



УДК 577.114.5 : 543.51

© 1994 Ю. Н. Елькин, Н. А. Командрова, С. В. Томшич,
П. В. Бондаренко *, Р. А. Зубарев *, А. Н. Кныш *

²⁵²Cf-ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННЫЕ МАСС-СПЕКТРЫ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;
* ПО «Электрон», Сумы*

Исследована возможность использования прибора МСБХ (²⁵²Cf-плазменно-десорбционного масс-спектрометра) для изучения олигосахаридов О-специфических цепей липополисахаридов бактерий. Получены и обсуждены экспериментальные данные по ионизации галактуроновой кислоты, нейтральных и бактериальных олигосахаридов, содержащих NHR- и COOH-группы. Прибор использован для оценки состава фракций при разделении продуктов деградации О-специфических полисахаридных цепей и установления их строения.

Определение молекулярной структуры О-специфических цепей липополисахаридов грамотрицательных бактерий позволяет правильно идентифицировать их виды и подвиды, осуществлять мониторинг инфекций. О-Специфические полисахариды бактерий характеризуются большим разнообразием моносахаридного состава и строения и продолжают оставаться источником новых моносахаридов [1]. Это часто затрудняет успешную интерпретацию ЯМР-спектров полисахаридных цепей новых видов бактерий или их олигосахаридных (ОС) фрагментов. Последние, как правило, получают в незначительных количествах химической деградацией полисахаридов с последующим хроматографическим разделением. Вопрос об индивидуальности ОС часто остается открытым. В подобных обстоятельствах масс-спектрометрический анализ исходных ОС [2, 3] оказался возможным благодаря появлению десольватационных методов ионизации — бомбардировка пучком ускоренных атомов [4] или ионов цезия [5], а также методов ионизации десорбцией электрическим полем [6]. Первые опыты десорбции электрическим полем низкомолекулярных ОС [6] явились основой для анализа поверхностных гликолипидов с помощью ²⁵²Cf-плазменной и лазерной десорбционной масс-спектрометрии [7].

Ранее, при изучении методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии глюкозы [8], лактозамина и хитоолигосахаридов [9], мальтоолигосахаридов [10] и более сложных гликоконъюгатов [7], было показано, что принципиальным результатом десорбции является формирование молекулярного аддукт-иона (МАИ) с катионами щелочных металлов (Na⁺, K⁺) и/или протоном (H⁺). Кроме того, изучение нейтральных [10] и аминоолигосахаридов [9] обнаружило образование

Сокращения: ОС — олигосахариды, Нех — гексоза, СИ — сиквенс-ионы, МАИ — молекулярный аддукт-ион.

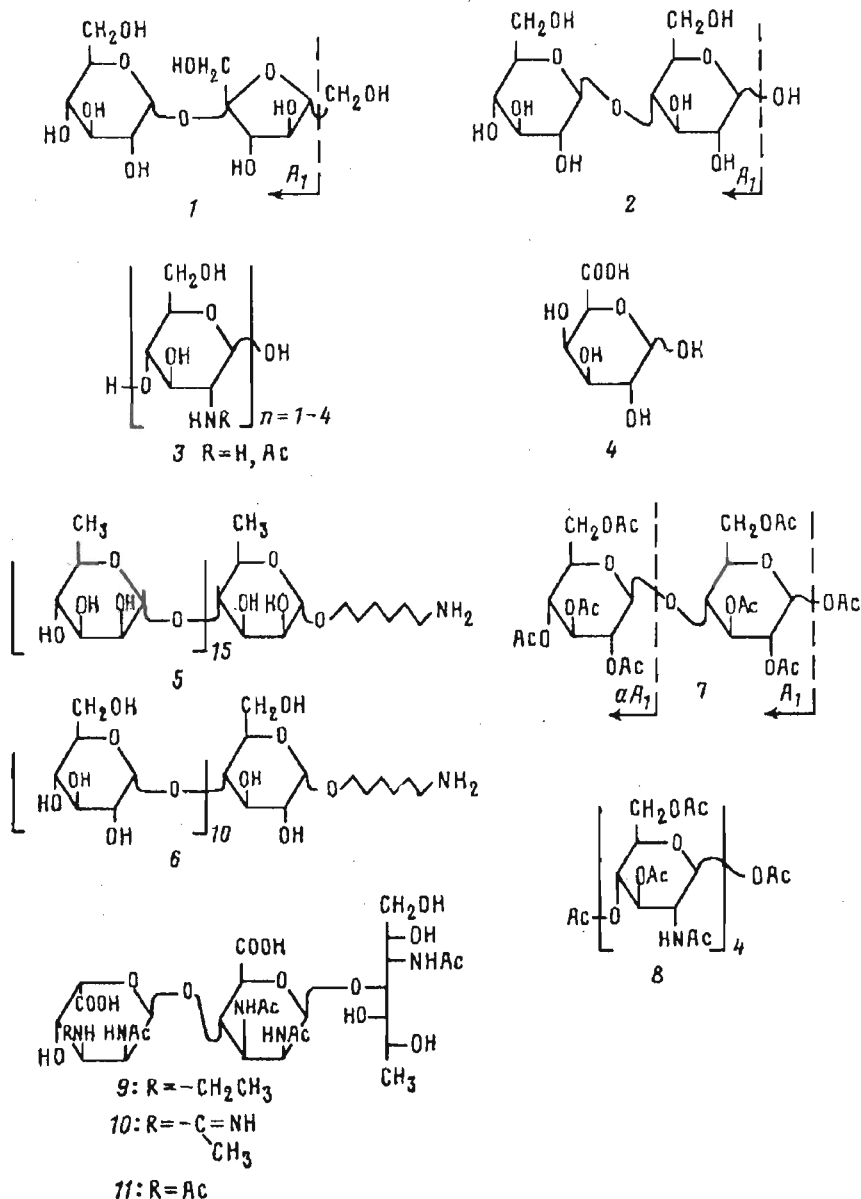
целого набора сиквенс-ионов (СИ), особенно в случае нейтральных ОС. Так, при исследовании аминоклисахаридов на примере N-ацетилированных хитобиозы и хитотетраозы [9] обнаружена интенсивная фрагментация по гликозидным связям с образованием типичных СИ $A_1, ((\text{HexNAc})_n - \text{OH})^+$ от тримера, а также ранее неизвестных ионов HexNAcH^+ , HexNAcNaNa^+ от димера. Формирование обоих типов ионов (МАИ и СИ) сопровождалось дегидратацией. Эти результаты получены на инструменте В10 10N с «проникающей» десорбцией [11], в котором осколки деления ^{252}Cf пронизывают мишень — тонкую фольгу, на тыльной стороне которой нанесен образец.

Возможность определения последовательности моносахаридных остатков углеводных цепей (секвенирования) одновременно с получением с заметным выходом МАИ побудило нас использовать этот метод масс-спектрометрии для анализа бактериальных ОС с помощью аналогичного прибора, но имеющего угловую схему ионооптической системы источника ионов — (МСБХ) [12], в котором осколки бомбардируют мишень — металлический диск под углом 45° со стороны образца (десорбция «отражением»). Так как полисахариды из бактерий характеризуются наличием NHR- и COOH-групп, этим методом прежде был изучен ряд кислот, нейтральных и аминоклисахаров, от моно- до тетраоз. Результаты показали только образование МАИ. Ни СИ, ни их дегидратированных спутников в спектрах, полученных на этом приборе, не обнаружено.

Отсутствие фрагментации ОС при десорбции «отражением» (МСБХ), вероятно, можно отнести за счет более «мягких» условий ионизации, чем в условиях с «проникающей» десорбцией. Об этом свидетельствуют эксперименты с сахарозой (1) и целлобиозой (2), полученные нами на макетном инструменте с «проникающей» десорбцией. Действительно, в спектрах ОС (1) и (2), кроме МАИ $M\text{Na}^+$ и $M\text{K}^+$, есть СИ: A_1 и $A_1 - \text{H}_2\text{O}$, тогда как в спектрах, полученных на МСБХ (с десорбцией «отражением»), наблюдаются только ионы МАИ. Спектры отрицательных ионов, полученные на обоих инструментах, имеют один пик иона $[M-\text{H}]^-$. Так как и при «проникающей» десорбции не зарегистрированы осколочные отрицательные ионы, то вполне вероятно, что молекулярный отрицательный ион образуется резонансным захватом электронов и его диссоциация приводит к иону $[M-\text{H}]^-$. Наиболее вероятные типы этого иона: карбоксилат-анион (появляется при энергии электронов 1,5 эВ) и алкоколят-анион (при 2,7 эВ) [13]. При такой избыточной энергии трудно ожидать фрагментации моносахаридов и разрыва ОС-цепей. Действительно, в спектрах ОС (1) и (2) наблюдаются даже пики кластерных ионов $[2M-\text{H}]^-$.

В спектрах аминоклисахаридов (3), полученных нами на МСБХ, также не обнаружено осколочных структурно значимых ионов, только пики МАИ. Например, в спектре N-ацетилглюкозамина (3, $n = 1$) наблюдается основной пик иона $M\text{Na}^+$ при m/z 244 и имеется незначительный пик при m/z 202, который следует расценивать как пик примесного глюкозамина ($M\text{Na}^+$), но не как фрагментный ион.

Интересно отметить результат, полученный при исследовании галактуронової кислоты (4), не описанный ранее. В ее спектре кроме пика при m/z 217 ($M\text{Na}^+$) имеется интенсивный пик при m/z 212. Можно предположить, что это молекулярный гидратированный ион $[M + \text{H}_2\text{O}]^+$. Оба эти иона десорбируются не только с нитроцеллюлозной, но и с жирнокислотной матрицы — бегеновой кислоты. Молекулы бегеновой кислоты при этом также ионизируются, но с образованием ионов M^+ и $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$, которые характерны для низковольтных масс-спектров электронного удара. Но молекулярного гидрат-иона эта кислота не образует, так как нет условий для возникновения внутримолекулярной водородной связи, имеющей место у галактуронової кислоты. Масс-спектры же отрицательных ионов обеих кислот содержат только один пик карбоксилат-аниона.



Исследуя различные ОС на МСБХ и получая только МАИ, было интересно использовать прибор для оценки степени полимеризации полисахаридов. С этой целью нами были получены спектры синтетических полисахаридов (5) и (6) с детектированием положительных ионов. Полисахарид (5) содержит 16 остатков рамнозы (M_r 2453) и проявляется в плазменно-десорбционном спектре пиком иона MNa^+ при m/z 2478. В спектре присутствует также пик иона при m/z 2918, молекулярная масса которого соответствует гомологу, содержащему на три остатка рамнозы больше, чем основной продукт синтеза. Это пример получения МАИ самого высокополимерного сахара (19 моносахаридных остатков) десорбцией осколками деления ^{252}Cf . Другой полисахарид (6), имеющий в своем составе 11 остатков глюкозы (M_r 1898), дает спектр, в котором имеется пик молекулярного иона MNa^+ при m/z 1921 и серия пиков, различающихся между

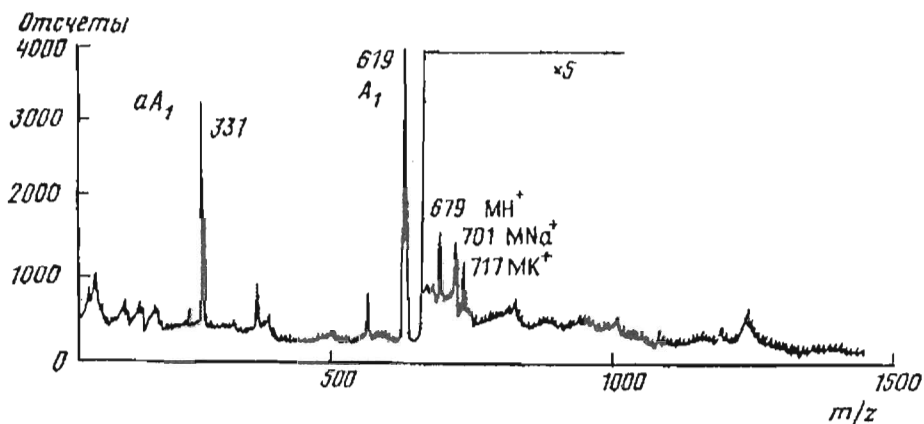


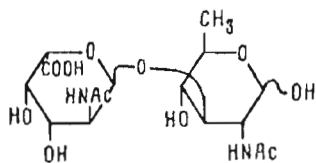
Рис. 1. ^{252}Cf -плазменно-десорбционный масс-спектр галактуроновой кислоты, полученный с нитроцеллюлозной матрицы

собой по молекулярной массе на 162 а.е.м. и заканчивающихся пиком при m/z 788 (что соответствует тетрамеру). Для объяснения этого факта наиболее вероятно предположить, что данные ОС представляют собой набор олигомеров, образующихся в процессе синтеза конечного продукта. Если рассматривать этот факт как эффект фрагментации, то тогда бы мы наблюдали серию пиков молекулярных ионов без натрия. В нашем же спектре имеется серия пиков именно МАИ соответствующих гомологов. Таким образом, полученные результаты позволяют судить о возможности данного прибора определять степень индивидуальности исследуемых образцов.

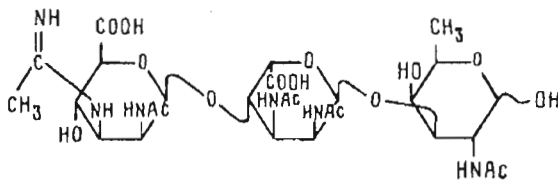
Масс-спектрометрическое исследование гликоконъюгатов показало, что для расщепления гликозидных связей МАИ, обладающих незначительной избыточной энергией (ионизация бомбардировкой ускоренными атомами Хе или осколками деления ^{252}Cf), и образования СИ требуется либо активация МАИ столкновением, либо предварительная модификация молекул в ацетильные или метильные производные [10, 11].

Масс-спектр ацетилированной целлобиозы (7), полученный нами (рис. 1), включает набор очень слабых пиков МАИ не только со щелочными металлами, но и с протоном, и два интенсивных пика СИ aA_1 при m/z 331 и A_1 при m/z 619 в сопровождении незначительных пиков продуктов отщепления нейтральных фрагментов с массой 60 и 42 а.е.м. Что касается аминокликосахаридов, то даже ацетилированная хитотетраоза (8) фрагментирует с образованием только слабых СИ первых двух остатков с восстанавливающего конца. Это, видимо, объясняется прочностью гликозидных связей модифицированных ОС все-таки оставляет надежду на получение сведений о последовательности их остатков из ^{252}Cf -плазменно-десорбционных масс-спектров. О-Специфические полисахаридные цепи ряда бактерий, например рода *Pseudomonas*, характеризуются содержанием высокоаминированных уроновых кислот [1]. Масс-спектры десорбции аминокликосахаридов ОС, полученные с детектированием положительных ионов, имеют только пики МАИ. МАИ альдобиоуроновых ОС (9)—(11) несут три катиона натрия, два из которых образуют соль. Спектр дисахарида с одной аминокликоуроновой кислотой (12) характеризуется МАИ с двумя катионами натрия. Спектры отрицательных ионов этих аминокликоуроновых ОС характеризуются значительным накоплением ионов $[M-H]^-$. Количество этих ионов, нормированное на число событий, значительно превосходит количество накопленных ионов MNa^+ в режиме регистрации положительных ионов. Этот факт следует использовать для обнаружения кислых ОС в продуктах расщепления О-специфических цепей. ОС (13) в спектре положительных ионов дает только пик МАИ с протоном (m/z 721) благодаря высокому средству к

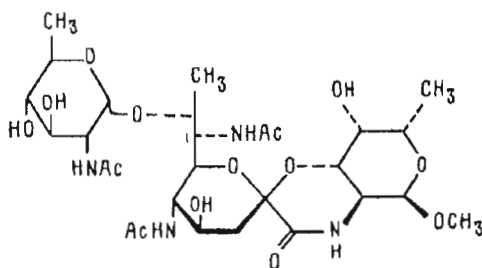
протону ацетамидиновой группы. Спектр нейтрального аминоолигосахарид (14) содержит серию комбинаций МАИ с катионами K^+ и Na^+ . Распределение МАИ по нескольким пикам из-за таких комбинаций может иметь преимущество при определении молекулярной массы ОС, так как в одном спектре будет сделано несколько измерений величины m/z МАИ одной и той же молекулы. Однако в случае незначительного количества образца предпочтительнее иметь один пик, в котором будет собран полный ионный ток МАИ.



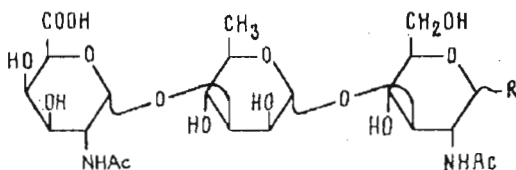
12



13



14



15: R=OH

16: R=F

Исследование спектров фрагмента (15) O-цепей *Yersinia enterocolitica* и его метильных и ацетильных производных (рис. 2) подтверждает этот вывод. Действительно, в спектре ацетилированного производного есть СИ с незначительным выходом (m/z 302 и 330), которые указывают на концевое расположение аминосугаров в цепи изучаемого трисахарид. В спектре метильных производных нет пиков СИ, но обнаружен пик при m/z 758 сопутствующего С-фторгликозида (16), побочного продукта HF-сольволиза полисахарида O-специфических цепей. Серия более легких пиков обусловлена фрагментами потери MeOH от МАИ и МАИ продуктов неполного метилирования.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных нами

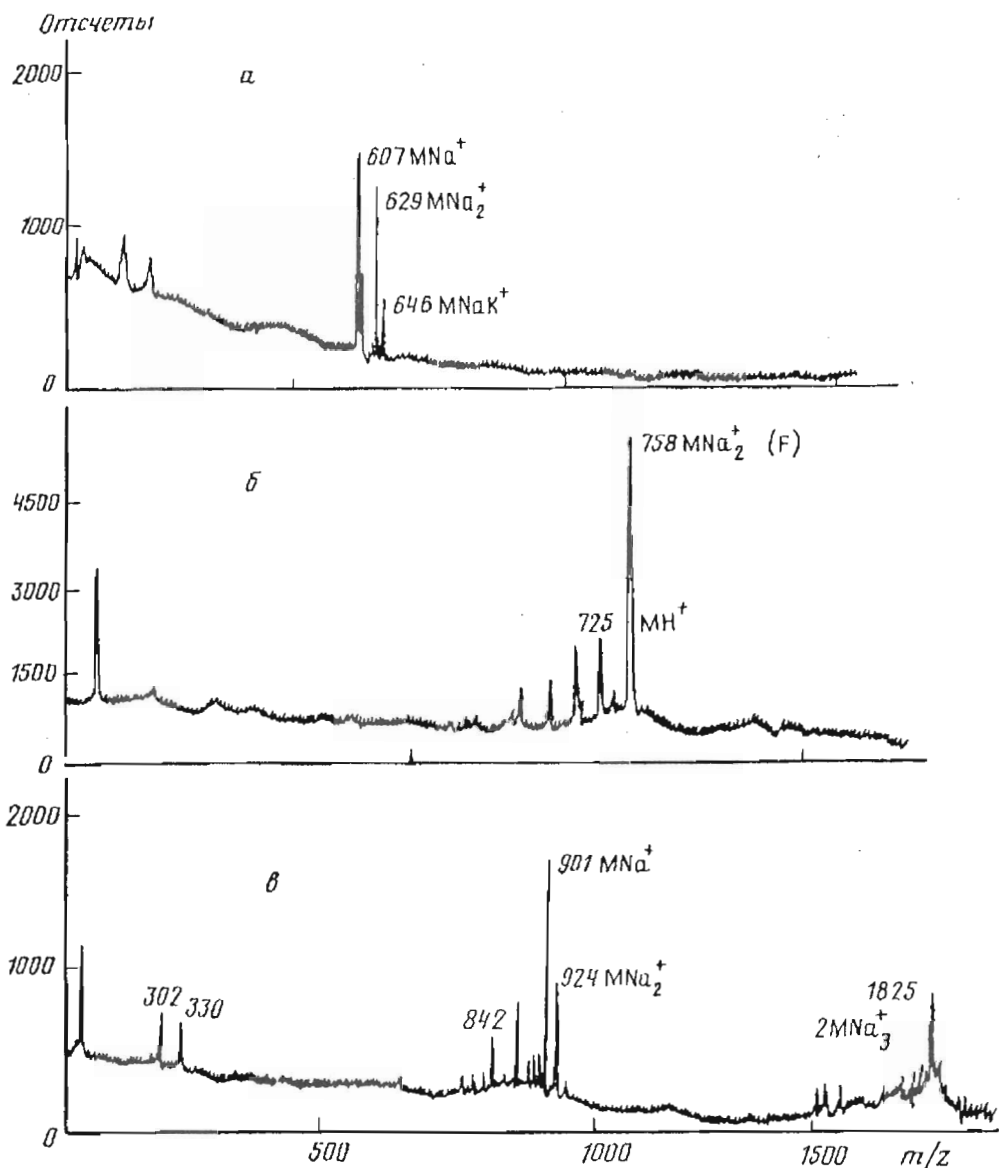


Рис. 2. ^{252}Cf -плазменно-десорбционные масс-спектры исходного трисахаридного фрагмента О-цепей *Yersinia enterocolitica* (а), метилированного (б) и ацетилированного (в) производных

показано, что при ^{252}Cf -плазменно-десорбционном масс-спектрометрическом исследовании углеводов на приборе МСБХ образуются только молекулярные аддукт-ионы и какая-либо фрагментация отсутствует. Это позволяет определять молекулярные массы олигосахаридов гетерогенного состава, степени их полимеризации, а также контролировать степень индивидуальности олигосахаридов. Ограниченная фрагментация модифицированных олигосахаридов дает возможность использовать метод для определения последовательности моносахаридных остатков в олигосахаиридах.

Авторы благодарят Ю. А. Книреля, Н. А. Кочарову, В. И. Торгова (ИОХ, Москва) за предоставление образцов для исследования.

Экспериментальная часть

Образцы ОС (5), (6), (9)—(14) были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н. Д. Зелинского (Москва).

Свободные ОС растворяли в воде или водном метаноле (30—70% метанола), метиловые эфиры и полные ацетаты ОС — в хлороформе, метаноле или смеси хлороформ — метанол (1 : 1). Примерно 1 мМ раствор сахаридов наносили на нитроцеллюлозную матрицу микрошприцем (3 мкл) и подсушивали струей теплого воздуха. Нитроцеллюлозную матрицу (коллоксилин целлулоидный) готовили методом электрораспыления раствора нитроцеллюлозы в ацетоне (Chemapol, ЧСФР) на установке «Электроспрей»-УНП (ПО «Электрон», Украина). На металлическую мишень образцы наносили только методом электрораспыления.

Масс-спектры получали при помощи времяпролетного масс-спектрометра МСБХ (ПО «Электрон», Украина) с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (диапазон массовых чисел до 20 кДа, чувствительность по грамицидину S 100 фмоль) [11]. Время накопления спектра от 7 до 20 мин, ускоряющее напряжение 25 кВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kocharova N. A., Paramonov N. A., Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Stanislavsky E. S., Lanyi B. // *Acta microbiol. Acad. sci. hung.* 1988. V. 13. P. 3—24.
2. Tomas-oates J. E., Dell A. // *Biochem. Soc. Trans.* 1989. V. 17. P. 416—422.
3. Webb J. W., Jiang K., Gillece-Castro B. L., Tarentino A. L., Plummer T. H., Byrd J. C., Fisher S. J., Burlingame A. L. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 169. P. 337—349.
4. Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981. P. 325—337.
5. Burlingame A. L., Baillie T. A., Derrick P. J. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. P. 165R—211R.
6. Housell E. F., Madigan M. J., Lawsan A. M. // *Biochem. J.* 1984. V. 219. № 3. P. 947—952.
7. Jardin I., Scanlan G., McNeil M., Brennan P. J. // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. P. 416—422.
8. Becker O., Furstenu N., Knippelberg W., Krueger F. R. // *Org. Mass Spectrom.* 1977. V. 7. P. 461—464.
9. Martin W. B., Silly L., Murphy C. M., Raley T. J., Cotter R. J., Bean M. F. // *Int. J. Mass Spectr. and Ion Processes.* 1989. V. 92. P. 243—265.
10. Aduro S., Chait B. T. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1621—1625.
11. Kamensky I., Craig A. G. // *Anal. Instrument.* 1987. V. 16. № 3. P. 71—91.
12. Knysh A. N., Savin O. R., Loschinin M. B., Kirianov G. Y., Bondarenko P. V., Zubarev R. A., Rozynov B. V. // *Proc. V Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod.* V. 2. Varna, 1989. P. 370—372.
13. Воинов В. Г., Елькин Ю. П., Богуславский В. М. // *Химия природн. соедин.* 1987. С. 348—354.
14. Khan A. H., Shaikh B., Allen E. H., Sokoloski E. A. // *Biomed. Environm. Mass Spectrom.* 1988. V. 17. P. 329—335.

Поступила в редакцию
28.X.1993

Yu. N. Elkin, N. A. Komandrova, S. V. Tomshich,
P. V. Bondarenko *,
R. A. Zubarev *, A. N. Knysh *

²⁵²Cf PLASMA DESORPTION MASS SPECTRA OF BACTERIAL
OLIGOSACCHARIDES

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of
Sciences, Vladivostok;*

** PA «Electron», Sumy*

²⁵²Cf plasma desorption mass spectrometry on a «reflect» desorption instrument (MSBX) was used to study oligosaccharides from bacterial O-specific antigenic chains. The data obtained for galacturonic acid, neutral and aminouronic oligosaccharides are discussed. This method is suggested for determining the composition of oligosaccharides from the O-specific polysaccharides and for elucidating their structures after modifications.