



УДК 577.112.088.5:543.51

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ MALDI-MS ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

© 2000 г. О. А. Миргородская[#], Ю. П. Козьмин*, М. И. Титов*, Н. В. Савельева,
Р. Кернер**, К. Сонксэн**, А. И. Мирошников*, П. Ройпсторфф**

Институт цитологии РАН, 198103, С.-Петербург, Тихорецкий пр., 4;

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

** Университет Южной Дании, Оденсе, Дания

Поступила в редакцию 28.03.2000 г. Принята к печати 20.04.2000 г.

Представлен модифицированный метод “изотопного разбавления” для количественного определения олигопептидов и белков на субпикомольном уровне применительно к MALDI-MS. Сущность метода состоит в количественном анализе не исходных соединений, а продуктов их ферментативного гидролиза, что позволяет осуществлять измерения в области с большим разрешением для MALDI-MS, а также делает этот метод независимым от молекулярной массы анализируемых олигопептидов и белков. В качестве внутреннего стандарта используются меченные стабильным изотопом ^{18}O продукты гидролиза тем же ферментом анализируемого олигопептида или белка известной концентрации. Включение изотопной метки обеспечивается посредством проведения гидролиза в среде H_2^{18}O . Вычисление концентрации олигопептида или белка в анализируемой пробе осуществляется на основании анализа изотопного распределения в масс-спектре смеси меченых и немеченых продуктов гидролиза.

Предлагаемый подход опробован на примере определения концентраций фрагмента 1–14 ангиотензиногена и двух белков – внеклеточной РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens* и ее белкового ингибитора барстара М. Продемонстрирована возможность использования данного метода для кинетических измерений.

Ключевые слова: пептиды и белки, количественный анализ; MALDI-MS; ^{18}O -меченые стандарты; ферментативный гидролиз; кинетические измерения.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время MALDI-масс-спектрометрия (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, MALDI-MS) – один из лучших методов для идентификации различных биологически активных соединений, включая биополимеры. Этот метод отличается высокой чувствительностью и позволяет идентифицировать соединения в смесях без их предварительного фракционирования [1–4].

Возможности метода были бы существенно расширены, если бы он позволял наряду с идентификацией индивидуальных соединений осуществ-

лять их количественное определение в смесях. Однако хорошо известно, что при использовании MALDI-MS не может быть воспроизведена абсолютная интенсивность регистрируемых квазимолекулярных ионов для каждого из индивидуальных соединений [4, 5]. Вместе с тем можно полагать, что изотопное распределение для каждого из таких ионов будет обладать хорошей воспроизводимостью. Это открывает возможность использования для количественного анализа с помощью MALDI-MS метода “изотопного разбавления”.

Однако использование “изотопного разбавления” в классическом варианте для масс-спектрометрического способа детектирования требует наличия изотопномеченного стандарта с известной концентрацией для каждого анализируемого вещества. Предлагаемый нами метод заключается в измерении концентрации не исходного биополимера, а какого-либо из продуктов его гидролитического расщепления в присутствии внутреннего стандарта, полученного гидролитическим расщеплением в H_2^{18}O этого же полимера с известной концентрацией.

Сокращения: MALDI-MS – масс-спектрометрия с использованием лазерной десорбции с матрицы; $[\text{O}_0]P^{1-8}$, $[\text{O}_1]P^{1-8}$, $[\text{O}_2]P^{1-8}$ – ангиотензин II без изотопа ^{18}O , с одним и двумя ^{18}O соответственно; T^{49–58}, T^{98–107}, T^{72–82} и T^{87–97} – пептиды из триптического гидролизата РНКазы; T^{3–11} – пептид из триптического гидролизата барстара М; НССА – α -циано-4-гидроксикоричная кислота; ДНВ – 2,5-дигидробензойная кислота.

[#] Автор для переписки (e-mail: oam@om1533.spb.edu; тел.: (812) 247-37-95; факс: (812) 247-03-41).

Анализ биополимера на основе анализа продуктов его гидролиза позволяет проводить измерения в более низкомолекулярной области масс-спектра, где изотопное отношение может быть определено с большей точностью. Использование данного подхода в сочетании с MALDI-MS обеспечивает достаточную точность и высокую чувствительность анализа. На основании результатов измерений, произведенных с помощью предложенного подхода, может быть вычислена исходная концентрация биополимера.

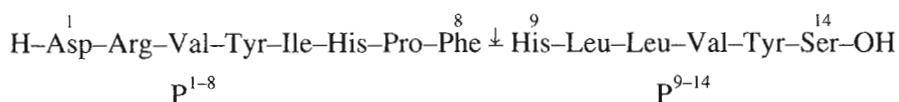
Возможность количественных измерений позволила распространить предложенный подход для проведения кинетических исследований.

В настоящей работе описывается использование предлагаемого подхода для определения концентрации олигопептида – ангиотензиногена-(1-14), фрагмента ангиотензиногена лошади, и двух бел-

ков – внеклеточной РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens* и модифицированной формы ее белкового ингибитора – барстара (барстара М), в которой оба остатка Cys заменены на Ala. Также демонстрируется использование подхода для проведения кинетических измерений на примере ферментативного гидролиза ангиотензиногена-(1-14).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика стандарта ангиотензиногена-(1-14). Для количественного анализа пептидов и белков в рамках предложенного подхода рационально проводить гидролиз с использованием протеиназ. В нашем случае мы использовали химазу [6]. Этот фермент, как нами было показано, осуществляет в ангиотензиногене-(1-14) разрыв пептидной связи Phe-His с образованием двух пептидов P¹⁻⁸ (ангиотензина II) и P⁹⁻¹⁴:



В соответствии с брутто-формулой пептида P¹⁻⁸, полученного при гидролизе ангиотензиногена-(1-14) в обычной воде, моноизотопная масса наиболее легкого квазимолекулярного иона с протоном будет равна 1046.5 Да. Сигнал квазимолекулярного иона этого пептида вследствие наличия в нем изотопа ¹³C представляет собой мультиплет с убывающим соотношением интенсивностей 100 : 62.3 : 21.3 : 5.0 : 0.7 (рис. 1а).

При гидролизе в H₂¹⁸O наиболее интенсивный пик будет соответствовать значению m/z 1048.5, то есть массе пептида, увеличенной на 2 Да. Из рис. 1б видно, что действительно регистрируется образование [¹⁸O₁]P¹⁻⁸. Наличие слабоинтенсивного пика с m/z 1046.5, соответствующего этому пептиду без ¹⁸O, т.е. [¹⁸O₀]P¹⁻⁸, обусловлено присутствием в H₂¹⁸O некоторого количества H₂¹⁶O.

Следует отметить также, что при гидролизе в присутствии H₂¹⁸O возможно введение более чем одного изотопа ¹⁸O при увеличении времени реакции до 48 ч (рис. 1в). Это обусловлено продолжающимся в присутствии фермента, хотя и более медленным изотопным обменом. Это характерно и для других протеиназ [7–9].

На рис. 2 приведен пример изотопного распределения для квазимолекулярных ионов (исходя из брутто-формулы) для каждой индивидуальной O-изотопной формы пептида P¹⁻⁸ (а–в) и суммы всех трех форм пептида, присутствующих в эквимольном соотношении (г). В нашем эксперименте для определения содержания всех O-изотопных форм пептида решалась, соответственно, об-

ратная задача – разложение суммарного спектра на сумму спектров индивидуальных форм. Относительное содержание каждой из O-изотопных форм рассчитывалось пропорционально сумме интенсивностей всех ее изотопных пиков.

Для получения стандарта процесс включения ¹⁸O в P¹⁻⁸ при гидролизе ангиотензиногена-(1-14) химазой в H₂¹⁸O останавливали на разных стадиях: через 4 ч (стандарт 1, S1) и после частичного обмена кислорода (48 ч) с целью получения пептида P¹⁻⁸ с двумя включенными изотопами ¹⁸O (стандарт 2, S2). Отметим, что в принципе не имеет значения, какое количество ¹⁸O присутствует в стандарте – важно, чтобы в нем было предвари-

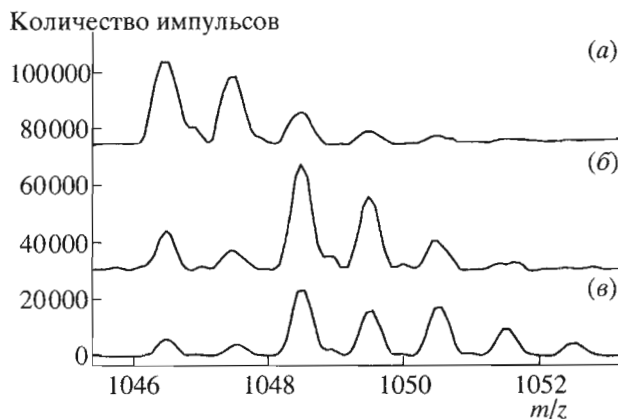


Рис. 1. Фрагменты MALDI-MS-спектра гидролизатов ангиотензиногена-(1-14) в присутствии химазы в обычной воде (а) и в тяжелой воде через 4 (б) и 48 ч (в).

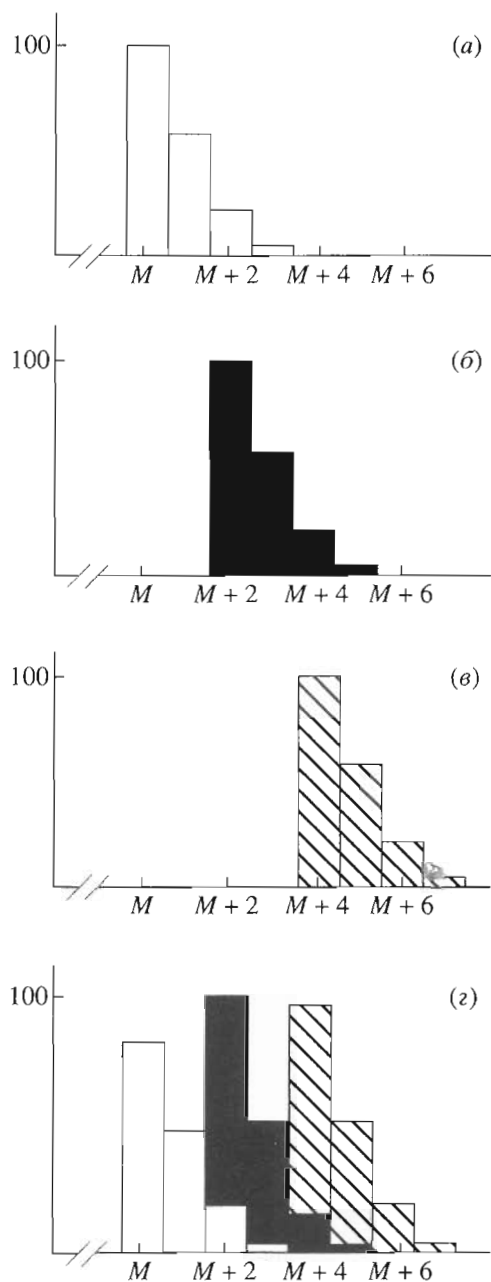


Рис. 2. Диаграммы изотопного распределения для $[^{18}\text{O}_0]\text{P}^{1-8}$ (а), $[^{18}\text{O}_1]\text{P}^{1-8}$ (б), $[^{18}\text{O}_2]\text{P}^{1-8}$ (в) и суммарной смеси этих субстанций в эквимольной концентрации (г).

тельно определено изотопное распределение. Использование двух внутренних стандартов с одним и двумя включениями ^{18}O представляется нам полезным, так как постоянство соотношения между *O*-изотопными формами в анализируемых смесях в процессе измерений может служить дополнительным контролем отсутствия нежелательных обменных процессов, могущих исказить результаты.

Количественное определение ангиотензиногена-(1-14) на основании изотопного распределения. Контроль за гидролизом ангиотензиногена-(1-14) и изотопное соотношение в пептиде P^{1-8} , используемом в качестве стандарта, определяли с помощью MALDI-MS (табл. 1, 2).

Из раствора анализируемого образца ангиотензиногена-(1-14), гидролизованного в обычной воде, и гидролизата, содержащего один из стандартов с ^{18}O (S1 или S2), были приготовлены смеси в разных соотношениях. В смесях контролировали изотопное распределение (табл. 3). Примеры результатов расчета содержания ангиотензиногена-(1-14), полученных из изотопного распределения пептида P^{1-8} для каждого из стандартов, представлены в табл. 1 и 2 и соответствуют опытам 1 и 4 в табл. 3.

Значения относительной интенсивности, приведенные в первой и последней строке в табл. 1 и 2, получены измерением площадей изотопных пиков в экспериментальных масс-спектрах стандартного раствора и смеси с гидролизатом анализируемого образца соответственно. Значения относительной интенсивности во второй строке вычислены исходя из брутто-формулы пептида P^{1-8} и распространенности изотопов в природе. Программа для таких расчетов обычно входит в обеспечение большинства современных масс-спектрометров. Относительную интенсивность вычисляют процентом от их сумм площадей изотопных пиков в строке.

Количественное соотношение стандарта и образца в смеси вычисляются посредством решения переопределенной системы линейных уравнений. В математическом смысле задача сводится к нахождению разложения вектора по заданному базису. Решение задачи достаточно просто (см. Приложение) и может быть получено с помощью математических функций табличного редактора без привлечения специальных математических пакетов.

Как следует из данных табл. 3, средняя ошибка по всем 16 выполненным измерениям не превышает 8%, причем основной вклад в нее вносят приборные погрешности измерения изотопных распределений. Для минимизации же собственно ошибки метода рекомендуется пользоваться стандартом, более обогащенным изотопом ^{18}O . От этого численное решение системы линейных уравнений будет более устойчиво.

Использование MALDI-MS в кинетических исследованиях на примере определения накопления ангиотензина II (пептида P^{1-8}) при гидролизе ангиотензиногена-(1-14) химазой. В описанном выше эксперименте в действительности измеряли концентрацию не самого ангиотензиногена-(1-14), а его фрагмента P^{1-8} . Вместе с тем наличие стан-

Таблица 1. Характеристика стандарта 1 для определения концентрации ангиотензиногена-(1-14)*

Проба	Относительная интенсивность первых 6 пиков, %						Концентрация ангиотензиногена-(1-14), мкМ	
	<i>M</i>	<i>M</i> + 1	<i>M</i> + 2	<i>M</i> + 3	<i>M</i> + 4	<i>M</i> + 5	эксперимент.	заданная
Стандарт	7.2	4.9	32.5	20.1	23.6	11.7	–	1.72
Образец	52.8	32.9	11.3	2.6	0.4	0	0.54	0.52
Смесь	17.8	11.5	24.2	17.6	17.8	11.1	2.26	2.24

* Пример расчета концентрации ангиотензиногена-(1-14) в растворе анализируемого образца, исходя из изотопного соотношения в смеси растворов образца и стандарта и известной концентрации стандарта S1.

Таблица 2. Характеристика стандарта 2 для определения концентрации ангиотензиногена-(1-14)*

Проба	Относительная интенсивность первых 6 пиков, %						Концентрация ангиотензиногена-(1-14), мкМ	
	<i>M</i>	<i>M</i> + 1	<i>M</i> + 2	<i>M</i> + 3	<i>M</i> + 4	<i>M</i> + 5	эксперимент.	заданная
Стандарт	3.4	2.0	23.3	16.1	35.0	20.2	–	4.56
Образец	52.8	32.9	11.3	2.6	0.4	0	0.61	0.54
Смесь	9.3	5.8	25.7	15.2	31.8	17.7	5.17	5.10

* Пример расчета концентрации ангиотензиногена-(1-14) в растворе анализируемого образца, исходя из изотопного соотношения в смеси растворов образца и стандарта и известной концентрации стандарта S2.

Таблица 3. Количественное определение ангиотензиногена-(1-14) с использованием ¹⁸O-меченого пептида P¹⁻⁸ в качестве внутреннего стандарта

Номер опыта	Концентрация стандарта в смеси*, мкМ	Относительная интенсивность первых 6 пиков для смеси, %						Концентрация ангиотензиногена-(1-14), мкМ	
		<i>M</i>	<i>M</i> + 1	<i>M</i> + 2	<i>M</i> + 3	<i>M</i> + 4	<i>M</i> + 5	эксперимент.	заданная
1	1.72	17.8	11.5	24.2	17.6	17.8	11.1	0.54	0.52
		16.3	10.2	27.4	15.7	20.0	10.4	0.41	0.52
		18.3	11.4	26.2	14.8	19.2	10.1	0.53	0.52
2	1.36	32.1	20.0	21.5	10.8	10.4	5.1	1.63	1.63
		29.7	18.5	23.1	11.9	11.3	5.5	1.3	1.63
		32.7	20.4	21.8	10.9	9.6	4.6	1.7	1.63
		30.8	19.2	21.4	10.8	11.7	5.9	1.47	1.63
3	0.77	39.8	24.8	17.9	7.9	6.5	3.1	2.32	2.60
		40.8	25.4	18.5	8.1	5.0	2.1	2.54	2.60
4	4.56	9.3	5.8	25.7	15.2	31.8	17.7	0.61	0.54
		9.8	6.1	23.1	13.6	30.3	17.1	0.68	0.54
5	2.85	18.5	11.5	18.9	10.2	25.9	14.8	1.22	1.35
		21.3	13.3	21.0	11.3	21.3	11.8	1.67	1.35
6	1.9	28.4	17.7	17.7	8.7	17.7	9.9	1.96	1.80
		26.2	16.3	17.9	9.0	19.5	11.0	1.63	1.80
7	1.14	35.2	21.9	17.3	8.3	10.9	5.8	2.36	2.16

* Для первых трех смесей использован стандарт S1 (см. табл. 1); в качестве матрицы для измерений использована HCCA. Для остальных смесей использовали стандарт S2 (см. табл. 2), в качестве матрицы – DHB.

дарта этого пептида [¹⁸O]P¹⁻⁸ открывает возможности для определения его текущих концентраций с помощью MALDI-MS в процессе гидролиза. Для этого в отобранные аликвоты реакционной смеси на разных степенях превращения исходно-

го субстрата можно внести стандарт, как это было сделано выше. Однако на наш взгляд более рационально внесение стандарта до начала реакции. Тогда, отбирая аликвоты из реакционной смеси по ходу гидролиза и контролируя измене-

Таблица 4. Масс-спектрометрический контроль за накоплением ангиотензина II (пептида P¹⁻⁸) при гидролизе ангиотензиногена-(1-14) химазой*

Номер опыта	Время реакции, мин	Относительные интенсивности первых 6 пиков в смеси, %						Концентрация ангиотензина II**
		M	M + 1	M + 2	M + 3	M + 4	M + 5	
1	0	5.5	4.3	22.3	15.7	6.9	2.4	0
2	3.5	11.38	7.49	25.05	19.31	9.62	3.8	5.8
		11.5	7.75	27.39	19.78	9.49	4.01	4.0
3	6	19.08	12.8	41.0	27.38	14.65	5.78	13.4
		18.61	13.32	40.93	27.93	16.62	6.0	11.8
4	9	31.7	20.1	57.0	43.7	23.1	6.1	18.2
		25.9	15.3	51.3	29.9	16.9	5.4	19.8
5	12	22.70	17.77	44.79	26.81	11.32	5.5	26.4
		30.06	20.98	47.69	39.61	16.06	6.8	28.9
6	14	26.28	18.58	45.58	28.93	13.75	6.25	32.5
		28.71	19.44	44.0	30.38	16.67	6.45	34.9
7	16	42.0	32.5	62.9	40.3	22.2	10.8	41.6
		31.3	22.75	41.60	23.55	14.4	6.1	52.2
8	20	34.74	27.77	42.92	31.02	16.04	6.45	53.4
		31.8	19.4	33.45	20.2	8.83	6.1	66.5
9	25	31.3	20.28	35.46	21.26	10.23	6.3	62.0
		30.43	20.43	34.28	22.36	9.29	5.9	63.2
10	35	26.5	18.0	21.9	15.2	7.4	3.0	83.6
		24.9	17.3	23.0	15.0	5.7	2.8	80.0
11	60	26.8	19.3	22.35	12.9	5.9	2.5	79.2
		40.5	23.5	30.5	20.1	9.4	4.1	89.6
12	120	41.1	24.9	27.9	17.3	8.3	3.5	100.0

* Масс-спектрометрические характеристики использованного стандарта, ¹⁸O-меченого ангиотензина II, соответствуют изотопному распределению в нулевой момент времени.

** Концентрация выражена в % по отношению к исходной концентрации субстрата.

ние изотопного распределения по ¹⁸O для пептида P¹⁻⁸, мы можем определять текущую концентрацию вновь образующегося пептида. Это позволит избежать дополнительных ошибок, связанных с приготовлением смесей растворов образца и стандарта. Результаты такого эксперимента обобщены в табл. 4, а также на рис. 3, где параллельно представлены данные по контролю за ходом этой реакции с помощью ВЭЖХ. Отметим хорошее совпадение данных, полученных двумя методами.

В приведенном выше примере знание концентрации стандарта на самом деле не так необходимо. Текущая концентрация может быть рассчитана исходя из соотношения изотопных форм пептида P¹⁻⁸ для двух моментов: перед добавлением фермента и после завершения реакции, когда полностью гидролизуется исходный субстрат, концентрация которого известна.

Возможность определения текущих концентраций в гидролизатах (по сути, скоростей реакции) позволяет предложить MALDI-MS для оценки широкого круга параметров самих ферментов, таких, как активность, pH-оптимум, k_{cat} , K_m , кинетические константы инактивации.

При этом удачный выбор субстрата и наличие нужного стандарта позволит определять эти параметры в смесях сложного состава без предварительного фракционирования.

MALDI-MS-анализ РНКазы и ее белкового ингибитора барстара М. При определении концентрации белка по пептидам – продуктам его ферментативного гидролиза, важно выбрать фермент с достаточно узкой специфичностью, который приводил бы к образованию отдельных фрагментов белка в эквимольных количествах. В качестве такого фермента может быть использован трипсин, гидролизующий пептидные связи вблизи основных аминокислот – Lys и Arg. Наличие Lys и Arg в дополнение к первичной аминогруппе для пептидов способствует образованию положительных квазимолекулярных ионов. Кроме того, при исчерпывающем триптическом гидролизе, как правило, отсутствуют перекрывающиеся фрагменты. Показано также, что трипсин достаточно быстро обменивает два атома кислорода, что является привлекательным свой-

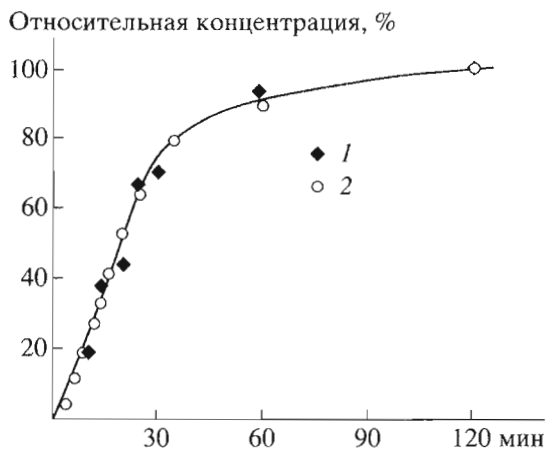


Рис. 3. Кинетические кривые накопления ангиотензина II (P^{1-8}) при гидролизе ангиотензиногена-(1-14) химазой по данным ВЭЖХ (1) и MALDI-MS (2). Масс-спектрометрические данные представлены в виде средних значений для всех измерений в каждый момент времени.

интенсивности пика $[^{18}O_0]P^{1-8}$ с двумя изотопами ^{13}C приближается к значению интенсивности первого изотопного пика $[^{18}O_1]P^{1-8}$.

В эксперименте с РНКазой при триптическом гидролизе образуется несколько таких подходящих пептидов с хорошей интенсивностью (рис. 4, табл. 5). При гидролизе в присутствии тяжелой воды практически все пептиды содержат один или два изотопа ^{18}O . Причем все они, как показывают расчеты с учетом их обычного изотопного распределения, имеют практически одинаковое соотношение ^{18}O -изотопных форм (см. табл. 5). Этот гидролизат, полученный из РНКазы с известной концентрацией в тяжелой воде, далее использовали в качестве стандарта. Аналогичным образом получен контрольный гидролизат РНКазы в обычной воде. Для остановки гидролиза и предупреждения изотопного обмена в анализируемые смеси добавляли ингибитор трипсина из сои в 1.2-кратном избытке по сравнению с трипсином. Оба гидролизата использованы для приготовления смесей, в которых измеряли изотопное распределение для четырех выбранных пептидов. По всем четырем пептидам из сопоставления измеренного изотопного распределения в смеси и в стандарте с известной концентрацией рассчитывали содержание РНКазы в анализируе-

ством, поскольку увеличивается разница между массами стандартного и анализируемого пептида. Например, это становится важным в том случае, когда содержание пептида P^{1-8} без ^{18}O существенно превышает содержание P^{1-8} с ^{18}O , то есть вклад

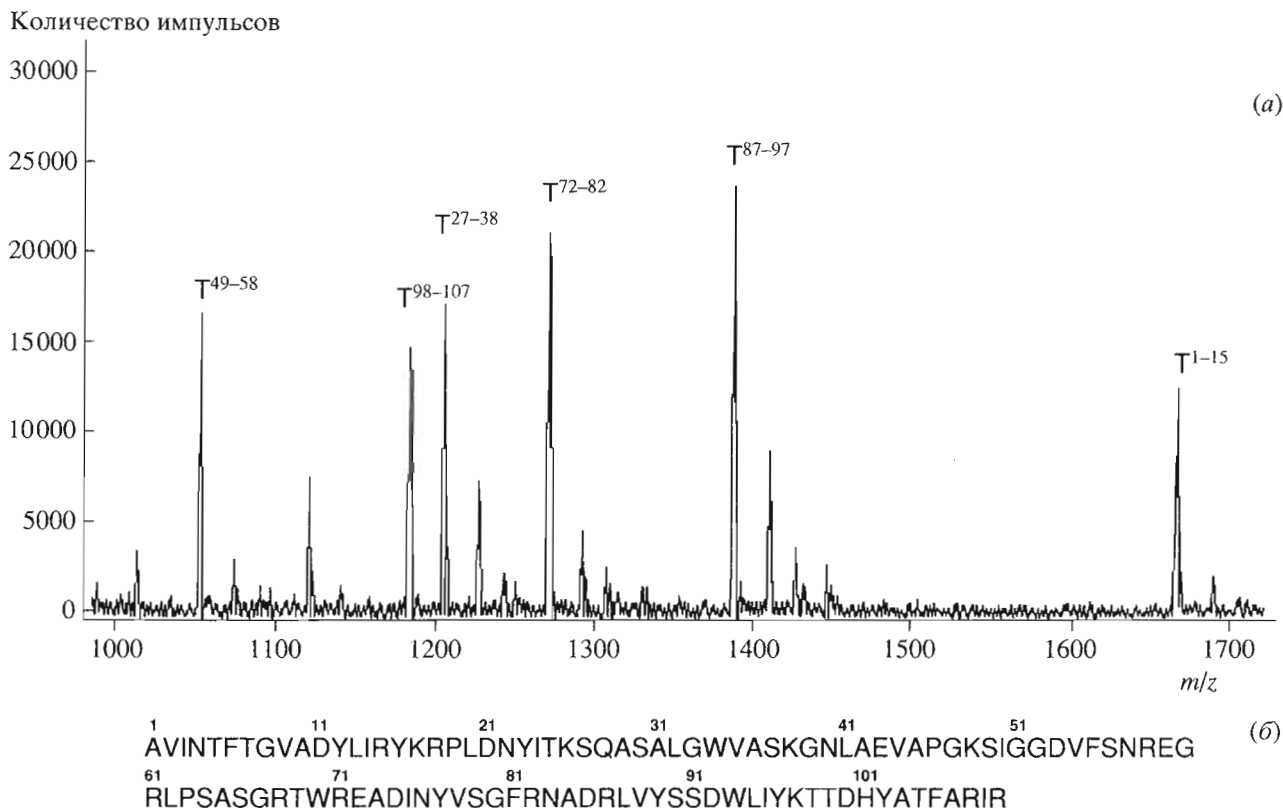


Рис. 4. Фрагменты MALDI-MS-спектра триптических гидролизатов РНКазы (а) и ее последовательность (б).

Таблица 5. *O*-Изотопное распределение в пептидах триптического гидролизата РНКазы, использованного в качестве стандарта

Пептид	Моноизотопная масса пептида, Да	Соотношение ¹⁸ O-изотопных форм пептидов, %		
		[¹⁸ O ₀]	[¹⁸ O ₁]	[¹⁸ O ₂]
T ⁴⁹⁻⁵⁸	1050.5	1.4	21.8	75.7
T ⁹⁸⁻¹⁰⁷	1181.5	1.8	20.6	77.6
T ⁷²⁻⁸²	1269.6	2.0	20.1	77.9
T ⁸⁷⁻⁹⁷	1385.6	1.6	17.4	82.0

Таблица 6. Определение концентрации РНКазы с помощью MALDI-MS по *O*-изотопному распределению для четырех пептидов триптического гидролизата РНКазы (T⁴⁹⁻⁵⁸, T⁹⁸⁻¹⁰⁷, T⁷²⁻⁸² и T⁸⁷⁻⁹⁷)

Номер опыта	Концентрация стандарта, мкМ	Концентрация РНКазы, мкМ				
		заданная	измеренная по триптическим пептидам			
			T ⁴⁹⁻⁵⁸	T ⁹⁸⁻¹⁰⁷	T ⁷²⁻⁸²	T ⁸⁷⁻⁹⁷
1	1.25	1.52	1.53	1.49	1.54	1.47
2	1.25	1.52	1.58	1.50	1.50	1.41
3	0.83	2.03	2.10	2.06	2.06	2.15

мом образце. Результаты анализа смесей представлены в табл. 6.

Как видно из приведенных данных (табл. 5, 6), для всех пептидов в стандарте соотношение *O*-изотопных форм сопоставимо, и данные по че-

тырем пептидам дают для РНКазы значения концентрации, близкие к заданным.

Из триптического гидролизата ингибитора РНКазы барстара М был выбран пептид T³⁻¹¹ с моноизотопной массой 998.55 Да (рис. 5). Как и в

Количество импульсов

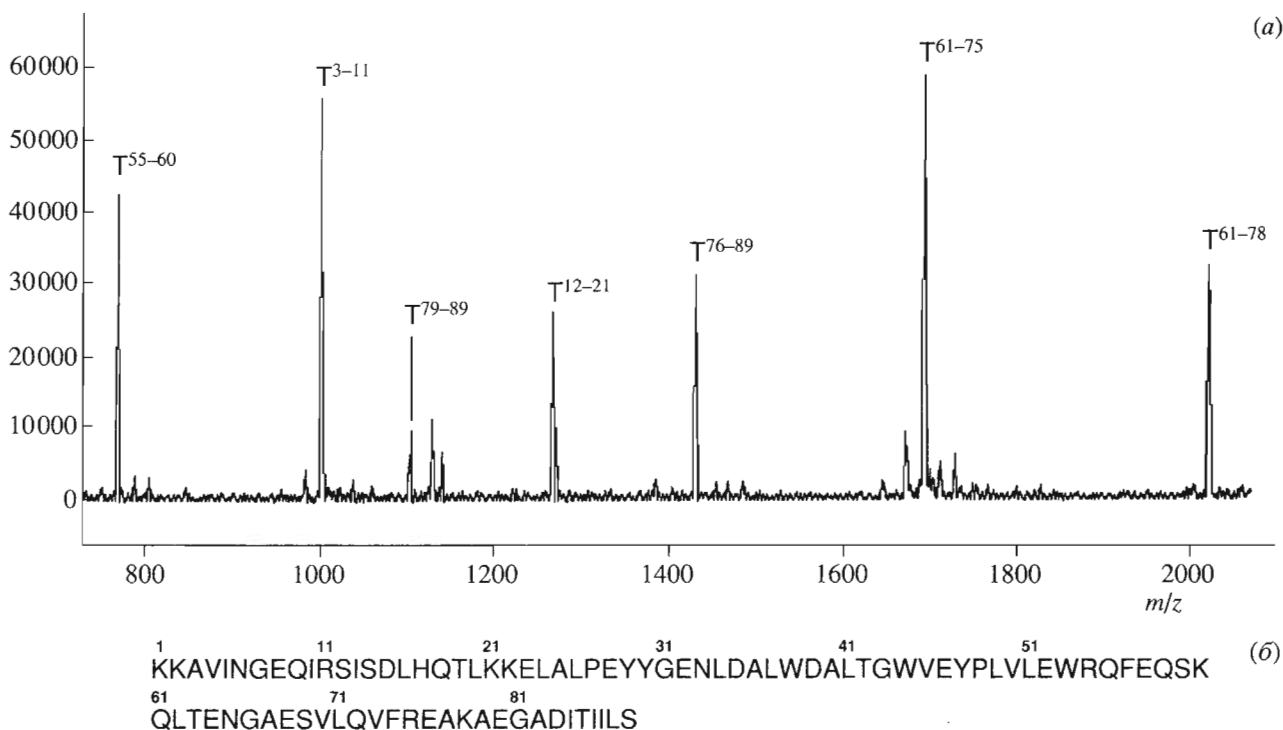
**Рис. 5.** Фрагменты MALDI-MS-спектра триптических гидролизатов барстара М (а) и его последовательность (б).

Таблица 7. Характеристика стандарта для определения концентрации барстара М*

Проба	Относительная интенсивность первых 6 пиков в смеси, %						Концентрация барстара М, мкМ	
	<i>M</i>	<i>M</i> + 1	<i>M</i> + 2	<i>M</i> + 3	<i>M</i> + 4	<i>M</i> + 5	эксперимент.	заданная
Стандарт	7.9	4.4	29.7	15.6	28.6	13.9	–	4.50
Образец	56.8	30.8	9.7	2.3	0.5	0.1	0.55	0.50
Смесь	13.2	7.1	27.7	14.3	25.3	12.3	5.05	5.00

* Пример расчета концентрации барстара М по пептиду T³⁻¹¹.

Таблица 8. Определение концентрации барстара М с помощью MALDI-MS по *O*-изотопному распределению для пептида T³⁻¹¹, продукта триптического гидролиза барстара М

Номер смеси	Концентрация стандарта, мкМ	Концентрация барстара М, мкМ		Номер смеси	Концентрация стандарта, мкМ	Концентрация барстара М, мкМ	
		эксперимент.	заданная			эксперимент.	заданная
1	4.5	0.55	0.50	4	3.25	1.74	1.75
2	3.75	1.28	1.25	5	2.25	3.15	2.75
3	3.5	1.54	1.5	6	2.0	3.29	3.0

случае РНКазы, были получены два триптических гидролизата – контрольный (в обычной воде) и содержащий стандарт (в тяжелой воде). Из этих растворов были приготовлены смеси, которые анализировали масс-спектрометрически с целью определения изотопных соотношений в пептиде T³⁻¹¹. На основании относительной интенсивности 6 изотопных пиков в каждой смеси рассчитывали содержание ингибитора в контрольных растворах. Пример расчета концентрации барстара М приведен в табл. 7. Результаты анализа всех приготовленных смесей представлены в табл. 8.

Как следует из данных табл. 8, ошибка в определении концентрации ингибитора не превышает 5% при минимальном количестве образца, взятого на анализ, 0.5 пмоль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен метод количественного определения олигопептидов и белков на субпикомольном уровне, основанный на анализе изотопного распределения в масс-спектрах продуктов их ферментативного гидролиза в присутствии изотопномеченых внутренних стандартов. Преимущество метода заключается в доступности для этих продуктов изотопномеченых стандартов, поскольку последние легко могут быть получены той же реакцией в среде H₂¹⁸O. Таким образом, для количественного определения биополимера в образце оказывалось достаточным наличие его стандартного раствора с известной концентрацией. При этом одна и та же реакция ферментативного гидролиза, применяемая к анализируемому образцу дает продукты для масс-спектрометрического измерения, а применяемая к стандартному раствору в среде H₂¹⁸O – их изотопномеченые аналоги.

Метод не требует никаких операций по предварительному фракционированию или очистке полученных продуктов.

Алгоритм, основанный на решении переопределенной системы линейных уравнений, позволяет вычислить соотношение меченого и немеченого продуктов в смеси несмотря на частичное наложение их сигналов в масс-спектре.

Преимуществом предложенного подхода является и снятие ограничений на молекулярный вес анализируемых белков, поскольку ферментативный гидролиз позволяет получать из них относительно низкомолекулярные продукты гидролиза, масс-спектры которых могут быть получены с достаточно высоким разрешением.

Несмотря на то что данная статья посвящена анализу олигопептидов и белков, метод может быть использован и для количественного анализа таких биополимеров, как олигонуклеотиды и олигосахариды, а также и для других соединений, которые могут быть подвержены гидролизу.

Метод идеально подходит для кинетических исследований гидролаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химотрипсиноподобная дуоденаза быка (химаза) [6] была любезно предоставлена Т.С. Замоладчиковой и Е.А. Соколовой (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва).

Бычий трипсин, ангиотензиноген-(1-14) лошади и соевый ингибитор трипсина производства фирмы "Serva" (Германия).

Внеклеточная РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens* и ее внутриклеточный белковый ингибитор

барстар М получены по ДНК-рекомбинантной технологии, выделены и затем очищены согласно [10] А. Дементьевым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва).

В работе использована тяжелая вода H_2^{18}O с 95–98% содержанием изотопа ^{18}O (Cambridge Isotope Laboratories, Англия).

MALDI-масс-спектры были сняты на приборе PerSeptive Voyager Elite с использованием специальной технологии (delayed ion extraction). Все спектры получены в режиме съемки положительных ионов суммированием 256 лазерных импульсов на один спектр. В качестве матриц использованы α -циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA) и 2,5-дигидробензойная кислота (DHB) производства фирмы "Serva" и "Aldrich" (США) соответственно.

Использованы растворы этих матриц (25 мг/мл) в ацетонитриле с 0.1% трифторуксусной кислотой (TFA) в объемном соотношении 7 : 3.

Для масс-спектрометрических измерений 0.3 мкл пробы наносили на мишень в 0.3 мкл раствора матрицы и 0.3 мкл 2% TFA. Во всех случаях, за исключением того, где это специально оговорено, в качестве матрицы использовали DHB.

ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милюхром" (ПО "Научприбор") на колонке из нержавеющей стали (2 × 62 мм) с сорбентом Nucleosil 5 C_{18} (Macherey Nagel). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 50% (по объему) в растворе 0.1% TFA со скоростью 0.1 мл/мин. Концентрации исходного субстрата и продуктов его гидролиза оценивали по площадям хроматографических пиков с учетом молярных коэффициентов поглощения, рассчитанных по аддитивной схеме [11].

Гидролиз ангиотензиногена-(1-14) химазой для его количественного определения проводили в 0.1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7.8, в присутствии обычной или тяжелой воды (H_2^{18}O) в стационарных условиях при весовом соотношении фермент-субстрат 1 : 50.

Для получения стандарта 1 (S1) реакционную смесь в H_2^{18}O выдерживали 4 ч в присутствии фермента. Затем ее разбавляли 0.1% TFA в соотношении 1 : 9. Конечная концентрация ангиотензиногена-(1-14) в растворе для стандарта 1 составляла 5.7 мМ.

Для получения стандарта 2 (S2) реакционную смесь в H_2^{18}O выдерживали 48 ч в присутствии фермента. Затем ее разбавляли ацетонитрилом в соотношении 1 : 10. Конечная концентрация ангиотензиногена-(1-14) в растворе для стандарта 2 составляла 1.9 мМ.

Определенные объемы S1 или S2 смешивали с анализируемым раствором ангиотензиногена-

(1-14) перед MALDI-MS-анализом. Конечные концентрации стандартов после смешения представлены в табл. 3.

Для **кинетических исследований** гидролиз ангиотензиногена-(1-14) с концентрацией 35 мкМ проводили под действием химазы с концентрацией 6.5 нМ в 0.05 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7.8, при 37°C. В реакционной смеси присутствовал в качестве стандарта ангиотензин II (P^{1-8}), содержащий ^{18}O -изотоп, в концентрации, эквивалентной исходной концентрации ангиотензиногена-(1-14) (35 мкМ).

Получение смеси ангиотензиногена-(1-14) с его стандартом осуществляли следующим образом. Сначала получали стандарт в условиях, аналогичных кинетическому эксперименту, гидролиз в присутствии H_2^{18}O проводили в течение 4 ч. Реакцию останавливали кипячением. Затем 10 мкл гидролизата, содержащего ангиотензин II, высушивали в вакуумной центрифуге и добавляли к нему 10 мкл раствора ангиотензиногена-(1-14) с эквимольной концентрацией. Этот раствор использовали для гидролиза химазой как указано выше.

Для масс-спектрометрических измерений через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 1 мкл и добавляли к 10 мкл 0.1% TFA для остановки реакции.

Для определения текущих концентраций с помощью ВЭЖХ отбирали аликвоты по 30 мкл и добавляли 5 мкл 20% уксусной кислоты для остановки реакции. На колонку наносили 15 мкл реакционной смеси (см. рис. 3).

Гидролиз РНКазы и барстара М трипсином для их количественного определения проводили в 25 мМ аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7.8, в присутствии обычной или тяжелой воды в стационарных условиях при весовом соотношении фермент-субстрат 1 : 50. Начальные концентрации этих белков составляли 0.11 и 0.10 мг/мл соответственно. Реакции останавливали добавлением в гидролизаты ингибитора трипсина из сои с концентрацией 0.2 мг/мл в объемном соотношении 10 : 1. Гидролизаты, полученные в H_2^{18}O , использовали в качестве стандарта. Определенные количества стандарта смешивали с анализируемым раствором РНКазы или барстара М перед MALDI-MS-анализом. Конечные концентрации стандарта после смешения представлены в табл. 6 и 8.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Искомые коэффициенты являются решением переопределенной системы линейных уравнений с двумя неизвестными, которые могут быть полу-

чены с помощью любой из множества программ для математического анализа.

Если рассматривать интенсивности в двух первых строках табл. 1 как прямоугольную матрицу $A_{(2 \times 6)}$, а интенсивность в последней строке как вектор-столбец $B_{(6 \times 1)}$, то получим матричное уравнение:

$$A^T X = B,$$

где A^T – транспонированная матрица A , X – вектор искомых коэффициентов. Поскольку число уравнений больше числа неизвестных, то решение может быть найдено только как наилучшее приближение (в смысле наименьших квадратов):

$$X = (AA^T)^{-1}AB.$$

Принимая во внимание, что при использовании одного и того же стандарта матрица $(AA^T)^{-1}A$ является неизменной, то, вычисленная однажды, она может быть использована для расчета результатов по всей серии анализируемых смесей, полученных с добавлением этого стандарта.

Учитывая, что матрица AA^T имеет размерность 2×2 , можно получить решение и без использования матричных операций. В этом случае расчет сильно упрощается и может быть выполнен даже вручную. Однако, принимая во внимание, что необходимые для расчета матричные операции являются стандартными функциями большинства табличных редакторов, гораздо

удобнее вычислять выражения в общем виде, например с использованием табличного процессора Microsoft Excel®.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C., Chait B.T. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1193A–1202.
2. Beavis R.C. // *Org. Mass Spectrom.* 1992. V. 27. P. 653–659.
3. Mann M., Talbo G. // *Current Opinion in Biotechnology.* 1996. V. 7. P. 11–19.
4. Kussmann M., Nordhoff E., Rahbek-Nielsen H., Haebel S., Larsen M.R., Jakobsen L., Gobom J., Mirgorodskaya E., Kristensen A.K., Palm L., Roepstorff P. // *J. Mass Spectrom.* 1997. V. 32. P. 593–601.
5. Cohen S.L., Chait B.T. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 31–37.
6. Sokolova E.A., Starkova N.N., Vorotyntseva T.I., Zamolodchikova T.S. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 255. P. 501–507.
7. Bender M.L., Kemp K.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79. P. 116–120.
8. Antonov V.K. *Chemistry of Proteolysis.* Berlin: Springer, 1993. P. 110–113.
9. Schnoelzer M., Jedrzejewski P., Lehman W.D. // *Electrophoresis.* 1996. V. 17. P. 945–953.
10. Dementiev A.A., Mirgorodskaya O.A., Moiseyev G.P., Yakovlev G.I., Shlyapnikov S.V., Kirpichnikov M.P. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999. V. 39. P. 159–170.
11. Yang C.-Y., Pownall H.J., Gotto A.M. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 145. P. 67–72.

Quantitative Determination of Peptides and Proteins by MALDI MS

O. A. Mirgorodskaya*#, Yu. P. Koz'min**, M. I. Titov**, N. V. Savel'eva*, R. Körner***, C. Sönksen***, A. I. Miroshnikov**, and P. Roepstorff***

* *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

** *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

*** *Department of Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, DK-5230 Denmark*

A modified method of isotope dilution was applied to the quantitative determination of peptides and proteins by MALDI MS at subpicomolar level. The essence of the method consists in the quantitative analysis of the enzymic hydrolysis products rather than the starting compounds. This allows the measurements to be performed at a higher resolution and makes the method independent of the molecular mass of oligopeptides and proteins examined. Fragments obtained by hydrolysis of the same oligopeptide or protein in a known concentration by the same enzyme and labeled with the stable ^{18}O isotope are used as internal standards. The label is introduced by carrying out the hydrolysis in H_2^{18}O , and the oligopeptide concentration is calculated from the isotope distribution between the labeled and unlabeled hydrolysis products in the mass spectrum. This method was tested in the determination of concentrations of the angiotensinogen (1–14) fragment (oligopeptide), extracellular RNAase from *Bacillus amyloliquefaciens* (protein) and its protein inhibitor, barstar M. Usefulness of this method in kinetic studies was also demonstrated.

Key words: peptides and proteins, quantitative determination; MALDI-MS; ^{18}O -labeled standards; enzymic hydrolysis; kinetic measurements

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 247-3795; fax: +7 (812) 247-0341; e-mail: oam@om1533.spb.edu.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 9. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.