

УДК 577.112:579.842.11

© Е. С. Корнева, А. Л. Верещагин, А. В. Новиков, М. А. Грачев

## УПРОЩЕНИЕ ТРИПСИНОВОГО ГИДРОЛИЗАТА ПРОТЕОМА *E. COLI* ПРИ ПОИСКЕ ПЕПТИДОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ЭЛЕКТРОРАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ (ES-TOF-MS)

Упрощение трипсинового гидролизата протеома *E. coli* при поиске пептидов РНК-полимеразы достигнуто путем применения гельпроникающей хроматографии. В результате анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией полученных при хроматографии фракций идентифицированы пептиды, наличие которых свидетельствует о присутствии РНК-полимеразы в исходном суммарном белке.

### ВВЕДЕНИЕ

Для поиска индивидуальных белков, возможность присутствия которых в протеомах живых клеток вытекает из структуры их геномов, широко применяются методы протеомики. Целью таких исследований является решение как фундаментальных проблем молекулярной биологии, так и практически важных задач, например задач медицинской диагностики. Наиболее широко применяется сочетание техники двумерного электрофореза — электрофокусировки — с масс-спектрометрией с лазерной ионизацией (MALDI). Применение этой техники имеет два серьезных ограничения. Во-первых, выделение чистых белковых фракций ограничивается недостаточной емкостью пластин двумерных гелей, следствием которой является загрязнение целевых белков мажорными клеточными белками, например тубулинами и актинами. Во-вторых, метод MALDI, как и другие методы масс-спектрометрии пептидов, является принципиально неколичественным, и потому, например, отсутствие искомого сигнала в масс-спектрах никак не говорит об отсутствии соответствующих белков в исследуемых клетках.

В связи с этим в последние годы развивается альтернативный подход, который иногда называют пептидомикой [1], — поиск не самих целевых белков, а индикаторных продуктов их расщепления, например характерных триптических пептидов. Для разделения пептидов можно применять не гель-электрофорез, а жидкостную хроматографию, динамический диапазон допустимой нагрузки для которой гораздо более широк по сравнению с гель-электрофорезом. Для реализации техники пептидомики необходимо выделить из клеток суммарный белок и подвергнуть его химической модификации для разрыва дисульфидных связей

и их последующей защиты (обычно путем алкилирования йодуксусной кислотой). Необходимо также принять меры для предотвращения неконтролируемого расщепления белков клеточными протеазами. Далее необходимо упростить подвергаемую масс-спектрометрии сложнейшую смесь пептидов для того, чтобы обеспечить ионизацию целевых пептидов и их надежную детекцию в масс-спектрах.

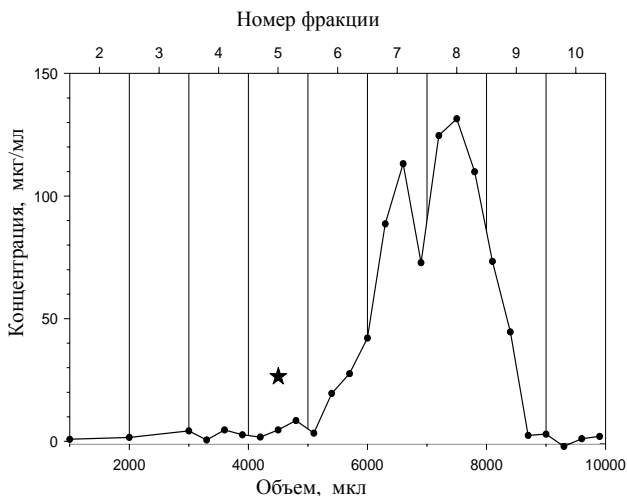
Целью настоящей работы было исследование возможности идентификации в протеоме *E. coli* РНК-полимеразы — белка с умеренным уровнем экспрессии (7000 копий на клетку [2]) путем трипсинолиза, гель-проникающей хроматографии и времяпролетной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали концентрированную культуру *E. coli*, ацетонитрил ("Криохром", Санкт-Петербург), йодуксусную кислоту, трифторуксусную кислоту фирмы "Merk" (Германия), PMSF ("Bio Rad", США), меркаптоэтанол ("Хеликон", Москва), азид натрия ("Лабтех", Москва), ацетон ("Экос-1"), дигидроортофосфат калия, тиомочевину, додецилсульфат натрия (SDS) фирмы "Реахим" (Москва), Tris и мочевины фирмы "Sigma" (Германия), TPCK трипсин ("Sigma" T 1426, Германия).

Лизаты клеток *E. coli* готовили, экстрагируя биомассу Tris-буфером, содержащим мочевины, тиомочевину, SDS. Полученный лизат последовательно карбоксиметилировали 0.05 М йодуксусной кислотой, восстановили 0.7 М меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали 0.075 М йодуксусной кислотой. Белок из смеси осаждали ацетоном [3]. Последующий трипсинолиз выполняли

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**



**Рис. 1.** Профиль гель-фильтрации триптических пептидов *E. coli*

по стандартной методике [3, 5], время инкубирования 6 ч.

Гель-фильтрацию проводили на колонке 20×0.5 см с сефадексом G-25. Элюирование — 0.2 М фосфатным буфером (pH = 6.5) с 0.02 % NaN<sub>3</sub>, собирая фракции по 1 мл. Фракции концентрировали и короткое время диализовали на холоде.

Хроматограммы записывали на микроколоночном жидкостном хроматографе с многоволновой фотометрической детекцией "Милюхром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск, Россия). Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MX 5303, оборудованном электрораспылительным источником ионов (ESI) и времяпролетным масс-анализатором (TOF) в режиме регистрации положительных ионов (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия). Объем анализируемой пробы 10 мкл. Скорость подачи образца 1–2 мкл/мин. Анализ фракций производился в режиме "жидкостной хроматограф—масс-спектрометр" в режиме прямой стыковки.

Известно, что в геноме *E. coli* закодировано около 4800 белков, дающих при трипсинолизе 37 000 пептидов. РНК-полимераза *E. coli* состоит из пяти субъединиц: β' (165 кДа), β (155 кДа), двух α (35 кДа) и σ (70 кДа). Прогнозируемая по геному смесь пептидов РНК-полимеразы *E. coli* представляет собой набор из приблизительно 450 компонентов. Из них основную часть составляют пептиды длиной менее 15 аминокислотных остатков (390 штук), а пептиды, содержащие более чем 20 аминокислот, имеются в количестве лишь 37 штук. Мы предположили, что, поделив сумму триптических пептидов *E. coli* с помощью гель-проникающей хроматографии, можно снизить ее сложность в области крупных молекул до степени, достаточной для регистрации индивидуальных пептидов РНК-полимеразы в масс-спектре. Основное внимание было уделено изучению фракций, содержащих длинные пептиды.

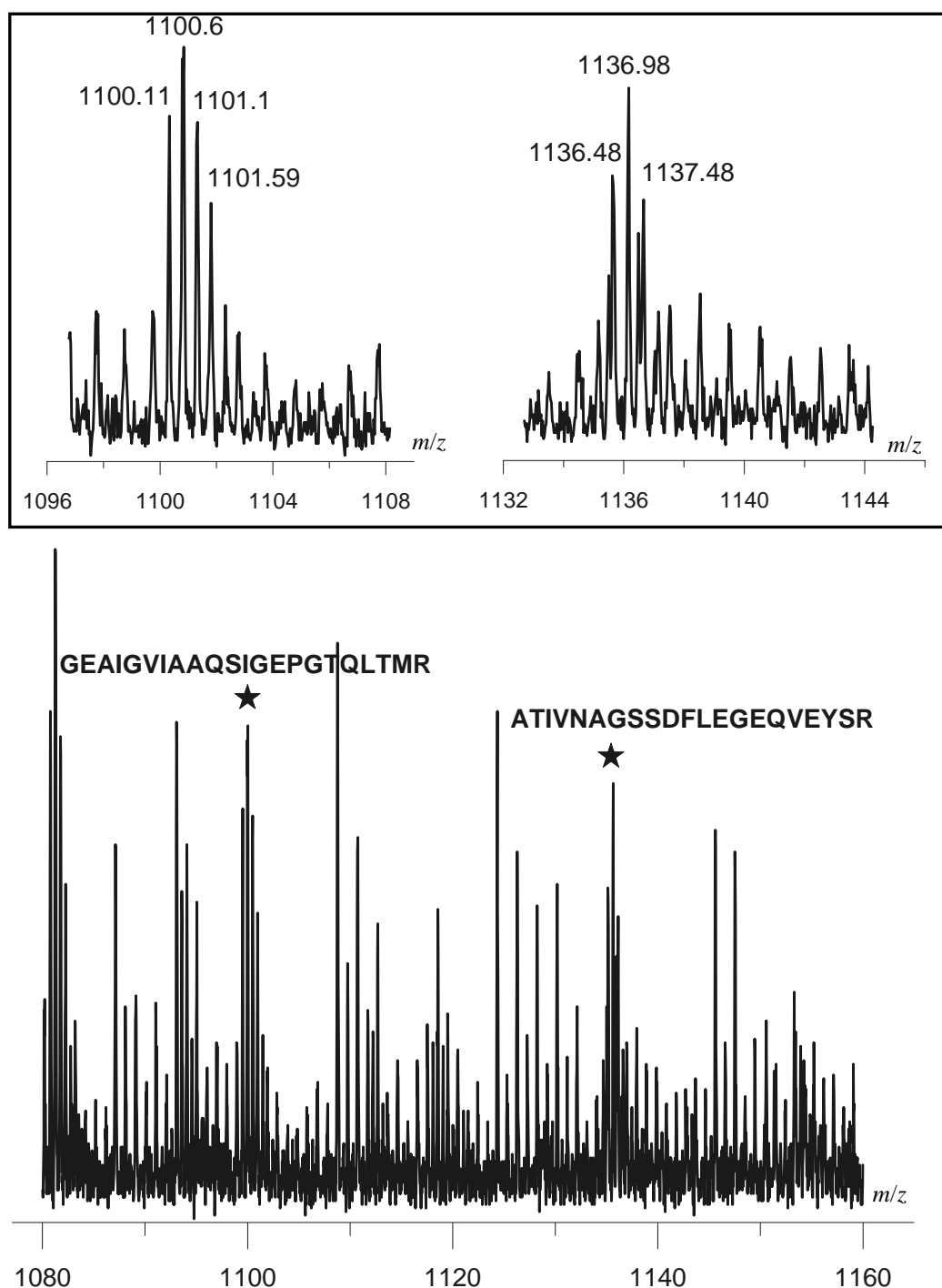
Суммарный белок *E. coli* выделяли из супернатанта, полученного путем центрифугирования гомогената бактериальной массы в смеси с 7 М мочевиной, 2 М тиомочевиной, 0.1 % SDS и 0.04 М Tris.ОН (pH 8.5). Супернатант последовательно подвергали алкилированию, восстановлению и вновь алкилированию. Белок осаждали ацетоном, растворяли в 0.1 М растворе Tris.ОН и гидролизовали трипсином до получения постоянного профиля обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

Полученную смесь триптических пептидов *E. coli* разделяли методом гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-25 (рис. 1). Масс-спектрометрии было подвергнуто 7 фракций. Судя по выходной кривой гель-проникающей хроматографии, короткие пептиды были отсеяны на 95 %.

Отобранные для дальнейшего анализа фракции короткое время диализовали против воды и концентрировали упариванием в вакууме, а затем доводили до объема 40 мкл. В полученных образцах методом времяпролетной масс-спектрометрии были обнаружены пептиды, распределившиеся в соответствии с размерами (табл., рис. 2).

Пептиды РНК-полимеразы, обнаруженные в трипсинолизате биомассы *E. coli*

Аминокислотный участок	Аминокислотная последовательность	Субъединица	М. в.	№ фракции
1356–1369	<b>LIPAGTGYAYHQDR</b>	В'	1560.7685	6
1264–1284	<b>ATIVNAGSSDFLEGEQVEYSR</b>	В'	2270.952	5
912–933	<b>GEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMR</b>	В'	2198.226	5

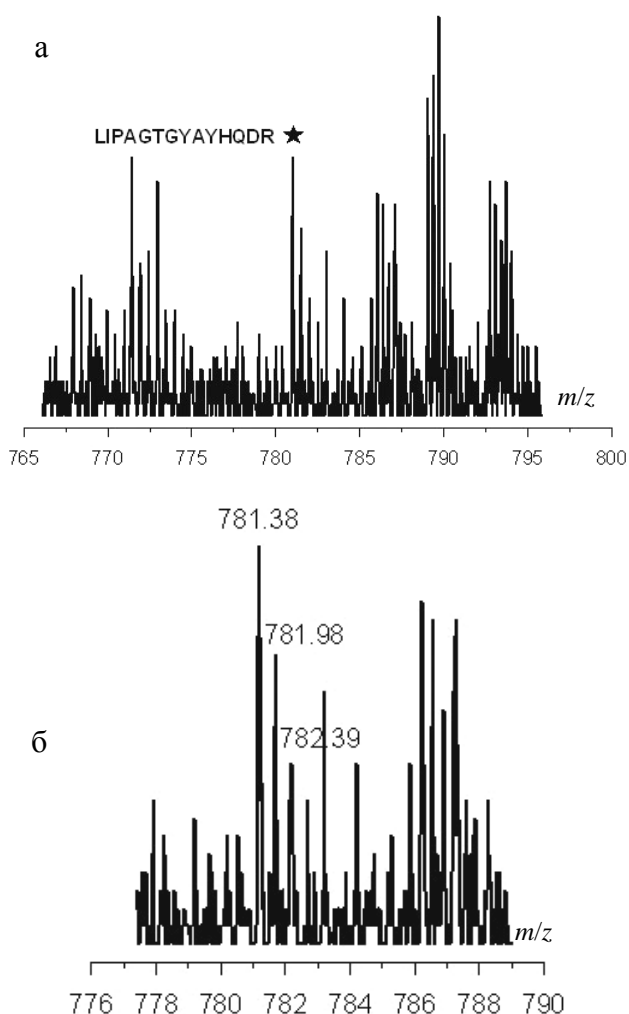


**Рис. 2.** Фрагмент масс-спектра фракции 5, содержащий сигналы пептидов GEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMR, ATIVNAGSSDFLEGEQVEYSR субъединицы В' РНК полимеразы *E.coli*. На врезке показаны в увеличенном масштабе участки (★)

В группе крупных пептидов (длиннее 20 аминокислотных остатков) два из интересовавших нас сигнала были отчетливо видны на фоне сигналов фрагментов, принадлежащих другим клеточным

белкам (рис. 2). Массы, предположительно соответствующие двухзарядным катионам пептидов

GEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMR,  
ATIVNAGSSDFLEGEQVEYSR,



**Рис. 3.** Фрагмент (а) масс-спектра фракции 6, содержащий сигнал пептида LIPAGTGYAYHQDR субъединицы В' РНК полимеразы *E. Coli*. Участок спектра (★) показан в увеличении на (б)

найлены во фракции 5. Кроме того, в шестой фракции обнаружен сигнал 14-членного фрагмента LIPAGTGYAYHQDR (рис. 3). Поиск, выполненный с помощью системы Mascot для *E. coli*, показал, что одновременное наличие трех указанных сигналов может объясняться лишь тем, что в

исходном белке присутствовала РНК-полимераза.

Принято считать, что трипсиновый гидролизат протеома живой клетки, состоящий из нескольких тысяч пептидов, представляет большую сложность для обнаружения в нем конкретных пептидов из-за трудоемких операций по их выделению или обогащению. Нами показано, что методом, включающим лишь одну стадию упрощения полного трипсинового гидролизата суммарного белка, можно установить наличие в нем протеина, не являющегося мажорным.

#### **Благодарности**

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований Российской академии наук "Физико-химическая биология" (проект 10.3) и гранта РФФИ 04-04-48669.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Soloviev M., Finch P. Peptidomics, Current Status // Journal of chromatography B. 2005. V. 815. P. 11–24.
2. (<http://www.nsu.ru>).
3. Практическая химия белка / Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. 621 с.
4. Basir Y.J., Conlon J.M. Peptidomic Analysis of the Skin Secretions of the Pickerel Frog *Rana palustris* Identifies Six Novel Families of Structurally-Related Peptides // Peptides. 2003. V. 24. P. 379–383.
5. Ihling C., Sinz A. Proteome Analysis of *Escherichia coli* Using High-Performance Liquid Chromatography and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // Proteomics. 2005. V. 5. P. 2029–2042.

*Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск (Корнева Е.С., Верещагин А.Л., Грачев М.А.)*

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

Материал поступил в редакцию 10.04.2007.

**SIMPLIFICATION OF TRYPSIN DIGEST OF PROTEOM *E. COLI*  
IN SEARCHING FOR RNA-POLYMERASE PEPTIDES  
BY MASS-SPECTROMETRY WITH ELECTROSPRAY  
IONIZATION (ES-TOF-MS)**

**E. S. Korneva<sup>1</sup>, A. L. Vereshchagin<sup>1</sup>, A. V. Novikov<sup>2</sup>, M. A. Grachev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Limnological Institute of the RAS Siberian Branch, Irkutsk*

<sup>2</sup>*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

Simplification of trypsin proteom *E. coli* in searching for RNA-polymerase peptides has been achieved by using gel-penetrating chromatography. As a result of analyzing the fractions obtained in the process of chromatography by the method of time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization, peptides were identified, the presence of which is the evidence of the presence of RNA-polymerase in the initial total protein.