



УДК 543.544

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ МЕТОДИКА ПОДГОТОВКИ ПРОБ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ КАЛИФОРНИЯ-252 (TOF-PDMS)

© 1996 г. В. Д. Чиванов[#], Р. А. Зубарев*, С. А. Аксенов**, О. Г. Бордунова, В. И. Еременко, В. М. Кабанец, В. И. Татарина, А. К. Мишнев, В. В. Кураев***, А. Н. Кныш***, И. А. Еременко

Сельскохозяйственный институт, 244030 Сумы, Петропавловская, 57;

*Отдел физики ионов Института радиационных исследований Университета г. Уппсала, Швеция;

**Институт прикладной физики НАНУ, Сумы;

***АО "SELM", Сумы, Украина

Поступила в редакцию 25.09.95 г. После доработки 18.01.96 г.

Установлено, что введение в образец органических кислот (пикриновой, щавелевой, лимонной, винной) значительно повышает выход квазимолекулярных ионов (КМИ) пептидов и белков во время пролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (TOF-PDMS). Степень увеличения выхода КМИ зависит от pK_a кислоты.

Ключевые слова: PDMS-масс-спектрометрия, белки, пептиды, методы пробоподготовки, органические кислоты.

Времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (time-of-flight plasma desorption mass spectrometry – TOF-PDMS) [1] достаточно распространена в биоорганической химии как высокоинформативный метод исследования биомолекул (белков, пептидов, нуклеиновых кислот, липидов [2]). В частности, TOF-PDMS используют для проведения поэтапного экспресс-анализа продуктов синтеза/секвенирования пептидов и белков, в особенности включающих неканонические аминокислоты [3,4]. Одним из ключевых и не решенных до конца вопросов, относящихся к TOF-PDMS пептидов и белков, является разработка методов подготовки проб, позволяющих получать воспроизводимые масс-спектры с одновременным повышением селективной чувствительности к отдельным компонентам мультикомпонентных смесей. Наиболее существенные достижения в этом направлении – введение в практику подготовки проб электронапыления образца на подложку [5] и использование нитроцеллюлозы в качестве матрицы [6]. Хотя нитроцеллюлоза и является наиболее общепринятой матрицей, используемой для анализа пептидов и белков TOF-PDMS, она не позволяет в отдельных случаях получать качественные масс-спектры веществ, находящихся в мультикомпонентных пробах в малых количествах (минорные примеси)

и/или в присутствии остаточных количеств солей – обязательных компонентов буферных систем.

По существу единственный метод, позволяющий удалять примеси из образца, подготовленного для масс-спектрометрического анализа посредством адсорбции белков/пептидов из жидкой фазы на слое нитроцеллюлозы [6], – это смывание водой или подкисленными TFA водно-метанольными/ацетонитрильными растворами [7]. Таким способом удается достаточно эффективно удалять примеси ионов Na^+ и K^+ , уменьшающие выход квазимолекулярных ионов (КМИ) $[M + n\text{H}]^{n+}$, $n \geq 1$. Промывка достаточно проста и удобна, но, к сожалению, часто сопровождается неконтролируемой утерей отдельных компонентов пробы.

Нами разработана методика подготовки проб, позволяющая увеличить выход КМИ искомым компонентам пробы посредством добавки к образцу сильных органических кислот – пикриновой и щавелевой. Основой для разработки данной методики послужили примеры отмеченного нами ранее увеличения выхода КМИ бычьего инсулина с нитроцеллюлозной матрицы в присутствии пикриновой кислоты [8] и наблюдавшегося Шмиттером [9] положительного влияния лимонной кислоты на масс-спектры PDMS смесей модифицированных пептидов как частные случаи хорошо известного в органической масс-спектрометрии “кислотного” эффекта [10].

[#] Автор для переписки.

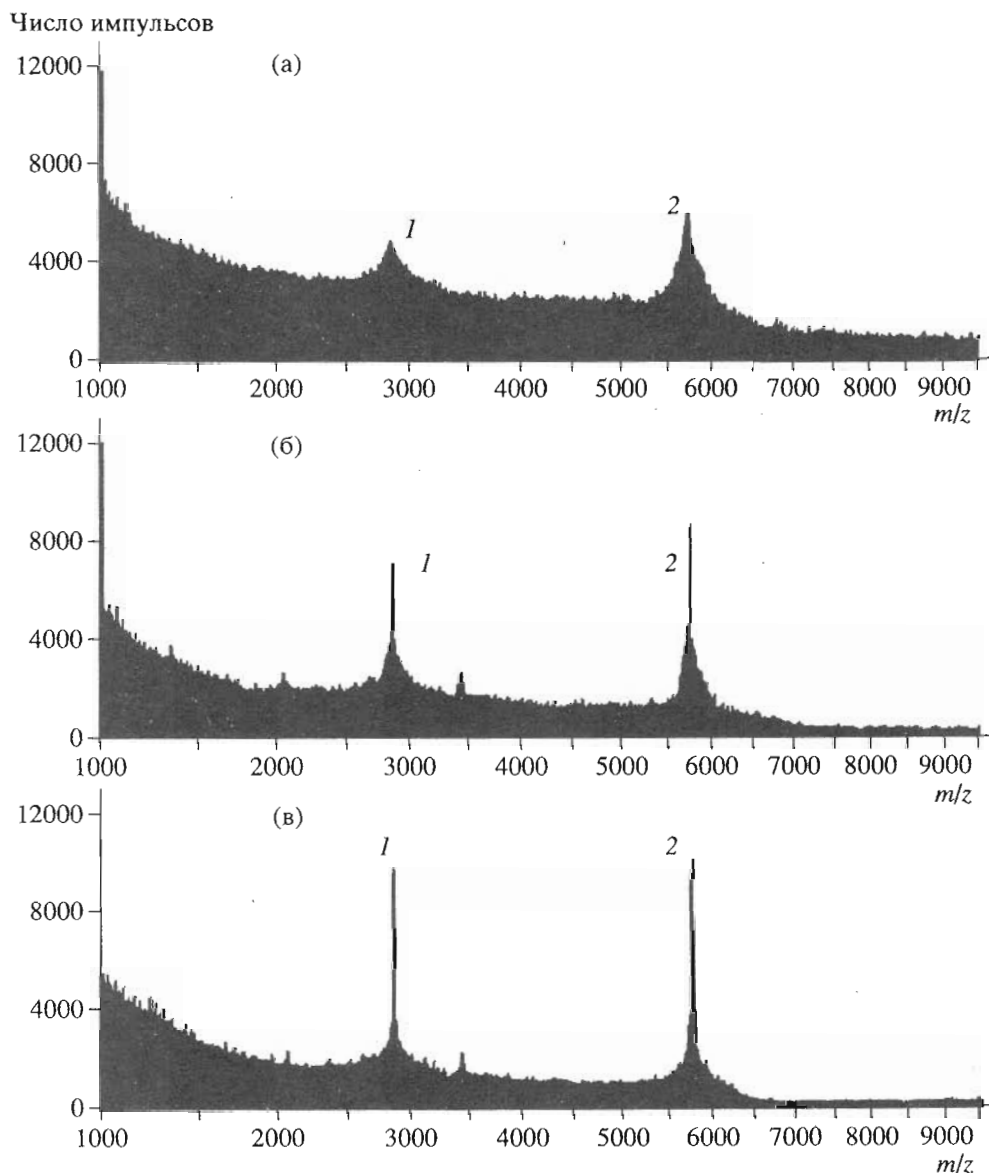


Рис. 1. TOF-PMDS-спектры бычьего инсулина (пробы 30 мкг/30 мл), снятые при различных условиях подготовки проб (см. "Экспериментальную часть"): а – стандартная методика, б – методика со стандартной промывкой (3 × 30 мкл), в – метод с допированием образца пикриновой кислотой. 1 – $[M + 2H]^{2+}$, m/z 2868; 2 – $[M + H]^+$, m/z 5735.

Сравнение выходов КМИ при отмывании белка, адсорбированного на нитроцеллюлозе, бидистиллированной водой и при допировании образца одной из наиболее сильных органических кислот, пикриновой (pK_a 0.38), показывает, что данная кислота несколько более выражено влияет на вид масс-спектра бычьего инсулина (рис. 1в), чем стандартная промывка (рис. 1б). Остальным органическим кислотам: щавелевой (pK_a 1.25), винной (pK_a 3.04), лимонной (pK_a 3.13) и аскорбиновой (pK_a 4.04) – также присуща способность увеличивать выход КМИ, которая, однако, снижается с ростом pK_a кислот (данные не приведены). Нами установлено, что для использования в анализе

белков и пептидов наиболее подходит щавелевая кислота, сочетающая малую летучесть с низким значением pK_a (пикриновая кислота из-за высокой летучести приводит к менее воспроизводимым результатам).

Описанное явление повышения выхода КМИ при допировании образцов пикриновой и щавелевой кислотами может быть использовано в первую очередь для анализа поликомпонентных смесей белков и пептидов [4]. Иллюстрацией может служить проведенный нами анализ неочищенного пчелиного яда – поликомпонентной смеси белковых и пептидных продуктов. Ввиду повышенной "летучести" главного компонента яда – основного

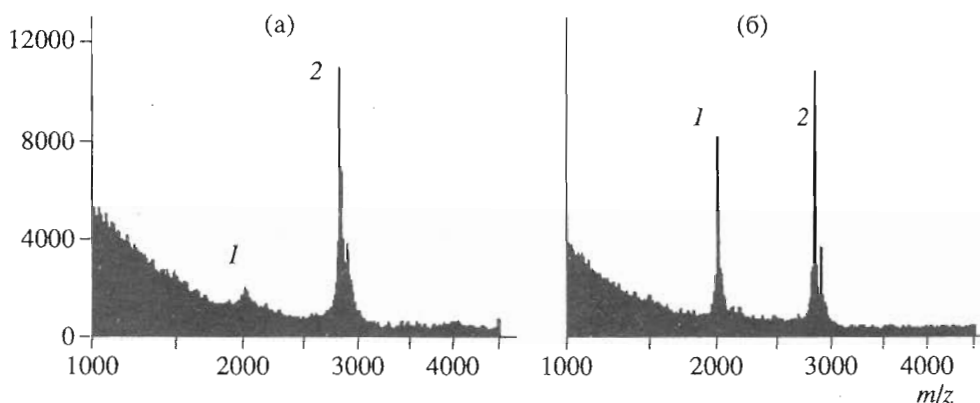


Рис. 2. TOF-PDMS-спектры пчелиного яда (5 мкг/20 мкл) при нанесении проб с использованием стандартной промывки (3×20 мкл) (а) и при допировании 2 мкг пикриновой кислоты (б). 1 – $[M + H]^+$, m/z 2029 (КМИ апамина), 2 – $[M + H]^+$, m/z 2848 (КМИ мелиттина).

белка мелиттина с M_r 2848 (50% от сухой массы цельного препарата) в масс-спектрах PDMS, полученных при стандартных методах подготовки проб, пики минорных компонентов практически отсутствуют (рис. 2а). Внесение в образец пикриновой кислоты позволило получить в масс-спектре отчетливый пик минорного компонента яда пептида апамина (1) с M_r 2029 (2% от сухой массы цельного препарата) наряду с пиком КМИ мелиттина (2) (рис. 2б).

Таким образом, описанная выше методика подготовки проб для PDMS позволяет повышать выход КМИ белков/пептидов в поликомпонентных образцах, предотвращать потери отдельных компонентов анализируемой пробы, возможные в случае использования традиционных методов подготовки проб.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: инсулин из поджелудочной железы быка (Sigma, США), пикриновую (Sigma, США), щавелевую, лимонную (Janssen Chimica, Бельгия), винную (Merck, Германия), аскорбиновую (х. ч.) кислоты, предварительно подвергнутые трехкратной перекристаллизации, ацетон, ос. ч. (Chemapol, Чехия), нитроцеллюлозу (Schleicher und Schüll, Германия).

Эксперименты проводили на времяпролетном биохимическом масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (АО "СЕЛМИ", Сумы, Украина). Ускоряющее напряжение +20 кВ, объем накапливаемых данных (событий распада ^{252}Cf (стартов)) 200000; 1 нс/канал. Приведены спектры, полученные при условии проведения автоматических процедур вычитания постоянного и гладкого фонов.

Подготовка проб: на позолоченный диск для нанесения проб с помощью установки "Электро-спрей-УНП" наносили электрораспылением слой

нитроцеллюлозы (концентрация раствора в ацетоне 1 мкг/мкл) по общепринятой методике [6]. Далее готовили пробы следующими способами: наносили раствор образца в 0.1% TFA и высушивали при $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (стандартный метод); выдерживали раствор образца на нитроцеллюлозе 1 мин, удаляли избыток раствора вращением диска (500 об/мин) и пробы трижды промывали бидистиллированной водой (метод со стандартной промывкой); совместно с раствором образца на нитроцеллюлозную матрицу наносили по 2 мкл растворов органических кислот: пикриновой (насыщенный раствор); щавелевой, винной, лимонной или аскорбиновой (все в концентрации 1 мкг/мкл) (допирование образца кислотами).

Авторы приносят глубокую благодарность сотрудникам Отдела физики ионов Института радиационных исследований Университета г. Уппсала (Швеция) проф. Б.У.Р. Сундквисту, П. Хоканссону, П. Демиреву за плодотворные дискуссии и помощь в проведении части экспериментальных исследований во время стажировки в отделе, а также П.В. Бондаренко (Сельскохозяйственный университет, Техас) за предоставление нитроцеллюлозы и препарата инсулина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torgerson D.F., Skowronski R.F., Macfarlane R.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. P. 616.
2. Sundqvist B.U.R. // Biological Mass Spectrometry / Eds A.L. Burlingame, J.A. McCloskey. Amsterdam: Elsevier, 1990. P. 37.
3. Wang R., Cotter R.J., Meschia J.F., Sisodia S.S. // Techniques in Protein Chemistry. V. III / Ed. R.H. Angeletti. N.Y.: Acad. Press, 1992. P. 505–513.

4. Zubarev R.A., Chivanov V.D., Hakansson P.L., Sundqvist B.U.R. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994. V. 8. P. 906–912.
5. McNeal C.J., Macfarlane R.D., Thurston E.L. // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. P. 2036.
6. Johnsson G.P., Hedin A.B., Hakansson P.L., Sundqvist B., Save B., Nielsen P., Roepstorff P., Johansson K.-E., Kamensky I., Lindberg M. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. P. 1084.
7. Rasmussen H.H., Mortz E., Mann M., Roepstorff P., Celis J.E. // *Electrophoresis.* 1994. V. 15. P. 406–416.
8. Knysh A., Chivanov V., Grebenik L., Zubarev R., Kuraev V. // *Proc. 5-th Int. Beijing Conf. and Exhib. on Instrum. Analysis. China, 1993.* B107.
9. Schmitter J.-M. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 557. P. 359.
10. Shiea J., Sunner J. // *Org. Mass Spectrom.* 1991. V. 26. P. 38.

An Improved Sample Preparation Technique for ^{252}Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry of Proteins and Peptides

V. D. Chivanov*, R. A. Zubarev**, S. A. Aksenov***, O. G. Bordunova*,
V. I. Eremenko*, V. M. Kabanets*, V. I. Tatarinova*, A. K. Mishnev*,
V. V. Kuraev****, A. N. Knysh****, and I. A. Eremenko*

*Agricultural Institute, ul. Petropavlovskaya 57, Sumy, 244030 Ukraine

**Department of Ion Physics, Institute of Radiation Studies, University of Uppsala, Sweden

***Institute of Applied Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine

****AO SELMI, Sumy, Ukraine

Abstract—The addition of organic acids (picric, oxalic, citric, or tartaric) to peptide and protein samples was found to significantly increase the yield of their quasi-molecular ions (QMI) in time-of-flight ^{252}Cf plasma desorption mass spectrometry. The yield of the ions depended on the pK_a of the acid added.

Key words: plasma desorption mass spectrometry, proteins, peptides, sample preparation techniques, organic acids.