



УДК 577.112.088.3:543.51

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ MALDI TOF
ДЛЯ БЫСТРОЙ КАЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ
ПРОДУКЦИИ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ БЕЛКОВ В *E. coli***© 1999 г. М. В. Серебрякова, С. И. Рогов, А. Ф. Шевалье, С. А. Грачев[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступило в редакцию 25.04.99 г. Принято к печати 28.04.99 г.

Исследованы возможности анализа штаммов *E. coli*, продуцирующих генно-инженерные белки, с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF. Показано, что данным методом можно быстро сканировать штаммы на наличие в них целевых химерных белков.

Ключевые слова: масс-спектрометрия MALDI; экспрессия в *E. coli*; химерные белки.

Методом MALDI TOF-MS нами получены масс-спектрометрические фингерпринты белковых экстрактов нескольких штаммов *E. coli*. При экстракции первым из указанных ниже способов (способ а, мягкий лизис) в масс-спектре проявляются в основном гидрофильные белки. Для *E. coli* BL21(DE3) [F-*ompThsdS_B*($r_B^-m_B^-$)*gal dcm* (DE3), Novagen] нами были получены также спектры и с использованием более жесткого способа экстракции белков (DMSO, способ б, см. ниже). При этом варианте экстракции в спектре могут отсутствовать гидрофильные белки, остающиеся в водной фазе. Тем не менее спектры, полученные для одного и того же штамма, с использованием обоих способов экстракции близки по набору регистрируемых масс (полное описание этих экспериментов будет опубликовано отдельно).

В данной работе приведены примеры исследования двух штаммов *E. coli*, продуцирующих соответственно два химерных белка: тиоредоксин/антигенная детерминанта вируса СПИД и тиоредоксин/С-концевой фрагмент серотонинового транспортера крысы. Клонирование соответствующих генов проведено в плазмиде рЕТ-32а [1]. После индукции химерного белка с помощью IPTG клетки были лизированы способом (а). На полученных (рисунок, а, б) масс-спектрах отчетливо видны оба генно-инженерных продукта.

На рисунке, б представлен спектр белкового экстракта *E. coli* до проведения индукции (штамм-

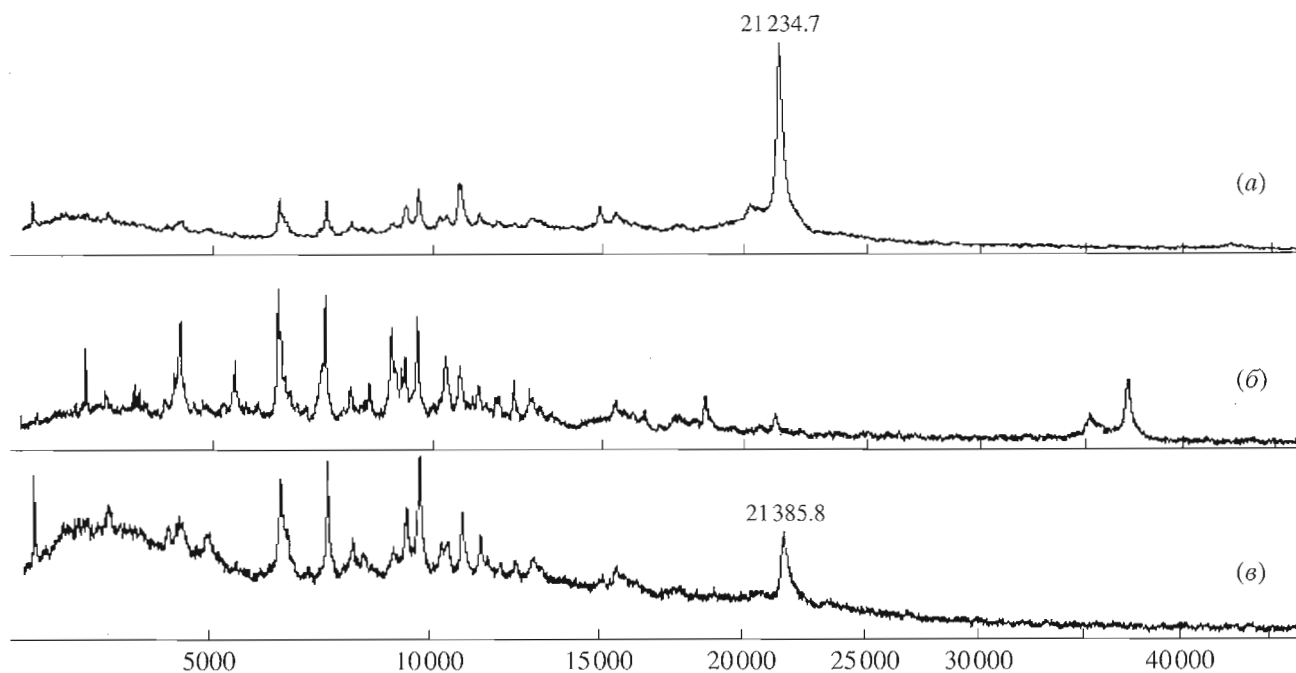
продукт и процедура экстракции те же, что и на рисунке а). На масс-спектре в этом случае отсутствует пик целевого химерного белка и в то же время выявляются белки с молекулярной массой более 35 кДа. Присутствие этих белков может быть связано как с изменением состава синтезируемых белков в неиндуцированных клетках, так и с особенностями процесса получения масс-спектров сложных смесей белков.

Метод MALDI-MS не позволяет судить о количественном соотношении белков в смеси. Во-первых, различные белки могут по-разному сокристаллизоваться с матрицей (в качестве матрицы использовалась 2,5-дигидроксibenзойная кислота (Aldrich); 20 мг/мл в смеси ацетонитрил-вода, 1 : 4, 0.1% трифторуксусная кислота) или высыхать на поверхности ее кристаллов или аморфных участков. Поэтому в зависимости от выбранного микроучастка мишени с нанесенным анализом, подвергающегося лазерному удару, варьирует и состав испаряемых веществ. Во-вторых, при испарении данного участка образца, различные белки по-разному увлекаются в газовую фазу и достаточно резко различаются по способности ионизоваться, принимая протон или другой катион анализа. Все это приводит к тому, что относительные интенсивности пиков в спектре могут в значительной степени варьировать в зависимости от индивидуальных свойств белков и условий проведения съемки [2].

Тем не менее метод MALDI-MS позволяет очень быстро выявить продуцируемый белок в клетках *E. coli* и с гораздо более высокой точностью, чем SDS-электрофорез, определить его молекулярную массу. Реальная точность определе-

Сокращения: MALDI – matrix-assisted laser desorbition/ionization, TOF-MS – time-of-flight mass spectrometry, времяпролетная масс-спектрометрия.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-65; e-mail: grachev@ibch.siobch.ras.ru).



Масс-спектры MALDI-TOF белковых экстрактов штаммов *E. coli*: (а) – белковый экстракт, содержащий химерный белок тиоредоксин/фрагмент серотонинового транспортера $[M^+]21234.7$; (б) – экстракт тех же клеток до индукции IPTG; (в) – экстракт клеток, продуцирующих белок тиоредоксин/антигенная детерминанта вируса СПИД $[M^+]21385.8$. Остальные пояснения в тексте.

ния массы – около 100–50 Да, что связано как с изотопным уширением сигнала, так и с представленностью различных катионов в исследуемом образце. В одном масс-спектрометрическом эксперименте (единичное введение образцов на мишени) на использованном нами спектрометре VISION 2000 можно анализировать до 50 различных клонов.

Спектры получены нами на времяпролетном (TOF) MALDI-спектрометре VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, Англия) в рефлекторном режиме с регистрацией положительных ионов. Ускоряющее напряжение 5 кВ, лазер 336 нм, импульс 3 нс, мощность около 120 мкДж на импульс.

Использованы следующие способы приготовления образцов:

а) 1–2 мкл влажного осадка клеток тщательно встряхивали с 10 мкл раствора матрицы. Дебрис осаждали центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин. Наносили на мишень 0.2 мкл надосадочной жидкости и высушивали на воздухе.

б) 1–2 мкл клеток лизировали, добавив 8 мкл диметилсульфоксида. Затем добавляли 20 мкл хлороформа, 10 мкл метанола, 20 мкл воды, тщательно перемешивали и разделяли фазы центрифугированием при 1000 *g* в течение 2 мин. Отде-

ляли хлороформную и водную фазы, к остатку (интерфазе) добавляли 10 мкл раствора матрицы. На мишень наносили 0.2 мкл этой смеси и высушивали на воздухе.

В настоящее время аналогичный подход используется и для установления видовой принадлежности различных штаммов бактерий [3, 4].

Предлагаемый способ позволяет резко сократить время анализа бактериальных штаммов на наличие гиперпродуцируемых генно-инженерных белков, это существенно усиливает возможности экспресс-анализа штаммов по сравнению с методом денатурирующего гель-электрофореза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. // *BioTechnology*. 1993. V. 11. P. 187–193.
2. Guilhaus M. // *J. Mass Spectrometry*. 1995. V. 30. P. 1519–1532.
3. Welham K.J., Domin M.A., Scannell D.E., Cohen E., Ashton D.S. // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1998. V. 12. P. 176–180.
4. Wang Z., Russon L., Li L., Roser D.C., Long S.R. // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1998. V. 12. P. 456–464.

The MALDI TOF Mass Spectrometry: Rapid Qualitative Determination of Expression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*

M. V. Serebryakova, S. I. Rogov, A. F. Shevalier, and S. A. Grachev[#]

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The possible use of MALDI TOF MS for the analysis of *Escherichia coli* strains producing recombinant proteins was studied. It was shown that the target chimerical proteins might be rapidly detected in the strains.

Key words: MALDI TOF mass spectrometry, protein expression in Escherichia coli, chimerical proteins

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7265; fax: +7 (095) 335-7103;
e-mail: grachev@ibch.siobc.ras.ru.