в 1990 г. — уже до 116 000 Да (*B. Spengler, R.S. Cotter., 1990*). Рекордные для масс-спектрометрии массы однозарядных ионов в несколько миллионов Дальтон (*F. Hillenkamp et al., 2002*) были зарегистрированы именно с помощью матрично активированной лазерной десорбции/ионизации. Одному из первооткрывателей метода Коичи Танаке (*K. Tanaka*) в 2002 г. присуждена Нобелевская премия в области химии.

Метод МАЛДИ обладает высочайшей чувствительностью (уровень атто- (10^{-18}) и зепто- (10^{-21}) молей), не требует сложной пробоподготовки и позволяет работать с гетерогенными образцами. Одной из разновидностей МАЛДИ, методом десорбционной ионизации с кремния (*Desorption/Ionization on Silicon, DIOS*), установлен абсолютный рекорд чувствительности любого аналитического метода. Пик молекулярного иона дез-Arg⁹-брадикинина с изотопным расщеплением зарегистрирован для 800 йоктомолей (480 молекул) этого пептида (*S.A. Trauger et al., 2004*). Повторить этот результат пока никому не удалось, но регистрация аналитов в зептомолярных (10^{-21}) количествах описана многими исследователями.

Метод позволяет установить молекулярную массу пептида или белка в сотни тысяч Дальтон с точностью 0.5–0.01 %. Для него характерны протонированные молекулы MH^+ и аддукты с катионами щелочных металлов. В спектрах неочищенных от солей образцов пики ионов $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ часто имеют более высокую интенсивность, чем MH^+ . Метод удобен для скринингового анализа, например, для установления молекулярных масс протеолитических пептидов в смеси после энзиматического расщепления белка. Особенностью метода является образование, прежде всего, однозарядных ионов. Интенсивности пиков двух- и трехзарядных ионов существенно ниже (рис. 1.2). Тем не менее, с увеличением молекулярной массы образца до 10^5 – 10^6 Да наблюдаются и многозарядные ионы (*Y. Cai et al., 2002*). Образованию многозарядных ионов способствует также использование неметаллических подложек (*V. Frankevich et al., 2003*) или источников МАЛДИ с высоким давлением (*P.B. O'Connor, C.E. Costello, 2001*).

Теория МАЛДИ объясняет преимущественное наблюдение однозарядных ионов реакциями первичных многозарядных ионов с нейтральными молекулами матрицы, электронами и анионами в зоне шлейфа (*M. Karas et al., 2000*). Поскольку эти процессы эффективнее, когда в них вовлечены многозарядные ионы, выживают, в основном, именно однозарядные.

Важнейшими варьируемыми параметрами метода являются природа матрицы, количественное соотношение матрица/анализируемое соединение, длина волны, долгота импульса и мощность лазерного излучения, способ пробоподготовки и т.д. (*F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, 2007*).

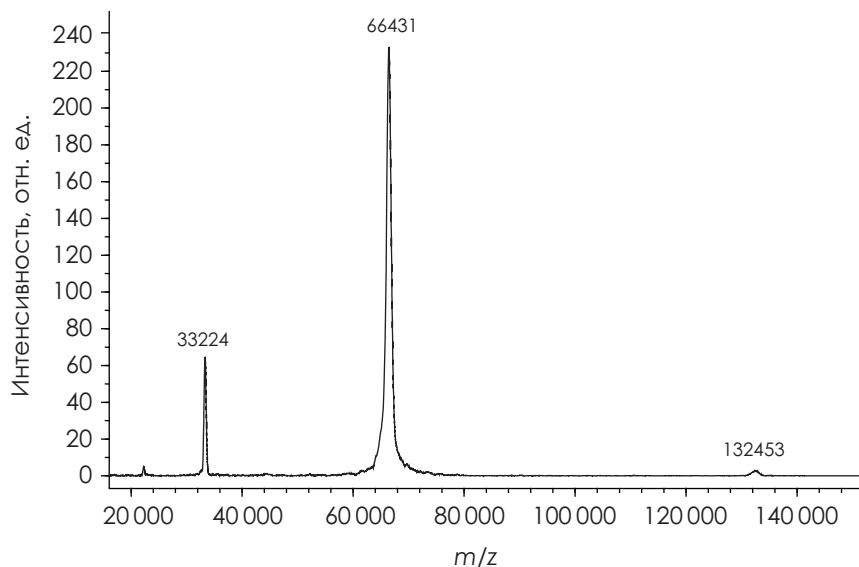


Рис. 1.2. Спектр МАЛДИ мономера (m/z 66 431) и димера (m/z 132 453) альбумина бычьей сыворотки.

Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Матрица выбирается таким образом, чтобы ее молекулы активно поглощали фотоны, эмиттируемые УФ- или ИК-лазером. В качестве матриц наиболее часто используют 2,5-дигидроксibenзойную и α -циано-4-гидроксикоричную кислоты, хотя в опубликованных на сегодняшний день работах описаны уже сотни разнообразных матриц. 2,5-Дигидроксibenзойная кислота, характеризующаяся незначительными фоновыми пиками в области низких масс, особенно эффективна для получения спектров легких соединений с молекулярной массой до 1000 Да. Молярное соотношение матрица/анализируемое вещество обычно составляет от 10:1 до 50000:1 и оптимизируется для каждого нового образца. Важно, чтобы во время высушивания нанесенного на подложку образца, произошла сокристаллизация вещества матрицы и анализируемого соединения.

Короткий световой импульс лазера поглощается молекулами матрицы и разрушает ее кристаллическую структуру. Часть молекул отрывается от поверхности и образует высокотемпературный суперплотный газ (зона шлейфа), в котором помимо молекул, ионов и ассоциатов матрицы присутствуют молекулы анализируемого соединения (см. рис. 1.3 на цветной вставке). В зоне шлейфа образуется газовая плазма, в которой протекают процессы вторичной ионизации. Механизмы этих реакций включают протонирование и депротонирование, перезарядку и присоединение аниона или катиона.

Ионизация аналита, протекающая путем поглощения энергии фотонов или в результате ионно-молекулярных реакций, приводит к образованию положительных и отрицательных ионов, которые вытягиваются высоким потенциалом (~ 25 кВ) из области ионизации и направляются в анализатор.

Практически во всех коммерческих приборах используется времяпролетный анализатор, поскольку он характеризуется и неограниченным диапазоном масс, и наибольшей скоростью регистрации масс-спектра, а основной задачей МАЛДИ является как раз получение информации о молекулярной массе высокомолекулярных соединений. Кроме того, именно времяпролетные приборы лучше других работают с импульсными методами ионизации и обладают высочайшей чувствительностью, поскольку все образовавшиеся в результате ионизации ионы достигают детектора. Спектры после каждого лазерного импульса могут суммироваться для получения качественной информации о молекулярной массе соединения. Обычно для приемлемого результата оказывается достаточно 30–50 лазерных импульсов.

К недостаткам метода можно отнести тот факт, что некоторые незначимые ингредиенты неочищенных смесей иногда дают очень интенсивные пики в спектрах. Эти пики могут маскировать наличие действительно важных для исследователя компонентов, т.е. МАЛДИ не является методом количественного анализа. Методы очистки проб для последующего МАЛДИ анализа описаны в обзоре (Y. Xu *et al.*, 2003).

1.3. Ионизация электрораспылением

Первая работа по вводу водных растворов органических соединений в масс-спектрометр была выполнена под руководством Л.Н. Галль и опубликована в 1984 г. (М.Л. Александров и др., 1984). Предложенный авторами метод ЭРИАД (экстракция ионов из раствора при атмосферном давлении) явился не чем иным, как прообразом одной из наиболее популярных сегодня масс-спектрометрических техник ионизации – ионизация электрораспылением (ИЭР, Electrospray Ionization, ESI). Тем не менее, Нобелевская премия в 2002 г. была присуждена Дж. Фенну (J.B. Fenn) как создателю метода ионизации электрораспылением для ввода жидкой пробы в масс-спектрометр. Следует подчеркнуть, что его первая работа по этой тематике (M. Yamashita and J.B. Fenn, 1984) со ссылкой на раннюю работу М. Доуля (M. Dole *et al.*, 1968) была опубликована в том же 1984 г., но позднее.

Метод ионизации электрораспылением позволяет вводить образец непосредственно в ионный источник или с предварительным разделением его при прохождении через колонку жидкостного хроматографа. Поток жидкости (см. рис. 1.4 на цветной вставке) направляется в иглу диаметром 0.1 мм, на которую подается высокое напряжение порядка 3–7 кВ. На выходе из

иглы в источнике ионов образуется аэрозоль из заряженных капель с высоким поверхностным зарядом. Эти капли движутся к противоэлектроду, имеющему потенциал Земли. В том же направлении уменьшается и давление, хотя в этой части ионного источника (до противоэлектрода) давление поддерживается на уровне атмосферного. По мере движения к входному отверстию первого сепаратора капли уменьшаются в размере за счет испарения растворителя. Достигая критического размера, при котором силы поверхностного натяжения далее не могут противостоять силам кулоновского отталкивания (предел Релея), капля «взрывается» с образованием более мелких капелек. Этот процесс повторяется. В итоге возникают микрокапли, содержащие всего одну заряженную частицу, которая может оказаться в газовой фазе после испарения остаточных молекул растворителя (*J.F. Mora et al., 2000*).

Альтернативный механизм предусматривает выброс заряженной молекулы с поверхности одноименно заряженной капли (*J.V. Iribarne and B.A. Thomson, 1976*). Недавняя работа, выполненная под руководством Ренато Зеноби (*K. Chingin et al., 2010*), является очень весомым аргументом в пользу этого механизма. Спектроскопические исследования пучка ионов, образовавшихся при электрораспылении, по мере их движения в масс-спектрометре показали существование всего двух пиков с разной длиной волны. Первый из них, очевидно, связан с сольватированными протонированными молекулами аналита, а второй — со свободными газофазными. В случае постепенного уменьшения степени сольватации пик поглощения должен был быть широким и охватывать весь диапазон сольватированных частиц: от полностью сольватированных до свободных ионов в газовой фазе.

В любом случае в газовой фазе оказываются несольватированные молекулы анализируемого вещества, которые проходят через сепаратор и оказываются в анализаторе. Модификация электрораспыления, названная «наноэлектрораспылением», оперирует потоками со скоростями в несколько нл мин⁻¹ и позволяет повысить эффективность образования ионов анализируемого вещества почти на два порядка (*M.S. Wilm, M. Mann, 1994*). Это особенно важно для исследования пептидов и белков, поскольку дает возможность значительно сократить количество аналита, необходимое для регистрации качественного масс-спектра. Работы по созданию и совершенствованию технических решений метода ионизации электрораспылением ведутся в настоящее время во многих лабораториях мира. В качестве приема можно предложить статью Б. Речке и А. Тимпермана и многочисленные ссылки в ней (*B.R. Rechke and A.T. Timperman, 2011*).

Помимо высочайшей чувствительности (атто- и зептомоли образца) и возможности работы с термолабильными и нелетучими веществами, ионизация электрораспылением позволила исследователям анализировать соединения с молекулярными массами до 1.0×10^6 Да и выше (*M.A. Tito et al.,*

2000). Зафиксированный рекорд составляет 1.1×10^7 Да (*R. Chen et al., 1995*), когда в масс-спектрометре с преобразованиями Фурье удалось измерить молекулярную массу ДНК бактериофага Т4, зарегистрировав молекулярные ионы с зарядом 28–35 тысяч. Все же следует отметить, что электрораспыление может использоваться с максимальной эффективностью для анализа соединений с массой до $\sim 1.5 \times 10^5$ Да. В случае более тяжелых молекул спектры становятся слишком сложными для расшифровки, так как большое число пиков многозарядных ионов располагается в сравнительно небольшом диапазоне (m/z от 500 до 3000).

Поскольку ионы, образующиеся в условиях электрораспыления, обладают значительно меньшей внутренней энергией, чем, например, в случае бомбардировки быстрыми атомами, их фрагментация практически не реализуется, а масс-спектр представляет собой набор пиков, обусловленных протонированными молекулами с разным числом протонов, т.е. с различными зарядами (точнее $[M + nH]^n+$). Для инициирования фрагментации этих ионов необходимо использовать тандемную масс-спектрометрию. Типичный масс-спектр ионизации электрораспылением полипептида (эскулентин 1a с молекулярной массой 4813.6896 Да) представлен на рис. 1.5.

Именно образование многозарядных ионов является важнейшим достоинством метода ионизации электрораспылением. Число присоединившихся протонов зависит от многих факторов. Если говорить о пептидах и белках, наиболее активно протонируются остатки основных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин и N-концевой атом азота). Практические наблюдения пока-

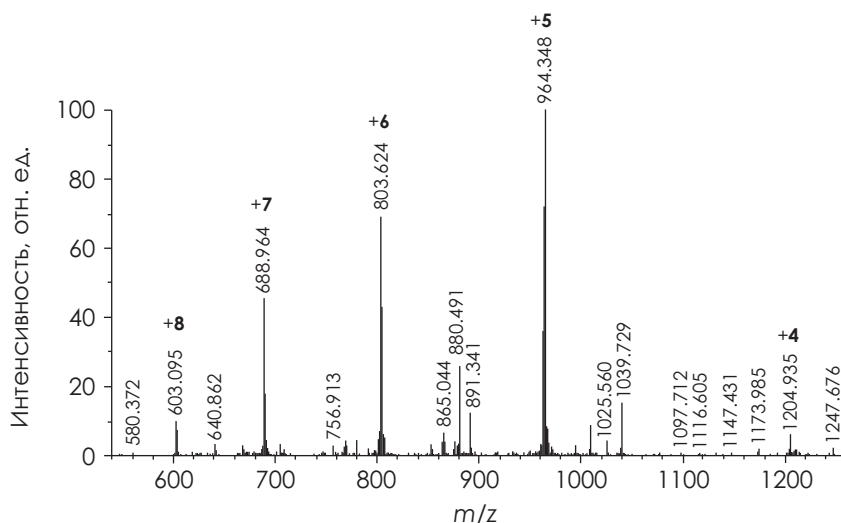


Рис. 1.5. Многозарядные ионы, образующиеся при электрораспылении в ионной ловушке пептида эскулентина 1a с молекулярной массой 4813.6896 Да.

зывают, что для электрораспыления характерно присоединение одного протона на участок цепи аминокислот массой в 1000 Да. Таким образом, белок с молекулярной массой 100 кДа можно зарегистрировать на шкале масс в области m/z 1000. Для глобулярных белков, растворенных в воде, предложена формула (1.1) наиболее вероятного заряда (*J. Fernandez de la Mora, 2000*). В этом случае использована теория постепенной десольватации органического иона в процессе электрораспыления.

$$Z = 0.078 M^{1/2}, \quad (1.1)$$

где Z – заряд, M – молекулярная масса.

Распределение интенсивностей молекулярных ионов в зависимости от числа присоединившихся протонов позволяет исследовать доступность мест протонирования и на базе этой информации делать выводы о высших структурах белковых молекул (*I.A. Kaltashov, S.J. Eyles, 2005*). Еще одним достоинством многозарядных ионов является возможность получения комплементарной информации при активации их фрагментации. Даже обычные спектры диссоциации, активированной соударением, будут несколько отличаться друг от друга в зависимости от числа зарядов иона-предшественника. Суммирование информации при записи этих спектров таких молекулярных ионов позволяет увеличить покрытие сиквенса, что полезно и для идентификации известных пептидов и белков, и для *de novo* секвенирования (см. раздел 6.1). Кроме того, в случае многозарядных ионов появляется возможность использования эффективных альтернативных методов активации фрагментации: диссоциации при захвате электрона и диссоциации при переносе электрона. К недостаткам метода можно отнести требования высокой гомогенности пробы и отсутствия значимых уровней солей (менее 1 миллимоля).

Существуют методы увеличения зарядности белковых ионов, образующихся в условиях ионизации электрораспылением. В частности эффективный подход связан с небольшими добавками в пробу низколетучих суперзаряжающих (supercharging) реагентов (*A.T. Ivarone et al., 2001; H.J. Sterling et al., 2010; S. Yin and R. Loo, 2011*). Наиболее популярными являются нитробензиловый спирт, сульфолан, диметилацетамид, диметилсульфоксид и т. д. В результате таких добавок возрастает степень протонирования пептидов и становится возможным зарегистрировать полипротонированные молекулы высокомолекулярных белков на приборах с небольшим диапазоном масс (рис. 1.6). При работе на приборах с преобразованием Фурье (орбитальная ловушка и ионный циклотронный резонанс) пики таких многозарядных ионов характеризуются улучшенным отношением сигнал/шум, повышенным разрешением и точностью измерения массы (*S.G. Valeja et al., 2010*). Механизм этого явления пока не совсем понятен. Наиболее популярная на сегодняшний день ги-

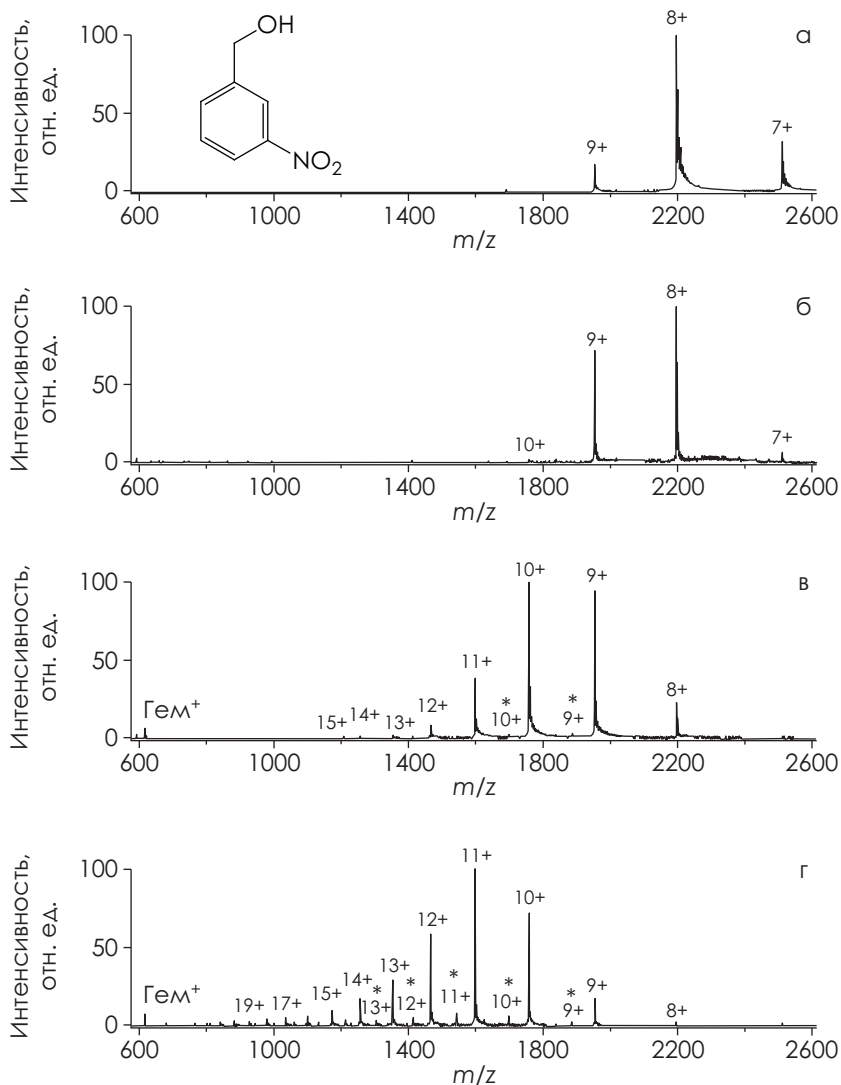


Рис. 1.6. Масс-спектры водного ацетатно-аммонийного раствора 20 μM миоглобина с добавками: а — 0.00%; б — 0.03%; в — 0.10%; г — 0.40% *m*-нитробензилового спирта (формула представлена на рис. 1.6а). * — зарядовые состояния ионов апомиоглобина (*H.J. Sterling et al., 2010*, с разрешения Springer).

потеза связывает возникновение этого эффекта с изменениями поверхностного натяжения в микрокаплях. Хотя в обычных водных растворах суперзаряжающие добавки не вызывают значительных структурных изменений белковых молекул, обогащение микрокапель, образующихся в условиях ионизации электрораспылением, мало летучими добавками приводит к химическому или термическому денатурированию больших молекул в миллисекунд-

ном временном диапазоне. В результате протонированию становятся доступны новые центры.

Л. Чен (*L.C. Chen et al., 2011*) продемонстрировал изменение поведения протонированных молекул в условиях ионизации электрораспылением при повышенном давлении. В частности, можно понизить спонтанное отщепление лабильных групп. Например, миоглобин, нековалентно связанный с железосодержащим порфирином (гемом), легко теряет этот фрагмент в условиях обычного электрораспыления. При повышении давления до 0.4 МПа в спектре ионизации электрораспылением доминирует пик неразрушенного комплекса.

Глава 2 Измерение молекулярной массы пептидов и белков

В настоящее время, когда определены последовательности аминокислотных звеньев миллионов различных пептидов и белков, полностью или частично расшифрованы геномы самых разнообразных организмов, во многих случаях определение молекулярной массы полипептида или белка является конечной стадией эксперимента, которая позволяет с высокой степенью надежности его идентифицировать. Этот процесс достаточно эффективно осуществляется при использовании компьютерных баз данных (например, UniProt, см. главу 5).

Молекулярная масса является важнейшей физико-химической характеристикой любого соединения. В случае пептидов она отражает его аминокислотный состав и наличие модифицирующих заместителей. Масс-спектры и ионизации электрораспылением, и МАЛДИ зачастую представлены исключительно кластером молекулярного иона. Любой анализатор, включая квадруполы и ионные ловушки, дает возможность определить среднюю молекулярную массу (см. ниже) соединения, а разрешающая способность современных времяпролетных анализаторов, орбитальных ловушек и приборов ионного циклотронного резонанса позволяет надежно установить моноизотопную массу, что во многих случаях достаточно для определения элементного состава пептидов.

Вид спектра ионизации электрораспылением или МАЛДИ тяжелых молекул (рис. 2.1) значительно отличается от классического вида спектра ионизации электронами. Обычные правила работы со спектрами ионизации электронами, фактически, становятся неэффективными для соединений с молекулярной массой более 1500 Да. Прежде всего, это касается изотопной картины в кластере молекулярного иона. Например, наличие в молекуле 100 атомов углерода, за счет присутствия одного атома ^{13}C , приведет к тому, что интенсивность пика $M+1$ составит 110 % от интенсивности пика M , обусловленного только изотопами ^{12}C . Пики $M+2$ и $M+3$, обусловленные двумя и тремя атомами ^{13}C в молекуле, будут иметь интенсивности 60 и 22 % соответственно. Даже водород, который учитывается при расшифровке спектра ионизации электронами как моноизотопный элемент, поскольку среднее природное содержание дейтерия составляет всего 0.015 % от содержания протия, приведет к появлению значимого изотопного пика $M+1$, если число атомов водорода

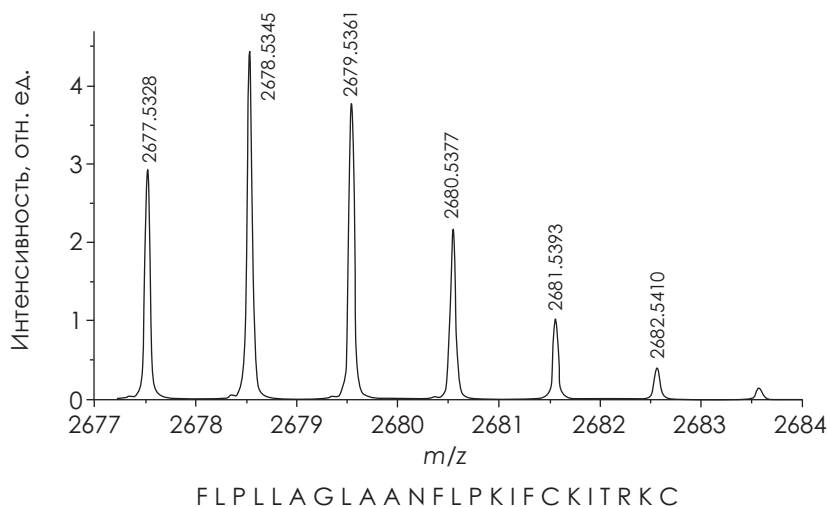


Рис. 2.1. Область молекулярного иона (протонированной молекулы) пептида $C_{128}H_{209}N_{31}O_{27}S_2$.

в молекуле более 100. Другие элементы, практически всегда присутствующие в составе биологических молекул (N, O, S), усложняют изотопную картину еще значительно. В результате, огромное число изотопных пиков проявляется в масс-спектре в виде широкого сигнала, ширина которого для сложных белков может составлять тысячи Дальтон. Ситуация несколько упрощается при использовании приборов ионного циклотронного резонанса с разрешающей способностью в несколько миллионов, однако с ростом молекулярной массы исследуемых соединений и этот метод позволяет получить лишь огибающую изотопных пиков молекулярного иона. Неправильно считать, что увеличение разрешающей способности однозначно ведет к увеличению точности измерения массы. Можно достаточно точно измерить среднюю молекулярную массу пептида или белка по максимуму огибающей изотопного кластера на приборе, не обладающем высоким разрешением.

Кроме того, для высокомолекулярных соединений кумулятивный эффект дефектов масс (А.Т. Лебедев, 2003) атомов становится значительным и ведет к существенным отклонениям номинальной массы, рассчитанной на основе целочисленных атомных масс элементов, от регистрируемой массы. На рис. 2.1 продемонстрировано различие между используемыми вариантами термина «молекулярная масса соединения». Поскольку в спектре представлена протонированная молекула, все величины молекулярной массы для этого пептида, о которых пойдет речь ниже, меньше на массу одного протона, а все изотопные пики на рис. 2.1 характеризуют ион $[M+H]^+$. Пик протонированной молекулы с номинальной массой 2676 Да в масс-спектре соединения

$C_{128}H_{209}N_{31}O_{27}S_2$ отсутствует, поскольку суммарный дефект массы оказывается больше 1 Да. Минимальную массу в спектре имеет пик с моноизотопной массой. Ее величина составляет 2677.5328 Да. Интенсивность этого пика уступает интенсивностям последующих двух пиков из-за большей вероятности присутствия в молекуле 1–2 более тяжелых изотопов. В связи с этим для спектров «тяжелых» соединений приходится вводить еще несколько определений молекулярной массы (рис. 2.1).

Номинальная масса — молекулярная масса, рассчитанная суммированием целочисленных атомных масс наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Моноизотопная масса — молекулярная масса, рассчитанная суммированием точных атомных масс (с учетом дефекта массы) наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Наиболее распространенная масса — масса иона, пик которого наиболее интенсивен в кластере молекулярного иона.

Средняя масса — молекулярная масса, рассчитанная суммированием усредненных атомных масс элементов (с учетом масс и распространенности изотопов).

Даже на приборе с разрешающей способностью 100 000, на котором был получен представленный на рис. 2.1 спектр пептида $C_{128}H_{209}N_{31}O_{27}S_2$, не удастся увидеть тонкую составную структуру изотопных пиков. Следующий за пиком с моноизотопной массой пик иона с m/z 2678.5345 состоит из пяти индивидуальных неразрешенных пиков, обусловленных присутствием изотопов 2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S (рис. 2.2). Рассчитаем массы и относительные интенсивности этих пиков. Присутствие одного атома дейтерия в молекуле приведет к появлению пика иона с массой 2678.5391 Да и относительной интенсивностью 4.18% к моноизотопному с m/z 2677.5328 или 2.6% в сумме интенсив-

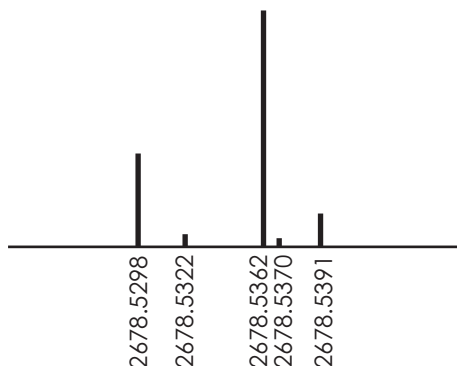


Рис. 2.2. Рассчитанный вид изотопного пика $MH+1$ в спектре пептида $C_{128}H_{209}N_{31}O_{27}S_2$ при разрешающей способности прибора 4 000 000.