

УДК 621.384.8+543.544

АМИНОКИСЛОТНЫЙ анализ коротких пептидов с помощью ВЭЖХ – масс-спектрометрии ЭРИАД. Миргородская О.А., Митрофанов Ю.П., Подтележников А.В., Шевченко А.А.//
Научное приборостроение. Методы и приборы биотехнологии. Л.: Наука, 1988, с.43.

Показано, что аминокислотный анализ коротких пептидов может быть осуществлен на приборном комплексе ХЖ-МХ 3303, состоящем из масс-спектрометра с устройством для экстракции ионов при атмосферном давлении (ЭРИАД), хроматографа "Милихром", работающего в режиме многоволновой детекции, и микроЭВМ. Лит. – 3 назв., ил. – 1.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЭРИАД

Рутинная процедура определения аминокислотного состава пептидов предусматривает их выделение, исчерпывающий кислотный гидролиз и определение отдельных аминокислот в гидролизате после их дериватизации (нингидрином, о-фталевым ангидридом, фенилизотиоцианатом и т.д.). Такая процедура длительна (время гидролиза составляет 24 ч) и трудоемка.

В то же время в работах [1, 2] показано, что частичный аминокислотный анализ пептидов (определение в их составе ароматических аминокислот) можно провести без их препаративного выделения и кислотного гидролиза при использовании ВЭЖ с многоволновой спектрофотометрической детекцией элюата. Ароматические аминокислоты имеют характеристическое поглощение в области 250 – 290 нм. Как показано в работе [2], спектральные отношения (отношения поглощения при одной длине волны к поглощению при другой длине волны) могут быть рассчитаны по аддитивным схемам с использованием либо молярных коэффициентов поглощения арома-

тических аминокислот на соответствующих длинах волн, либо с использованием относительных коэффициентов, вычисляемых из спектральных отношений каждой ароматической аминокислоты. Определение спектральных отношений в ходе спектрофотометрической детекции элюата (одновременной детекции на двух длинах волн при использовании хроматографа "Миликром" [1] или записи всего УФ-спектра в максимуме соответствующего хроматографического пика при использовании детектора с фотодиодной линейкой) позволяет уже, например, на стадии хроматографического анализа ферментативного гидролизата исследуемого белка либо качественно определить наличие или отсутствие ароматических аминокислотных остатков в том или ином хроматографическом пике, либо даже вычислить содержание всех ароматических аминокислот в хроматографическом пике.

Однако получаемая таким образом информация не позволяет сделать каких-либо выводов о присутствующих в пептиде неароматических аминокислотах, и, кроме того, ее достоверность сильно зависит от гомогенности исследуемого хроматографического пика.

В данной работе показано, что в сочетании с масс-спектрометрией ЭРИАД многоволновая спектрофотометрическая детекция может либо однозначно устанавливать аминокислотный состав, либо позволяет заменить количественный аминокислотный анализ собранного хроматографического пика качественным определением 1-3 аминокислот в его неполном кислотном гидролизате с помощью масс-спектрометра.

В масс-спектрометрии ЭРИАД пептиды регистрируются преимущественно в виде квазимолекулярных ионов $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+Na]^+$ непосредственно из водно-метанольных или водно-ацетонитрильных элюатов, что дает возможность определить молекулярный вес исследуемого пептида и проверить его гомогенность [3]. Входящий в состав приборного комплекса ХЖ-МХ-3303 хроматограф "Миликром" позволяет осуществлять спектрофотометрическую детекцию элюата одновременно на нескольких (практически до 3) длинах волн в спектральном диапазоне 190 - 360 нм, что дает возможность уже в процессе хроматографического выделения пептидов определить характеризующие их спектральные отношения A_{280}/A_{210} , A_{220}/A_{210} . С целью получения точного аминокислотного состава изучаемого пептида полученные данные обрабатывались специальной программой, реализованной на микроЭВМ "Электроника-60". Исходными данными для программы служат молекулярный вес пептида, спектральные отношения и погрешности их определения, а также информация о наличии или отсутствии в пептиде каких-либо аминокислот (получаемая из анализа масс-спектров неполного кислотного гидролизата пептида или из возможно имеющихся исходных данных). Последние два вида исходных данных могут задаваться независимо.

Результаты определения аминокислотного состава ряда модельных пептидов приведены в таблице.

Погрешность определения спектральных отношений принималась нами равной 0,02. Как видно из таблицы, введение информации о спектральных отношениях определяет состав "ароматической" части аминокислотного состава и примерно (с точностью до 1-2 аминокислот) величину "неароматической" части. Устанавливаемая погрешность в определении спектральных отношений в интервале 0,01-0,2 не изменяет состава "ароматической" части, но изменяет "неароматическую часть" за счет увеличения или уменьшения количества пептидных связей и, соответственно, количества неароматических аминокислот.

Как показано в таблице, применение только спектральных отношений и молекулярных весов, значительно сужая число возможных вариантов аминокислотного состава

Таблица

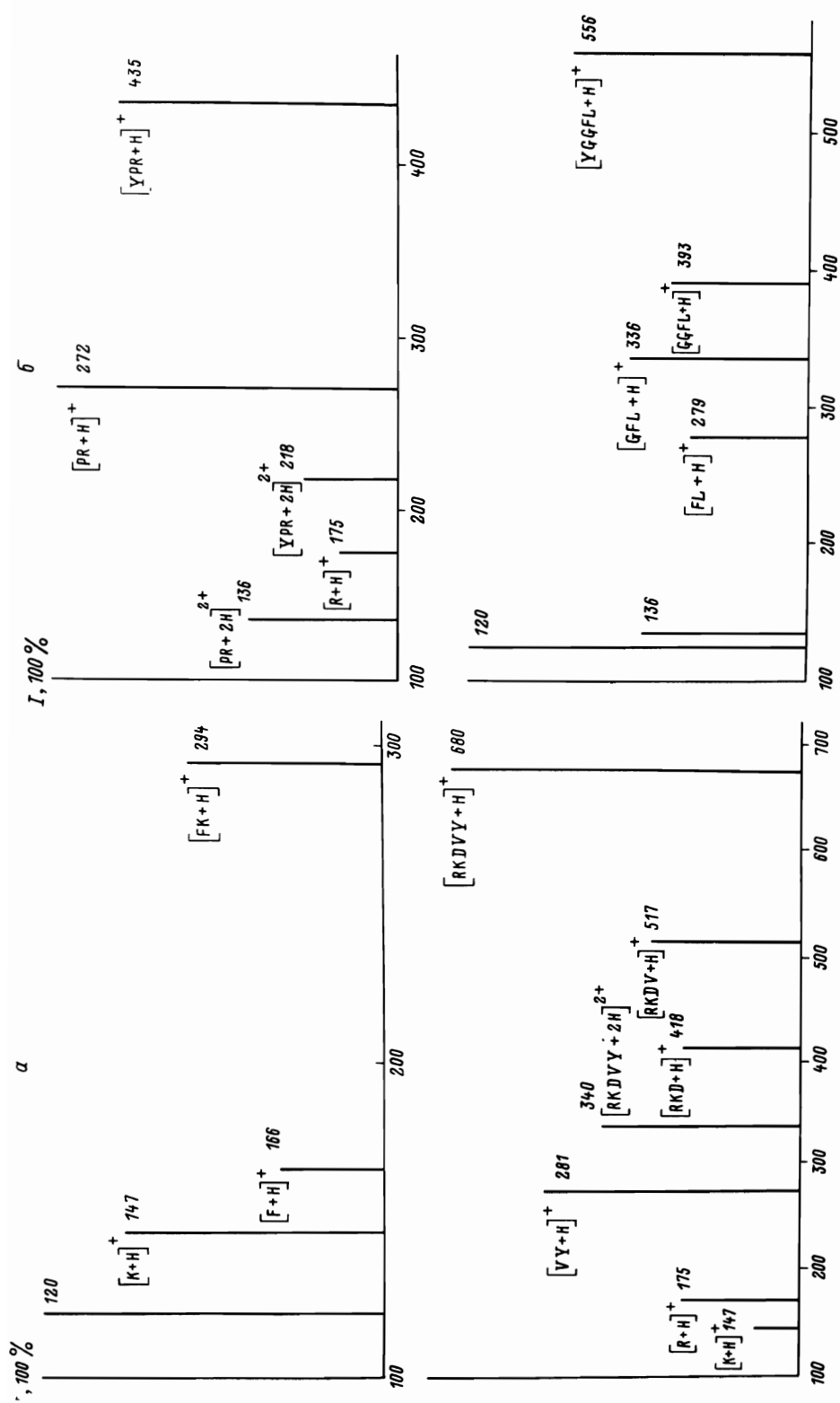
Результаты определения аминокислотного состава модельных пептидов

Пептид	Молекулярный вес	Наличие аминокислот по данным масс-спектра кислотного гидролизата	Количество вариантов аминокислотного состава, рассчитанное по:		
			молекулярному весу	молекулярному весу и спектральным отношениям	молекулярному весу, спектральным отношениям и качественному аминокислотному составу
FK	293	F, K	7	FAG, FK	FK
YPR	434	Y, R	47	VPR	YPR
YGGFL	555	Y, G	167	YGGFL YAGFV YARF, YNLF YKVF	YGGFL
RKDVI	679	R, K, L	907	I8	RKDVI

ва, тем не менее не дает возможности определить его однозначно. В этом случае предлагается провести кислотный гидролиз пептида в мягких условиях (50°C , 6 и HCl) и исследовать получаемый таким образом неполный гидролизат с помощью масс-спектра. Как показано на рисунке, такой гидролиз не нужно проводить до конца, поскольку наличие в составе пептида отдельных аминокислот можно определять не только по линиям их квазимолекулярных ионов в масс-спектре гидролизата, но и по разности масс исходного пептида и продуктов его гидролиза ("лестнице" продуктов [3]), получая одновременно и некоторую информацию об аминокислотной последовательности. Следует подчеркнуть, что, как видно из таблицы, нет необходимости определять наличие всех присутствующих в пептиде аминокислот, или

определять их относительные количества — достаточно лишь качественно обнаружить 1–2 аминокислоты. Поскольку в предлагаемом методе аминокислотный состав получается расчетным путем из точного значения молекулярного веса пептида, метод позволяет отдельно определять в его составе Asn и Asp , Gln и Glu , что невозможно в обычной процедуре аминокислотного анализа из-за происходящего при гидролизе дезамидирования, а также определять нестабильные в условиях кислотного гидролиза аминокислоты.

Таким образом, предлагаемый метод существенно ускоряет аминокислотный анализ коротких пептидов, делая необязательным их препаративное выделение, исчерпывающий кислотный гидролиз и количественный анализ аминокислот в гидролизате. Метод, в отличие от обычно применяемого, определяет точное значение аминокислотного состава (раздельное определение кислот и их амидов, триптофана). Одновременно в методе контролируется гомогенность исследуемого пептида, а на стадии масс-спектрометрического анализа неполного гидролизата может быть извлечена некоторая дополнительная информация о его аминокислотной последовательности.



Масс-спектры продуктов частичного кислотного гидролиза пептидов: а) FK и RKDVY; б) YPR и YGGFL

ЛИТЕРАТУРА

1. Барам Г.И., Грачев М.А., Назимов И.В. // Биорган.хим., 1985, Т. II, № 12, с. 1677-1679.
2. Yang C.Y., Pownall H.J., Gotto A.M. // Anal. Biochem. 1985, V. 145, N1, p. 67-72.
3. Александров М.Л., Барам Г.И., Галль Л.Н. // Биорган.хим., 1985, Т. II, № 5, с. 700-707.