



УДК 547.458.02:543.51

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЭРИАД
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ,
СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОСАХАРИДЫ

Александров М. Л., Безукладников П. В., Грачев М. А.***,
Елякова Л. А.*, Звягинцева Т. Н.*, Кондратьев В. М.,
Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Фридлянский Г. В.*

Научно-техническое объединение, Академии наук СССР, Ленинград;

** Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток;*

***Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Масс-спектрометрия ЭРИАД*, как было показано на примере анализа реакционных смесей, содержащих пептиды [1], позволяет без какой-либо предварительной модификации изучать структуру олигомеров, кинетику реакций с их участием непосредственно в реакционных смесях. Такая возможность достигается тем, что квазимолекулярные ионы компонентов смеси образуются в самой реакционной смеси, без применения дополнительной ионизации, и могут транспортироваться в анализатор так, что масс-спектры содержат только линии квазимолекулярных ионов компонентов смеси [1]. В настоящей работе продемонстрированы возможности метода для исследования реакционных смесей, содержащих углеводы. Использование «метки» на одном из концов исходного полимера, аналогично построению «лестницы» продуктов неполного гидролиза при определении последовательности аминокислот в пептидах [2], существенно облегчает определение структуры олигосахаридов, исследования кинетики и механизма действия ферментов и т. д. Проблемы кинетических исследований заключаются в трудности сопоставления экспериментальных и теоретических зависимостей скорости накопления только одного из продуктов реакции, определяемого с помощью химических превращений, как обсуждается в работе [3]. Применение более универсального масс-спектрометрического метода для определения состава и кинетических зависимостей в реакционных смесях (даже с применением «мягких» методов ионизации) затруднено наличием фрагментных линий в спектрах, необходимостью проведения в ряде случаев предварительной модификации продуктов реакции [4].

В качестве примера в этой работе показана возможность изучения реакционной смеси, полученной при ферментативном гидролизе ламинарина. Поскольку в исходном субстрате на «восстанавливающем» конце содержится маннит, имеющий молекулярную массу на 2 а.е.м. больше, чем глюкоза, легко установить его наличие или отсутствие в олигосахариде и этим различить «правые» и «левые» продукты реакции при различных глубинах гидролиза. Такая концевая метка позволяет оценить относительную вероятность атаки ферментом той или иной гликозидной связи.

На рис. 1 показаны масс-спектры моно- и дисахарида: глюкозы и сахарозы — полученные методом ЭРИАД на опытном образце масс-спектрометра ХЖ-МС 3303 в НТО АН СССР. Эти соединения в присутствии солей металлов, в данном случае NaCl, регистрируются в виде квазимолекулярных ионов $[M+Na]^+$, как и при использовании других «мягких» методов ионизации. Аналогичным образом регистрируются маннит, ламинарибиоза, ламинаритриоза и ламинарипентаоза с относительными интенсивностями

* ЭРИАД — экстракция ионов из раствора при атмосферном давлении.

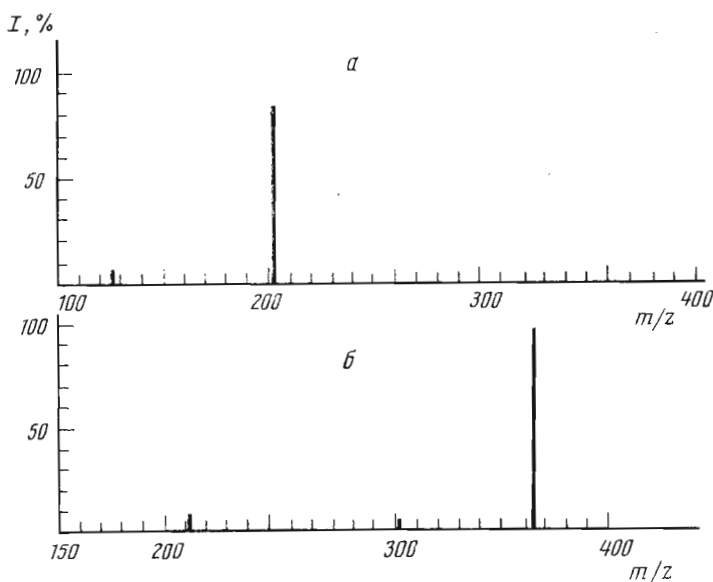


Рис. 1. Масс-спектры ЭРИАД глюкозы (а), сахарозы (б) в 90% метаноле в присутствии NaCl

ми линий спектра 2:7:6:1 соответственно при равных молярных концентрациях компонентов в модельной смеси.

Гидролизаты 10^{-3} М ламинарина, растворенного в ацетатном буфере с рН 5,2, были получены при добавлении эндо-1,3- β -D-глюканазы ЛИУ (КФ 3.2.1.6) из морского моллюска *Spisula sachalinensis* [5] (10^{-3} моль на 1 моль ламинарина). Реакционные смеси, полученные для разных глубин гидролиза (определение по методу Нельсона [6]), разбавлялись в соотношении 1:1 по объему метанолом, содержащим $5 \cdot 10^{-4}$ М NaCl, и вводилась в масс-спектрометр. При подаче пробы со скоростью 0,5 мкл/мин на запись спектра в течение 1 мин расходовалось 50–100 пмоль ламинарина. В спектрах, показанных на рис. 2, присутствуют глюкоза, ди-, три-, тетра- и пентаолигосахариды, как состоящие только из глюкозы (G-олигосахариды), так и содержащие на конце маннит (M-олигосахариды). В области массовых чисел спектра, больших 50 а.е.м., не содержится никаких линий, которые можно было бы отнести к появлению фрагментов или присутствию примесей. В связи с тем что при увеличении молекулярной массы олигосахаридов интенсивность соответствующей линии спектра уменьшается, возможна зависимость интенсивности линий спектра от природы олигосахаридов: (G) или (M) — для измерения концентрационных соотношений необходимы калибровочные измерения. Однако, очевидно, можно сравнивать интенсивности линий олигосахаридов с близкой массой, т. е. олигосахаридов G и M с одинаковой степенью полимеризации. Результаты рис. 2 свидетельствуют о том, что доля маннитсодержащих продуктов увеличивается по мере увеличения степени полимеризации. Такая тенденция близ-

Соотношение G- и M-олигосахаридов в реакционной смеси с разной глубины ферментативного гидролиза ламинарина, определенное по масс-спектрометрическим измерениям

Степень полимеризации олигосахаридов	Молярное соотношение олигосахаридов G и M в смесях		
	I	II	III
2	5,5	4	4
3	2	3	4
4	1,5	2,5	2
5	—	1,5	2

Примечание. I, II и III соответствуют глубине гидролиза 10, 20 и 30%.

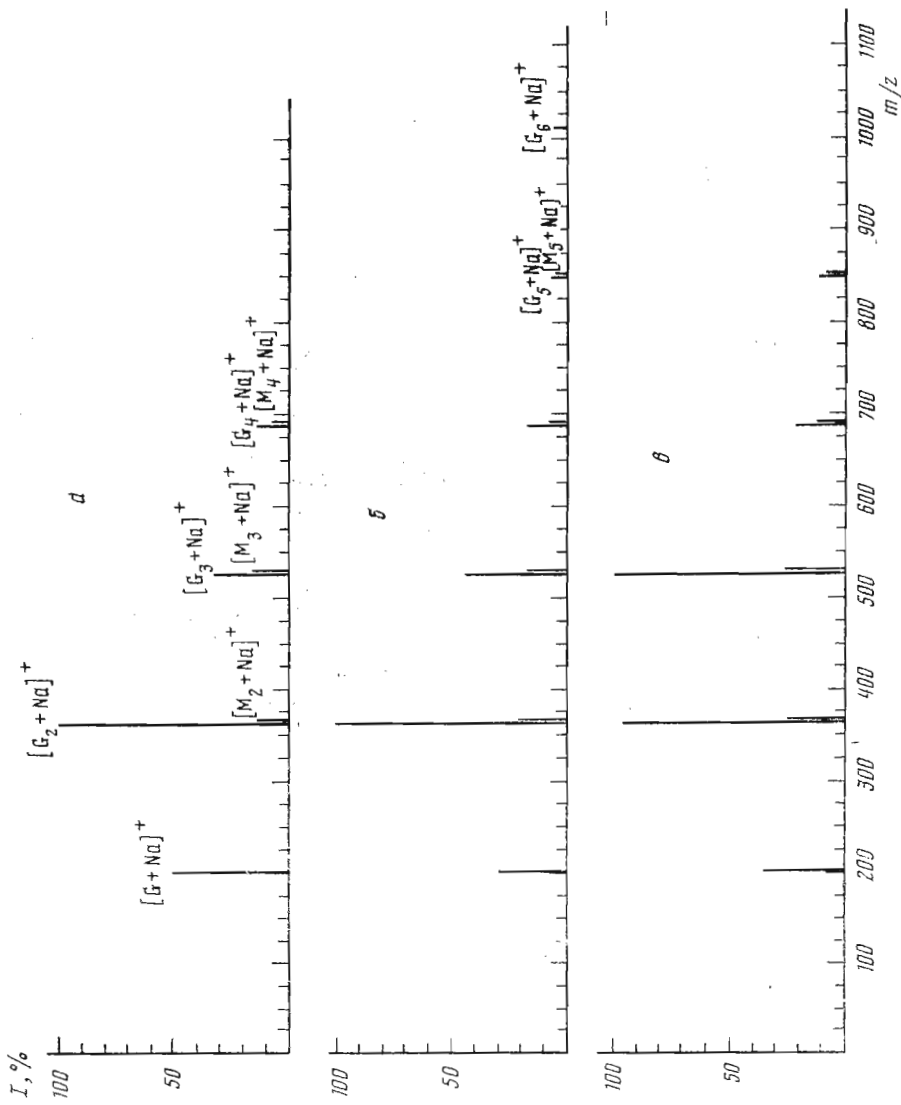


Рис. 2. Масс-спектры ЭРИАД ферментативных гидролизатов ламинарина с глубиной гидролиза 10 (а), 20 (б), 33% (в) эндо-1,3-*D*-глюкоказы ЛПУ из морского моллюска *Spisula sachalinensis* в 50% метаноле в присутствии NaCl. G и M — олигосахариды ламинарина, содержащие на «восстановляющем» конце глюкозу и маннит; нижний цифровой индекс — их степень полимеризации

ка к ожидаемой для статистически равномерного гидролиза. Вместе с тем практически постоянное соотношение олигомеров G и M данной длины в гидролизате, независимое от глубины гидролиза (таблица), указывает на то, что: 1) как и следовало ожидать для эндоглюканазы LIV [5], преимущественная доля разрывов приходится на связи, удаленные от маннитного конца; 2) при указанных концентрациях фермента и субстрата и глубинах гидролиза определяющую роль в обеспечении постоянства этого соотношения может играть механизм множественной атаки [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Краснов В. Н., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. Биоорг. химия, 1985, т. 14, № 5, с. 700–704.
2. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Грачев М. А., Кнорре В. Д., Краснов В. Д., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 705–708.
3. Мазур А. К., Елякова Л. А. Молекулярн. биология, 1983, т. 17, вып. 1, с. 101–111.
4. Чижов О. С., Шашков А. С. В кн.: Прогресс химии углеводов/Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985, с. 30–54.
5. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. Biochim. et biophys. acta. 1970, v. 212, № 1, p. 111–115.
6. Nelson N. J. Biol. Chem., 1944, v. 153, № 1, p. 375–381.

Поступило в редакцию
1.VII.1986

INVESTIGATION OF OLIGOSACCHARIDE-CONTAINING REACTION MIXTURES BY MEANS OF A MASS-SPECTROMETER WITH DIRECT INLET OF LIQUID

ALEXANDROV M. L., BESUKLADNIKOV P. W.*, GRACHEV M. A.**,
ELYAKOVA L. A.*, ZVYAGINTSEVA T. N.*, KONDRATYEV V. M.,
KUSNER Yu. S., MIRGORODSKAYA O. A., FRIDLANSKY G. V.

*Institute of Analytical Instrumentation, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad;*

* *Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Science Centre, Academy
of Sciences of the USSR, Vladivostok;*

** *Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucooligosaccharides of the general formula G_n and $G_{n-1}M$ (M is a β -(1 \rightarrow 6) linked mannitol residue, $n=1-5$), may be detected as complexes with sodium ions by means of mass-spectrometry combined with the previously described method of extraction of ions from solutions (ERIAD). This method gives only quasi-molecular ions and practically no fragmentation products. The approach makes it possible to follow the kinetics of hydrolysis of laminarin by an endo-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucanase LIV from *Spisula sachalinensis*.