



УДК 577.112.5:543.31

**НОВЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ПЕПТИДОВ**

*Александров М. Л.**, *Барам Г. И.*, *Галль Л. Н.**,
Грачев М. А., *Кнорре В. Д.*, *Краснов Н. В.**,
Куснер Ю. С., *Миргородская О. А.***, *Николаев В. И.**,
*Шкуров В. А.**

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск;*

** Институт аналитического приборостроения Академии наук СССР, Ленинград;*

*** Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков
и ферментов медицинского назначения, Ленинград*

Определение аминокислотных последовательностей в настоящее время производится главным образом по методу Эдмана. Хорошо известные трудности этого метода при применении его к длинным полипептидным цепям (связанные с большими затратами времени и с накоплением «химического шума») заставляют искать альтернативные способы расшифровки последовательности, среди которых перспективными с точки зрения высокой чувствительности являются масс-спектрометрические методы.

Еще в 1966 г. была теоретически показана принципиальная возможность масс-спектрометрического определения первичной структуры не слишком длинных цепей известного аминокислотного состава [1]. Предполагалось, что осуществим статистический гидролиз, при котором в гидролизате присутствуют фрагменты, получающиеся при всех возможных комбинациях разрывов пептидных связей в цепи, а для каждого из фрагментов масс-спектрометрически измеряется с точностью до одной атомной единицы молекулярная масса. Алгоритм восстановления первичной структуры оказался несложным и весьма устойчивым к наличию неполной или избыточной («шумовой») информации. По мере развития масс-спектрометрической техники «мягкой» ионизации, обеспечившей получение масс-спектров пептидов, содержащих практически лишь пики молекулярных ионов, масс-спектрометрическое определение первичной структуры в соответствии с работой [1] стало практически возможным. В работах [2–4] продемонстрировано определение первичной структуры ряда индивидуальных пептидов и их смесей на масс-спектрометрах с ионизацией при полевой десорбции (FD) [2, 3] и быстрыми атомами (FAB) [4]. Фрагменты получались путем эдмановской и (или) ферментативной деградации. Однако эти уже хорошо разработанные способы масс-спектрометрического анализа не позволяют осуществить непосредственный ввод жидкости в прибор, что увеличивает расход пробы, время анализа, затрудняет стыковку с жидкостным хроматографом, упрощающим в ряде случаев расшифровку масс-спектра, например при дискриминации остатков лейцина и изолейцина.

В настоящей работе на примере брадикинина показано, что описанный в нашем предыдущем сообщении [5] способ масс-спектрометрического анализа с непосредственным вводом жидкой пробы может быть использован для определения первичной структуры пептидов.

На схеме статистической деградации брадикинина карбоксипептидазой Y приведены молекулярные массы протонированных молекулярных ионов и разности их масс, на рис. 1 — экспериментальные результаты ис-

	MH^+		
1060	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg		
		$\Delta M = 153$ (Arg)	
904	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe		
		$\Delta M = 147$ (Phe)	
757	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro		
		$\Delta M = 97$ (Pro)	
660	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser		
		$\Delta M = 87$ (Ser)	
573	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe		
		$\Delta M = 147$ (Phe)	
426	Arg-Pro-Pro-Gly		

следования реакции брадикинина с карбоксипептидазой Y. Реакцию проводили при pH 5,2, концентрации брадикинина 10 мг/мл и фермента $8 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. Через определенные промежутки времени для масс-спектрометрического анализа отбирали 2 мкл реакционной смеси и реакцию в пробе останавливали разбавлением метанолом 1:10. Пробу подавали в масс-спектрометр со скоростью $1,4 \cdot 10^{-2}$ мкл/с. Из рис. 1 видно, что разности масс квазимолекулярных ионов в спектре позволяют однозначно определить C-концевую последовательность пептида как ..Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Известно, что карбоксипептидаза Y (Олайн) медленно отщепляет остаток глицина [6]. Поэтому фрагменты, образующиеся после отщепления остатка глицина, принципиально не могут быть накоплены в концентрации, соизмеримой с предыдущими. Однако «лестницу» продуктов неполного гидролиза можно получить и путем кислотного гидролиза. В настоящей работе для этой цели в молекулу брадикинина была введена N-концевая «якорная» дансильная группа и полученный дансилбрадикинин был подвергнут неполному кислотному гидролизу (6 M HCl, 4 ч, 60° C). Масс-спектр полученного гидролизата (рис. 2) свидетельствует об N-концевой последовательности брадикинина. В спектре отсутствуют линии Dns-пептидов, содержащих остаток серина, поскольку кислотный гидролиз по нему протекает существенно быстрее, чем по другим аминокислотным остаткам [6].

Введение якорной группы в данном случае преследует две цели: 1) сдвинуть информативную область масс-спектра в сторону более высоких масс, где нет пиков низкомолекулярных компонентов реакционной смеси и примесей, и этим уменьшить влияние «химического» шума; 2) однозначно определить принадлежность продуктов неполного гидролиза к N-концу молекулы пептида и этим упростить интерпретацию результатов. В более сложных случаях, когда не удается получить легко интерпретируемые, упорядоченные, как на рис. 1 и 2, спектры молекулярных масс фрагментов, должны использоваться алгоритмы восстановления первичной структуры типа предложенных в работе [1]. В таких случаях в качестве средств химической модификации и статистической деградации для масс-спектрометрического анализа можно привлекать весь имеющийся арсенал модифицирующих и деградирующих агентов, а также протеиназ.

Количество брадикинина, затраченное на получение одного из спектров типа приведенных на рис. 1, с отношением сигнал/шум более 50, составило около 100 пмоль, время на запись спектра — около 10 мин. Очевидные преимущества масс-спектрометрического анализа с непосредственным вводом жидкой пробы, как видно по рис. 1 и 2, — высокая скорость определения спектра фрагментов, простота интерпретации экспериментальных результатов, отсутствие «химического» шума, особенно в спектрах C-концевых последовательностей и модифицированных соединений. При условии повышения чувствительности на два-три порядка величины (это достигается за счет уменьшения времени записи спектра, оптимизации системы формирования ионного пучка, уменьшения отношения сигнал/шум в спектре при использовании его математической обработки)

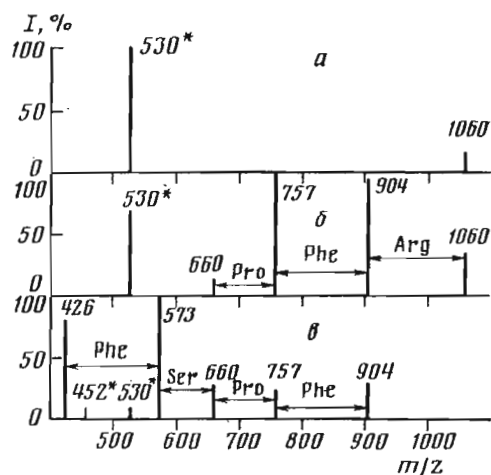


Рис. 1. Масс-спектры продуктов гидролиза брадикинина карбоксипептидазой Y, снятые через 27 (б) и 307 мин (в) после начала реакции; а – исходная смесь. Звездочкой обозначены двухзарядные ионы, образующиеся только тогда, когда пептид имеет достаточную длину

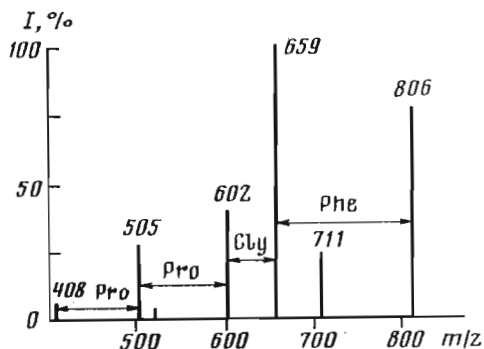


Рис. 2. Масс-спектр продуктов неполного кислотного гидролиза дансилбрадикинина. MH^+ : Dns-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser...



описываемый метод определения первичной структуры может успешно конкурировать либо в сочетании с секвенатором дополнять метод Эдмана.

Авторы искренне благодарят Б. В. Розынова и И. В. Назимова (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР) за полезные рекомендации при написании работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов Ю. В., Франк-Каменецкий А. Д., Франк-Каменецкий М. Д. Биохимия, 1966, т. 31, вып. 4, с. 799–804.
2. Shimonishi Y., Hong Y.-M., Kitagishi T., Matsuo T., Matsuda H., Katakuse I. Eur. J. Biochem., 1980, v. 112, № 2, p. 251–264.
3. Hong Y.-M., Takao T., Aiimoto S., Shimonishi Y. Biomedical Mass Spectrometry, 1983, v. 10, № 8, p. 450–457.
4. Morris H. R., Panico M., Taylor G. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 117, № 1, p. 299–305.
5. Александров М. Л., Барам Г. И., Галля Л. Н., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 700–704.

Поступило в редакцию
14.VI.1984
После доработки
29.X.1984

APPLICATION OF A NOVEL MASS-SPECTROMETRIC METHOD TO SEQUENCING OF PEPTIDES

ALEXANDROV M. L.*, BARAM G. I., GALL L. N.*, GRACHEV M. A.,
KNORRE V. D., KRASNOV N. V.*, KUSNER Yu. S., MIRGORODSKAYA O. A.**,
NIKOLAEV V. I.*, SHKUROV V. A.*

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

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

*** All-Union Institute for Research and Technology of Antibiotics
and Enzymes for Medical Application, Leningrad.*

The new method of direct inlet of liquids into mass-spectrometer described recently gives predominant lines of molecular ions in the mass spectra of even long peptides. The method has been applied to sequencing of peptides. It was checked with a model peptide bradykinin Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. The latter was subjected to partial digestion with carboxypeptidase Y, and the mixture of the digestion products obtained introduced directly into a mass-spectrometer in an aqueous-metanol solution. The differences of the molecular masses over the «ladder» of molecular ions obtained confirmed the C-terminal sequence... Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. In another experiment, Dns-bradykinin was obtained and subjected to partial acidic hydrolysis. The differences of molecular masses over the «ladder» of molecular ions of Dns-peptides obtained was in accord with the N-terminal sequence Dns-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe... Compared with the classical methods, the novel approach promises to facilitate sequencing of peptides.