

УДК 543.51

© Я. А. Дубровский, Е. П. Подольская

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИНОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ МЕТОДОМ MALDI-MS (ОБЗОР)

В обзоре рассмотрены возможности MALDI-масс-спектрометрии применительно к анализу токсинов пептидной природы, продуцируемых бактериями, некоторыми растениями, морскими организмами, насекомыми, членистоногими и змеями. Показаны преимущества и недостатки метода.

Кл. сл.: пептидные токсины, веномика, масс-спектрометрия, MALDI-масс-спектрометрия

### ВВЕДЕНИЕ

Идентификация токсинов в различных средах — одна из наиболее сложных задач в аналитической токсикологии. Как правило, не ставится задача определять все известные токсины единым тестом. Укусы смертельно ядовитых змей и насекомых опознают по симптоматике и вероятности встретить ядовитое животное. При лечении вводится соответствующая поли- или моновалентная анти-сыворотка. Так как яды животных мощный источник новых фармакологически активных соединений, в последнее время начала активно развиваться новая отрасль протеомики — "веномика", изучающая белковый состав ядов различных животных.

Область определения бактериальных и растительных токсинов тесно связана с деятельностью государственных органов по защите здоровья населения, таких как FDA и EPA в США или Роспотребнадзор в Российской Федерации. У таких органов существуют аттестованные методики по проверке различных пищевых продуктов и сырья на наличие определенных токсинов, опасных для населения.

В последнее время появился интерес к идентификации ряда токсинов в связи с их потенциальной террористической угрозой. Нароботать запасы ботулинового нейротоксина смог Ирак при Саддаме Хусейне в 1980-е годы и японская террористическая секта "Аум Синрикё".

При классификации природных токсичных веществ биологического происхождения используются понятия *яд* и *токсин*. *Токсин* — индивидуальное химическое соединение природного происхождения с высокой биологической активностью. *Яд* — секрет специализированных ядовитых желез животных (змей, насекомых, амфибий и пр.). Высокая

поражающая способность большинства ядов природного происхождения связана с присутствием в их составе токсинов, характеризующихся высокой специфичностью действия на определенные биосубстраты (рецепторы, ионные каналы, синапсы).

**Нейротоксины** змей нарушают передачу возбуждения в нервно-мышечных синапсах; *батрахотоксин*, *тетродотоксин* и *сакситоксин* блокируют натриевые каналы нервных клеток и таким образом блокируют передачу нервного импульса; ферменты ядов гадюк и гремушников воздействуют на систему свертывания крови и т. д. [1].

**Бактериальные токсины.** Большинство бактериальных токсинов представляют собой высокомолекулярные соединения белковой, полипептидной или полисахаридной природы, обладающие антигенными свойствами. В настоящее время охарактеризовано около 150 токсинов. Бактериальные токсины относятся к наиболее токсичным из известных веществ. Среди них — ботулиновый, холерный, дифтерийный, столбнячный, стафилококковые токсины. Преимущественно бактериальные токсины действуют на нервную или сердечно-сосудистую систему.

**Микотоксины.** Химическая природа и биологическая активность микотоксинов чрезвычайно разнообразны. Наибольший интерес представляют вещества, продуцируемые микроскопическими грибами, способными заражать пищевые продукты, такие как *эрготоксины* (грибы спорыньи *Claviceps*), *афлатоксины* и близкие им соединения (грибы *Aspergillus flavus* и родственные виды), *трихоцетеновые* микотоксины (грибы *Fusarium* и родственные виды), *охратоксины* и др. Наиболее опасными токсинами высших грибов являются пептидные токсины *аманитины*, *амани-*

ны и фаллоидины, в наибольшей концентрации содержащиеся в бледной поганке *Amanita phalloides* [2].

**Токсины высших растений.** Фитотоксины являются веществами различной химической природы и неодинаковой биологической активности. Фитотоксины относятся к группам алкалоидов, терпеноидов, липидов, гликозидов, сапонинов, флавоноидов, кумаринов, белков и пептидов. Ряд фитотоксинов обладают антигенными свойствами, и их можно определять иммунологическими методами [2].

**Токсины животных.** Ряд животных из самых различных семейств содержат в органах и тканях чрезвычайно токсичные вещества. Некоторые животные являются вторично-ядовитыми, т. к. могут аккумулировать токсины, поступающие из окружающей среды (моллюски, накапливающие в тканях сакситоксин, продуцируемый одноклеточными динофлагеллятами; рыба, аккумулирующая метил-ртуть, в местах сброса ртутных соединений). Химическое строение зоотоксинов чрезвычайно разнообразно — белки и ферменты, олиго- и полипептиды, липиды, биогенные амины, терпены и др. Часто в яде животного выявляется большая смесь биологически активных веществ, многие из которых обладают ферментативной активностью. Как правило, белковые токсины (змей, насекомых, паукообразных) вводятся с помощью вооруженного ядовитого аппарата парентерально, т. к. многие из них разрушаются пищеварительными ферментами. Токсины небелковой природы эффективны и при энтеральном введении (токсические алкалоиды амфибий, токсины рыб, моллюсков и др.) [3] (см. приложение).

Последние публикации в области изучения токсинов предполагают, что основные чрезвычайно токсичные природные токсины уже известны. Новые токсины обладают значительно меньшей токсичностью, особенно токсины, выделенные из ядов различных животных. Наиболее токсичными являются бактериальные токсины.

Новый подход по идентификации токсинов связан с развитием масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации, позволяет успешно анализировать термолабильные нелетучие соединения, к которым относится большинство природных токсинов, а появление биоинформационных баз данных значительно облегчает идентификацию токсинов белковой и пептидной природы. Масс-спектрометрическая идентификация пептидных токсинов более надежна, чем общепринятые иммунологические методы, недостатком которых является возможность ложноположительных и ложноотрицательных ответов. Несмотря на то что некоторые белки отсутствуют в базах данных, используемый метод сравнения аминокислотных

последовательностей, определенных в ходе исследования (например, тандемный MS-MS-анализ), с последовательностями уже определенных белков (MS BLAST) позволит, если не идентифицировать белки, то хотя бы определить их класс.

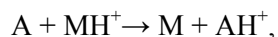
## MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Метод MALDI основан на воздействии импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Матрица представляет собой химическое соединение, которое способно возгоняться под воздействием лазера и захватывать с собой молекулы нелетучих термолабильных аналитов. Кроме того, матрица способствует ионизации анализируемого вещества. Вещество, используемое в качестве матрицы, должно отвечать следующим основным требованиям [4–6]:

- обладать высоким коэффициентом экстинкции при длине волны лазерного излучения;
- ионизировать нейтральные молекулы анализируемого вещества путем переноса заряда или заряженной частицы;
- обладать хорошей растворимостью в растворителях, применяемых в процессе пробоподготовки;
- быть химически инертным по отношению к анализируемому веществу;
- иметь низкую летучесть и термическую устойчивость.

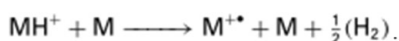
При облучении лазером с длительностью импульса несколько наносекунд и высокими величинами интенсивности излучения ( $10^6$ – $10^7$  Вт/см<sup>2</sup>) из образца, представляющего собой твердый раствор или смесь анализируемого вещества и матрицы, происходит выброс материала в виде микрочастиц [7]. Такие частицы могут достигать размеров несколько сотен микрометров. Над поверхностью возникает область высокого локального давления — так называемый факел, который преимущественно состоит из нейтральных частиц. Вместе с тем в нем присутствуют и заряженные частицы, доля которых составляет  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  от полного числа всех частиц. На начальном этапе образования факела его плотность близка к плотности вещества в конденсированном состоянии. С расширением факела (в первые наносекунды) происходит распад конгломератов вплоть до образования отдельных молекул или их фрагментов, а также заряженных (преимущественно матричных) частиц. Ионизацию молекул, происходящую непосредственно при выбросе материала из конденсированного состояния, принято рассматривать как "первичную".

В расширяющемся факеле происходят непрерывные соударения между частицами, в том числе возможны ион-молекулярные реакции между матричными заряженными частицами и молекулами анализируемого вещества, которые приводят к ионизации последнего:

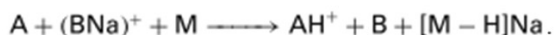
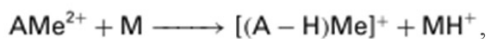


где А — молекула анализируемого вещества, М — матричная молекула. Такого рода ионизацию относят к "вторичной". Возбуждение молекул, которое может протекать несколькими способами, сопровождается фотоионизацией. Далее протекает множество фотохимических реакций. В результате может образоваться набор ионов, которые участвуют в последующей стадии ионизации анализируемого соединения. Часть процессов, происходящих с молекулами матрицы, может относиться и к молекулам анализируемых соединений. Большая (на 5–6 порядков) концентрация молекул матрицы по сравнению с анализируемыми соединениями позволяет считать, что ионизация последних осуществляется в результате переноса электрона или протона  $H^+$  [8].

**Перенос электрона :**



**Перенос протона :**



Таким образом, при рассмотрении MALDI-масс-спектра мы наблюдаем пики, относящиеся к фрагментам матрицы (в диапазоне 100–400 Да, что затрудняет масс-спектрометрический анализ аминокислот и небольших пептидов) и анализируемого вещества (табл. 1). Кроме того, достаточно часто регистрируются ионы, относящиеся

**Табл. 1.** Сигналы, относящиеся к фрагментам матрицы СНСА (α-циано-4-гидроксикоричная к-та)

Формула	Масса (Да)
Cyano H – (CO <sub>2</sub> )	146.06
Cyano H – (CN)	164.05
Cyano H – (H <sub>2</sub> O)	172.04
Cyano H	190.05
Cyano Na	212.03
Cyano K	228.01
Cyano <sub>2</sub> H – (CO <sub>2</sub> )	335.1
Cyano <sub>2</sub> H	379.09
Cyano <sub>2</sub> Na	401.07
Cyano <sub>2</sub> K	417.05

к комплексу матрица—аналит, что всегда необходимо учитывать при интерпретации масс-спектров. Наиболее распространенные матрицы приведены в табл. 2.

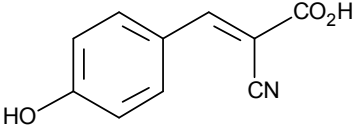
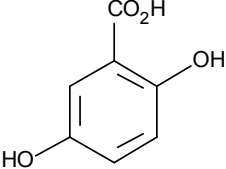
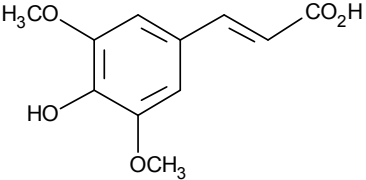
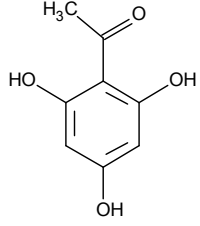
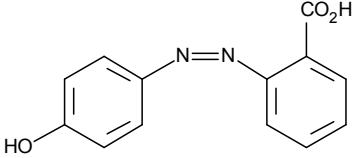
К основным преимуществам метода ионизации MALDI можно отнести следующие.

1. MS-анализ био- и синтетических полимеров без разрушения молекулы, диапазон масс до 500 000 Да.
2. Высокая чувствительность от  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  до  $10^{-21}$  моль исследуемого вещества.
3. Относительно высокая толерантность к солям.
4. При ионизации в основном образуются однозарядные ионы, что значительно облегчает интерпретацию спектров.
5. Возможность работы с многокомпонентными смесями.
6. Возможность получения структурной информации при проведении MS-MS-анализа.

**ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА  
ДЛЯ MALDI-MS-АНАЛИЗА**

Основное преимущество метода MALDI-MS состоит в том, что этим методом можно определять молекулярные массы цельных белков без предварительного расщепления на пептиды. Несмотря на то что молекулярная масса белка не является характеристичным параметром (большое количество белков обладает близкими по значению молекулярными массами; кроме того,

Табл. 2. Наиболее распространенные матрицы

Матрица	Молекулярная масса (Да)	Структурная формула	Примечание
α-циано-4-гидроксикоричная к-та (СНСА)	189.17		Анализ пептидов и белков с массами меньше 10 кДа
2,5-дигидроксibenзойная к-та (DHB)	154.12		Анализ гидролизатов белков, углеводов, олигосахаридов, гликопептидов, а также пептидов и белков с массой ниже 10 кДа. Хорошо подходит для детектирования отрицательных ионов гликолипидов.
β-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)-акриловая к-та (горчичная к-та) (SA)	224.21		Анализ больших пептидов и белков с молекулярной массой более 10 кДа
2,4,6-тригидроксиацетофенон (ТНАР)	186.16		Анализ гликопротеинов и РНК. Хорошо подходит для детектирования отрицательных ионов гликолипидов.
2-(4'-гидроксифенилазо)-бензойная к-та (НАВА)	242.23		Анализ олигосахаридов или интактных белков.

в биологических образцах зачастую встречаются фрагменты белков), анализ цельных белков, содержащихся в образце, может дать достаточную ценную информацию. Например, позволить оценить количество белков в пробе или же предположить наличие модификаций, которые несет белок.

По значению молекулярной массы невозможно идентифицировать белок. Для идентификации белки, содержащиеся в образце, подвергают ферментативному гидролизу. В качестве фермента чаще всего используют трипсин, но также возможно применение и других ферментов,

например пепсина, химотрипсина, эластазы и др. В зависимости от молекулярной массы белка и содержания в нем аминокислот, по которым проходит гидролиз, в образце может содержаться от 10 до 100 и более пептидов. Для каждого из белков набор пептидов, полученных в результате ферментативного гидролиза уникален, соответственно набор молекулярных масс пептидов гидролизата является характеристичным параметром для идентификации белка.

Поскольку метод достаточно толерантен к содержанию солей в образце, зачастую для успешного анализа достаточно смешать на

мишени аналит и матрицу. В случае высокого содержания солей или других мешающих загрязнителей в образце применяют процедуру обессоливания с помощью колонок, содержащих сорбент С-18 для пептидов или С-4 для белков.

Существует несколько методик нанесения образца на мишень. Чаще всего аналит и матрицу тщательно перемешивают в отдельной емкости и затем совместно наносят на мишень. Кроме того, можно наносить на мишень последовательно сначала матрицу, а потом аналит; для лучшей сокристаллизации образец пипетируют прямо на мишени. Разработаны методики и имеются готовые коммерчески доступные микроколонки (например, ZipTip фирмы "Millipore"; Supel-Tips фирмы "Supelco") для одновременного обессоливания образца и нанесения его на мишень. Процедура включает в себя такие стадии, как нанесение образца на колонку, промывку водой и элюирование аналита прямо на мишень. Стоит отметить, что эта процедура также позволяет концентрировать анализируемые вещества, когда на колонку наносят 10 мкл пробы, а элюируют уже 1–1.5 мкл. Если в качестве элюента использовать раствор матрицы в полярном растворителе, качество нанесения образца получается максимально высоким.

При анализе методом MALDI-MS в масс-спектре пептидов чаще всего содержатся исключительно однозарядные ионы, что значительно облегчает интерпретацию данных, однако этот метод имеет существенный недостаток. В силу специфики источника ионов образец должен быть кристаллическим, что делает невозможным его стыковку с жидкостным хроматографом и соответственно проведение анализа в режиме "on-line". Существуют системы для анализа в режиме "off-line" (LC-MALDI), но в этом случае количество анализов при исследовании одного образца увеличивается многократно. Поэтому перед масс-спектрометрическим анализом методом MALDI-MS компоненты сложных биологических образцов предварительно разделяют. Одним из наиболее часто используемых методов разделения компонентов белковых смесей является гель-электрофорез в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия[9]. В полиакриламидном геле белки разделяются по заряду, который сообщает белкам додецилсульфат натрия; полученный заряд прямо коррелирует с молекулярной массой белка. Местоположение белка определяют после окрашивания геля красителем Кумасси G-250. Для проведения масс-спектрометрического анализа полосу, содержащую белок, вырезают и трипсинолиз проводят непосредственно в геле.

В случае содержания в смеси белков с близкими молекулярными массами белки могут не разделиться и мигрировать в электрическом поле одной полосой. Для получения индивидуально изолированного белка из смеси используют последовательную комбинацию метода изоэлектрофокусировки и ДСН-электрофореза, которая получила название двумерного электрофореза.

Двумерный электрофорез (2D) является уникальным и востребованным инструментом в исследовании сложных белковых смесей. Метод был предложен в начале 1970-х годов в работах [10] и [11] и основан на последовательном применении изоэлектрофокусировки белков с их разделением по изоэлектрическим точкам и дальнейшем разделении по молекулярной массе методом электрофореза. Метод позволяет получить двумерную картину индивидуально изолированных белков, что важно при анализе таких сложных белковых смесей, как клеточные органеллы или плазма крови. Метод из-за достаточной трудоемкости не пользовался такой популярностью, как хроматографическое разделение белковых смесей, до появления работы Шевченко и соавторов [12], в которой была показана возможность использования метода 2D-электрофореза для масс-спектрометрического определения триптических пептидов белка из индивидуально вырезанного пятна. Следует отметить, что на сегодняшний день практически единственным способом анализа пептидов из пятна 2D-геля является MALDI масс-спектрометрия.

Для определения структуры и идентификации токсинов в последние годы все чаще применяются масс-спектрометрические методы [13–15]. Несмотря на то что до сих пор в качестве основных приборных комплексов для анализа пептидных токсинов используют масс-спектрометры с источником ионов "электроспрей" в сочетании с жидкостным хроматографом, метод MALDI-масс-спектрометрии находит свое применение, особенно в тех случаях, когда количество токсина, выделенного из биологического образца, чрезвычайно мало. Кроме того, как уже упоминалось, идентификация белков, выделенных из двумерного геля, возможна только с помощью метода MALDI-MS.

#### **MALDI-MS-АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ**

Одной из важнейших задач токсикологической химии является разработка методов анализа бактериальных токсинов. С тех пор как Ру (Roux) и Йерсен (Yersin) выделили в 1888 г. дифтерийный токсин, микробные токсины были признаны основными факторами вирулентности различных

патогенных бактерий. Бактериальные токсины были определены как растворимые вещества, которые изменяют нормальный метаболизм клеток хозяина и оказывают тем самым вредное влияние на макроорганизм [16]. Стоит отметить, что, во-первых, бактериальные токсины относятся к наиболее токсичным соединениям, существующим в природе, во-вторых, большинство из них представляют собой достаточно большие белковые молекулы, что затрудняет их выделение и соответственно идентификацию, и, наконец, на сегодняшний день основными методами определения бактериальных токсинов являются иммунохимические методы [17–19] и мышинный тест [20, 21], имеющие ряд существенных недостатков. Только в последнее время появляются работы, в которых с помощью масс-спектрометрических методов идентифицируют бактериальные токсины, такие как ботулиновый нейротоксин, столбнячный токсин, стафилококковый энтеротоксин.

К семейству ботулинового нейротоксина (BoNT) принадлежат 7 различных белков (A–G), продуцируемых различными штаммами анаэробных бактерий *Clostridium botulinum* и в редких случаях *Clostridium baratii* и *Clostridium butyricum* [22–24]. Токсины действуют на периферические холинэргические синапсы, ингибируя спонтанный и импульсный выброс ацетилхолина [25, 26]. BoNT является самым токсичным соединением из известных на сегодняшний день, доза 1–3 нг/кг является смертельной для человека. Токсины BoNT являются причиной ботулизма у новорожденных и пищевого ботулизма. Они существуют в природе в виде больших комплексов, включающих нейротоксин и один или несколько белков, которые, как полагают, обеспечивают защиту и стабильность молекулы токсина в желудочно-кишечном тракте [27, 28]. С помощью MALDI-MS-масс-спектрометрического анализа было проведено пептидное картирование всех четырех серотипов ботулинового токсина.

Кроме того, был разработан масс-спектрометрический метод определения эндопептидазной активности ботулиновых токсинов различных серотипов в клинических образцах [29, 30]. Использование антител позволило значительно обогатить образцы исследуемыми токсинами и в дальнейшем определить их ферментативную активность по расщеплению введенного пептида. Продукты деградации детектировали методами масс-спектрометрии. Также этим методом исследовали ингибирование эндопептидазной активности ботулиновых токсинов [31].

Столбнячный токсин относится к экзотоксинам и состоит из двух фракций: тетаноспазмина со свойствами нейротоксина, который поражает двигательные клетки центральной нервной системы и вызывает сокращение поперечно-полосатых

мышц; тетаногемолизина, лизирующего эритроциты. Столбняк — довольно распространенное явление. Люди страдают от данного заболевания в любом возрасте, но чаще всего он бывает у мальчиков до 15 лет, что вызвано их повышенным травматизмом.

Токсин малостоек, быстро разрушается под влиянием нагревания, солнечного света, щелочной среды. Ферменты желудочно-кишечного тракта не разрушают токсин, но он не всасывается через слизистую оболочку кишечника, в связи с чем безопасен при попадании перорально. При действии формалина и при содержании в термостате при 37–38 °С в течение суток токсин утрачивает ядовитые, но сохраняет антигенные свойства. Полученный таким образом столбнячный анатоксин используют для активной иммунизации против столбняка [32].

В основном столбнячный токсин определяется иммунологическими методами [33, 34] либо с помощью мышинного теста, и существует только несколько публикаций, в которых описываются другие методы определения столбнячного токсина. Несмотря на то что столбнячный токсин является белком и может быть исследован с помощью методов хроматографии и масс-спектрометрии, данных о подобных исследованиях крайне мало. Тем не менее метод MALDI-TOF-MS был успешно применен для характеристики С-фрагмента столбнячного токсина и его комплексов с доксорибуцином и другими лигандами [35, 36].

Стафилококковые энтеротоксины (SEB) — токсины, продуцируемые стафилококками. Выделены и изучены четыре типа стафилококковых энтеротоксинов со специфическими антигенными свойствами (A, B, C и F). Наиболее подробно изучен стафилококковый энтеротоксин типа В (SEB), который выделен в высокоочищенном состоянии. Среди аминокислотных остатков в полипептидной цепи токсина больше других представлены остатки аспарагиновой кислоты (17.92 % мол. массы), лизина (15.25 %) и тирозина (11.2 %). Стафилококковые энтеротоксины высоко резистентны к повышенной температуре: температура 120 °С за 20 мин их не инактивирует. В средах с низкими показателями pH активность токсина снижается.

До недавнего времени при определении энтеротоксина В применялись исключительно иммунологические методы, такие как иммунохроматографический анализ, радиоиммунный анализ, иммуноферментный анализ (ИФА) [37]. Только в последние годы появились работы, в которых для определения структуры и идентификации энтеротоксина применяются масс-спектрометрические методы [38–40]. Некоторое количество работ посвящено идентификации энтеротоксина В методом MALDI-TOF в раз-

личных средах [41–44]. Совсем недавно была разработана методика, позволяющая определять токсины в сложных биологических образцах с очень высокой чувствительностью (500 фмоль), основанная на высокоспецифичном аффинном выделении энтеротоксина с последующим MALDI-MS-анализом [45].

#### MALDI-MS-АНАЛИЗ ТОКСИНОВ, ИМЕЮЩИХ РАСТИТЕЛЬНОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ

Рицин и абрин — гемотоксины растительного происхождения, при попадании в организм повреждают оболочки эритроцитов крови и вызывают их гемолиз, это приводит к нарушению свертывания крови и вызывает общие повреждения в тканях.

Рицин — основной токсичный компонент бобов клещевины *Ricinis communis*, содержащийся в жмыхе, остающемся при производстве касторового масла [46]. Рицин — гликопротеин (62 кДа), белковая часть молекулы которого построена из двух субъединиц — каталитической А-субъединицы (RTA, *Ricinus Toxin A-chain*) и лектиновой В-субъединицы (RTB, *Ricinus Toxin B-chain*), соединенных одной дисульфидной связью. RTA (30.6 кДа) представляет собой высокоактивную N-гликозидазу, отщепляющую консервативный остаток аденина в 28S рРНК эукариот [47]. Благодаря своей потенциальной токсичности RTA нашла применение в создании иммунотоксико-конъюгатов, состоящих из токсина и антитела и обладающих направленным токсическим действием, например в противоопухолевой терапии [48] и терапии ВИЧ [49].

Летальные дозы токсина зависят от способа введения в организм животных и от вида животных. При парэнтеральном введении летальные дозы рицина для различных животных изменяются в широком интервале (от сотых до десятитысячных долей мг/кг), что связано, с одной стороны, с использованием в экспериментах препаратов рицина различной степени очистки и, с другой, различной детоксицирующей способностью ферментных систем лабораторных животных. Летальные дозы рицина при оральном введении выше, чем при парэнтеральном. Минимальная летальная доза рицина для человека может составлять 5 мкг/кг [50, 51].

Абрин состоит из белков, которые весьма эффективно препятствуют агглютинации эритроцитов и служат сильнодействующим клеточным ядом. Смертельная доза абрина для мыши (при инъекции) составляет один микрограмм (ЛД<sub>50</sub>, 0.02 в мг/кг).

Основными методами определения рицина и абрина являются иммунологические методы, эти

методы хорошо отработаны и показывают высокую чувствительность [52–54]. Тем не менее в последние годы развиваются методы определения данных белков, основанные на электрофоретических, спектрографических и спектрометрических методах. Например, был разработан метод триптического картирования рицина и абрина с последующим анализом методом тандемной масс-спектрометрии для использования в судебной медицине. Известно, что рицин состоит из двух субъединиц, соединенных между собой дисульфидными связями. Для установления целостности рицина и определения его молекулярной массы применялся анализ-метод MALDI-MS. После триптического гидролиза отдельно каждой субъединицы была проведена MS-MS-идентификация пептидов, входящих в состав образца. После верификации метод был апробирован при анализе неочищенного экстракта, содержащего рицин и абрин, и были определены и идентифицированы характерные пептиды как для рицина, так и для абрина [55].

#### ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-MS ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНОВ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Токсины морских моллюсков рода *Conus* являются обильным источником биоактивных пептидов (конотоксинов, или конопептидов). На сегодняшний день известно, что брюхоногими моллюсками продуцируется несколько сотен активных конотоксинов и менее одного процента из них имеют фармакологическое описание [56, 57].

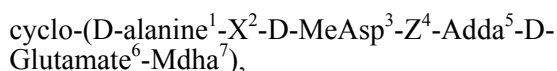
Следует отметить, что способность конотоксинов проявлять биологическую активность можно рассматривать как универсальные биотесты для определения вида конотоксина.

Их относительно небольшой размер и структурное разнообразие позволяют предполагать наличие большого количества посттрансляционных модификаций и делают конотоксины [58] интереснейшим объектом исследования. Однако работ, посвященных изучению специфических конотоксинов, очень немного [59].

Для рутинного анализа конотоксинов чаще всего применяются иммунохимические методы [60, 61], не позволяющие определять структуру токсинов и выявлять новые. Методом MALDI-MS был охарактеризован новый структурный вид конотоксинов — пептидов, богатых метионином PaIA и GrIA из яда *P. albida* [62]. Кроме того, при анализе MALDI-FTICR были выявлены ранее неизвестные конотоксины, выделенные из *Conus virgo* [63], с молекулярными массами 1328.5142 Да и 1358.5592 Да. Было доказано наличие в каждом из них двух дисульфидных мостов и определена их аминокислотная последовательность.

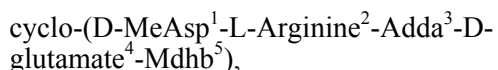
Цианобактериальный токсин был найден в пресных (озера, пруды, реки, резервуары) и соленых (устья рек, моря, озера) водоемах. Токсичность цианобактерий во время цветения достаточно давно привлекает внимание исследователей, поскольку имеется информация об отравлении животных ядами, продуцируемыми цианобактериями. Случаи таких отравлений происходили по всему миру. Насчитывается около 40 видов организмов, способных вырабатывать подобные токсины, например такие, как *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* и *Oscillatoria (Planktothrix)* [64–66]. Цианотоксины включают в себя цитотоксины и биотоксины (нейротоксины: анатоксин-а, анатоксин-а(S)), сакситоксины, гепатотоксины, микроцистины (МС) и нодуларины и могут приводить к острой, летальной, хронической и субхронической интоксикациям людей и животных.

На сегодняшний день известны 77 различных микроцистинов, выделенных из цианобактерий. Первые такие соединения были найдены в пресноводных цианобактериях и являлись циклическими гептапептидами с общей структурой



где X и Z — переменные аминокислоты; D-MeAsp — D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота; Mdha — N-метилдегидроаланин; Adda — (2S, 3S, 8S, 9S)-3-амино-9метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диенольная кислота. Стоит отметить, что Adda является основной структурной особенностью этой группы цианобактериальных пептидных токсинов и отвечает за связывание токсина с протеинфосфатазами [67]. Другие модификации включают в себя замену D-аланина или метилдегидроаланина на D-серин и N-метилсерин соответственно. Структурные изменения могут затрагивать все 7 аминокислот, но чаще всего замечаются L-аминокислоты в позициях X и Z и модифицируются (метируются) аминокислоты в позициях 3 и 7.

Аналогом микроцистинов является нодуларин, имеющий структуру



где Mdhb — 2-метиламино-2-дигидроасляная кислота (является аналогом Mdha в микроцистинах). Mdhb не позволяет образовывать нодуларину ковалентных связей с протеинфосфатазами. И также, как и микроцистины, имеет несколько переменных сайтов.

Большинство работ, посвященных исследованию микроцистинов и нодуларин масс-спектрометрическими методами, выполнено на приборах, снабженных такими источниками ионизации, как

FAB и ESI, либо методом GC-MS [68–70]. В последнее время появляются работы, в которых успешно используется источник ионизации MALDI. Использование метода MALDI-MS значительно улучшает чувствительность определения токсинов [71].

## ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-MS В ВЕНОМИКЕ

Недавно появилось новое направление масс-спектрометрических исследований, получившее название "Веномика". Областью исследований веномики соответственно являются веномы (яды), вырабатываемые живыми организмами. Масс-спектрометрия как метод анализа, позволяющий определить в течение короткого времени большое количество белковых соединений, является наиболее подходящим методом для выявления и идентификации пептидных и белковых компонентов, входящих в состав веномов насекомых, членистоногих, рептилий и т. д.

При комбинировании различных методов разделения компонентов венома (хроматографические и электрофоретические методы) и использовании различных классов масс-спектрометров можно получать информацию о соединениях, входящих в состав венома, такую как набор молекулярных масс белков и пептидов венома (MALDI-MS). Или же определить набор молекулярных масс триптических пептидов каждого из белков (MALDI-MS), что соответственно позволит идентифицировать белки методом PMF. Наконец, возможности методов tandemной масс-спектрометрии позволяют не только идентифицировать известные белки по пептидам, но и определить аминокислотную последовательность неизвестных ранее белков [72].

Известно, что яд паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* наряду с альфа-латротоксином — пресинаптическим нейротоксином, стимулирующим секрецию нейромедиаторов из синаптических окончаний нервных клеток позвоночных, включает ряд белковых токсичных компонентов, стимулирующих пресинаптическую активность нервных клеток беспозвоночных [73–75]. Альфа-латротоксин представляет собой белок с молекулярной массой около 120 кДа и pI ~ 5.2. Предполагается, что его молекула содержит два функциональных фрагмента, один из которых участвует в связывании с рецептором, а другой обуславливает каналоформенные свойства токсина. LD<sub>50</sub> токсина составляет 46 мкг/кг [76, 77]. Для определения и идентификации компонентов яда каракурта был успешно применен масс-спектрометрический анализ с предварительным разделением компонентов яда с помощью электрофоретических методов. Компоненты очищенного от



механических примесей яда каракурта разделяли методом 2D-гельэлектрофореза. Для анализа пептидов, полученных после трипсинолиза белков в пятнах 2D-геля, был использован MALDI-TOF/TOF MS-метод, что позволило установить аминокислотную последовательность ряда пептидов, входящих как в известные компоненты яда, так и в ранее неизученные белки, т. е. аминокислотная последовательность пептидов была определена впервые [78].

Методами MALDI-TOF MS и MALDI-TOF/TOF MS были исследованы веномы скорпионов нескольких видов. Состав венома скорпионов *Orthochirus innesi* и *Androctonus amoreux* оценивали по масс-спектрам, полученным методом MALDI-MS; а затем низкомолекулярные пептиды, а также пептиды, полученные в результате триптического гидролиза были проанализированы и идентифицированы методом тандемной масс-спектрометрии [79]. При использовании описанных подходов была исследована токсичная фракция венома скорпиона *Tityus serrulatus* и показана его биологическая активность, а также веном скорпиона *Mesobuthus martensii* [80, 81].

При исследовании венома пчел основное внимание уделялось поиску и идентификации новых составляющих пчелиного яда. Так, в 2005 г. была проведена работа по выявлению новых бомболитинов в веноме шмеля *Bombus lapidarius*. В ходе данного исследования неочищенный веном анализировали методом MALDI-TOF/TOF MS. В спектре неочищенного венома были определены значения  $m/z$ , которые не были отнесены к известным компонентам; затем MALDI-TOF/TOF MS-анализ позволил методом De-novo установить аминокислотную последовательность выбранных пептидов, что привело к идентификации трех новых бомболитинов [79].

Особый интерес представляет работа по определению венома пчелы в ужаленных тканях, поскольку в ней применялась методика масс-спектрометрического анализа самих тканей, а не белков, извлеченных заранее [82]. Методика включает в себя следующие стадии: приготовление срезов тканей, нанесение на срезы матрицы, нанесение срезов на мишень, MALDI-MS-анализ, идентификация белков. При необходимости вместе с матрицей могут быть нанесены внутренние стандарты, что обеспечивает количественный анализ. Данная работа проводилась как *in vitro*, при воздействии пчел на свиные уши, так и *in vivo*, когда объектом укуса были живые мыши. В результате работы были не только определены белки и пептиды, входящие в состав венома пчелы, но и в режиме реального времени было показано удаление токсинов и аллергенов с места первоначального воздействия. Вполне возможно, что в будущем данный подход можно будет использовать не

только для решения научных задач, но и для определения вида токсина при укусах человека.

Веномы пауков рассматриваются как один из основных объектов исследования с использованием масс-спектрометрических методов [83–85]. Стоит отметить, что веномы пауков могут очень сильно отличаться друг от друга как по составу, так и по сложности. Веном *Brachypelma vagans* характеризуется наличием только нескольких компонентов [86], в то время как в веноме австралийского тарантула насчитывается гораздо большее количество соединений [87]. Также при исследованиях веномов пауков большое внимание уделяется выявлению и идентификации новых, ранее не известных токсинов [88–90]. Расшифровка геномов различных организмов позволяет по последовательности ДНК устанавливать аминокислотную последовательность белков, в том числе и входящих в состав веномов. Таким способом был предсказан ряд токсинов, которые должны содержаться в веноме австралийского норного паука. При проведении (LC-MALDI-MS)-анализа предположения были полностью подтверждены и получены сигналы, соответствующие по массам, предсказанным по последовательностям ДНК.

Ежегодно около 1 млн человек подвергаются укусам ядовитых змей, при этом в 24 % случаев развиваются тяжелые поражения, а 2–3 % укусов — со смертельным исходом. Токсины змей представляют собой комплекс активных веществ, в состав которого входят

- ферменты — во всех ядах найдены гиалуронидаза, фосфолипаза A2, нуклеотидаза, фосфодиэстераза, дезоксирибонуклеаза, рибонуклеаза, аденозинтрифосфатаза, нуклеотидпирофосфатаза, оксидаза L (аминокислот) и экзопептидаза;
- полипептиды, относящиеся к нейро- и геммотоксинам;
- белки со специфическими свойствами, такими как фактор роста нейронов, антикомплементарный фактор и др.;
- неорганические вещества.

По характеру действия на теплокровных животных яды змей подразделяются на две основные группы: нейротоксины и геммотоксины. Нейротоксичные — действуют на нервную систему. Наиболее характерны для аспидов (кобры, бунгарусы, мамбы) и морских змей. Геммотоксичные яды — действуют на кровь. К ним относятся большинство ядов гадюк и гремучих змей. Геммотоксины представлены двумя группами: сериновыми протеазами и металлопротеазами [91]. На сегодняшний день для ядов всех известных змей получены антитела и антисыворотки. Но задача по определению отдельно взятых токсинов, входящих в состав ядов змей, только начинает решаться с применением масс-спектрометрических методов.

При определении венома змей *Naja naja atra* и *Agkistrodon halys* был применен подход, включающий в себя практически все известные прогрессивные методики предварительного фракционирования и масс-спектрометрического анализа белков и пептидов. В качестве сепарационных методов применяли гель-фильтрацию, одно- и двумерный гель-электрофорезы и обращеннофазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию. Для детекции и идентификации белков и пептидов были использованы MALDI-MS и ESI-MS-MS [92].

Также при использовании сочетания хроматографических, иммунохимических, электрофоретических и масс-спектрометрических методов были определены фосфолипаза A2 и нейротоксины (например, тестилотоксин) в веноме *Pseudonaja textilis* [93], кротоксин в веноме *Crotalus simus simus* (Коста Рика) и *Crotalus durissus terrificus* (Бразилия) [94].

Таким образом, в последнее десятилетие появилось множество работ, посвященных исследованию венома змей, в каждой из которых применяются методы масс-спектрометрии [95–97]. Но особого внимания заслуживает работа, в которой не только расшифровывается веном змеи, но и проводится сравнительный анализ его состава в зависимости от возраста особи [98]. В качестве объекта исследования рассматривался веном змеи *Bothrops atrox* трех возрастных групп: детенышей, молодых особей и взрослых особей. Белки, входящие в состав венома, делили методом двумерного гель-электрофореза и анализировали методом MALDI-MS. Белки идентифицировали методом PMF. Кроме того, триптический гидролизат веномов исследовали методом tandemной масс-спектрометрии. Было показано, что концентрация некоторых металлопротеиназ, практически отсутствующих в веноме детенышей, у взрослых особей значительно возрастает.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартными методами для идентификации природных токсинов являются иммуноферментные методы анализа. В настоящее время имеются антитела или антисыворотки практически ко всем значимым токсинам. Иммунологические методы анализа тем не менее имеют свои недостатки, такие как возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Распространенной альтернативой иммунологическим методам анализа пептидных токсинов является комплекс (жидкостный хроматограф—масс-спектрометр с источником ионов "электроспрей"). MALDI-масс-спектрометрия с использованием современных биоинформационных баз данных является мощным инструментом в анализе белков и пептидов. Использование MALDI-масс-спектрометрии в области анализа токсичных белков и пептидов в настоящий момент используется реже, чем LC-MS, и является дополняющим, а не конкурирующим методом. MALDI-масс-спектрометрия незаменима при анализе таких аналитически сложных смесей, как веномы ядовитых животных. В этом случае проводится 2D-электрофорез с последующим MALDI-масс-спектрометрическим анализом. MALDI-масс-спектрометрия, особенно в комбинации с иммунологическим обогащением аналита из матрицы, имеет большой потенциал в токсикологическом анализе бактериальных и растительных пептидных токсинов. Кроме того, развитие направления масс-спектрометрического картирования в тканях (MALDI imaging) позволит моделировать распространение токсина в тканях, например при анализе укуса ядовитых животных или насекомых.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Сравнительная таблица токсичности некоторых токсинов у лабораторных животных (мыши, п/к\*, в/б\*\*) [99]

№ п/п	Агент	ЛД <sub>50</sub> (мкг/кг)	Молекулярный вес (Да)	Источник
1	Ботулиновый токсин	0.001	150 000	Бактерии
2	Шигатоксин	0.002	55 000	Бактерии
3	Столбнячный токсин	0.002	150 000	Бактерии
4	Абрин	0.04	65 000	Растительный (абрус)
5	Дифтерийный токсин	0.1	62 000	Бактерии
6	Майтотоксин	0.1	3 400	Морские динофлагелляты

Сравнительная таблица токсичности некоторых токсинов у лабораторных животных (мыши, п/к\*, в/б\*\*) [99]  
(продолжение)

№ п/п	Агент	ЛД <sub>50</sub> (мкг/кг)	Молекулярный вес (Да)	Источник
7	Палитоксин	0.15	2 700	Кораллы
8	Сигуатоксин	0.4	1 000	Морские динофлагелляты, рыба
9	Текстилотоксин	0.6	80 000	Змеи семейства Elapidae
10	Токсины <i>Clostridium perfringens</i>	0.1–5.0	35 000–40 000	Бактерии
11	Батрахотоксин	2.0	539	Земноводные
12	Рицин	3.0	64 000	Растительный (касторовые бобы)
13	Альфа-конотоксин	5.0	1 500	Моллюски
14	Гайпотоксин	5.0	46 000	Змеи семейства Elapidae
15	Тетродотоксин	8.0	319	Иглобрюх (рыба фугу)
16	Сакситоксин	10.0 (ингал. 2.0)	299	Морские динофлагелляты
17	Стафилококковый энтеротоксин В	27.0 (ингал. макаки резуса)	28 494	Бактерии
18	Анатоксин-А	50.0	500	Сине-зеленые водоросли
19	Микроцистин	50.0	994	Сине-зеленые водоросли
20	Аконитин	100.0	647	Растительный
21	Т-2 токсин	1210.0	466	Микотоксин

**Примечание.** \* — подкожно, \*\* — внутрибрюшинно.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Б.Н., Вальцева И.А. Яды змей. Ташкент: Медицина, 1977. 251 с.
2. Орлов Б.Н., Гелашивили Д.Б., Ибрагимов А.К. Ядовитые животные и растения СССР. М.: Высшая школа, 1990. 272 с.
3. Орлов Б.Н., Гелашивили Д.Б. Зоотоксикология (ядовитые животные и их яды). М.: Высшая школа, 1985. 285 с.
4. Hillenkamp F., Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers // *Anal. Chem.* 1991. V. 63, N 24. P. 1193A–1202A.
5. Karas M., Glückmann M., Schefer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors // *J. Mass Spectrom.* 2000. V. 35. P. 1–12.
6. Knochenmuss R., Stortelder A., Breuker K., Zenobi R.

- Secondary ion–molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization // *J. Mass Spectrom.* 2000. V. 35, N 11. P. 1237–1245.
7. Zenobi R., Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry // *Mass Spectrom. Rev.* 1998. V. 17. P. 337–366.
8. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бинум, 2003. 496 с.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
10. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals // *Humangenetik.* 1975. V. 26, N 3. P. 231–243.
11. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250,

- N 10. P. 4007–4021.
12. *Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93, N 25. P. 14440–14445.
  13. *Bilitewski U., Brenner-Weiss G., Hansen P.-D., et al.* Bioresponse-linked instrumental analysis // *Trends in Analytical Chemistry.* 2000. V. 19, N 7. P. 428–443.
  14. *Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W.* Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food // *Int. J. Food Microbiol.* 2000. V. 60, N 1. P. 1–13.
  15. *Nedelkov D., Nelson R.W.* Detection of Staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69, N 9. P. 5212.
  16. *Schlessinger D., Schaechter M.* Bacterial toxins // *Mechanisms of microbial disease / Eds M. Schaechter, G. Medoff, Bl. Eigenstein.* 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. P. 162–175.
  17. *Roman M.G., Humber J.Y., Hall P.A., et al.* Amplified immunoassay ELISA-ELCA for measuring Clostridium botulinum type E neurotoxin in fish fillets // *J. Food Prot.* 1994. V. 57. P. 985–990.
  18. *Doellgast G.J., Beard G.A., Bottoms J.D., et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes with dual-label antibodies // *J. Clin. Microbiol.* 1994. V. 32. P. 105–111.
  19. *Doellgast G.J., Triscott M.X., Beard G.A., et al.* Sensitive enzymelinked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay // *J. Clin. Microbiol.* 1993. V. 31. P. 2402–2409.
  20. Botulism in the United States (1899–1996). Handbook for Epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, CDC, Atlanta, Ga, Centers for Disease Control and Prevention, 1998.
  21. Botulinum toxin. Detection in foods, blood and other test materials. Method no. 79, 2nd ed. Nordic Committee on Food Analysis, Espoo, Finland, 1991.
  22. *Habermann E., Dreyer F.* Clostridial neurotoxins: handling and action at the cellular and molecular level // *Current topics in microbiology and immunology.* 1986. V. 129. P. 93–179.
  23. *Harvey S.M., Sturgeon J., Dasey D.E., Clin J.* Botulism due to Clostridium baratii type F toxin // *Microbiol.* 2002. V. 40, N 6. P. 2260–2262.
  24. *Simpson L.L.* Identification of the major steps in botulinum toxin action // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. V. 44. P. 167–193.
  25. *Brooks V.B.* An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of botulinum toxin on miniature end-plate potentials // *J. Physiol.* 1956. V. 134, N 2. P. 264–277.
  26. *Kao I., Drachman D.B., Price D.L.* Botulinum toxin: mechanism of presynaptic blockade // *Science.* 1976. V. 193. P. 1256–1258.
  27. *Singh B.R., Li B., Read D.* Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? // *Toxicon.* 1995. V. 33. P. 1541–1547.
  28. *Jahn R., Hanson P.I., Otto H., Ahnert-Hilger G.* Botulinum and tetanus neurotoxins: emerging tools for the study of membrane fusion // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1995. V. 60. P. 329–335.
  29. *Kalb S.R., Moura H., Boyer A.E., et al.* The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in serum and stool samples // *Anal. Biochem.* 2006. V. 351, N 1. P. 84–92.
  30. *Gaunt P.S., Kalb S.R., Barr J.R.* Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007. V. 19. P. 349–354.
  31. *Barr J.R., Moura H., Boyer A.E., et al.* Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry // *Emerg. Infect. Dis.* V. 11, N 10. P. 1578–1583.
  32. Возбудитель столбняка. URL: (<http://www.4medic.ru/page-id-186.html>).
  33. *Kiessig S.T., Hentschel C., Jahn S., et al.* A solid-phase enzyme immunoassay for the detection of tetanus toxin using human and murine monoclonal antibodies // *J. Basic Microbiol.* 1991. V. 31, N 2. P. 135–140.
  34. *Буркин М.А., Свиридов В.В., Перельгина О.В.* Иммуноферментное определение столбнячного токсина и анатоксина с использованием моноклональных антител // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2004. Т. 40, № 4. С. 478–484.
  35. *Shields S.J., Oyeyemi O., Lightstone F.C., Balhorn R.* Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003. V. 14, N 5. P. 460–470.
  36. *Shapiro R.E., Specht C.D., Collins B.E., et al.* Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, N 48. P. 30380–30386.
  37. *Ler S.G., Lee F.K., Gopalakrishnakone P.* Trends in detection of warfare agents: Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1133, N 1-2. P. 1–12.
  38. *Bilitewski U., Brenner-Weiss G., Hansen P.-D., et al.* Bioresponse-linked instrumental analysis // *TRAC.* 2000. V. 19, N 7. P. 428–433.
  39. *Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W.* Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food // *Int. J. Food Microbiol.* 2000. V. 60, N 1. P. 1–13.
  40. *Nedelkov D., Nelson R.W.* Detection of staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69, N 9. P. 5212.
  41. *Usuki S., Pajaniappan M., Thompson S.A., Yu R.K.* Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with Campylobacter lipooligosaccharides // *Glycoconj. J.* 2007. V. 24, N 2-3. P. 167–180.
  42. *Schlosser G., Kačer P., Kuzma M., et al.* Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococ-

- cal Enterotoxin B // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73, N 21. P. 6945–6952.
43. *Nedelkov D., Nelson R.W.* Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69, N 9. P. 5212–5215.
  44. *Katussevani B., Pakulat N., Fleer S., et al.* Concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression // *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. V. 48, N 2. P. 546–555.
  45. *Kull S., Pauly D., Sturmann B., Kirchner S., et al.* Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2010. V. 82, N 7. P. 2916–2924.
  46. *Goldstein I.J., Hayes C.E.* The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals // *Advances in carbohydrates chemistry and biochemistry.* 1978. V. 35. P. 127–340.
  47. *Audi J., Belson M., Patel M., Poisoning R.* A comprehensive review // *JAMA.* 2005. V. 294, N 18. P. 2342–2351.
  48. *Olsnes S., Kozlov J.V.* Ricin // *Toxicon.* 2001. V. 39, N 11. P. 1723–1728.
  49. *Pincus S.H., Wehrly K., Cole R., et al.* In vitro effects of anti-HIV immunotoxins directed against multiple epitopes on HIV type 1 envelope glycoprotein 160 // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1996. V. 12, N 11. P. 1041–1051.
  50. *Bradberry S.M., Dickers K.J., Rice P., et al.* Ricin poisoning // *Toxicol. Rev.* 2003. V. 22, N 1. P. 65–70.
  51. Антонов Н.С. Химическое оружие на рубеже двух столетий. М.: Прогресс, 1994. 176 с. (с. 108–111).
  52. *Garber E.A.E.* Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages // *J. Food Prot.* 2008. V. 71, N 9. P. 1875–1883.
  53. *Garber E.A.E., Walker J.L., O'Brien T.W.* Detection of abrin in food using enzyme-linked immunosorbent assay and electrochemiluminescence technologies // *J. Food Prot.* 2008. V. 71, N 9. P. 1868–1874.
  54. *Dayan-Kenigsberg J., Bertocchi A., Garber E.A.E.* Rapid detection of ricin in cosmetics and elimination of artifacts associated with wheat lectin // *J. Immunol. Methods.* 2008. V. 336, N 2. P. 251–254.
  55. *Ostin A., Bergstrom T., Fredriksson S.-A., Nilsson C.* Solvent-assisted trypsin digestion of ricin for forensic identification by LC-ESI MS/MS // *Anal. Chem.* 2007. V. 79, N 16. P. 6271–6278.
  56. *Lewis R.J., Garcia M.L.* Therapeutic potential of venom peptides // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2003. N 2. P. 790–802.
  57. *Olivera B.M.* Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 31173–31177.
  58. *Jakubowski J.A., Kelley W.P., Sweedler J.V.* Screening for post-translational modifications in conotoxins using liquid chromatography/mass spectrometry: an important component of conotoxin discovery // *Toxicon.* 2006. V. 47. P. 688–699.
  59. *Romeo C., Di Francesco L., Oliverio M., et al.* Conus ventricosus venom peptides profiling by HPLC-MS: A new insight in the intraspecific variation // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. P. 488–498.
  60. *Ashcom J.D., Stiles B.G.* Characterization of alpha-conotoxin interactions with the nicotinic acetylcholine receptor and monoclonal antibodies // *Biochem. J.* 1997. V. 328, N 1. P. 245–250.
  61. *Loughnan M.L., Nicke A., Jones A., et al.* Chemical and functional identification and characterization of novel sulfated alpha-conotoxins from the cone snail *Conus anemone* // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47, N 5. P. 1234–1241.
  62. *López-Vera E., Heimer de la Coteria E.P., Maillo M., et al.* A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea) // *Toxicon.* 2004. V. 43, N 4. P. 365–374.
  63. *Quinton L., Le Caër J.P., Vinh J., et al.* Fourier transform mass spectrometry: a powerful tool for toxin analysis // *Toxicon.* 2006. V. 47, N 6. P. 715–726.
  64. *Harada K.-I., Ogawa K., Matsuura K., et al.* Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139 // *Toxicon.* 1991. V. 29. P. 479–489.
  65. *Brittain S., Mohamed Z.A., Wang J., Lehmann V.K.B., et al.* Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont // *Toxicon.* 2000. V. 38, N 12. P. 1759–1771.
  66. *Henriksen P., Thesis Ph.D.* Toxic cyanobacteria/blue-green algae in Danish freshwaters. Dept. of Phycology, University of Copenhagen, 1996. P. 1–43.
  67. *Suarez-Isla B.A., Velez P.* Paralytic shellfish poisoning. Biological detection methods // *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection / Ed. Botana L.M.* Marcel Dekker, NY, 2000. P. 187–202.
  68. *Karlsson K., Spoof L., Meriluoto J.* Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue-matrix effects and method validation // *Environ. Toxicol.* 2005. V. 20, N 3. P. 381–389.
  69. *Bogialli S., Bruno M., Curini R., Di Corcia A., et al.* Simple assay for analyzing five microcystins and nodularin in fish muscle tissue: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53, N 17. P. 6586–6592.
  70. *Ruiz M.J., Camean A.M., Moreno I.M., Pico Y.* Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1073, N 1-2. P. 257–262.
  71. *Meisen I., Distler U., Muthing J., et al.* Direct coupling of high-performance thin-layer chromatography with UV spectroscopy and IR-MALDI orthogonal TOF MS for the analysis of cyanobacterial toxins // *Anal. Chem.* 2009. V. 81, N 10. P. 3858–3866.
  72. *Escoubas P., Quinton L., Nicholson G.M.* Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. P. 279–295.
  73. *Da Silva P.H., Da Silveira R.B., Appel M.H., et al.* Brown spiders and loxoscelism // *Toxicon.* 2004. V. 44, N 7. P. 693–709.
  74. *McCrone J.D.* Comparative lethality of several *Latrodectus* venoms // *Toxicon.* 1964. N 2. P. 201–203.
  75. *Rash L.D., Hodgson W.C.* Pharmacology and biochemistry of spider venoms // *Toxicon.* 2002. V. 40. P. 225–254.

76. *Daly F.F.S., Hill R.E., Bogdan G.M., Dart R.C.* Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. hesperus* venom by redback spider (*L. hasseltii*) antivenom // *Clin. Toxicol.* 2001. V. 39, N 2. P. 119–123.
77. *Futrell J.M.* Loxoscelism // *Am. J. Med. Sci.* V. 304. P. 261–267.
78. *Volkova T.M., Pluzhnikov K.A., Woll P.G., Grishin E.V.* Low molecular weight components from black widow spider venom // *Toxicon.* 1995. V. 33, N 4. P. 483–489.
79. *Favreau Ph., Menin L., Michalet S., et al.* Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen // *Toxicon.* 2006. V. 47. P. 676–687.
80. *Pimenta A.M., Stocklin R., Favreau P., et al.* Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2001. N 15. P. 1562–1572.
81. *Pimenta A.M., De Marco A.F., De Lima M.E., et al.* Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2003. N 17. P. 413–418.
82. *Francesse S., Lambardi D., Mastrobuoni G., et al.* Detection of honeybee venom in envenomed tissues by Direct MALDI MSI // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009. V. 20. P. 112–123.
83. *Escoubas P., Corzo G., Whiteley B.J., et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2002. V. 16. P. 403–413.
84. *Richardson M., Pimenta A.M., Bemquerer M.P., et al.* Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria* // *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology.* 2006. V. 142. P. 173–187.
85. *Liang S., Li X., Cao M., et al.* Identification of venom proteins of spider *S. huwena* on two-dimensional electrophoresis gel by N-terminal microsequencing and mass spectrometric peptide mapping // *J. Protein Chemistry.* 2000. V. 19. P. 225–229.
86. *Escoubas P., Celerier M.L., Nakajima T.* High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 1997. N 11. P. 1891–1899.
87. *Escoubas P., Sollod B., King G.F.* Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach // *Toxicon.* 2006. V. 47. P. 650–663.
88. *Corzo G., Escoubas P., Stankiewicz M., et al.* Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins II, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae) // *European Journal of Biochemistry/FEBS.* 2000. V. 267. P. 5783–5795.
89. *Kozlov S., Malyavka A., McCutchen B., et al.* A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom // *Proteins.* 2005. V. 59. P. 131–140.
90. *Budnik B.A., Olsen J.V., Egorov T.A., et al.* De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis* // *J. Mass Spectrom.* 2004. V. 39. P. 193–201.
91. *Саловарова В.П., Приставка А.А., Берсенева О.А.* Введение в биохимическую экологию. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2007. 159 с.
92. *Shuting L.I., Jingqiang W., Xumin Z., et al.* Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys* // *Biochem. J.* 2004. V. 384. P. 119–127.
93. *Judge R.K., Henry P.J., Mirtschin P., et al.* Toxins not neutralized by brown snake antivenom // *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2006. V. 213. P. 117–125.
94. *Fryl B.G., Wuster W., Ramjan S.F.R., et al.* Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. P. 2047–2062.
95. *Lomonte B., Escolano J., Fernandez J., et al.* Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii* // *J. Proteome Res.* 2008. N 7. P. 2445–2457.
96. *Tashima A.K., Sanz L., Camargo A.C.M., et al.* Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers // *J. Proteomics.* 2008. V. 71. P. 473–485.
97. *Serrano S.M.T., Fox J.W.* Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures // *Proteomics.* 2008. N 8. P. 909–920.
98. *Guércio R.A.P., Shevchenko A., Shevchenko A., et al.* Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox* // *Proteome Science.* 2006. N 4. P. 11.
99. *Куценко С.А.* Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2002. 570 с.

**Институт аналитического приборостроения РАН,  
Санкт-Петербург**

Контакты: Подольская Екатерина Петровна,  
Kpodolskaya@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 27.09.2010.

## **PEPTIDE TOXINS IDENTIFICATION BY MALDI-MS METHOD (REVIEW)**

**Ya. A. Dubrovsky, E. P. Podolskaya**

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

In this review the MALDI mass-spectrometry opportunities in respect to the analysis of peptide nature toxins produced by bacteria, some kinds of plants, sea organisms, insects, arthropoda and snakes are considered. The advantages and disadvantages of the present method are showed.

*Keywords:* peptide toxins, venomics, mass-spectrometry, MALDI-TOF