



УДК 577.112.853.088:543.51

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ
ГЛИКОПЕПТИДОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК БАКТЕРИЙ
(НА ПРИМЕРЕ *LACTOBACILLUS BULGARICUS*)****Решетова О. С., Розынов Б. В., Безруков М. В.,
Богданова Н. А.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Масс-спектрометрия применена для структурного анализа одного из гликопептидов бластолизина — противоопухолевого бактериального препарата, получаемого из клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus*. Гликопептид гидролизовали 6 н. HCl при 100° С, гидролизат дансильировали или трифторацетилювали и подвергали метанолизу или дейтерометанолизу, а затем анализировали масс-спектрометрически (электронный удар, химическая ионизация с NH₃) в системе прямого ввода или после газового хроматографа. Дансильные производные предварительно разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод масс-спектрометрии успешно используется для структурного анализа различных элементов клеточных стенок бактерий: гликолипидов [1, 2], полисахаридов [3], пептидолипидов [4], масс-спектрометрическое исследование гликопептидов также возможно [5–8]. В данной работе предложено использовать масс-спектрометрию электронного удара и химической ионизации с аммиаком для экспрессной проверки первичной структуры некоторых гликопептидов, исходя из структурного анализа продуктов их деградации.

В качестве объекта исследования был выбран один из гликопептидов клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus*, интенсивно изучаемых в последнее время в ИБХ АН СССР [9–11] (рис. 1).

Интерес к анализу структуры гликопептидов клеточных стенок этих бактерий объясняется их значительной противоопухолевой активностью. Смесь гликопептидов, образующихся в результате лизоцимного гидролиза клеточных стенок *L. bulgaricus*, используется в качестве противоопухолевого препарата, известного под названием «бластолизин» [12].

Фракционирование бластолизина позволило выделить и охарактеризовать гликопептидный фрагмент с молекулярной массой порядка 10 000, ответственный за противоопухолевую активность бластолизина. Индивидуальность выделенного гликопептида была подтверждена методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и диск-электрофореза [13]. В гидролизате исследуемого гликопептида были идентифицированы GlcN, Mur, Ala, Glu, Asp, Lys и аммиак в соотношении 1:1:2:1:1:1:1, характерном для гликопептидов *Lactobacillus* [14]. Единственным N-концевым аминокислотным остатком, обнаруженным стандартным фенилтиогидантоиновым методом [15], оказался остаток Asp. Этот гликопептидный фрагмент и был использован в наших исследованиях.

Гликопептид подвергали кислотному гидролизу и продукты гидролиза анализировали масс-спектрометрически после превращения пептидов в метиловые эфиры N-дансильных [16] или N-трифторацетильных производных [17]. Выбор таких производных объясняется наличием интенсивных пиков молекулярных ионов в спектрах дансилпептидов и возможностью анализа трифторацетатов методом комбинирования газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГЖХ-МС). Что касается углеводных цепей, то при кислотном гидролизе происходит удаление N-ацетильных защитных групп аминсахаров, и при химической модификации гидролизата аминокислоты сахаров дансильруются или трифторацетируются.

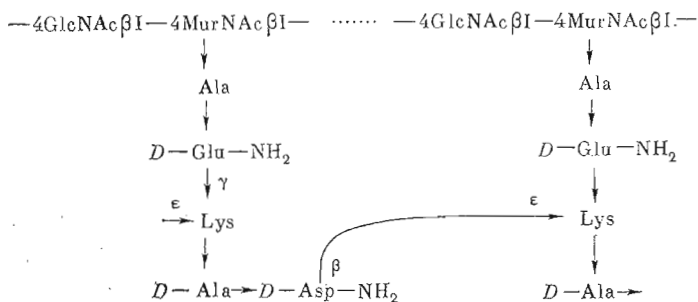


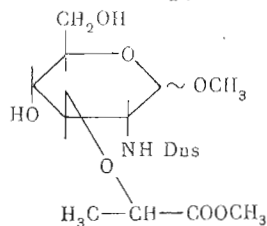
Рис. 1. Структура гликопептида клеточных стенок *L. bulgaricus* (по [10])

В условиях кислотного гидролиза остатки Asn и Glu превращаются в Asp и Glu соответственно, что не позволяет обнаружить их в гликопептиде. Частичный гидролиз амидных групп может также происходить в процессе выделения гликопептида (например, при делипидировании клеточных стенок бактерий [6]). Следовательно, определение амидных групп необходимо осуществлять другими методами.

Если поведение метиловых эфиров N-дансил- и N-трифторацетилпептидов [16–18] и трифторацетильных производных аминсахаров [19] в условиях масс-спектрометрирования достаточно хорошо изучено, то поведение N-дансиламинсахаров до настоящего времени не изучалось. Поэтому прежде чем перейти к определению состава гидролизатов, мы исследовали особенности масс-спектрометрического поведения модифицированных соответствующим образом глюкозамина и мурамовой кислоты.

В масс-спектре электронного удара модифицированного глюкозамина (рис. 2) наблюдается интенсивный пик молекулярного иона M^+ с m/z 426. Это значение m/z свидетельствует о том, что при метанолизе дансилглюкозамина практически полностью замещается водород полуацетальной гидроксильной группы, обладающий высокой подвижностью в соединениях с электроноакцепторной группой при атоме азота [20], и образуется метилгликозид. Из масс-спектра видно, что распад M^+ связан с последовательным элиминированием молекул H_2O и CH_3OH , в результате которого образуются ионы с m/z 408, 394, 376, 358. Ионы с m/z 250, 235, 203 и 171 характерны для масс-спектров N-Dns-производных [18].

На рис. 3 представлен масс-спектр электронного удара модифицированной мурамовой кислоты. В спектре также присутствует интенсивный пик молекулярного иона M^+ с m/z 512, значение которого указывает на то, что молекула содержит две метильные группы, одна из которых, как и в случае глюкозамина, находится при гликозидном углеродном атоме, а вторая — у кислорода карбоксильной группы.



При элиминировании из молекулярного иона молекулы H_2O или последовательно двух молекул CH_3OH образуются ионы с m/z 494, 480 и 448. Ион $[M-H_2O]^+$ далее теряет группы $COOCH_3$ или $OCH(CH_3)COOCH_3$, давая ионы с m/z 421 и 391. Малоинтенсивный пик с m/z 498 принадлежит молекулярному иону N-дансилмурамовой кислоты, содержащей метильную группу лишь в виде сложноэфирной. Этот ион выбрасывает молекулу CH_3OH и превращается в ион с m/z 466.

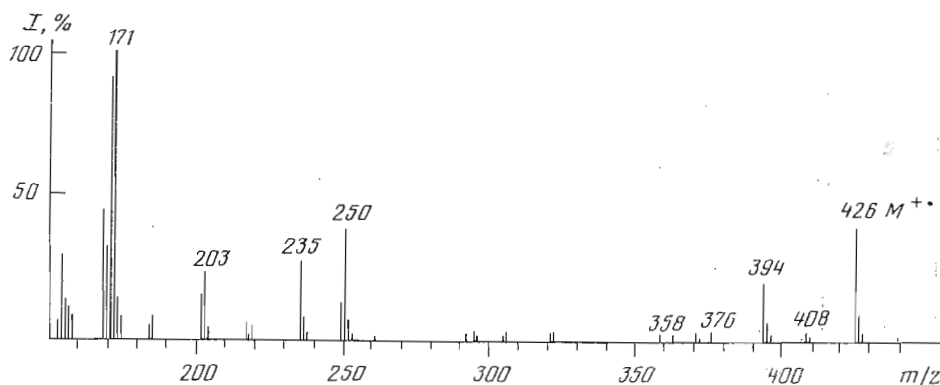


Рис. 2. Масс-спектр электронного удара метилгликозида N-дансилглюкозамина GlcNDns-OMe. Здесь и далее $I, \%$ — относительная интенсивность, %

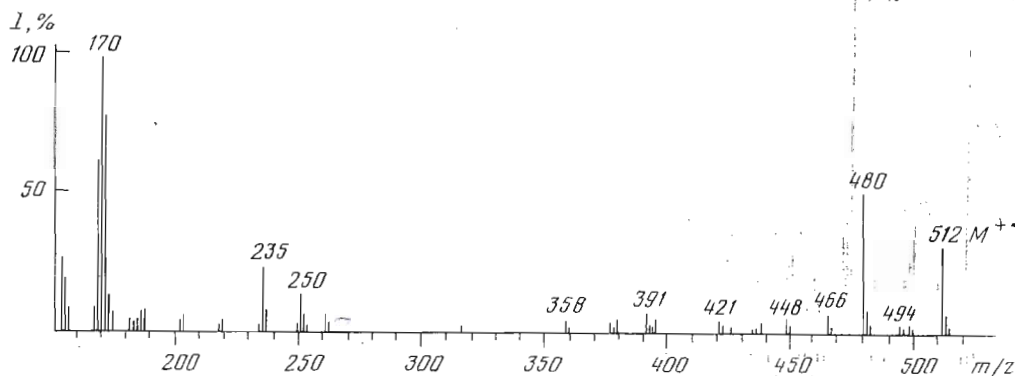


Рис. 3. Масс-спектр электронного удара метилового эфира метилгликозида N-дансилмурамовой кислоты MurNDns(OMe)-OMe

Высокая интенсивность пиков молекулярных ионов в масс-спектрах метиловых эфиров N-дансилпептидов и метилгликозидов N-дансиламиносахаров позволяет использовать эти ионы для идентификации таких соединений прямо в смесях без предварительного хроматографического разделения компонентов. На рис. 4а приведен частичный масс-спектр электронного удара подвергнутого метанолизу N-дансилпированных продуктов часового гидролиза (6 н. HCl, 100° C) изучаемого гликопептида. В масс-спектре наблюдаются пики молекулярных ионов ($M_1^+ - M_8^+$) метиловых эфиров N-дансильных производных аланина (m/z 336), аспарагиновой (m/z 394) и глутаминовой (m/z 408) кислот, лизина (m/z 626), N-дансилглюкозамина (m/z 412) и его метилгликозида (m/z 426), метилового эфира метилгликозида N-дансилмурамовой кислоты (m/z 512). Кроме того, в масс-спектре присутствует также пик M^+ метилового эфира N-дансилпептида, построенного из остатков аланина и глутаминовой кислоты (m/z 479). Пики с m/z 448 и 376 отвечают ионам, которые могут образовываться как при распаде молекулярных ионов соединений Dns[Ala, Glu(OMe)]-OMe и Dns-Glu(OMe)-OMe соответственно, так и при фрагментации молекулярных ионов Dns-аминосахаров. Пика с m/z 394 наряду с молекулярным ионом Dns-Asp(OMe)-OMe отвечает и ион, образующийся в результате элиминирования молекулы метанола из молекулярного иона метилгликозида N-дансилглюкозамина (рис. 2). Смещение массовых чисел в масс-спектре N-дансилпроизводных продуктов гидролиза, подвергнутого метанолизу 1 н. HCl в CD_3OH (рис. 4б), подтверждает это. Массовые числа части ионов с m/z 480, 448 и 376 увеличились на 3 а.е.м., а массовые числа ионов с m/z 412, 394 и 358 остались без изменения. На основании данных масс-спектров 4а и 4б можно однозначно сделать вывод об аминокислотном и углеводном составе исследуемого гликопептида.

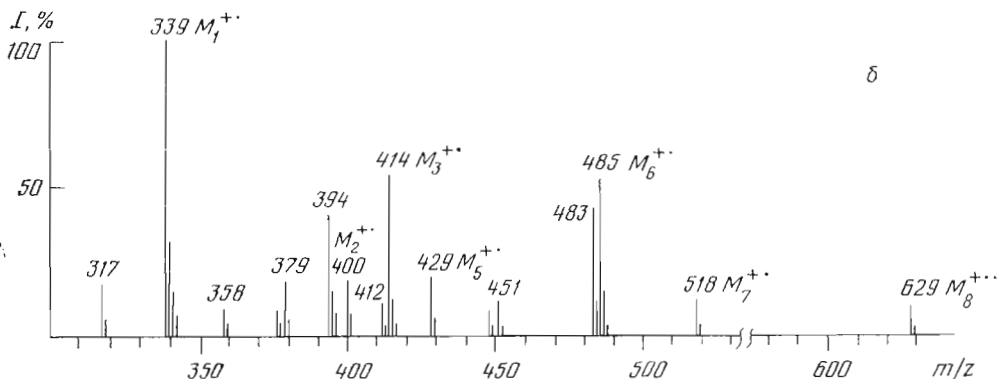
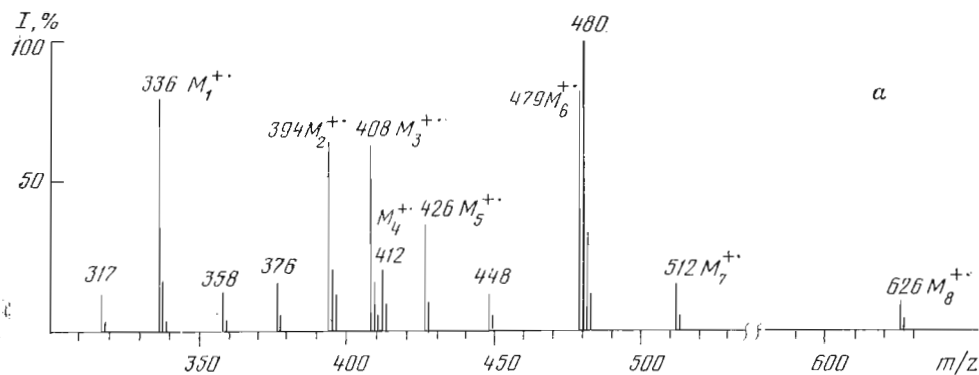


Рис. 4. Масс-спектр электронного удара продуктов часового гидролиза исследуемого гликопептида после их дансильирования и метанолиза в CH_3OH (а) и CD_3OH (б). Приведены молекулярные ионы: M_1^{+} — Dns-Ala-OMe; M_2^{+} — Dns-Asp(OMe)-OMe; M_3^{+} — Dns-Glu(OMe)-OMe; M_4^{+} — GlcNDns; M_5^{+} — GlcNDns(OMe); M_6^{+} — Dns-[Ala, Glu(OMe)]-OMe; M_7^{+} — MurNDns(OMe)-OMe; M_8^{+} — Dns Lys(Dns)-OMe

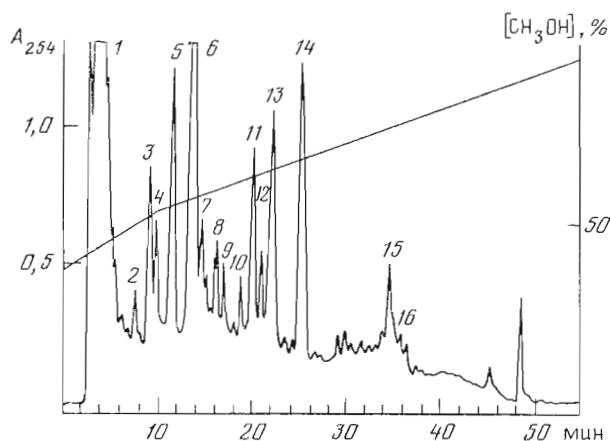


Рис. 5. ВЭЖХ продуктов 30-минутного гидролиза (6 н. HCl, 100°C) гликопептида после их дансильирования и метанолиза: Dns-OH (1); Dns-Asp(OMe)-OMe (5); Dns-NH₂ (6); Dns-Glu(OMe)-OMe (7); Dns-Ala-Asp(OMe)-OMe (11); Dns-Ala-OMe, Dns-Ala-Glu(OMe)-OMe, MurNDns-OMe, MurNDns-OMe (13); Dns-N(CH₃)₂ (14); L-Ala-OMe L-Ala-Glu(OMe)-OMe Dns-Lys(Dns)-Ala-OMe (15); Dns-Lys(Dns)-OMe (16). Условия разделения см. «Экспер. часть»

С целью получения информации о строении пептидного участка гликопептида он был подвергнут 30-минутному гидролизу (6 н. HCl, 100°C). После дансильирования и метанолиза смесь продуктов гидролиза разделяли методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой в градиенте концен-

Масс-спектры электронного удара Dns-Ala-Asp(OMe)-OMe (A)
и Dns-Ala-Glu(OMe)-OMe (B)

Ион	А		Б	
	m/z	I, %	m/z	I, %
M^+	465	28,0	479	22,0
$[M - (OMe)]^+$	434	2,5	448	3,0
$[M - (HOMe)]^+$			447	1,0
$[M - (COOMe)]^+$	406	3,5	420	2,5
$[M - (COOMe + HOMe)]^+$			388	1,5
$[Dns-NH-CH-CH_3]^+$	277	24,0	277	27,0
$[DnsNH_2]^+$	250	18,0	250	10,0
$[Dns]^+$	234	16,0	234	23,0
$[Dns - (SO_2) + H]^+$	171	100,0	171	100,0
$[Dns - (SO_2)]^+$	170	93,0	170	93,0

Примечание. Dns — 5-диметиламинонафталинсульфонил.

траций метанол — вода (рис. 5). Хроматографические фракции анализировались масс-спектрометрически, и на основании масс-спектров определено строение и состав компонентов фракций. Были идентифицированы метиловые эфиры N-дансилпроизводных аминокислот (пики 5, 7, 13, 16) и дипептидов Ala-Asp (пик 11), Ala-Glu (пик 13), Lys-Ala (пик 15).

В масс-спектрах метиловых эфиров N-дансильных производных Ala-Asp и Ala-Glu присутствуют интенсивные пики молекулярных ионов (табл. 1). Наличие в масс-спектрах обоих пептидов заряженного N-дансильированного аминного фрагмента аланина с m/z 277 однозначно свидетельствует, что остаток аланина является N-концевым.

В масс-спектрах хроматографических фракций 3–6 (рис. 5) присутствуют пики молекулярных ионов N-дансилглюкозамина (m/z 412) и его метилгликозида (m/z 426). В масс-спектрах хроматографических фракций 8–13 наблюдаются пики ионов, характерных для N-дансильных производных мурамовой кислоты, с m/z 512, 498 и 480 (ср. рис. 3). Появление амносахаров в столь большом количестве хроматографических фракций объясняется тем, что они присутствуют в гидролизате в двух аномерных формах, каждая из которых может быть гликозилирована или нет [21].

В масс-спектре хроматографической фракции 13 наблюдаются пики с m/z 583, 551 и 519, которые отвечают соответственно ионам M^+ , $[M - CH_3OH]^+$ и $[M - 2CH_3OH]^+$ соединения MurNDns-OMe. Пики

с m/z 694, 662 и 634 принадлежат ионам $[M - CH_3OH]^+$, $[M - 2CH_3OH]^+$ и $[M - (CH_3OH + HCOOCH_3)]^+$ соединения MurNDns-OMe

Ala-Glu(OMe)-OMe (выводы сделаны исходя из сравнения фрагментации в масс-спектрах модельных соединений и в конкретном спектре).

Часть гидролизата гликопептида после модификации не разделялась, а полученную смесь анализировали в системе прямого ввода пробы. На рис. 6 представлен частичный масс-спектр этой смеси. В масс-спектре присутствуют пики молекулярных ионов (M_3^+ — M_5^+) метиловых эфиров N-дансилпептидов: (Asp, Lys) с m/z 755, (Glu, Lys) с m/z 769 и (Asp, Lys, Ala) с m/z 826. Необыкновенно высокая интенсивность пиков ионов $[M - CH_3OH]^+$ пептидов (Asp, Lys) и (Asp, Lys, Ala) по сравнению с интенсивностью аналогичного пика пептида (Glu, Lys) может объясняться $\beta \rightarrow \epsilon$ -связью остатков аспарагиновой кислоты и лизина в гликопептиде клеточных стенок бактерий *Lactobacillus* (рис. 1). Наличие такой связи в условиях масс-спектрометрии может способствовать образованию циклических структур [22], которые и определяют устой-

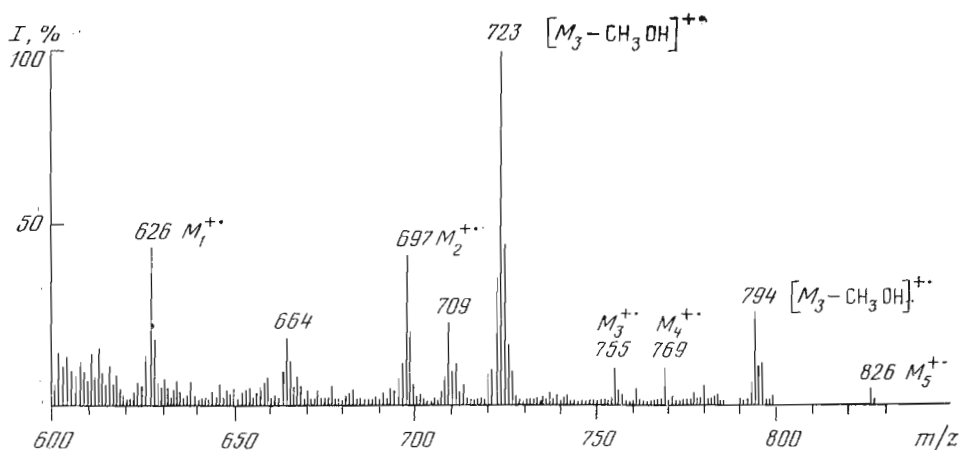
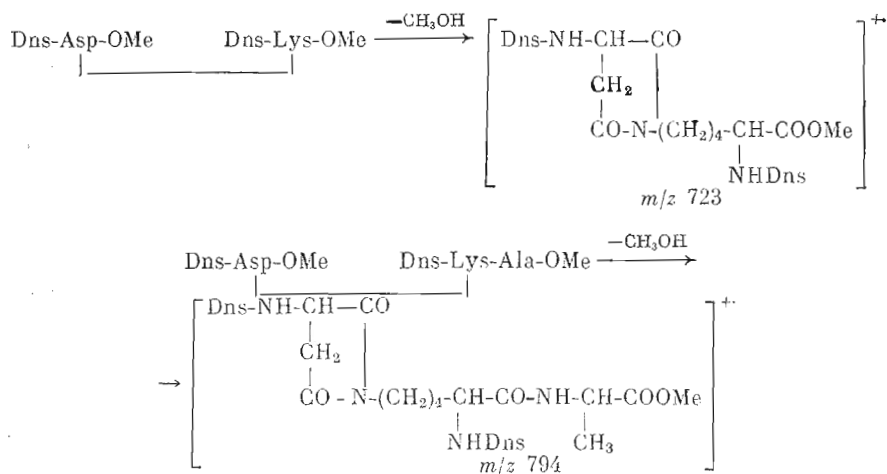


Рис. 6. Частичный масс-спектр электронного удара смеси продуктов гидролиза гликопептида (6 н. HCl, 100° С, 30 мин) после их дансильирования и метанолиза. Приведены молекулярные ионы: M_1^{+} — Dns-Lys(Dns)-OMe; M_2^{+} — Dns-Lys(Dns)-Ala-OMe; M_3^{+} — Dns-[Asp(OMe), Lys(Dns)]-OMe; M_4^{+} — Dns-[Glu(OMe), Lys(Dns)]-OMe; M_5^{+} — Dns-[Asp(OMe), Lys(Dns), Ala]-OMe

чивость ионов с m/z 723 и 794 соответственно:



Из масс-спектров дансильированных гидролизатов не удалось установить аминокислотную последовательность лизинсодержащих пептидов (кроме Lys-Ala); была лишь определена их молекулярная масса. Для установления первичной структуры этих лизинсодержащих пептидов продукты гидролиза после метанолиза и N,O-трифторацетилирования анализировались методом ГЖХ-МС (рис. 7). В хроматографических фракциях идентифицированы производные аминокислот Ala, Asp, Glu, Lys и пептидов Ala-Asp, Glu-Ala, Ala-Glu, Lys-Ala, Asp(Lys), Glu-Lys, Asp(Lys-Ala) [17]. По времени удерживания на колонке (в сравнении с модельными соединениями) и по фрагментным ионам в масс-спектрах [19] обнаружены трифторацетильные производные глицерина, глюкозы, глюкозамина и метилового эфира мурамовой кислоты.

В табл. 2 и 3 представлены масс-спектры производных дипептидов Ala-Glu и Glu-Ala. Эти спектры существенно различаются. Фрагменты с m/z 202, 174, 116 в спектре пептида Ala-Glu подтверждают С-концевое положение глутаминовой кислоты, а фрагменты с m/z 240, 213, 212, 180, 152 в спектре пептида Glu-Ala указывают на N-концевое положение глутаминовой кислоты.

Масс-спектр электронного удара Tfa-Ala-Glu(OMe)-OMe

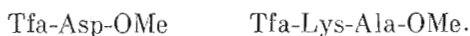
m/z	$I, \%$	Ион	m/z	$I, \%$	Ион
343	0,3	$[M+H]^+$	102	2,0	
342	0,35	M^+	101	2,5	
311	2,5	$[M - (OMe)]^+$	100	6,0	
310	6,5	$[M - (HOMe)]^+$	99	4,5	
283	26,0	$[M - (COOMe)]^+$	98	10,5	
279	1,5	$[M - (OMe+HOMe)]^+$	93	4,5	
278	1,3	$[M - (HOMe+HOMe)]^+$	92	5,0	
251	4,5	$[M - (HOMe-COOMe)]^+$	88	14,0	
224	1,7	$[M - (2COOMe)]^+$	87	4,0	
223	2,5	$[M - (COOMe+HCOOMe)]^+$	85	11,0	
213	2,5		84	95,0	$+ NH_2=CH-CH_2$
203	5,0				$\quad \quad \quad $
202	30,0	$[CO-NH-CH-COOMe]^+$	83	5,5	$\quad \quad \quad CH=CO$
		$\quad \quad \quad $	82	26,0	
		$\quad \quad \quad CH_2-CH_2-COOMe$			
181	1,5		78	3,5	
180	1,7		75	3,0	
175	4,5		74	5,0	
174	37,0	$[NH-CH-COOMe]^+$	73	3,0	
		$\quad \quad \quad $	72	17,0	
		$\quad \quad \quad CH_2-CH_2-COOMe$			
170	12,0		71	8,0	
168	3,0		70	18,0	
159	2,5		69	27,0	$[CF_3]^+$
145	3,0		60	2,5	
144	46,5		59	14,0	
143	7,0		58	10,5	
142	61,5		57	33,5	
141	69,0	$[CF_3CO-NH-CH_2-CH_3]^+$	56	14,5	
140	48,5		55	4,0	
128	2,0		52	3,5	
127	3,5		46	7,5	
126	5,0	$CF_3CO-NH=CH_2$	45	16,5	
118	5,0		44	29,5	
117	13,0		43	19,5	
116	100,0	$NH_2=CH-CH_2-CH_2-COOMe$	42	15,5	
115	3,0		41	19,0	
114	25,0				
111	8,0				
110	26,0	$[NH-C=C=O]^+$			
		$\quad \quad \quad $			
		$\quad \quad \quad CH_2-CH=C=O$			

В масс-спектре бисметилового эфира бистрифторацетильного производного



(табл. 4) отсутствует пик молекулярного иона с m/z 481, а наблюдается пик иона $[M-CH_3OH]^+$ с m/z 449, который может образоваться при циклизации остатка аспарагиновой кислоты в соответствующий имид [22]. Наиболее вероятный путь фрагментации этого дипептида приведен на схеме.

Аналогичный характер распада наблюдается и в случае бисметилового эфира бистрифторацетильного производного



В его масс-спектре также отсутствует пик молекулярного иона M^+ с m/z 552, а присутствует пик иона $[M-CH_3OH]^+$ с m/z 520. Основные пути распада иона с m/z 520 состоят в элиминировании группы COOMe с образованием иона с m/z 461 и отрыве CO-Ala-OMe с образованием

Масс-спектр электронного удара Tfa-Glu(OMe)-Ala-OMe

m/z	$I, \%$	Ион	m/z	$I, \%$	Ион
343	0,2	$[M+H]^+$	107	4,0	
342	0,2	$M^{+\bullet}$	104	4,5	
312	0,3		102	8,0	$[\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOMe}]^+$
311	1,0	$[M-(\text{OMe})]^+$	97	5,0	
283	10,5	$[M-(\text{COOMe})]^+$	85	6,0	
279	5,0	$[M-(\text{OMe}+\text{HOMe})]^+$	84	14,0	$^+\text{NH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CO}$
251	9,0	$[M-(\text{COOMe}+\text{HOMe})]^+$	83	6,0	
252	3,0		82	8,0	
241	3,0		81	4,0	
240	5,0	$[\text{CF}_3\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}]^+$ $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$	75	5,0	
			74	48,5	$[\text{CH}_3-\text{COOMe}]^+\bullet$
224	3,5	$[M-(2\text{COOMe})]^+$	71	8,5	
214	4,5		70	14,0	
213	40,0	$[\text{CF}_3\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}]^+\bullet$	69	27,0	$[\text{CF}_3]^+$
212	16,0	$\text{CF}_3\text{CONH}^+=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$	59	9,5	
210	2,5		58	4,5	
209	2,0		57	15,0	
208	2,0		56	10,5	
207	3,5		55	14,5	
197	3,5		45	15,0	
192	5,0		44	100,0	$^+\text{NH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3$
183	2,5		43	20,0	
182	14,0		42	6,0	
181	16,5		41	10,5	
180	25,0	$[\text{CF}_3\text{CONHCHCH}_2\text{CH}=\text{C}=\text{O}]^+$			
166	2,0				
155	2,5				
154	3,5				
153	9,5				
152	33,5	$[\text{CF}_3\text{CONHCHCH}=\text{CH}_2]^+$			
140	17,5				
139	11,0				
138	15,0				
135	3,5				
129	3,5	$\text{CF}_3\text{C}^+=\text{O}-\text{NH}=\text{C}=\text{CH}_2$			
126	4,5				
110	4,0				
109	4,0				

Таблица 4

Масс-спектр электронного удара Tfa-Asp-OMe Tfa-Lys-OMe

m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
481	—	266	4,0	178	4,0	110	22,5
449	4,0	265	4,0	167	27,0	98	15,5
418	4,0	252	14,0	166	2,5	97	5,0
417	13,0	251	7,0	164	9,0	96	9,0
392	3,0	224	6,0	162	2,0	95	4,0
391	15,5	223	4,0	154	6,0	94	12,5
390	75,0	212	27,5	153	3,0	85	6,0
380	2,5	211	12,5	152	12,5	84	11,5
371	3,5	207	5,0	144	7,5	83	10,5
336	3,0	197	19,0	140	7,5	82	15,0
321	1,5	195	48,0	139	6,0	81	5,5
320	4,5	186	10,5	138	4,0	78	7,0
305	2,0	185	3,0	137	14,0	74	10,5
304	5,5	182	4,0	136	4,5	70	43,0
293	2,5	181	6,0	135	7,0	69	38,0
292	9,0	180	7,5	128	69,0	68	11,0
278	5,0	179	11,0	126	7,0	67	100,0
277	29,0		6,0	111		66	7,5

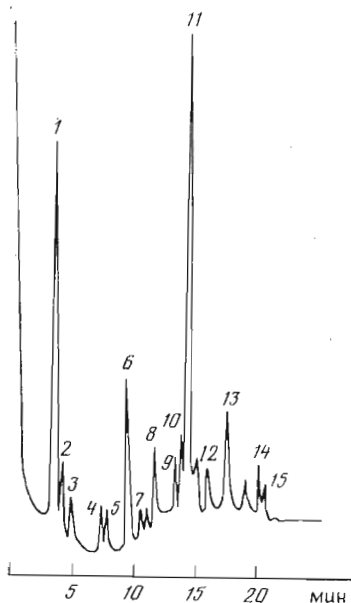


Рис. 7. ГЖХ продуктов 30-минутного гидролиза (6 н. HCl, 100° C) после их метанолиза и трифторацетилирования: Tfa-Ala-OMe (1); трифторацетат глицерина (2); бистрифторацетат глицерина (3); тетратрифторацетильные производные глюкозы и глюкозамина (4); Tfa-Asp(OMe)-OMe (5); Tfa-Glu(OMe)-OMe (6); бистрифторацетильное производное метилового эфира муравьей кислоты (7); Tfa-Lys(Tfa)-OMe (8); Tfa-Ala-Asp(OMe)-OMe (9); Tfa-Glu(OMe)-Ala-OMe (10); Tfa-Ala-Glu(OMe)-OMe (11); Tfa-Lys(Tfa)-Ala-OMe (12); Tfa-Asp-OMe Tfa-Lys-OMe (13); Tfa-Glu(OMe)-Lys(Tfa)-OMe (14); Tfa-Asp-OMe Tfa-Lys-Ala-OMe (15)

иона с m/z 390, который распадается далее, как показано на схеме. В спектре также присутствует дик иона с m/z 180 и его осколков.

Результаты хроматомасс-спектрометрического исследования трифторацетильных производных полностью подтвердили данные, полученные при масс-спектрометрическом анализе N-дансильированных гидролизатов, и, кроме того, в гидролизате удалось обнаружить пептид Glu-Ala, присутствующий также в 20- и 40-минутных гидролизатах. В зависимости от продолжительности гидролиза меняется соотношение пиков на хроматограммах, но время удерживания и масс-спектр этого соединения остаются постоянными. Появление в гидролизатах пептида Glu-Ala можно объяснить либо присутствием не обнаруживаемых при ВЭЖХ и диск-электрофорезе примесей, что мало вероятно, либо необычным, но вполне возможным для гликопептидов разветвлением пептидной цепи при остатке глутаминовой кислоты [14].

Для идентификации более тяжелых пептидов смесь продуктов гидролиза после метанолиза и трифторацетилирования анализировали без разделения методом масс-спектрометрии с химической ионизацией, используя аммиак в качестве газа-реагента. В этих условиях в масс-спектрах пептидов наблюдаются обычно пики ионов MH^+ и $[MH+NH_3]^+$, распад которых связан с элиминированием молекулы CH_3OH . В табл. 5 представлены масс-спектры смеси метиловых и дейтерометиловых эфиров трифторацетатов продуктов 30-минутного гидролиза начиная с m/z 200. В спектрах присутствуют пики ионов $[MH+NH_3]^+$, отвечающие метиловым или тридейтерометиловым эфирам аминокислот Ala (m/z 217 или 220), Asp (m/z 275 или 281), Glu (m/z 289 или 295), Lys (m/z 370 или 373) и муравьей кислоты (m/z 571, 475 и 379 или 574, 478 и 382), содержащей соответственно три, две и одну трифторацетильные группировки (это подтверждено опытом на модельном соединении). В масс-спектрах присутствуют ионы MH^+ и $[MH+NH_3]^+$ соответствующих производных дипептидов: Ala-Asp (m/z 329 и 346 или 335 и 352); Ala-Glu (Glu-Ala) (m/z 343 и 360 или 349 и 366), Lys-Ala (m/z 424 и 441 или 427 и 444), Asp(Lys) (m/z 482 и 499 или 488 и 505). Наблюдаются также ионы MH^+ и $[MH+NH_3]^+$ для пептидов, содержащих остатки Ala, Glu, Lys (m/z 567 и 584 или 573 и 590), Asp, Lys, Ala (m/z 553 и 570 или 559 и 576), Glu, Lys, Asp (m/z 625 и 642 или 634), Ala, Glu, Lys, Asp (m/z 696 и 713 или 705 и 722), Ala, Glu, Lys, Asp, Ala (m/z 767 и 784).

Наибольшая интенсивность в пептидах, содержащих остатки глутаминовой кислоты и особенно соединенной $\beta \rightarrow \epsilon$ -связью с лизиново-аспарагиновой кислоты, обладают пики ионов, образующихся в результате эли-

Масс-спектры химической ионизации трифторацетильных производных метиловых (А) и тридеутерометиловых эфиров (Б) продуктов 30-минутного гидролиза гликопептида *

Соединение	А		Б	
	[M+H] ⁺	[MH+NH ₃] ⁺	[M+H] ⁺	[MH+NH ₃] ⁺
Ala	200 (15,0)	217 (45,0)	203 (27,0)	220 (60,0)
Asp	258 (8,0)	275 (65,0)	264 (23,0)	281 (69,0)
Glu	272 (13,5)	289 (78,0)	278 (50,0)	295 (88,0)
Lys	353 (7,0)	370 (43,0)	356 (10,0)	373 (45,0)
(Ala, Asp)	329 (10,0)	346 (36,0)	335 (9,0)	352 (53,0)
(Ala, Glu)	343 (47,0)	360 (100,0)	349 (65,0)	366 (100,0)
(Lys, Ala)	424 (7,5)	441 (19,0)	427 (7,0)	444 (57,0)
Mur	362 (10,0)	379 (20,0)		382 (5,0)
	458 (3,0)	475 (28,0)	461 (16,0)	478 (42,0)
	554 (2,0)	571 (6,0)	557 (6,0)	574 (55,0)
(Asp, Lys)	482 (6,5)	499 (12,0)	488 (9,0)	505 (16,5)
(Glu, Lys)		513 (4,0)	502 (7,0)	519 (10,0)
(Asp, Lys, Ala)	553 (12,0)	570 (17,0)	559 (5,5)	576 (12,0)
(Ala, Glu, Lys)	567 (2,5)	584 (9,0)	573 (18,0)	590 (17,0)
(Glu, Lys, Asp)	625 (14,0)	642 (10,0)	634 (5,0)	651 (4,0)
Mur(-Ala)	625 (14,0)	642 (10,0)	628 (6,0)	645 (17,5)
(Ala, Glu, Lys, Asp)	696 (27,0)	713 (11,5)	705 (14,0)	722 (14,0)
(Ala, Glu, Lys, Asp, Ala)	767 (7,5)	784 (7,5)		
Mur(-Ala-Glu)	768 (2,5)	785 (2,5)	774 (27,5)	791 (18,0)

* Приведены массовые числа (m/z), относительные интенсивности пиков соответствующих ионов в процентах указаны в скобках.

минирования молекул CH_3OH или CD_3OH из ионов MH^+ и $[\text{MH}+\text{NH}_3]^+$ (в табл. 5 не приведены). Так, в дейтерометилированной смеси эти пики указывают на присутствие пептида (Glu, Lys, Asp) с m/z 599 и 616 и (Ala, Glu, Lys, Asp, Ala) с m/z 741 и 758.

Кроме того, в масс-спектрах гидролизата присутствуют протонированные молекулярные ионы и их аддукты с аммиаком, отвечающие трифторацетильным производным Mur-Ala-OMe (m/z 625 и 642), массовые числа которых совпадают с массовыми числами ионов пептида (Glu, Lys, Asp), но отличаются от массовых чисел, наблюдаемых в масс-спектре дейтерированной смеси (m/z 628 и 645) и гликопептида Mur-Ala-Glu(OMe)-OMe (m/z 768 и 785 или 774 и 791).

Наличие в гидролизате лишь Mur(-Ala) говорит о том, что остаток N-ацетилмурамовой кислоты связан с остатком аланина, который в свою очередь соединен с остатком глутаминовой кислоты (Mur-Ala-Glu, пептид Ala-Glu). Пептид (Ala, Glu, Lys) подтверждает наличие связи между остатком глутаминовой кислоты и лизином. Выделенный при ГЖХ-МС трипептид Asp(Lys-Ala) указывает на Lys-D-Asp-тип исследуемого гликопептида [14]. В гидролизатах не удалось обнаружить продуктов, подтверждающих наличие в гликопептиде связи между остатками Asp и Glu [9] на отсутствие которой указывалось и ранее [10].

Проведенные исследования показывают, что для быстрого установления строения гликопептида *L. bulgaricus* и других аналогичных соединений [14] можно применять кислотный гидролиз с последующим масс-спектрометрическим анализом в комбинации с ГЖХ и ВЭЖХ химически модифицированных гидролизатов. На основании такого анализа возможно определение типа гликопептида — важного критерия классификации бактерий.

Экспериментальная часть

Масс-спектры электронного удара были получены на приборе LKB 9000 (LKB, Швеция), масс-спектры химической ионизации с аммиаком — на приборе MAT 44s (Varian MAT, ФРГ) при быстром испарении образца с эмиттера (скорость нагрева эмиттера 200°/мин).

ГЖХ-МС-анализ проводили на хроматомасс-спектрометре LKB 9000, для ГЖХ применяли стеклянную колонку (3000×3 мм) с 1,5% OV-17 на хромосорбе Gas

Слoм Q (Serva) в температурном режиме: 40–250°С (10°/мин), расход геля 25 мл/мин, энергия ионизирующих электронов при масс-спектрометрии 70 эВ.

ВЭЖХ. Для жидкостной хроматографии N-дансильированных и подвергнутых метанолизу продуктов гидролиза гликопептида использовали колонку (0,46×25 см) с носителем Ultrasphere-ODS. Процент метанола в элюенте (метанол – вода) изменялся от 40 до 100. Скорость подачи элюента 1,5 мл/мин.

Гидролиз для определения аминокислотного и аминосахарного состава проводили 20 ч в запаянных под вакуумом ампулах при 115°С в 6 н. HCl.

Дансильирование. К 1–10 нмоль пептида приливали 10 мкл воды, 20 мкл 0,05 М NaHCO₃ и 30 мкл 0,01 М Dns-Cl в сухом ацетоне. Реакцию проводили 30 мин при 60°С. Затем добавляли 8 мкл 0,1 н. HCl и упаривали [17].

Метанолиз. К пептиду приливали 1 н. HCl в MeOH и выдерживали 10 мин при 60°С.

Трифторацетилирование. Пептид после метанолиза выдерживали в CH₂Cl₂, содержащем 10% (CF₃CO)₂O, 30 мин при 60°С или 2 ч при 20°С. Продукты гидролиза трифторацетилировали аналогично.

ЛИТЕРАТУРА

1. Senn M., Ioneda T., Pudles J., Lederer E. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 3, p. 353–356.
2. Батраков С. Г., Садовская В. Л., Розынов В. В., Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 667–681.
3. Selvdron R. R. In: Recent developments in mass spectrometry in biochemistry, medicine and environmental research. Proc. 8th Int. Symp., Venice, June 18–19, 1983/Ed. Frigerio A. Amsterdam e.a.: Elsevier, 1984, p. 159–176.
4. Батраков С. Г., Муратов В. Б., Розынов В. В., Решетова О. С., Бергельсон Л. Д., Коронелли Т. В. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 563–573.
5. Adam A., Petit J. F., Wietzerbin-Falszpan J., Sinay P., Thomas D. W., Lederer E. FEBS Lett., 1969, v. 4, № 1, p. 87–89.
6. Wietzerbin-Falszpan J., Das B. C., Asuma I., Adam A., Petit J. F., Lederer E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, v. 40, № 1, p. 57–63.
7. Nebelin E., Das B. C. FEBS Lett., 1979, v. 107, № 1, p. 254–258.
8. Phillips L. R., Nishimura O., Fraser B. A. Carbohydr. Res., 1984, v. 132, № 2, p. 275–286.
9. Bogdanov I. G., Dalev P. G., Gurevich A. I., Kolosov M. N., Mal'kova V. P., Pletyanikova L. A., Sorokina I. B. FEBS Lett., 1975, v. 57, № 3, p. 259–261.
10. Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1843–1858.
11. Sadovskaya V. L., Andronova T. M., Merimson V. G., Rozynov B. V. Org. Mass Spectrom., 1980, v. 15, № 9, p. 473–476.
12. Bogdanov I. G. In: Symposium on Antibiotics. Abstracts of Papers, Prague, 1959. p. 120.
13. Безруков М. В., Андропова Т. М., Сорокина И. Б., Малькова В. П. В кн.: I Всесоюзный симпозиум «Химия белков и пептидов». Тез. докл. Рига, 1983, с. 142–143.
14. Schleifer K. H., Kandler O. Bacteriol. Rev., 1972, v. 36, № 4, p. 407–477.
15. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жигулина Е. В., Виноградова Е. И. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410–413.
16. Day R. A., Falter H., Lehman J. P., Hamilton R. E. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 4, p. 782–788.
17. Gelpi E., Koenig W. A., Gilbert J., Oro J. J. Chromatogr. Sci., 1969, v. 7, № 3, p. 604–613.
18. Мирошников А. Ш., Снежкова Л. Г., Назимов Н. В., Решетова О. С., Розынов В. В. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1467–1477.
19. König W. A., Bauer H., Voeller E., Bayer E. Chem. Ber., 1973, v. 106, № 6, p. 1905–1919.
20. Кочетков Н. К., Бочков А. Б., Дмитриев Б. А., Усов А. П., Чижов О. С., Шибалева В. Н. В кн.: Химия углеводов. М.: Химия, 1967, с. 187–238.
21. Cheetham N. W. H., Sirimanne P. J. Chrom., 1983, v. 196, № 1, p. 171–175.
22. Williams D. H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 1983, v. 53, № 1, p. 37–44.

Поступила в редакцию

23.VII.1985

После доработки 5.IV.1986

MASS-SPECTROMETRY STRUCTURE ELUCIDATION OF THE CELL WALL GLYCOPEPTIDES EXEMPLIFIED WITH *LACTOBACILLUS BULGARICUS*

RESHETOVA O. S., ROZYNOV B. V., BEZRUKOV M. V., BOGDANOVA I. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Mass spectrometry has been applied to the structural analysis of one of the glycopeptides from blastolysin, antitumor bacterial preparation isolated from the *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. The glycopeptide (MW 10 000) was subjected to partial acid hydrolysis (6 N HCl, 100°С) and the resulting products were dansylated or trifluoroacetylated and methylated or deuteromethylated. The mixture of these derivatives was examined by high-performance liquid chromatography or gas chromatography followed by mass spectrometry using electron impact and ammonia chemical ionization techniques.