



УДК 577.112.5.088.5 : 543.51

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ЭКСТРАКЦИЕЙ
ИОНОВ ИЗ РАСТВОРА ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ
(ЭРИАД) ДЛЯ СОСТАВЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ КАРТ

Решетова О. С., Розынов Б. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва

Изучена возможность получения пептидных карт на основании масс-спектров ЭРИАД на примере трипсинового гидролизата γ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы и химо трипсиновых гидролизатов ее бромциановых фрагментов 18—57 и 58—87. В масс-спектрах исследованных гидролизатов имеются пики ионов MH^+ всех пептидов, которых следовало ожидать исходя из специфичности действия ферментов. Для записи масс-спектра достаточно 1—2 нмоль гидролизата.

Метод пептидных карт (отпечатков пальцев), основанный на двухмерном разделении пептидных гидролизатов с помощью электрофореза и хроматографии в тонком слое, широко используется в белковой химии [1]. Развитие вторично-эмиссионной масс-спектрометрии, позволяющей получать пики квазимолекулярных ионов нативных соединений [2], сделало реальным использование масс-спектрометрического подхода к составлению пептидных карт [3, 4]. Такие масс-спектрометрические пептидные карты предложено использовать для идентификации продуктов биотехнологии [3, 5—7], проверки аминокислотной последовательности белков, определенной секвенированием кодирующих их генов [8—10], для изучения кинетики гидролиза белков [11, 12].

Однако применение вторично-эмиссионной масс-спектрометрии для этих целей осложняется различной поверхностной активностью пептидов в глицириновой матрице, что порой приводит к отсутствию в масс-спектрах пиков ионов некоторых гидрофильных соединений, находящихся в более глубоких слоях матрицы [4, 13, 14].

Нами изучена возможность использования для составления масс-спектрометрических пептидных карт метода экстракции ионов из раствора при атмосферном давлении (ЭРИАД), разработанного в Институте аналитического приборостроения АН СССР [15]. Исследовались гидролизаты γ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы и ее фрагментов [16].

В условиях ЭРИАД пучки квазимолекулярных ионов пептидов образуются при газокINETическом испарении их растворов, на которое мало влияет поверхностная активность исследуемых соединений. Ионы получают при температуре, близкой к комнатной, что к минимуму сводит температурные эффекты. В спектрах пептидов, получаемых этим методом, обычно присутствуют пики ионов MH^+ , которые могут сопровождаться пиками ионов $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + 2H]^{2+}$, $[MH + Na]^{2+}$, $[MH + K]^{2+}$, а пики осколочных ионов, как правило, отсутствуют. Не всегда в спектрах пептидов одновременно присутствуют пики всех перечисленных ионов. Так, в масс-спектре Leu-Ala-Gln-Tyr-Gly-Phe-Phe (пептид гидролиза сGMP-фосфодиэстеразы стафилококковой протеиназой) присутствуют пики всех ионов, за исключением $[M + 2H]^{2+}$ (рис. 1), а в спектре Ser-Lys-Pro-Pro-Lys (пептид трипсинового гидролиза сGMP-фосфодиэстеразы) наблюдаются лишь ионы MH^+ с m/z 556 (100%) и $[M + Na]^+$ с m/z 578 (59%).

Присутствие в спектре пептида пиков двухзарядных ионов, а также ионов $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$ дополнительно подтверждает его молекулярную массу, но затрудняет расшифровку масс-спектра при анализе

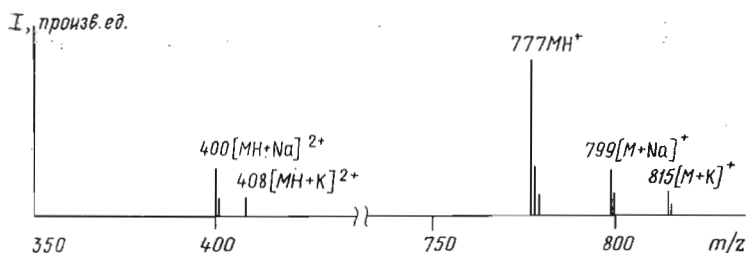


Рис. 1. Масс-спектр ЭРИАД пептида Leu-Ala-Gln-Tyr-Gly-Ile-Ile

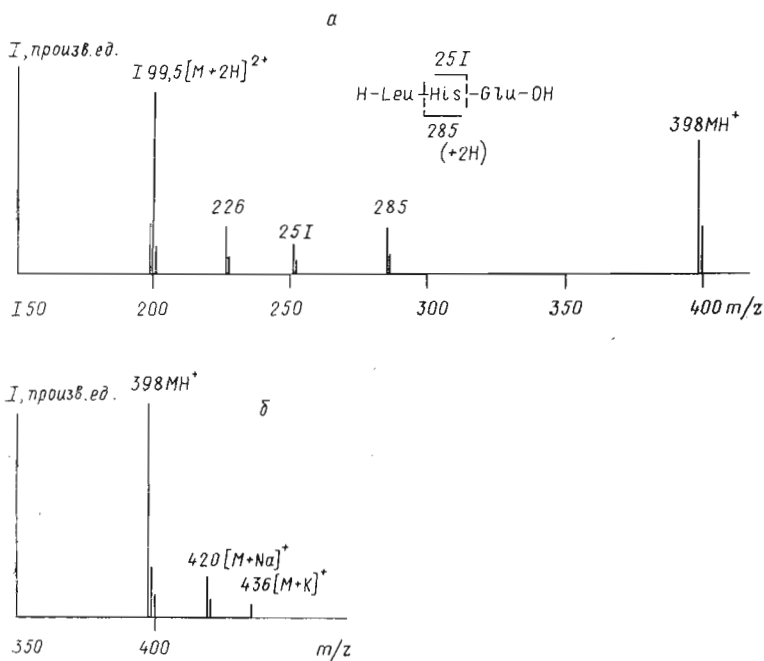


Рис. 2. Масс-спектры ЭРИАД пептида Leu-His-Glu при $\Delta U = 360$ (а) и 540 В (б)

пептидных смесей. Для того чтобы исключить по возможности образование двухзарядных ионов, спектры смесей записывались при разности потенциалов (ΔU) между диафрагмами газодинамической системы, равной 500–600 В [15]. Так, при $\Delta U = 360$ В (рис. 2а) в масс-спектре пептида Leu-His-Glu (продукт гидролиза сGMP-фосфодиэстеразы стафилококковой протениназой) наблюдаются пики ионов MH^+ и $[M + 2H]^{2+}$, а при $\Delta U = 540$ В (рис. 2б) — MH^+ и $[M + Na]^+$. Следует отметить, что в спектрах коротких пептидов могут присутствовать пики осколочных ионов, образующихся в результате разрыва амидных связей пептидной цепи (ионы с m/z 251 и 285 на рис. 2а) или углерод-углеродных связей аминокислотных остатков (ион с m/z 226 образуется в результате элиминирования радикала CH_2COOH ионом с m/z 285). В спектрах более длинных пептидов (> 5 остатков) пики осколочных ионов практически не наблюдаются ни при каких значениях ΔU .

Заранее предсказать характер масс-спектра ЭРИАД изучаемого пептида невозможно, поэтому при интерпретации спектров пептидных смесей приходится учитывать возможность одновременного присутствия пиков всех шести указанных выше одно- и двухзарядных квазимолекулярных ионов, а также пиков осколочных ионов.

В табл. 1 представлен масс-спектр ЭРИАД химотрипсинового гидролизата бромцианового фрагмента 18–57 белка сGMP-фосфодиэстеразы. Полученная в результате обработки масс-спектра пептидная карта (со-

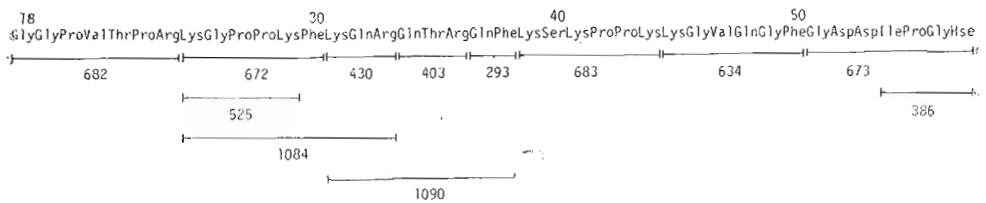


Рис. 3. Подтверждение структуры фрагмента 18—57 сГМР-фосфодиэстеразы на основании масс-спектрометрической пептидной карты

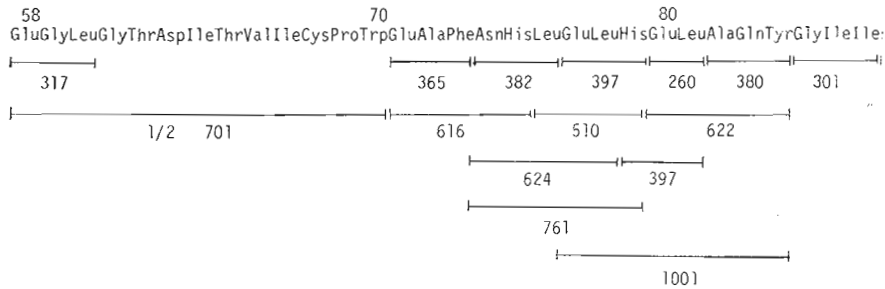


Рис. 4. Подтверждение структуры фрагмента 58—87 сГМР-фосфодиэстеразы на основании масс-спектра пептидов его химотрипсинового гидролизата

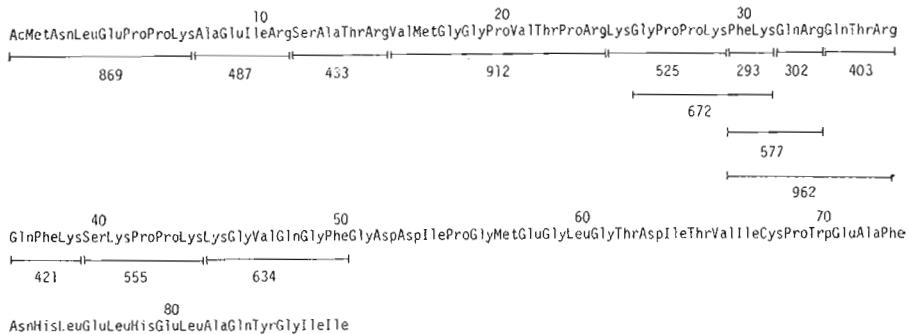


Рис. 5. Подтверждение N-концевой части структуры белка сГМР-фосфодиэстеразы на основании масс-спектра пептидов трипсинового гидролизата

вокупиность значений молекулярных масс всех пептидов гидролизата) полностью подтверждает структуру фрагмента 18—57 (рис. 3). По данным масс-спектра, кроме гидролиза по карбоксильным группам фенилаланина происходит разрыв полипептидной цепи по карбоксильным группам аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты. Кроме того, в спектре присутству-

Таблица I
Масс-спектр ЭРИАД пептидов химотрипсинового гидролизата фрагмента 18—57 сГМР-фосфодиэстеразы (m/z; в скобках I, %)

Пептид	MH ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+2H] ²⁺
GlyGlyProValThrProArg	683 (75,0)	705 (6,0)		
LysGlyProProLys	526 (5,0)			
LysGlyProProLysPhe	673 (55,0)	695 (41,0)	711 (6,0)	
LysGlnArg	431 (32,0)			
LysGlyProProLysPheLysGlnArg				543 (5,0)
LysGlnArgGlnThrArgGlnPhe				546 (4,5)
GlnThrArg	404 (34,0)			
GlnPhe	294 (54,0)	316 (7,5)	332 (5,0)	
LysSerLysProProLys	684 (100,0)	706 (9,0)		
LysGlyValGlnGlyPhe	635 (14,0)	657 (6,0)		
GlyAspAspIleProGlyHse	674 (44,0)	696 (49,0)	712 (12,0)	
IleProGlyHse	387 (21,0)			

Масс-спектр ЭРИАД пептидов химотрипсинового гидролизата фрагмента 58—87
сGMP-фосфодиэстеразы
(m/z ; в скобках I , %)

Пептид	MH^+	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[MH+Na]^{2+}$	$[MH+K]^{2+}$
GluGlyLeu	318 (24,0)	340 (96,0)				
GluGlyLeuGly- ThrAspIle- ThrValIle- CysProTrp				702 (12,0)	713 (6,0)	
GluAlaPhe	366 (14,0)	388 (12,0)	404 (95,0)			
GluAlaPheAsn- His	617 (8,0)					
AsnHisLeu	383 (11,0)	405 (6,0)				
AsnHisLeu- GluLeu	625 (9,0)	647 (8,0)	663 (8,0)	313 (15,0)	324 (100,0)	340 (96,0)
AsnHisLeu- GluLeuHis	762 (16,0)	784 (9,0)	800 (6,0)	381,5 (17,0)		
LeuGluLeuHis	511 (15,0)	533 (6,0)				
GluLeuHis (HisGluLeu)	398 (26,0)	420 (6,0)				
GluLeu	261 (21,0)					
AlaGlnTyr	381 (18,0)	403 (15,0)	419 (15,0)			
GluLeuAla- GlnTyr	623 (5,0)	645 (16,0)	661 (18,0)			
GluLeuHisGlu- LeuAlaGln- Tyr	1002 (8,0)	1024 (5,5)	1040 (3,0)		512 (36,0)	
GlyIleIle	302 (65,0)	324 (100,0)	340 (96,0)			

Таблица 3

Масс-спектр ЭРИАД пептидов трипсинового гидролизата белка
сGMP-фосфодиэстеразы
(m/z ; в скобках I , %)

Пептид	MH^+	$[M+Na]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[MH+Na]^{2+}$
AcMetAsnLeuGluProProLys	870 (44,0)	892 (11,0)	435,5 (8,0)	446,5 (4,0)
AlaGluIleArg	488 (48,0)			
SerAlaThrArg	434 (39,0)			
ValMetGlyGlyProValThrProArg	913 (56,0)	935 (12,0)	457 (25,0)	479 (4,0)
LysGlyProProLys	526 (37,0)		263,5 (5,0)	
PheLys	294 (100,0)			
GlnArg	303 (44,0)	325 (7,0)		
PheLysGlnArg	578 (38,0)			
GlnThrArg	404 (30,0)			
GlnPheLys	422 (52,0)			
PheLysGlnArgGlnThrArg	963 (10,0)			
SerLysProProLys	556 (22,0)	578 (38,0)		
LysGlyValGlnGlyPhe	635 (22,0)	657 (7,0)		
GlyProProLysPheLys	673 (6,0)			

ют пики ионов с m/z 375, 450, 459, 462, 512, 891, 899 (в табл. 1 не приводятся), образование которых можно объяснить либо неспецифичностью действия фермента, либо гидролизом примесей в исследуемом полипептиде.

Аналогичная масс-спектрометрическая пептидная карта получена для химотрипсинового гидролизата бромцианового фрагмента 58—87 белка сGMP-фосфодиэстеразы (табл. 2, рис. 4). Данные табл. 2 показывают, что пики ионов $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ имеют иногда интенсивность, большую, чем ионов MH^+ , что можно объяснить повышенным содержанием в образце солей щелочных металлов. Значения массовых чисел квазимолекулярных ионов свидетельствуют, что гидролиз проходит по карбоксильным группам ароматических аминокислот, гистидина и лейцина.

В масс-спектре смеси пептидов трипсического гидролиза сGMP-фосфодиэстеразы (табл. 3) присутствуют пики ионов MH^+ всех пептидов, которые должны были получиться при трипсिनном гидролизе. Появление

в гидролизате пептида Lys-Gly-Val-Gln-Gly-Phe объясняется часто наблюдаемой неспецифичностью действия трипсина по связям, образуемым ароматическими аминокислотами [17]. Значительную интенсивность имеют пики квазимолекулярных ионов N-концевого пептида Ac-Met-Asn-Leu-Glu-Pro-Pro-Lys. Ни одного из возможных пиков квазимолекулярных ионов фрагмента 51—87 (рис. 5) в спектре не наблюдается, потому что данный прибор не позволяет анализировать соединения с молекулярной массой, большей 1600 Да. Однако структура этого фрагмента подтверждается пептидными картами хмотрипсиновых гидролизатов фрагментов 18—57 и 58—87, образующихся при расщеплении сGMP-фосфодиэстеразы бромцианом (см. рис. 3, 4).

Полученные масс-спектрометрические карты позволили подтвердить всю аминокислотную последовательность сGMP-фосфодиэстеразы, установленную классическим методом [16]. В отличие от пептидных карт, получаемых хроматографическими методами, масс-спектрометрические пептидные карты дают информацию не только о количестве пептидов, получаемых в результате гидролиза, но и о их молекулярных массах. То, что масс-спектры ЭРИАД не зависят от поверхностно-активных свойств пептидов, в ряде случаев может делать их более информативными в сравнении со вторично-эмиссионными масс-спектрами. Однако в спектрах ЭРИАД наблюдается несколько большее число одно- и двухзарядных квазимолекулярных ионов каждого компонента смеси и это делает процесс составления пептидных карт более трудоемким.

Авторы выражают благодарность В. М. Липкину и Х. Г. Мурадову за предоставление пептидов и гидролизатов белка и обсуждение полученных результатов.

Экспериментальная часть

Масс-спектры ЭРИАД получены на приборе ХЖ-МХ 3303. Проба с расходом 0,003 мкл/с вводилась в металлический капилляр, находящийся под потенциалом 2,5 кВ относительно первой диафрагмы. Разность потенциалов между соплом и сканмером составляла 500—600 В [15]. Экстракцию ионов проводили из метанольного раствора с добавлением 10% H₂SO₄ до pH 2 при температуре порядка 20° С.

Для анализа достаточно 1—2 имоль полипептида.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Страйер Л.* Биохимия. М.: Мир, 1984. С. 92—93.
2. *Розынов Б. В., Жданович Ю. А., Кузовков А. Д.* // Механизм биосинтеза антибиотиков / Ред. Скрябин Г. К., Навашин С. Н. М.: Наука, 1986. С. 186—188.
3. *Morris H. R., Panico M., Taylor G. W.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. № 1. P. 299—305.
4. *Teller L. W.* // Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 158—162.
5. *Pucci P., Garestia C., Fiorelli G., Mastrobuoni A. M., Pagano L.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 130. № 1. P. 84—90.
6. *Seki S., Kambara H., Nacki H.* // Org. Mass Spectrom. 1985. V. 20. № 1. P. 18—24.
7. *Crotfahn L., Steinert H.* // Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 164—169.
8. *Gibson B. W., Biemann K.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 1956—1960.
9. *Tokao T., Hitouji T., Shimonishi Y., Tanabe T., Inouye S., Inouye M.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 301. № 10. P. 6105—6109.
10. *Biemann K., Gibson B. W., Mathews W. R., Pang H.* // Mass Spectrom. in health and life sci. / Eds Barlingame A. L., Castagnoli N., Jr. Amsterdam: Elsevier, 1985. P. 239—263.
11. *DeAngelis F., Botta M., Ceccarelli S., Nicoletti R.* // Biochem. J. 1986. V. 236. № 2. P. 609—612.
12. *Caprioli R. M.* // Biochem. Soc. Trans. 1987 V. 15. P. 162—164.
13. *Naylor S., Shelton N. I., Williams D. H.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1986. P. 1619—1621.
14. *Naylor S., Findeis A. F., Gibson B. W., Williams D. H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 20. P. 6359—6363.
15. *Александров М. Л., Галль Л. П., Краснов П. В., Николаев В. И., Шкуров В. А.* // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. № 9. С. 1570—1580.
16. *Овчинников Ю. А., Мурадов Х. Г., Фейгина М. Ю., Назимов И. В., Хорошилова Н. И., Шемякин В. В., Азиедов Н. Б., Липкин В. М.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 6. С. 1496—1499.
17. *Остославская В. И., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Сурова И. А., Левин Е. Д., Тимозина Е. А., Степанов В. М.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1030—1047.

THE APPLICATION OF THE SOLUTED ION EXTRACTION
AT ATMOSPHERIC PRESSURE (SIE AP) MASS SPECTROMETRY
FOR PEPTIDE MAPPING

RESHETOVA O. S., ROZYNOV B. V.

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

SIE AP mass spectra of tryptic peptides from the cyclo-GMP phosphodiesterase γ -subunit and of chymotryptic peptides from the cyanogen bromide fragments of the same subunit exhibit MH^+ ions for all theoretically possible smaller peptides. These facts show that SIE AP mass spectrometry can be successfully applied to peptide mapping using 1—2 nmoles of the compound.