



УДК 547.96.02+547.466:543.51

**О МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ФЕНИЛТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ  
ПРИ СЕКВЕНАТОРНОМ АНАЛИЗЕ БЕЛКОВ\****Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А.,  
Розынов Б. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Масс-спектрометрия электронного удара использована для анализа 3-фенил-2-тиогидантоинов аминокислот, образующихся при автоматическом анализе белков на секвенаторе. Особое внимание уделено идентификации Ser, Thr, Cys(Cm), Gln, Asn, Trp, Lys(Ptc), His.\*\* Определены оптимальные режимы записи масс-спектров и установлены пределы чувствительности метода. Для надежного анализа фенилтиогидантоинов аминокислот обычно достаточно 3 эмоль. Анализ смесей осуществляли методом термической разгонки. Масс-спектрометрическая идентификация фенилтиогидантоинов аминокислот использована при установлении первичной структуры леггемоглобина II клубеньков желтого люпина *Lupinus luteus L.*

Идентификация аминокислот в виде их фенилтиогидантоинов при определении аминокислотной последовательности олигопептидов обычно осуществляется методами ТСХ, ГЖХ и аминокислотного анализа. Однако использование этих методов для идентификации Ser, Thr, Gln, Asn, Trp, Lys(Ptc), His при анализе первичной структуры высокомолекулярных пептидов с использованием секвенатора сопряжено с целым рядом трудностей.

Вместе с тем известен масс-спектрометрический метод идентификации фенилтиогидантоинов аминокислот, предложенный в 1964 г. [2]. За прошедшие годы этот метод получил широкое развитие [3—13] и с успехом использовался при установлении структуры ряда белковых соединений [14—17]. Однако в публикациях, посвященных этому методу, мало внимания уделено описанию методических приемов анализа и оценке возможностей идентификации производных упомянутых выше лабильных аминокислот.

В данной работе изучены особенности масс-спектрометрического поведения индивидуальных фенилтиогидантоинов аминокислот (табл.1) и их смесей. Изучение зависимости интенсивностей пиков от энергии ионизирующих электронов и температуры испарения образца позволило выбрать оптимальный режим записи масс-спектров. Для получения информативных масс-спектров большинства фенилтиогидантоинов белковых амино-

\* Настоящая работа была представлена на советско-западногерманском симпозиуме по химии белков и пептидов [1].

\*\* В работе использованы рекомендованные IUPAC — IUB сокращения аминокислот и их производных: PhNCS — фенилтиогидантоин, Ptc — фенилтиокарбамойл-, Cm — карбоксиметил-.

## Характеристические ионы в масс-спектрах фенилтиогидантоинов аминокислот

Фенилтиогидантоины	Мол. вес	Пики характеристических ионов, $m/e$ (отн. интенсивность, %)					Температура испарения образца, °C	
Gly	192	120(20)	135(40)	163(10)	192(100)		25	
Ala	206	87(15)	120(12)	177(15)	206(100)		25	
Ser	222	85(50)	204(100)	222(82)			30—40	
Pro	232	69(45)	85(9)	203(8)	232(100)		25	
Val	234	192(43)	205(15)	219(5)	234(100)		25	
Thr	236	120(21)	163(13)	192(100)	218(35)	236(5)	40	
Leu	248	192(47)	205(25)	219(17)	248(100)		30	
Ile	248	192(96)	219(18)	248(100)			30	
Asn	249	205(42)	249(100)				85	
Asp	250	177(8)	204(12)	234(1)	250(100)		80	
Gln	263	205(67)	218(16)	219(7)	263(100)		65	
Glu	264	119(14)	204(38)	246(26)	264(100)		80—100	
Met	266	61(50)	205(90)	266(100)			60	
His	272	81(98)	95(63)	153(37)	272(100)		120	
Phe	282	91(100)	136(15)	249(6)	282(71)		40	
Arg	291	119(100)	127(36)	155(86)	249(11)	274(22)	291(10)	115
Cys (Cm)	296	47(27)	92(25)	204(100)			60	
Met (O <sub>2</sub> )	298	218(48)	298(100)				70	
Tyr	298	107(100)	192(71)	298(18)			80	
Trp	321	103(7)	107(2)	130(100)	321(18)		60	
Lys (Ptc)	398	135(100)	246(7)	263(24)	305(10)		90—100	

кислот было достаточно 0,2 нмоль, для PhNCS-производных Asp, Asn, Glu, Gln — 1—2 нмоль, а для производных His и Arg требовалось от 4 до 5 нмоль при энергии ионизирующих электронов от 15 до 70 эВ. Несмотря на большую чувствительность масс-спектрометра при высоких энергиях ионизации, спектры фенилтиогидантоинов аминокислот, полученных в результате расщепления белков на секвенаторе, записывались при низких ионизирующих энергиях, что значительно упрощало масс-спектр и тем самым повышало надежность идентификации исследуемых производных аминокислот.

Оптимальные температуры испарения стандартных образцов фенилтиогидантоинов (табл. 1) выбирались таким образом, чтобы пики молекулярных и характеристических ионов в масс-спектрах имели наибольшую интенсивность при оптимальной чувствительности масс-спектрометра. Как видно из табл. 1, фенилтиогидантоины аминокислот, за исключением Cys (Cm) > PhNCS и Lys (Ptc) > PhNCS, можно идентифицировать по пикам их молекулярных ионов, которые максимальны в случае PhNCS-производных Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Met, His, Pro. Идентификация Ser > PhNCS ( $M^+$ ,  $m/e$  222) и Thr > PhNCS ( $M^+$ ,  $m/e$  236) более надежна, когда наряду с пиками молекулярных ионов учитываются пики ионов с  $m/e$  204 ( $M - H_2O$ )<sup>+</sup> для серина и 218 ( $M - H_2O$ )<sup>+</sup> для треонина.

Идентификация Cys (Cm) > PhNCS осуществляется по пику иона максимальной интенсивности с  $m/e$  204 ( $M - HS - CH_2COOH$ )<sup>+</sup>. Пик иона с таким же значением  $m/e$  характерен и для Ser > PhNCS, однако в масс-спектре последнего соединения имеется, кроме того, интенсивный пик молекулярного иона с  $m/e$  222; оптимальные температуры испарения этих веществ различаются на 20°. Lys (Ptc) > PhNCS идентифицируется по наличию в масс-спектре пиков ионов с  $m/e$  305 ( $M - C_6H_5NH_2$ )<sup>+</sup> и 263

Относительная интенсивность (%) пиков в масс-спектрах фенилтиогидантоинов аминокислот при одинаковых значениях массовых чисел \*

Фенил- тиогидан- тоины	Массовые числа											
	192	204	205	206	218	219	232	246	249	250	263	284
Gly	<u>100</u>											
Ala			13	<u>100</u>								
Ser	71	100	19	14								
Pro							<u>100</u>					
Val	43		15			5						
Thr	100				35	7						
Leu	47		25			17						
Ile	96											
Asn		28							<u>100</u>	16		
Asp		12	14						9	<u>100</u>		
Gln		68	67		16	7		77			<u>100</u>	
Glu	5	38	25		37			26				<u>100</u>
Met	60		90									
His	20											34
Phe									6	2		
Arg									11			
Cys(Cm)		100	18									
Met(O <sub>2</sub> )	13		42		48							
Tyr	71											
Trp	2											
Lys(Ptc)	50		12					6			24	5

\* Подчеркнуты интенсивности молекулярных ионов.

( $M - \text{PhN}=\text{CS}$ )<sup>+</sup>, которые появляются при температуре испарения образца ~ 100°.

Таким образом, для идентификации всех аминокислот, обычно встречающихся в белковых молекулах, достаточно использовать частичные масс-спектры их фенилтиогидантоинов в диапазоне массовых чисел от  $m/e$  192 (молекулярный ион Gly > PhNCS) до  $m/e$  321 (молекулярный ион Trp > PhNCS). Совпадение значений массовых чисел характеристических ионов в спектрах PhNCS-производных Ser, Lys(Ptc), Asn, His, Phe с  $m/e$  молекулярных ионов PhNCS-производных Ala, Gln, Pro, Gly, Asn, Glu (табл. 2) существенно осложняет идентификацию продуктов дальних стадий деградации пептидов, которые представляют собой сложные смеси фенилтиогидантоинов аминокислот. Для разделения таких смесей использовался метод термической разгонки образца в системе напуска масс-спектрометра путем плавного повышения температуры испарителя от температуры, соответствующей оптимальному режиму записи масс-спектра более летучего компонента, до температуры, соответствующей испарению более тяжелого компонента. Использование такого температурного фракционирования позволяет избежать «потери» анализируемых фенилтиогидантоинов в ходе записи масс-спектров и сводит к минимуму ошибки, связанные с наличием ионов с одинаковыми значениями  $m/e$ . Это продемонстрировано на примере разделения стандартных PhNCS-производ-

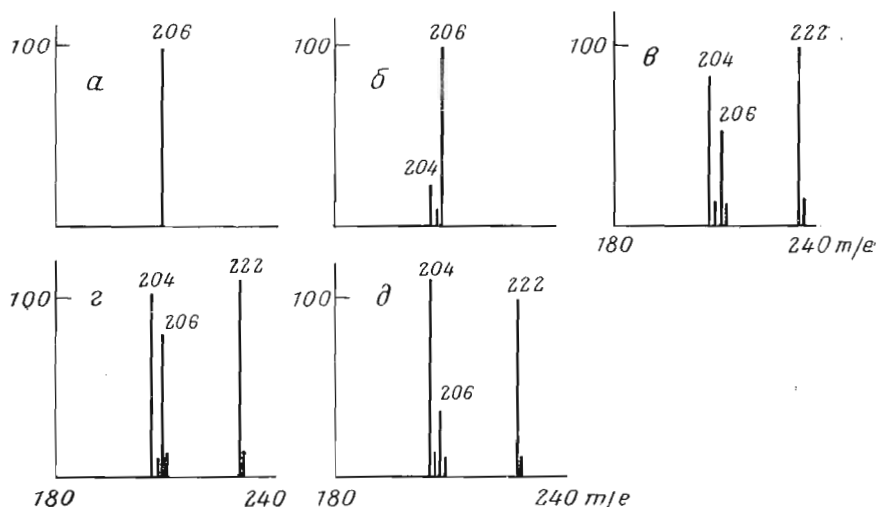


Рис. 1. Частичные масс-спектры (15 эВ) фенилтиогидантоинов аланина (а), серина (д) и их смеси (б, в, г). Температуры испарения образцов (°C): 25 (а, б), 30 (в), 50 (г), 40 (д)

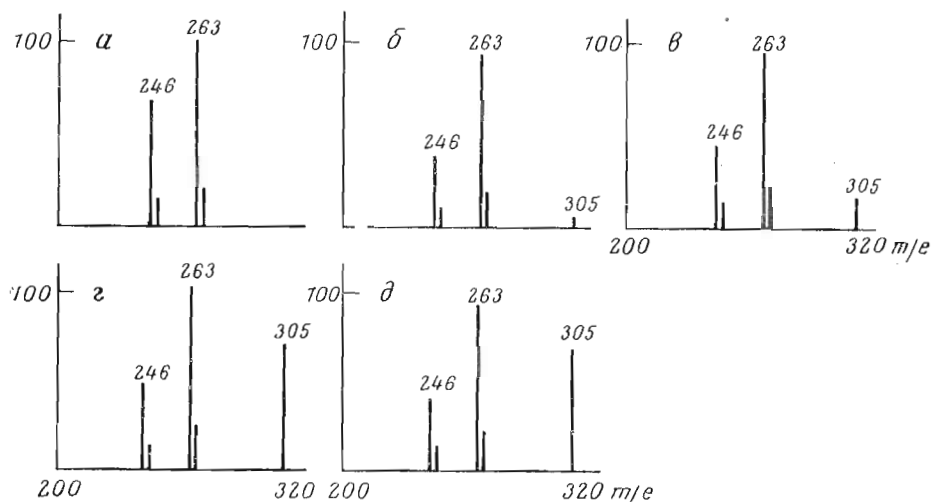


Рис. 2. Частичные масс-спектры (15 эВ) фенилтиогидантоинов глутамина (а), N-фенилтиокарбамоиллизина (д) и их смеси (б, в, г). Температуры испарения образцов (°C): 70 (а), 80 (б), 90 (в), 105 (г), 100 (д)

ных аланина и серина, лизина (Ptc) и глутамина. При температуре испарителя 25° регистрируется практически масс-спектр Ala > PhNCS (рис. 1, а), а при повышении температуры до 50° Ala > PhNCS постепенно отгоняется из смеси и мы получаем масс-спектр Ser > PhNCS (рис. 1, д). В масс-спектрах Gln > PhNCS и Lys (Ptc) > PhNCS присутствуют пики ионов с  $m/e$  246 и 263 (рис. 2, а, в), а в масс-спектре лизинового производного присутствует также пик иона с  $m/e$  305. Плавное повышение температуры испарения смеси фенилтиогидантоинов от 60 до 100°, мы записывали сначала Gln > PhNCS (рис. 2, а), который с повышением температуры отгоняется из смеси, и при 105° мы имеем практически индивидуальный масс-спектр Lys (Ptc) > PhNCS (рис. 2, в).

Полученные выше результаты послужили основой для разработки методики записи и интерпретации масс-спектров фенилтиогидантоинов аминокислот, образующихся при установлении первичной структуры пеп-

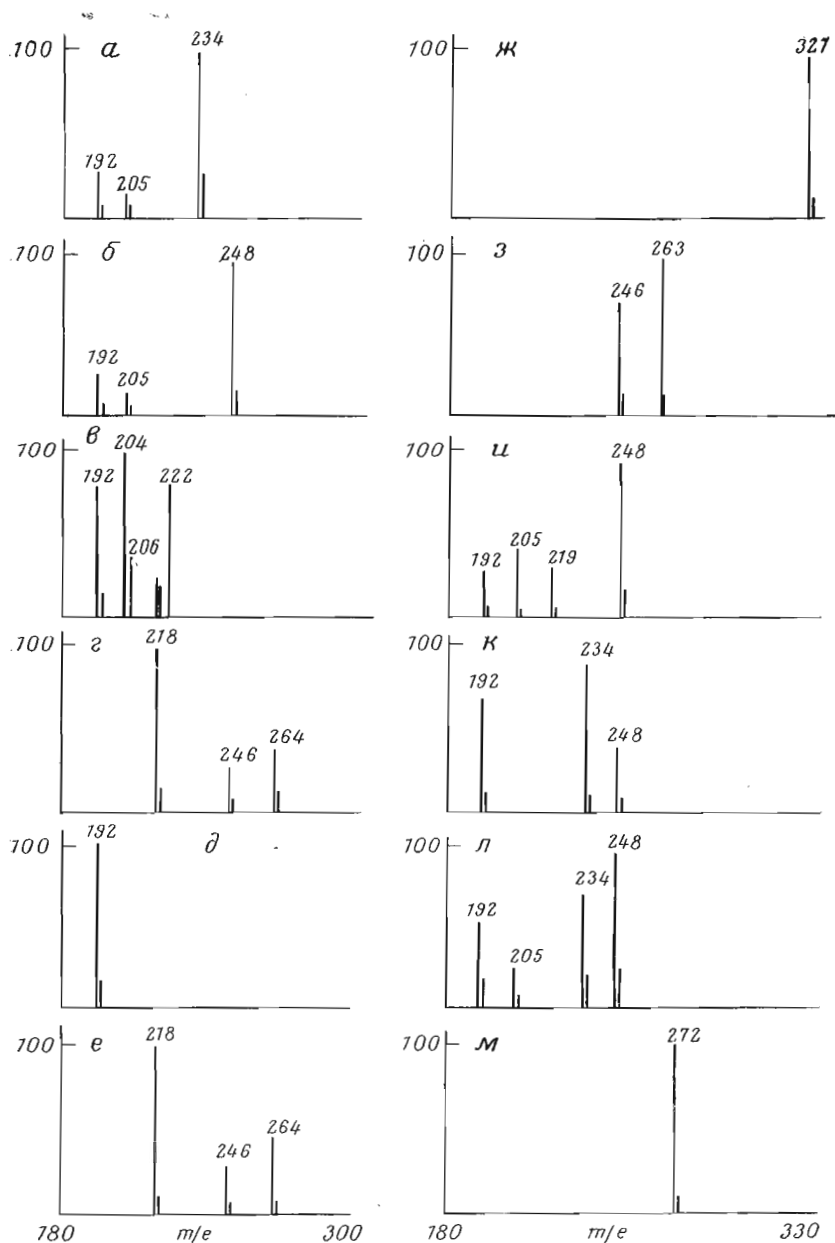


Рис. 3. Частичные масс-спектры фенилтиогидантоинов аминокислот в циклах 1—12 расщеплений N-концевой части молекулы миоглобина кашалота на секвенаторе. Представленные масс-спектры принадлежат фенилтиогидантоинам следующих аминокислот (в скобках указаны температуры испарения образцов и энергии ионизирующих электронов): а — валина (25°, 15 эВ), б — лейцина (25°, 70 эВ), в — серина (55°, 70 эВ), г — глутаминовой кислоты (75°, 15 эВ), д — глицина (30°, 15 эВ), е — глутаминовой кислоты (85°, 15 эВ), ж — триптофана (65°, 15 эВ), з — глутамина (90°, 15 эВ), и — лейцина (25°, 15 эВ), к — валина (25°, 15 эВ), л — лейцина (25°, 15 эВ), м — гистидина (70°, 15 эВ)

тидов с помощью секвенатора. Методика состоит в записи серии масс-спектров аликвоты раствора (1—3%) с каждого цикла отщепления при плавном повышении температуры испарения образца. Отнесение масс-спектров образцов производится с учетом данных табл. 1 и 2, которые

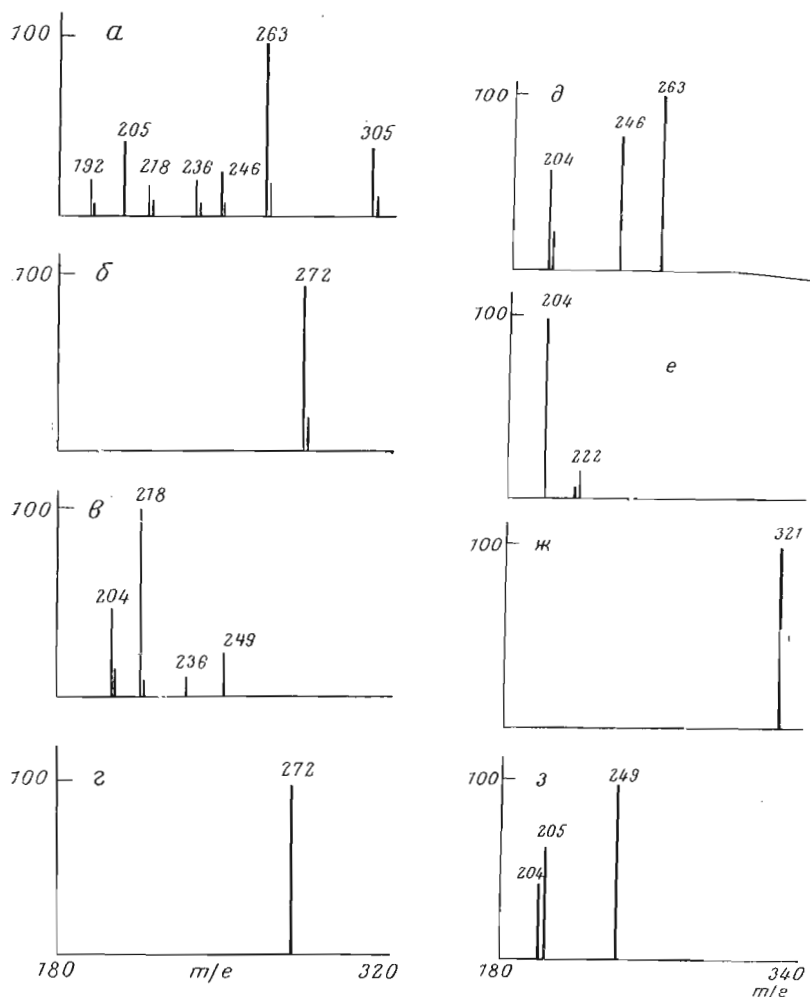


Рис. 4. Частичные масс-спектры (20 эВ) фенилтиогидантоинов N-фенилтиокарбамоил-лизина (а), гистидина (б), треонина (в) и глутидина (з) в циклах 24—27 расщеплений на секвенаторе молекулы леггемоглобина II, а также глутамина (д), серина (е), триптофана (ж) и аспарагина (з) в циклах 7, 14, 15 и 19 расщеплений на секвенаторе этого же белка. Температуры испарения образцов (°C): 100 (а), 115 (б), 60 (в, е, ж), 80 (д, з), 95 (з)

позволяют оценить область перекрытия, температуру испарения и относительную интенсивность перекрывающихся пиков, что существенно облегчает и ускоряет интерпретацию масс-спектров.

Возможность однозначной идентификации PhNCS-производных показана на примере стандартного белка — миоглобина кашалота. Масс-спектры фенилтиогидантоинов первых 12 N-концевых аминокислот в оптимальном для идентификации режиме представлены на рис. 3. Сопоставление полученных масс-спектров и данных табл. 1 и 2 позволяет надежно идентифицировать аминокислоты и установить их последовательность в молекуле белка.

Аналогичным способом идентифицировались PhNCS-производные аминокислот, образующиеся при секвенаторном отщеплении N-концевых аминокислотных остатков от молекулы леггемоглобина II из клубеньков желтого люпина. При совокупности масс-спектрометрического метода с методами ТСХ, ГЖХ и аминокислотного анализа была определена аминокислотная последовательность Gly-Ala-Leu-Thr-Glu-Ser-Gln-Ala-Ala-

<sup>10</sup> Leu-Val-Lys-Ser-Ser-Trp-Glu-Glu-Phe-Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys-His-Thr-His-Arg-Phe-Phe-X-Leu-Val-Leu-. Методами ТСХ и ГЖХ не удалось однозначно идентифицировать PhNCS-производные в циклах 24—27 отщепления. Методом аминокислотного анализа были идентифицированы лизин, гистидин,  $\alpha$ -аминомасляная кислота, гистидин. Масс-спектрометрический метод идентификации давал хорошие результаты на всех стадиях деградации рассматриваемого белка. Особое внимание уделялось интерпретации масс-спектров производных Ser, Thr, Gln, Asn, Trp, Lys (Ptc, His) на дальних стадиях отщепления (рис. 4). На основании полученных спектров однозначно идентифицировали продукты деградации полипептида.

При анализе реальных продуктов секвенаторного расщепления полипептидов, представляющих собой смеси фенилтиогидантоинов аминокислот и продуктов побочных реакций, для идентификации требуется 3 нмоль каждого производного. Наличие солей квадрола ( $M$  292) не мешает масс-спектрометрическому анализу. Появление в некоторых образцах при температурах испарения порядка 30—40° пика иона с  $m/e$  228, возможно, связано с наличием дифенилтиомочевины ( $M$  228). Наличие в образцах примесей вызывает практически одинаковое понижение летучести исследуемых PhNCS-производных, что является показателем неполноты очистки реакционной массы при ее промывках в реакторе секвенатора.

Проведенные исследования свидетельствуют, что секвенаторный анализ первичной структуры высокомолекулярных пептидных фрагментов при использовании масс-спектрометрического метода идентификации образующихся в процессе анализа PhNCS-производных аминокислот — эффективный и быстрый метод анализа белков.

### Экспериментальная часть

*Приготовление стандартных растворов фенилтиогидантоинов аминокислот для съемки масс-спектров.* Использовались растворы фенилтиогидантоинов аминокислот (Pierce, США) в концентрациях 5; 0,1 0,05 нмоль/мкл. Навеску порядка 1—15 мг взвешивали на весах Бунге и растворяли в этилацетате или метаноле. Концентрации приготовленных растворов проверяли путем измерения их оптической плотности при длинах волн 269 и 249 нм (спектрофотометр фирмы Gilford, США). Растворы фенилтиогидантоинов сохраняли при 0°, их концентрацию контролировали спектрометрически. Для записи спектров индивидуальных соединений брали аликвоты, содержащие 3 нмоль вещества, а для смесей — по 3 нмоль каждого компонента.

*Приготовление образцов фенилтиогидантоинов аминокислот при секвенаторном анализе миоглобина кашалота.* 5 мг (300 нмоль) миоглобина кашалота (Beskman, США) анализировали с использованием секвенатора (Sequencer 890C, Beskman, США) по стандартной белковой программе № 072172 (1 сочетание, 2 отщепления). Тиазолиноновые производные после каждого цикла отщепления отбирали и превращали в соответствующие фенилтиогидантоины путем 10-минутного нагревания при 80° в 1 н. растворе HCl с добавкой 0,1% дитиотрепта. Отбирали аликвоту, содержащую 3 нмоль соединения, переносили ее в испарительную ампулу масс-спектрометра и под вакуумом упаривали растворитель.

*Условия записи масс-спектров.* Масс-спектры получены на масс-спектрометре LKB 9000 (LKB, Швеция) непосредственным введением образца в ионный источник масс-спектрометра при температуре ионизационной камеры 250—270°. Методика испарения образца была следующей: плавно повышая температуру испарителя от 25 до 130°, записывали серию масс-спектров (до 20 с одной пробы), на интерпретацию которых при отсутствии ЭВМ затрачивалось 30—40 мин.

Для ионизации использовались электроны с энергией от 15 до 70 эВ. Ускоряющее напряжение 3600 В. Время записи одного масс-спектра составляло 3—4 с, время полного анализа одной пробы — 10—15 мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nazimov I. V., Levina N. B., Bogdanova I. A., Rosinov B. V. (1976) Abstracts USSR—FRG symposium on chemistry of peptides and proteins, Dushanbe, 86.
2. Степанов В. М., Вульфсон Н. С., Пучков В. А., Зякун А. М. (1964) Ж. общ. химии, 34, 3832—3835.
3. Melvas B. W. (1969) Acta chem. scand., 83, 1679—1684.
4. Hagenmaier H., Ebbighausen W., Nicholson G., Votsch W. (1970) Z. Naturforsch., 25b, 681—689.
5. Richards F. F., Barnes W. T., Lovins R. E., Salomone R., Waterfield M. D. (1969) Nature, 221, 1241—1244.
6. Faizwell T., Barnes W. T., Richards F. F., Lovins R. E. (1970) Biochemistry, 9, 2260—2265.
7. Fales H. M., Yumiko Nagai, Milne G. W. A., Brewer H. B., Thomas Jr., Bronzert J., Pisano J. J. (1971) Anal. Biochem., 43, 288—299.
8. Weygand F., Obermeier R. (1971) Eur. J. Biochem., 20, 72—80.
9. Sun T., Lovins R. E. (1972) Anal. Biochem., 45, 176—191.
10. Tschesche H., Schneider M., Wachter E. (1972) FEBS Lett., 23, 367—372.
11. Sun T., Lovins R. E. (1972) Org. Mass Spectrom., 6, 39—45.
12. Merritt G., Dipietro Jr. G., Robertson D. H., Levy E. J. (1974) J. Chromatogr. Sci., 12, 668—673.
13. Murai A., Takeuchi Y. (1975) Bull. Chem. Soc. Japan, 48, 2911—2914.
14. Tschesche H., Wachter E. (1970) Eur. J. Biochem., 16, 187—198.
15. Brewer H. B., Fairwell Jr. T., Ronan R., Sizemore G. W., Arnand C. D. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3385—3588.
16. Wittmann-Liebold B., Geissler A. W., Marzizing E. (1975) J. Supramolecul. Structure, 3, 426—447.
17. Tschesche H., Dietl T. (1975) Eur. J. Biochem., 58, 439—451.

Поступила в редакцию  
17.VI.1976

#### ON MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF AMINO ACID PHENYLTHIOHYDANTOINS IN THE AUTOMATIC SEQUENCING OF PROTEINS

NAZIMOV I. V., LEVINA N. B., BOGDANOVA I. A.,  
ROSYNOV B. V.

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

Electron impact mass spectrometry (MS) was used for analysis of 3-phenyl-2-thiohydantoin (PTH) of amino acids produced during automatic analysis of polypeptides. A particular emphasis was made on MS determination of Ser, Thr, CM-Cys, Gln, Asn, Trp, Lys(Ptc), and His. Optimal conditions for mass spectral analysis were found and the sensitivity limits of the method were evaluated. Reliable identification generally could be done using 3 nanomoles of PTH. MS was utilized during determination of primary structure of leghemoglobin II from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) root nodules.