

УДК 577.112.088.5: 543.51

© А. В. Новиков, Н. В. Савельева, Н. В. Краснов, П. Роепсторфф, Р. Кёрнер,  
О. А. Миргородская

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ESI-MS И ИЗОТОПНО МЕЧЕННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ СТАНДАРТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ

Представлен метод количественного определения белков и олигопептидов на пикомольном уровне применительно к ESI-MS. Суть метода заключается в определении концентрации отдельных аминокислот, входящих в состав анализируемого белка, после его гидролиза (кислотного или ферментативного) путем измерения относительных интенсивностей ионов аминокислоты и ее изотопно меченного аналога. В качестве внутренних стандартов использованы  $^{18}\text{O}$ -содержащие аналоги 5 аминокислот, а также дейтерированный лизин и модифицированный азотом  $^{15}\text{N}$  аргинин. Метод применим для белков с известным аминокислотным составом. Предлагаемый подход опробован на примере определения концентраций бычьего сывороточного альбумина, химоитрипсина, проинсулина.

### ВВЕДЕНИЕ

Для понимания физиологических процессов на молекулярном уровне фундаментально важным является знание не только аминокислотной последовательности белков, но и количественного содержания этих белков [1]. Предполагается, что новые масс-спектрометрические (MS) методы, такие как ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) и MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry), ставшие существенным инструментом при определении белковой последовательности, имеют и хорошие перспективы для количественного определения белков. Основанием для этого являются результаты недавно опубликованных работ [2–4]. Предложенный в них подход для количественного определения белков основан на сравнении интенсивностей ионов отдельных пептидов, полученных при гидролизе этих белков трипсином, и их  $^{18}\text{O}$ -меченных аналогов, используемых в качестве стандартов. Получение этих стандартов легко осуществляется с помощью гидролиза фиксированного количества анализируемого белка в среде  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Преимуществом такого подхода наряду с высокой чувствительностью, несомненно, является специфичность в определении концентрации белков, что позволяет проводить одновременное определение нескольких белков в смесях. Недостатком предложенного подхода является необходимость иметь образец каждого анализируемого белка для получения стандартов.

Учитывая необходимость анализа большого количества компонентов в протеоме, каждый из которых может быть выделен с использованием

двумерного электрофореза и идентифицирован непосредственно в геле с использованием масс-спектрометрии, в настоящей работе предлагается другой, более универсальный подход. Он основан на том, что для определения концентрации белка достаточно в принципе определить концентрацию какой-либо аминокислоты, входящей в состав этого белка, используя, как предложено ранее для пептидов,  $^{18}\text{O}$ -меченый или меченный иным изотопом стандарт этой аминокислоты. В качестве такой аминокислоты может быть выбрана, например, одна из основных аминокислот (Lys или Arg). Возможно, а может даже более целесообразно, регистрировать сразу несколько аминокислот. Это увеличит точность измерений без дополнительных затрат времени на анализ, а также позволит подтвердить предполагаемый структурный состав анализируемого белка или осуществить дополнительный контроль чистоты этого белка.

Традиционное определение концентрации белков большей частью является опосредованным. Так, например, достаточно часто используется спектрофотометрическое определение поглощения света растворами белков при 280 нм, обусловленного главным образом наличием в их составе ароматических аминокислотных остатков тирозина и триптофана. Концентрацию при этом оценивают в относительных оптических единицах или в ее абсолютном значении, если известен коэффициент экстинкции для анализируемого белка.

Можно сказать, что предлагаемое нами масс-спектрометрическое измерение концентрации белка по содержанию аминокислот лежит в русле традиций. Привлекательным является также тот факт, что определение концентрации белка факти-

чески сводится к измерению относительных интенсивностей ионов аминокислоты и ее  $^{18}\text{O}$ -содержащего аналога. Это значит, что можно использовать различные типы масс-спектрометрической техники, которые в области измерения не регистрируют этих ионов. При этом достаточно иметь прибор с разрешением, гарантирующим хорошее разделение изотопных ионов.

В качестве вариантов для измерений могут быть использованы любые аминокислоты. Вопрос выбора аминокислоты в принципе определяется возможностью приобретения или самостоятельного приготовления изотопно меченного стандарта этой аминокислоты и возможностью осуществления гидролиза белка до получения тестируемой аминокислоты в свободной форме. Выбор Lys и Arg, сделанный нами, определялся несколькими факторами и прежде всего тем, что эти аминокислоты обладают максимальным выходом положительно заряженных ионов. Наряду с вышеупомянутыми аминокислотами была оценена возможность использования в качестве стандартов His, Phe и Tyr. Эти аминокислоты также широко представлены в белках и дают не перекрывающиеся с другими аминокислотами значения  $m/z$ , что характерно как для их природных форм, так и для их  $^{18}\text{O}$ -аналогов. Необходимо также отметить, что среднее содержание аминокислот в белках более чем на порядок выше концентрации самого белка, что способствует увеличению чувствительности при измерении. Так, количество аминокислотных остатков Lys, Arg, His, Phe и Tyr в молекуле бычьего сывороточного альбумина (БСА) составляет 59, 23, 17, 27 и 20 соответственно.

Широкое использование предлагаемого подхода зависит от доступности изотопно меченных аминокислот. В случае использования  $^{18}\text{O}$ -изотопов необходимые аминокислотные стандарты легко могут быть получены самими исследователями путем проведения реакций в среде  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в результате включения  $^{18}\text{O}$ -изотопа в карбоксильную группу природных аминокислот несколькими способами:

- с помощью изотопного обмена в свободной аминокислоте в присутствии катализаторов, таких как  $\text{H}^+$  (например, трифторуксусная кислота) или трипсин (для Lys и Arg);

- при гидролизе Lys- или Arg-содержащих пептидов или белков под действием трипсина с последующей обработкой карбоксипептидазой В;

- при гидролизе пептидов или белков, содержащих разнообразные Lys- или Arg-кластеры под действием трипсина;

- при гидролизе полимеров этих аминокислот.

Отметим, что с точки зрения получения стандартов изолированных аминокислот последние три способа представляются более трудоемкими,

если не сказать экзотическими, нежели первый. Тем не менее они также упомянуты нами, поскольку в ряде случаев помогают получить дополнительную информацию о структуре исследуемых белков и пептидов.

Очевидно, что стратегия подготовки белков к анализу предлагаемым здесь способом должна приводить к максимально полному высвобождению нужных аминокислот из полипептидных последовательностей. Для этого могут быть выбраны различные способы — как химические, так и ферментативные. В настоящей работе для этих целей использован традиционный кислотный гидролиз (применяемый при определении аминокислотного состава белков).

Очевидно, что для масс-спектрометрического анализа аминокислот предпочтительнее использовать ионизацию электрораспылением (ESI, electrospray ionization), хотя могут быть использованы и другие методы, включая электронный удар.

В настоящей работе описывается использование предлагаемого подхода для определения концентрации белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА), рекомбинантного проинсулина человека (проИНС) и химоотрипсиногена (ХТГ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение $^{18}\text{O}$ -стандартов Lys, Arg, His, Phe и Tyr в присутствии трифторуксусной кислоты

В первой серии экспериментов наработку  $^{18}\text{O}$ -меченных аминокислотных стандартов осуществляли в присутствии 20 % трифторуксусной кислоты (см. Приложение), причем были получены стандарты как для отдельных аминокислот, так и для их смесей.

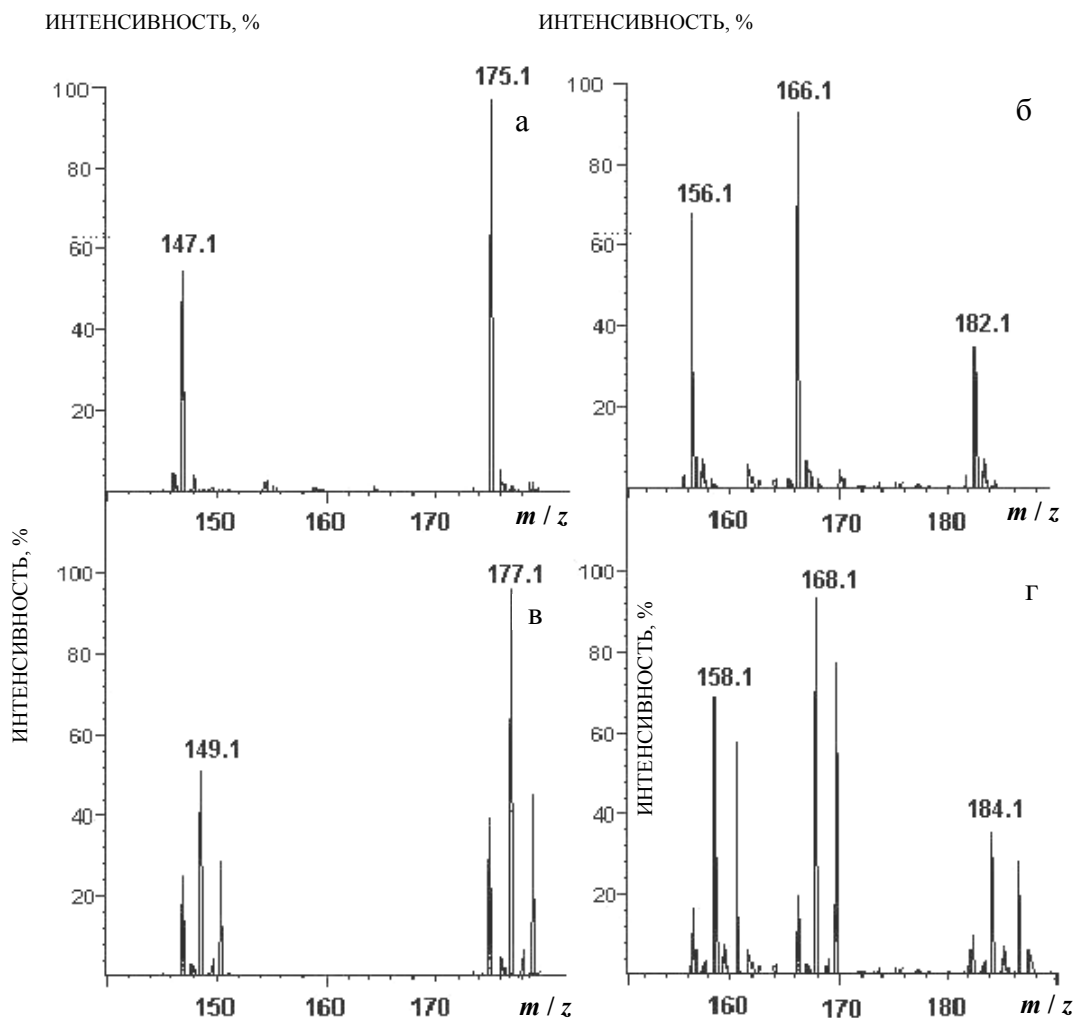
Рассчитанные на основании брутто-формулы моноизотопные массы каждой аминокислоты с протоном равны 147.11, 175.11, 156.08, 166.09 и 182.08 для Lys, Arg, His, Phe и Tyr соответственно. Сигнал квазимолекулярного иона каждой аминокислоты вследствие наличия изотопа  $^{13}\text{C}$  представляет собой мультиплет с убывающим соотношением интенсивностей в среднем 100 : 7 : 0.2. В соответствии со способом расчета, предложенным в работах [3, 4], пики изотопного распределения маркировали как  $M$ ,  $M + 1$ ,  $M + 2$  и т.д., где  $M$  — моноизотопная масса наиболее легкого квазимолекулярного иона с протоном. При осуществлении изотопного обмена в среде  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  наиболее интенсивный пик будет соответствовать значению  $m/z$ , увеличенному на 2 Да ( $M + 2$ ).

На рис. 1 представлены масс-спектры природных аминокислот (а, б) и полученных на их основе двух  $^{18}\text{O}$ -стандартов (в, г). Стандарт 4 (S4) представляет собой смесь Lys и Arg, а стандарт 5 (S5) —

смесь His, Phe и Tyr. Видно, что в действительности регистрируются аминокислоты (АК) как с одним включенным изотопом  $^{18}\text{O}$ , так и с двумя ( $^{18}\text{O}_1\text{АК}$  и  $^{18}\text{O}_2\text{АК}$ ). Также для всех аминокислот отмечается наличие пика, соответствующего аминокислоте без  $^{18}\text{O}$ , т. е.  $^{18}\text{O}_0\text{АК}$ . На основании соотношения интенсивностей изотопного распределения для каждой индивидуальной О-изотопной формы аминокислоты в соответствии с подходом, описанным в работах [3, 4], были рассчитаны соотношения изотопных форм для всех стандартов аминокислот (табл. 1). Видно, что внутри каждой из двух смесей стандартов аминокислот (S4 и S5) это соотношение оказывается приблизительно одинаковым.

Несмотря на присутствие  $^{18}\text{O}_0\text{АК}$ , полученные в данной работе стандарты были использованы

для количественных измерений. Необходимым требованием, кроме знания точной концентрации аминокислот-стандартов, является только неизменность во времени их изотопного распределения. Отметим, что для того, чтобы избежать последующих изменений в соотношении  $^{18}\text{O}$ -изотопов в полученных стандартах, необходимо удалить растворитель, например, посредством лиофилизации растворов. При этом наряду с водой испаряется трифторуксусная кислота. Это приводит к тому, что в результате последующего перераспределения в обычной воде, содержание  $^{18}\text{O}$  в аминокислотах не будет изменяться. При необходимости смещение О-изотопного распределения в сторону получения форм, содержащих один или более чем один изотоп  $^{18}\text{O}$ , может быть осуществлено при увеличении времени реакции [3, 4].



**Рис. 1.** Фрагменты ESI-MS-спектров аминокислот Lys и Arg (а, в) и His, Phe и Tyr (б, г): природных форм (а, б) и  $^{18}\text{O}$ -изотопных форм стандартов S4 и S5 (в, г)

**Табл. 1.**  $O^{18}$ -изотопное распределение в аминокислотах и их смесях, использованных в качестве внутренних стандартов

Стандарт			Соотношение $^{18}O$ -изотопных форм АК, %		
Номер	Состав	Молярное соотношение аминокислот	$[^{18}O_0]$	$[^{18}O_1]$	$[^{18}O_2]$
S1	Lys	—	15.0	64.0	21.0
S2	Arg	—	26.0	45.0	29.0
S3	Lys	1.15	24.5	51.0	24.5
	Arg	1	27.0	50.0	23.0
S4	Lys	1.15	25.1	51.8	23.1
	Arg	1	24.5	50.4	25.1
S5	His	1.55	11.5	48.5	40.0
	Phe	1.32	11.3	47.5	41.2
	Tyr	1	14.7	46.4	38.9

**Табл. 2.** Количественное определение концентрации аминокислот с использованием в качестве внутреннего стандарта  $^{18}O$ -изотопных форм аминокислот

Опыт (смесь)	Концентрация стандарта в смеси, мкМ		Относительная интенсивность основных 3 пиков для смеси, %			Концентрация аминокислоты, мкМ	
			$M$	$M + 2$	$M + 4$	эксперимент.	заданная
1	Arg	6	49.2	33.2	17.6	2.9	3
	Lys	6.3	53.9	29.8	16.3	0.25	3.1
2	Arg	10	33.7	46.6	18.8	1.3	1.5
	Arg	10	34	48.4	17.6	1.3	
3	Arg	46.0	43.8	41.4	14.8	1.6	1.5

Как оказалось, использование аминокислот для количественного определения белков вместо триптических пептидов этих белков имеет еще одно важное преимущество, связанное с их природным изотопным распределением. Из рис. 1, в, г видно, что значения интенсивностей квазимолекулярных ионов  $M + 1$ ,  $M + 3$ ,  $M + 5$  оказываются пренебрежительно малыми по сравнению со значениями интенсивностей для  $M$ ,  $M + 2$  и  $M + 4$ .

Поэтому расчет концентраций анализируемых образцов существенно упрощается. В противоположность этому определение концентрации белка по его пептиду с соотношением интенсивностей  $M / (M + 1) / (M + 2) / (M + 3) / (M + 4)$ , равным  $100 : 62.3 : 21.3 : 5.0 : 0.7$  (ангиотензин II,  $M = 1046.5$  [3, 4]) не позволяет пренебречь значениями  $M + 1$ ,  $M + 3$ ,  $M + 5$  и требует использования для подсчета значений интенсивностей всех 6 первых пиков.

#### Количественное определение аминокислот по их $^{18}O$ -меченым стандартам

Для изучения возможности использования  $^{18}O$ -меченых аминокислот с целью определения концентрации природных аминокислот готовили растворы последних по отдельности и в смесях по 2 или 3 аминокислоты. Затем полученные растворы смешивали с соответствующими стандартами в разных соотношениях (см. Приложение). В этих смесях контролировали изотопное распределение (табл. 2). На основании способа вычисления, представленного в работах [3, 4], были определены концентрации 5 аминокислот в растворах разных приготовлений.

Вместо  $^{18}O$ -меченых форм аминокислот можно использовать в качестве стандарта такой изотопный аналог тестируемого вещества, наиболее интенсивный пик которого будет соответствовать

значению  $m/z$ , увеличенному, например, на 3 и более Да, что и продемонстрировано ниже.

### Количественное определение лизина и аргинина с использованием в качестве стандарта D<sub>4</sub>-лизина и <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-аргинина соответственно

Использование в качестве стандарта модифицированного дейтерием лизина (D<sub>4</sub>-Lys) является привлекательным по нескольким причинам. Во-первых, наиболее интенсивный пик соответствует значению  $m/z$ , увеличенному на 4 Да относительно такового для природной аминокислоты. Во-вторых, D<sub>4</sub>-Lys имеется в продаже. Возможность применения такого внутреннего стандарта была продемонстрирована на примере определения концентрации лизина, для чего готовили различные смеси исходного и дейтерированного лизина. Предварительно осуществляли масс-спектрометрический анализ исходных компонентов по отдельности, затем из них готовили смеси (рис. 2). Вычисления концентрации природной аминокислоты сводятся к определению соотношения между пиками, соответствующими  $M$  и  $M + 4$ . В табл. 3 приведены данные определения концентрации исходного лизина.

Аналогичная работа была проведена с использованием в качестве стандарта аргинина, у которого два атома азота по гуанидо-группировке заменены двумя изотопами <sup>15</sup>N (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-аргинин). При этом для расчета концентрации природного аргинина необходимо только определить соотношения между пиками, соответствующими  $M$  и  $M + 2$  (рис. 2). Как и для лизина, в данном случае также наблюдается неплохое соответствие экспериментальных и заданных концентраций анализируемой кислоты. Экспериментальные данные были также сведены в табл. 3.

### Определение концентрации белков в растворе

Подготовка образцов белков для измерения их концентраций заключается в достижении полного высвобождения из пептидной последовательности всех анализируемых кислот, для которых имеется в наличии стандартный образец. На первом этапе для этой цели использовали кислотный гидролиз по методике для аминокислотного анализа, осуществленный в газовой фазе (см. Приложение). Типичный масс-спектр гидролизата белка, например бычьего сывороточного альбумина (БСА), представлен на рис. 3, а. Анализ этого спектра показывает, что любая аминокислота из выбранных нами регистрируется масс-спектрометрически. При внесении в этот гидролизат стандартов всех 5 аминокислот в масс-спектре четко можно проследить

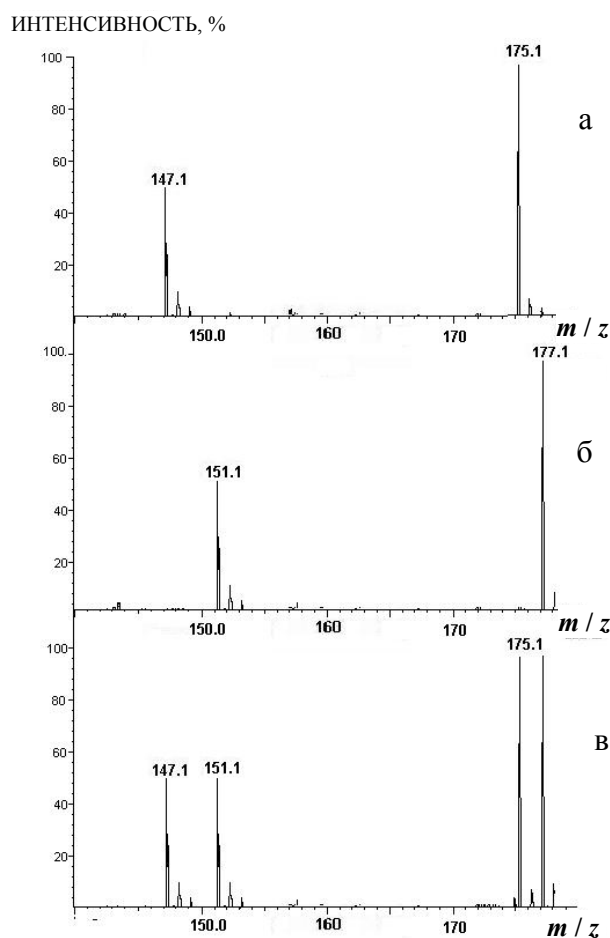


Рис. 2. Фрагменты ESI-MS-спектров нативных форм лизина и аргинина (а), стандартов D<sub>4</sub>-Lys и <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Arg (б) и их смесей (1:1, моль/моль) с нативными лизином и аргинином (в)

за изменением, которое соответствует присутствию изотопных по кислороду форм аминокислот (рис. 3, б). Расчет концентраций немеченых аминокислот осуществляли на основании соотношений интенсивностей первого, третьего и пятого изотопных пиков для смесей с помощью подхода, описанного в работах [3, 4]. В табл. 4 представлены результаты расчетов концентрации белка, вычисленные с учетом содержания в нем каждой из анализируемых аминокислот. Использование в одном определении сразу нескольких стандартов позволяет повысить точность измерений. Видно, что средняя ошибка при определении концентрации БСА несколько превышает таковую для свободных аминокислот, и это, вероятно, связано с введением дополнительной стадии, а именно кислотного гидролиза.

**Табл. 3.** Определение концентрации аргинина и лизина с использованием в качестве стандартов коммерческих аминокислот

Опыт	Концентрация стандарта в смеси, мкМ		Относительная интенсивность основных пиков для смеси, %			Концентрация аминокислоты, мкМ	
			$M$	$M + 2$	$M + 4$	эксперимент.	заданная
1	D <sub>4</sub> -Lys	5.0	47.4	—	52.6	5.9	5.0
		9.1	49.0	—	51.0	8.7	9.1
		9.1	37.3	—	62.7	5.4	9.1
		10.0	49.4	—	50.6	9.8	10.0
		39.0	30.8	—	69.2	17.4	13.0
		39.0	29.0	—	71.0	15.9	13.0
		39.0	30.9	—	69.1	17.4	13.0
		13.0	55.1	—	44.9	16.0	13.0
		13.0	57.5	—	42.5	17.6	13.0
		11.2	55.3	—	44.7	13.8	13.4
		26.0	53.8	—	46.2	30.3	26.0
		26.0	53.5	—	46.5	30.0	26.0
		26.0	53.4	—	46.6	29.8	26.0
		13.0	81.3	—	18.7	56.5	39.0
		13.0	83.0	—	17.0	63.6	39.0
		13.0	81.2	—	18.8	56.8	39.0
		45.0	47.6	—	52.4	40.9	45.0
		45.0	39.0	—	61.0	28.7	45.0
		45.0	46.7	—	53.3	39.4	45.0
		2	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Arg	7.7	61.0	39.0	—
7.7	57.2			42.8	—	10.3	12.1
25.0	30.0			70.0	—	10.7	12.5
25.0	25.5			74.5	—	8.6	12.5

Анализ данных, полученных при определении концентрации БСА по всем 5 аминокислотным стандартам, показывает, что наиболее сопоставимые результаты получаются для трех аминокислот: Arg, His и Phe. При использовании Тут получено заниженное значение концентрации, что является ожидаемым, поскольку при выбранном способе кислотного гидролиза эта аминокислота должна разрушаться. Расчет по Lys дает некоторый разброс данных. Он обусловлен тем, что наблюдается несоответствие между соотношениями интенсивностей изотопных ионов по <sup>13</sup>C. Это следует из иного, нежели ожидаемое, соотношения интенсивностей ионов  $M / (M + 1)$ ,  $(M + 2) / (M + 3)$ . Фактически это обусловлено наличием фоновых пиков в этой области. Если учесть, а практически

исключить из расчета каждый второй пик, т. е.  $M + 1$ ,  $M + 3$ ,  $M + 5$ , а также использовать значение отношения  $(M + 3) / (M + 5)$ , полученное ранее для стандарта, можно попытаться скорректировать расчет. Происхождение налагающихся на Lys пиков мы не можем уверенно объяснить, тем более что соотношения интенсивностей не воспроизводятся в этой области значений  $m / z$ . Из этого следует, что к определению концентрации белка по Lys при наличии высоких фоновых пиков в области его регистрации следует относиться с осторожностью.

Кроме O-изотопных форм аминокислотных стандартов, для определения концентрации белков по их кислотным гидролизатам были также использованы стандарты D<sub>4</sub>-лизин и <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-аргинин.

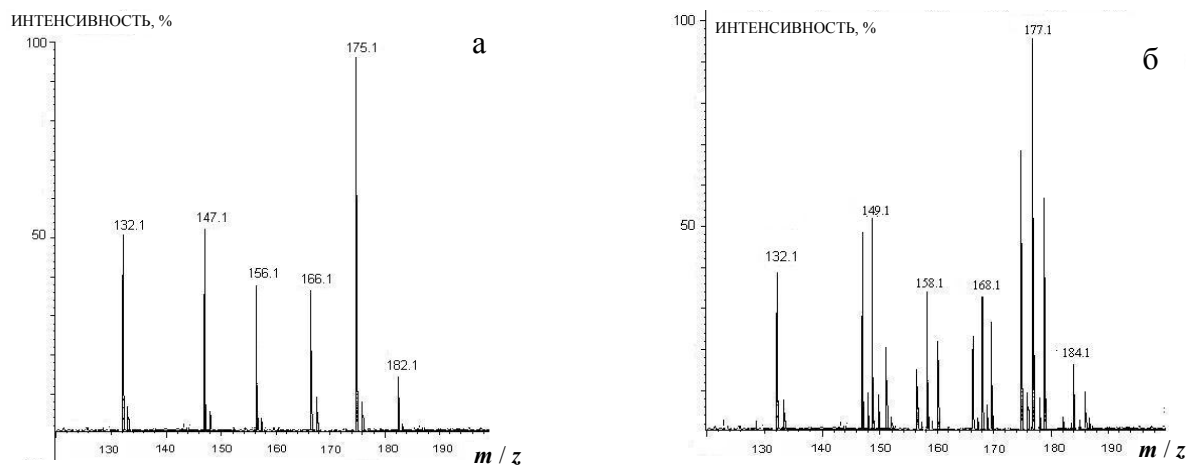


Рис. 3. Масс-спектр кислотного гидролизата БСА (а) и его смеси со стандартами S4 и S5 (б) (табл. 4, опыт 5)

Табл. 4. Определение концентрации БСА с использованием  $^{18}\text{O}$ -меченых внутренних стандартов S4 и S5

Опыт (смесь)	Концентрация стандарта в смеси, мкМ		Относительная интенсивность основных 3 пиков для смеси, %			Концентрация БСА, мкМ	
			M	M + 2	M + 4	эксперимент.	заданная
1	Arg	52.0	33.6	44.2	19.2	0.41	0.34
	Lys	59.0	40.8	42.9	16.3	0.25	
2	Arg	52.0	34.2	46.9	18.8	0.31	0.34
	Lys	59.0	41.4	41.8	16.8	0.27	
3	Arg	46.0	51.9	33.6	14.5	1.11	0.90
	Lys	53.0	45.0	41.3	13.7	0.30	
4	Arg	45.0	33.5	47.0	19.5	0.25	0.33
	Lys	51.0	42.0	43.0	15.0	0.24	
5	His	46.5	21.6	44.6	33.8	0.35	0.54
	Phe	39.0	28.3	37.9	33.8	0.34	
	Tyr	30.0	18.0	44.0	38.0	0.06	
	Arg	30.0	47.8	37.7	14.5	0.55	
	Lys	34.0	45.9	36.1	18.0	0.23	
	His	42.5	29.1	39.4	31.5	0.62	
	Phe	36.0	38.6	31.6	29.8	0.60	
Tyr	27.5	25.0	42.2	32.8	0.19		

Табл. 5. Определение концентрации белков с использованием в качестве стандартов D<sub>4</sub>-лизина и <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-аргинина

Опыт	Белок	Концентрация стандарта в смеси, мкМ		Относительная интенсивность основных пиков для смеси, %			Концентрация белка, мкМ	
				M	M + 2	M + 4	эксперимент.	заданная
1	БСА	Arg	10.0	61.0	39.0	—	0.7	1.0
			23.0	50.3	49.7	—	1.0	1.0
			23.0	50.5	49.5	—	1.0	1.0
			46.0	32.0	68.0	—	0.9	1.0
2	Lys	8.0	55.9	—	44.1	0.17	0.14	
		Arg	3.0	63.9	36.1	—	0.23	0.14
3	ХТГ	Lys	6.7	57.1	—	42.7	0.64	0.50
		Arg	2.1	52.4	47.6	—	0.58	0.50
4	проИНС	Lys	4.0	47.4	—	52.6	1.8	2.0
		Arg	8.5	39.4	60.6	—	1.4	2.0
		Lys	4.0	47.4	—	52.8	1.8	2.0
		Arg	8.5	40.1	59.9	—	1.4	2.0
		Arg	8.5	42.9	57.1	—	1.6	2.0
		Lys	11.9	30.6	—	69.4	2.6	2.7
		Arg	5.8	59.2	40.8	—	2.1	2.7

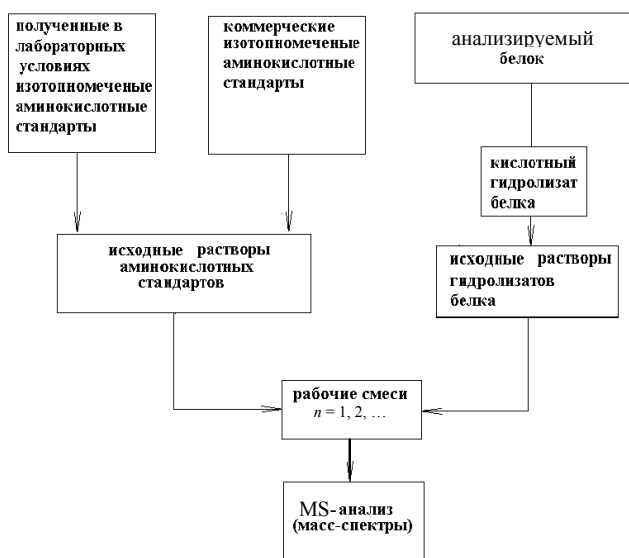


Рис. 4. Функциональная схема масс-спектрометрического количественного определения белков в растворах

В табл. 5 суммированы данные для трех белков. В данном случае также наблюдается неплохое соответствие экспериментальных и заданных концентраций анализируемых белков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В приведенных выше примерах продемонстрирована принципиальная возможность количественного определения известных белков. Функциональная схема разработанного подхода представлена на рис. 4. Очевидно, что далеко не все белки могут быть идентифицированы, однако измерение относительных концентраций во всех случаях может быть осуществлено. Отметим, что измерение относительных концентраций белков в норме и патологии позволит определить некоторые физиологические характеристики клеток и тканей, связанные с этими белками-маркерами.

Привлекательным является универсальность предлагаемого подхода с выбором любой из канонических аминокислот, характерных для данных белков. Выбор Lys и Arg представляется также целесообразным вследствие их высокой чувствительности в режиме регистрации положительных ионов и их широкого распространения в белках, хотя бывают и исключения: например, хорошо из-



вестный белок пепсин содержит одну основную кислоту. В среднем же содержание этих аминокислот в несколько раз, а иногда и на 1–2 порядка превышает молярную концентрацию анализируемого белка, что также способствует увеличению чувствительности анализа.

Представляется также важным отметить, что предлагаемый подход может стать рутинным при анализе белков в том случае, если будут в наличии дешевые коммерческие препараты аминокислот, которые могут быть использованы как стандарты. Его достоинством является перспектива автоматизации, например, при создании соответствующих реакторов по подготовке образцов к анализу. Параметры прибора, который может быть использован в комплекте с таким автоматом, должны обеспечивать воспроизводимость соотношения интенсивностей изотопных ионов с их хорошим разрешением.

#### **ПРИЛОЖЕНИЕ. Экспериментальная часть**

В работе использовали бычий сывороточный альбумин и химотрипсиноген (Sigma, США), рекомбинантный проинсулин человека, полученный в лабораторных условиях в ИБХ РАН [6], мелиттин, аргинин, лизин, гистидин, фенилаланин, тирозин, карбоксипептидазу В (Serva, Германия), трипсин (Spofa, Чехия), трифторуксусную кислоту (ТФУ), ацетонитрил (MeCN) фирмы Merck.

Для получения О-изотопных стандартов использовали тяжелую воду  $H_2^{18}O$  с 95–98% содержанием изотопа  $^{18}O$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США). В качестве изотопно меченных аминокислот были использованы дейтерированный лизин 4,4,5,5- $D_4$ лизин ( $D_4$ -Lys) 98 % чистоты по D и L-аргинин-гуанидо- $^{15}N_2$  ( $^{15}N_2$ -Arg) 98 % чистоты по  $^{15}N$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США). Остальные реактивы отечественного производства.

#### **Получение аминокислотных стандартов S1–S5**

$^{18}O$ -меченые стандарты аминокислот получали изотопным обменом при инкубации нативных аминокислот в среде  $H_2^{18}O$  в присутствии 20 % ТФУ при 20 или 100 °С в течение 5–7 дней или 8 ч соответственно. Предварительно из точных навесок аминокислот готовили растворы в обычной воде, разливали по пробиркам фиксированное количество каждой аминокислоты (по отдельности или в смеси) и сушили на вакуумной центрифуге. Для осуществления изотопного обмена инкубировали как отдельные аминокислоты (стандарты S1 и S2), так и смеси, состоящие из двух (стандарты S3 и S4) или трех аминокислот (стандарт S5) (табл. 1). Концентрации аминокислот при этом

лежали в интервале 22–34 мМ. Растворы полученных О-изотопных стандартов разливали по нескольким пластиковым пробиркам вместимостью 0.5 мл (фирмы Eppendorf), фиксируя количество вносимых стандартов, и высушивали на вакуумной центрифуге.

#### **Кислотный гидролиз белков**

Гидролиз белков осуществляли из твердого состояния в парах кислот. Для этого предварительно готовили растворы анализируемых белков, разливали их как по отдельности, так и в смеси с аминокислотными стандартами по пластиковым пробиркам вместимостью 0.5 мл (фирмы Eppendorf) и высушивали на вакуумной центрифуге. Содержание белка в каждой пробирке варьировали в пределах 20–600 пмоль в зависимости от содержания тестируемых аминокислот в каждом конкретном белке. Добавление стандартов  $D_4$ -Lys и  $^{15}N_2$ -Arg осуществляли таким образом, чтобы молярное соотношение количества тестируемой аминокислоты каждого белка (вычисленное из аминокислотного состава этого белка) и количества соответствующего аминокислотного стандарта составляло приблизительно 1:1.

Высушенные в пробирках белковые образцы помещали в камеру для гидролиза, представляющую собой стеклянный флакон вместимостью 22 мл, снабженный клапаном из инертного материала. В такой флакон ставили по 3–4 пробирки. Крышки с пробирок удаляли. Затем аккуратно по стенке вливали 800 мкл смеси HCl/ТФУ (1:1), содержащей 10 мМ фенола. После заполнения флакона аргоном в нем создавали вакуум до 1 мбар, помещали в суховоздушный термостат и выдерживали при 107 °С в течение 18 ч. Для удаления следов кислоты гидролизованные образцы подсушивали либо на вакуумной центрифуге в течение 10–15 мин, либо в токе азота.

#### **Масс-спектрометрический анализ**

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Finnigan MAT95 (TermoQuest, Бремен, Германия), оборудованном электрораспылительным источником ионизации (electrospray ionization, ESI) и масс-анализатором с двойной фокусировкой. Все спектры получены в режиме съемки положительных ионов суммированием 100–150 импульсов. Объем анализируемой пробы 20 мкл. Концентрация по аминокислоте должна составлять не менее 2 пмоль/мкл, что соответствует по белку не менее 0.05, 0.15 и 0.5 пмоль/мкл соответственно для БСА, ХТГ и проИНС. Скорость подачи раствора образца 1 мкл/мин.

Нативные аминокислоты и их стандарты растворяли в 50 % ацетонитриле в присутствии 0.1 % уксусной кислоты в 100 мкМ концентрации. Затем определенные объемы стандартов (S4, S5,  $D_4$ -Lys

и  $^{15}\text{N}_2\text{-Arg}$ ) смешивали с анализируемыми растворами нативных аминокислот в разных соотношениях. Конечные концентрации стандартов и нативных аминокислот после смешивания представлены в табл. 2–4.

Образцы гидролизованных белков растворяли в 50 % ацетонитриле в присутствии 0.1 % уксусной кислоты в максимальной концентрации 10, 15 и 25 мкМ соответственно для БСА, ХТГ и про-ИНС. Затем определенные объемы стандартов (S4, S5 и/или D<sub>4</sub>-Lys и  $^{15}\text{N}_2\text{-Arg}$ ) смешивали с анализируемыми растворами гидролизованных белков в разных соотношениях. Конечные концентрации стандартов и нативных аминокислот после смешивания представлены в табл. 5.

Образцы ферментативно гидролизованного мелиттина и его стандарта S6 перерастворяли, как указано выше, и готовили смеси в соотношении 1:1. Концентрация стандарта в пересчете на исходный мелиттин составила 32 мкМ.

#### Расчет концентраций из соотношения изотопов

Концентрации нативных аминокислот в растворах задавали по навеске и проверяли в эксперименте по соотношению интенсивностей изотопных пиков для их смесей с аминокислотными стандартами. В случае использования стандартов D<sub>4</sub>-Lys и  $^{15}\text{N}_2\text{-Arg}$  концентрации нативных аминокислот в смеси рассчитывали исходя из соотношения интенсивностей  $M / (M + 4)$  и  $M / (M + 2)$  соответственно и известной концентрации стандарта в смеси. При использовании в качестве стандартов O-изотопных форм аминокислот концентрации свободных аминокислот в смеси рассчитывали из изотопного соотношения с использованием табличного процессора Microsoft Excel, как описано в [3, 4]. Концентрации белков рассчитывали с учетом содержания анализируемых аминокислот в этих белках.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yao X., Freas A., J. Ramirez P., Demirev P.A., Fenselau C. Proteolytic  $^{18}\text{O}$  Labeling for Comparative Proteomics: Model Studies with two Serotypes of Adenovirus // *Anal. Chem.* 2001. V. 75. P. 2836–2842.
2. Desiderio D.M., Wirth U., Lovelace J.L., Fridland G., Umstot E.S., Nguyen T. M.-D., Schiller P.W., Szeto H.S., Clapp J.F. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric quantitation of the mu opioid receptor agonist DAMGO in ovine plasma // *J. Mass Spectrom.* 2000. V. 35. P. 725–733.
3. Mirgorodskaya O.A., Kozmin Y.P., Titov M.I., Körner R., Sönksen C.P., Roepstorff P. Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry using  $^{18}\text{O}$ -labeled internal standards // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. V. 14. P. 1226–1232.
4. Миргородская О.А., Козьмин Ю.П., Титов М.И., Савельева Н.В., Кёрнер Р., Сонксен К., Мирошников А.И., Роепсторфф П. Использование MALDI-MS для количественного анализа пептидов и белков // *Биоорганическая химия.* 2000. Т. 26. С. 662–671.
5. Mirgorodskaya E.P., Mirgorodskaya O.A., Dobretsov S.V., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Kozlovskiy V.I., Raznikov V.V. Electro-spray mass-spectrometric study of melittin trypsinolysis by a kinetic approach // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 2864–2869.
6. Mirgorodskaya O., Kazanina G., Roepstorff P., Mirgorodskaya E., Zamolodchikova T., Vorotyntseva T., Miroshnikov A., Alexandrov S. A comparative study of the specificity of proinsulin hydrolysis by duodenase, trypsin and plasmin // *Prot. and Peptide Letters.* 1998. V. 5. P. 27–32.

**Институт аналитического приборостроения РАН,  
Санкт-Петербург (А.В. Новиков, Н.В. Краснов)**

**Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург  
(Н.В. Савельева, О.А. Миргородская)**

**Университет Южной Дании, Дания, Оденсе  
(П. Роепсторфф, Р. Кёрнер)**

Материал поступил в редакцию 23.07.2002.

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF PEPTIDES AND PROTEINS BY ESI-MS

**A. V. Novikov, N. V. Savel'eva\*, N. V. Krasnov, Peter Roepstorff\*\*,  
Roman Koerner\*\*, O. A. Mirgorodskaya\***

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

*\*Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg*

*\*\*University of Southern Denmark, Denmark, Odense*

A method of quantitative determination of peptides and proteins by ESI-MS at picomolar levels was developed. The essence of the method consists in determination of the concentration of individual amino acids from the analyzed proteins. Proteins were first subjected to hydrolysis (acid or enzymatic) and then we measured relative ion intensities of amino acids and their isotope labeled analogs. As internal standards, the  $O^{18}$ -containing analogs for 5 amino acids, and also deuterated lysin and arginine modified by nitrogen  $2N^{15}$  were used. The method is applicable to proteins with known amino acid sequences. This method was tested by the determination of concentration of bovine serum albumin (BSA), chemotrypsinogen and proinsulin.