

УДК 543.544.414

© О. А. Кельцьева, В. Д. Гладилович, Е. П. Подольская

## МЕТАЛЛ-АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ОСНОВЫ И ПРИМЕНЕНИЕ

В обзоре рассмотрен принцип действия и основные возможности применения металл-аффинной хроматографии, которые включают в себя очистку гистидин-меченных белков, металл-связывающих белков, нуклеотидов и антител. Описаны преимущества и недостатки как самого метода, так и различных сорбентов.

*Кл. сл.:* металл-аффинная хроматография, металл-аффинные сорбенты, очистка белков, фосфопротеомика

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активное развитие получают высокоспецифичные и высокоселективные методы выделения органических и биоорганических соединений из биологических образцов и объектов окружающей среды. В первую очередь к таким методам можно отнести металл-аффинную хроматографию (МАХ, ИМАС — immobilized-metal affinity chromatography). В научной литературе на русском языке используют также названия: металлхелатная, или лигандобменная хроматография. В основе этого хроматографического метода лежит различное сродство органических соединений к ионам некоторых металлов. Ионы, в большинстве случаев это — ионы металлов, хелатируют полидентантными лигандами, иммобилизованными на вспомогательной подложке (силикагель, агароза, сефароза, сшитый сополимер полистирола и дивинилбензола).

Концепция металл-аффинной хроматографии была впервые сформулирована и представлена Поратом [1]. Она была основана на известном сродстве ионов переходных металлов, таких как  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$  к гистидину и цистеину в водных растворах. Впоследствии появилась идея использовать прочно зафиксированные ионы металлов для фракционирования белков. Реакция образования комплекса иона металла и некоторых функциональных групп (например, фосфатных групп) органических молекул, как правило, обратима. Следовательно, иммобилизованные ионы металлов можно использовать как сорбент. Взаимодействие между сорбентом и аналитом рН-зависимое, поэтому связанные вещества можно элюировать, изменяя рН, уменьшая ионную силу буфера или используя другие хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или имидазол.

Одним из самых известных приложений МАХ является очистка гистидин-меченных белков(His).

В последнее время наблюдается увеличение применения МАХ при проведении предварительной обработки образца для обнаружения наркотиков, таких как тетрациклины, фторхинолоны, макролиды,  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды [2]; при пробоподготовке для выявления биомаркеров в сыворотке крови, моче и тканях для диагностики заболеваний с последующим применением методов масс-спектрометрии [3, 4].

### ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ МЕТОДА МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ионы металлов чаще всего классифицируются согласно теории ЖКМО (Жестких кислот мягких оснований) Пирсона [5]. Жесткие кислоты (например, ионы  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ) легче всего координируют кислород и фтор функциональных групп, мягкие кислоты (ионы  $Cu^+$ ,  $Hg^+$ ,  $Ag^+$ ) — серу. Промежуточные по жесткости ( $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) — азот, кислород и серу. Селективность жестких и промежуточных ионов различна: при оптимальном для их связывания рН (кислом и нейтральном соответственно) они координируются с разными функциональными группами. Такие группы могут содержаться в белках и нуклеиновых кислотах. "Мишенями" жестких кислот могут являться аспарагиновая и глутаминовая кислоты, тирозин или фосфорилированные серин, треонин или тирозин.

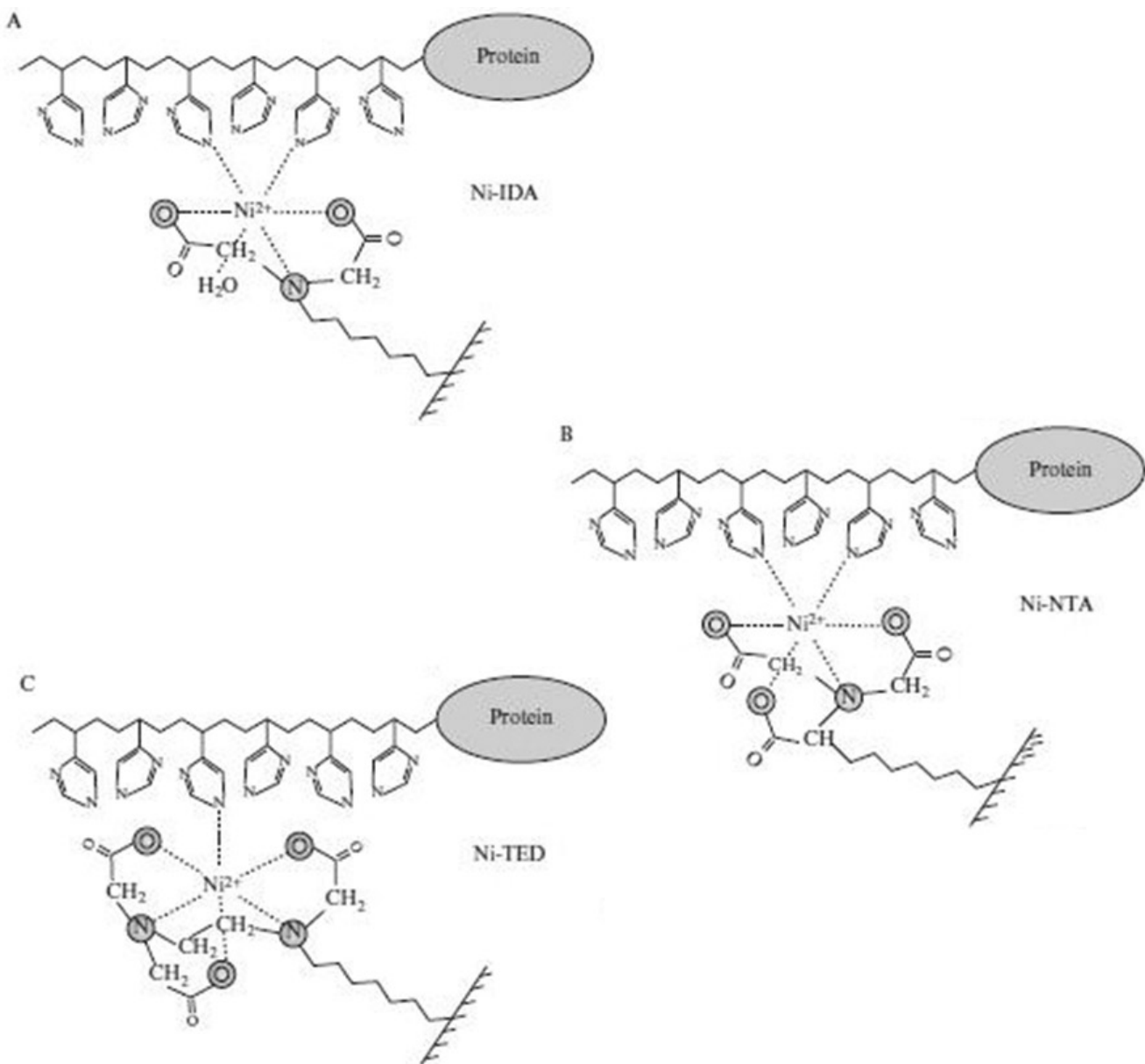
Адсорбция белков и пептидов методом МАХ основана на обратимом взаимодействии между аминокислотами, выступающими в качестве доноров электронов, и ионами металла, хелатированными лигандами, которые иммобилизованы на поверхности твердого носителя [5]. Несмотря на значительное количество аминокислот, которые могут участвовать в процессе связывания (в том числе глицин, аргинин, лизин, тирозин, гистидин,

цистеин, аспарагиновая кислота), фактически сорбция белка определяется наличием гистидина.

Наиболее часто используемыми при приготовлении металл-аффинных сорбентов являются ионы переходных металлов. Электрон-доноры (N, S и O) в хелатирующих соединениях могут координировать ионы металлов с получением металл-хелатов в диапазоне от бидентатных до пентадентатных соединений в зависимости от числа занятых координационных связей.

Были разработаны различные подложки для МАХ. Традиционно в качестве подложки использовался мягкий гель, такой как агароза. Полисахариды, например целлюлоза, обладают преимуществом из-за хорошей биологической совместимости. Но они демонстрируют низкую механическую прочность и, следовательно, не могут быть использованы в системах высокого давления. Напротив, неорганическая матрица, такая как диоксид кремния, обладает превосходными механическими свойствами, но имеет недостаток в виде необратимой неспецифической сорбции белков [6].

Основной механизм взаимодействия His-меченных белков с иммобилизованным ионом металла представлен на рисунке.



Модель взаимодействия между остатками гистидина и ионами металлов в три-(IDA), тетра-(NTA) и пентадентатных IMAC лигандах (TED) [5]

Такой лиганд, как нитрилотриуксусная кислота (nitrilotriacetic acid, NTA), удерживает ион  $Ni^{2+}$  четырьмя валентностями (рис., В), и две валентности иона металла доступны для взаимодействия с кольцами имидазола гистидиновых остатков. Это соотношение оказалось наиболее эффективным для очистки гистидин-меченных белков. Другой тетраденатный лиганд — карбоксиметиласпарат [7], имеющийся в продаже как кобальт-содержащая смола Talon [<http://www.clontech.com/>]. В отличие от тетраденатных лигандов иминодиуксусная кислота (iminodiacetic acid, IDA) координирует двухвалентные ионы тремя валентностями (рис., А), оставляя третью валентность иона металла свободной для взаимодействия с кольцом имидазола, хотя неясно, будет ли имидазол иметь пространственную возможность участвовать во взаимодействии.

По всей видимости, координационное число играет важную роль в отношении качества очищения белковых фракций. Степень очистки белка с применением IDA и NTA-матриц, как правило, дает различный результат, поскольку часто наблюдается сильное выщелачивание ионов металлов из IDA-лигандов по сравнению с NTA [5]. Самое низкое выщелачивание металлов показано при использовании пентаденатного лиганда, который координирует ионы особенно сильно (рис., С).

Как было указано выше, выбор металла для МАХ зависит от структуры анализируемых соединений. Наряду с тем что трехвалентные катионы, такие как  $Al^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$  и  $Fe^{3+}$  [8, 9], или четырехвалентный  $Zr^{4+}$  предпочтительны для сорбции фосфорсодержащих белков и пептидов, двухвалентные ионы  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  используют для очистки гистидин-меченных белков. Комбинация тетраденатного лиганда, который обеспечивает сильное связывание, и иона металла, который оставляет два координационных сайта свободными для взаимодействия с биополимерами ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), получила наиболее широкое признание и приводит к высокой степени извлечения и чистоте выделенного белка.

Металл-аффинные сорбенты могут быть как на основе хелатированных лигандами ионов металлов, так и нанесены на функциональные поверхности, например чипы, в методе SELDI (активированная поверхность лазерная десорбция / ионизация). Методы на основе чипов (например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR)) позволяют иммобилизовать His-меченные белки (белки, меченные гистидиновым остатком-тэгом) для количественных и кинетических исследований. Кроме того, МАХ была использована на этапе ингибитора истощения до ПЦР-амплификации нуклеиновых кислот из сложных образцов, таких как

кровь, в технологии, названной Chelex [1]. Были предложены и методы МАХ для профилирования протеома на основе чипов [10], и эти методы используют в качестве инструмента в клинической практике обследования на наличие фосфатных групп и гистидин-содержащих белков и пептидов (SELDI).

Наиболее важные из многочисленных приложений металл-аффинной хроматографии будут рассмотрены далее.

### ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Изначально разработанная для очистки нативных белков [1] МАХ оказалась технологией с очень широким спектром применения, в том числе в случае хроматографического очищения: возможность метода позволяет очищать наиболее распространенные металлопротеины, антитела, фосфорилированные и рекомбинантные His-меченные белки. В попытке использовать специфичность и высокое сродство His-меченных белков к иммобилизованным ионам металлов металл-аффинные лиганды были применены для изучения белок-белковых взаимодействий, где белки должны быть стабильно иммобилизованы на поверхности. В качестве примера приведем ниже два приложения этого подхода: ELISA (иммуноферментный анализ) — в качестве диагностического инструмента, и технологии на основе чипов для функциональных исследований.

Одной из наиболее важных областей применения МАХ является очистка рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина. Даже один шаг очистки в большинстве случаев приводит к той степени чистоты препарата белка, которая достаточна для решения наиболее распространенных задач в биохимии. Структура меченого конца, т. е. его положение, последовательность и длина, может влиять на процесс производства белка на нескольких стадиях: скорость экспрессии, доступность для привязки к металл-аффинному сорбенту, образование трехмерной белковой структуры, формирование белковых кристаллов и в меньшей степени на растворимость и активность. Наиболее распространенная форма His-конца состоит из шести последовательных остатков гистидина ( $H_6$ ), которые связываются с металлами достаточно хорошо, чтобы сместить равновесие ассоциации / диссоциации больше в сторону ассоциации, ведущей к стабильному связыванию в большинстве случаев [11].

Есть несколько преимуществ применения металл-аффинной хроматографии для очистки меченных белков по сравнению с другими видами аффинной хроматографии [12]. Кроме простоты и низкой стоимости использования наиболее поразительной особенностью является надежность МАХ:

- метод работает как в нативных, так и денатурирующих условиях, таких как 8 М мочевины или 6 М гуанидингидрохлорид [13], и позволяет осуществлять последовательный рефолдинг на колонке [14];
- метод работает в окислительно-восстановительных условиях;
- связанные с сорбентом белки способны выдерживать воздействие широкого спектра различных химических веществ;
- относительно высокое сродство и специфичность позволяют обеспечивать высокую эффективность сорбции даже при наличии высоких титров белка;
- процедуры очистки масштабируемы.

Несмотря на такие преимущества, МАХ имеет свои ограничения. Очевидно, что использования хелатообразователей в анализируемом образце следует избегать, что может быть недостатком, поскольку, например, ЭДТА — мощный ингибитор металлопротеаз — может быть применена только в низких концентрациях. Следует также проявлять осторожность при использовании других потенциально хелатных групп, таких как Трис, соли аммония и некоторые аминокислоты.

До недавнего времени использование сильных восстановителей, таких как дитиотреитол (ДТТ), в металл-аффинном анализе считалось проблематичным из-за вымывания никеля из сорбента, и как следствие подозревалось увеличение концентрации никеля в белковых препаратах. Тем не менее было обнаружено, что умеренные концентрации ДТТ полностью совместимы с очисткой на Ni-NTA [5]. Даже если ДТТ может восстановить ионы никеля, это приведет к изменению цвета смолы, а не к вымыванию лигандов, и смолы, обрабатываемые в восстановительных условиях, могут быть регенерированы и повторно использованы. Эти результаты показывают, что, несмотря на изменение цвета вследствие восстановления никеля ДТТ, сорбент по-прежнему функционирует.

Для того чтобы МАХ приводила к высокой степени очистки за один этап, требуется высокая корреляция количества гистидин-меченного белка-рекомбинанта в образце с количеством металл-аффинного сорбента [15]. Стоит отметить, что существуют белки, проявляющие поверхностные свойства, подходящие для взаимодействия с иммобилизованными ионами металлов, которые могут образовывать связи с сорбентом, хотя их

сродство к сорбенту ниже, чем у гистидин-меченных белков. Соответственно избыток сорбента может привести к тому, что препарат будет загрязнен такими белками. Более того, существуют некоторые белки, в которых локальная плотность хелатирующих аминокислот, таких как гистидин, настолько велика, что они практически неизбежно будут связываться с ионами иммобилизованных металлов. Для избавления от соэлюирующихся белков или предотвращения их адсорбции существуют несколько процедур:

- проводить дополнительные этапы очистки перед МАХ;
- подбирать соотношение гистидин-меченного белка и сорбента;
- использовать альтернативную подложку;
- дополнительно очищать целевой белок после МАХ методом обращенно-фазовой хроматографии.

Дополнительная очистка перед стадией МАХ возможна методами ион-обменной (ИОХ) или эксклюзионной хроматографии (ЭХ). ИОХ имеет лучшие возможности разделения, но ЭХ не только способна разделять молекулы по их размерам и помогает отделить совокупность молекул с высокой молекулярной массой, но и может быть использована для обессоливания препарата [16]. Хотя ЭХ-МАХ (в отличие от ИОХ-МАХ) может быть представлена как стандартизованная процедура без учета биохимических свойств белка, таких как диапазон разделения и *pI*, для ее проведения необходим набор различных ЭХ-колонок. Кроме того, чтобы использовать все возможности этих технологий, требуется дорогостоящее оборудование, в частности автоматизированная хроматографическая система, что часто существенно снижает скорость проведения большого количества параллельных измерений. Аффинную очистку методом МАХ обычно выполняют в режиме связывание—промывка—элюирование. Это позволяет легко ввести второй сорбент в процедуру двухэтапной очистки, приводящей к получению высокоочищенного белкового препарата [17].

Повысить чистоту белков при проведении МАХ возможно использованием в качестве матрицы для сорбента покрытых декстраном гранул агарозы, которые составляют большинство хроматографических носителей (Sephagoses, Superflow, Agaroses), что предотвращает соэлюцию белков с выраженной аффинностью к перечисленным матрицам [18]. К недостаткам метода можно отнести коммерческую недоступность декстран-покрытых гранул и как следствие необходимость в приготовлении металл-аффинного сорбента в лабораторных условиях. Подложки на основе силикагеля также предотвращают адсорбцию белков с аффинностью к агарозе и, кроме того,

обладают хорошей устойчивостью к давлению, что делает их подходящими для применения в ВЭЖХ, но силикагелевые смолы часто страдают от низкой связывающей способности и ограниченной устойчивости к высоким значениям pH, что критично при проведении МАХ.

Недавно был разработан новый подход, позволяющий избежать использования твердых хроматографических носителей, получивший название "аффинное осаждение", и было показано, что МАХ также может быть проведена этим методом [19]. Хелатирующий лиганд химически связывается с полимером, который после сорбции гистидин-меченного белка агрегирует при изменении внешних условий (pH, температура), после чего вместе с белком может быть осажден центрифугированием. Протокол его использования все еще относительно сложен, но со временем, возможно, данный метод будет широко использован при очищении белков методом МАХ.

#### МЕТАЛЛ-АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ИММУНОХИМИИ

Сорбент Ni(II)-NTA, лиганды которого иммобилизованы на поверхности луночных планшетов, используют для задерживания His-меченных антигенов в их растворимой и структурно не поврежденной форме при серологических исследованиях. Иммобилизация с помощью гистидиновых остатков может быть выгодна и удобна для стандартной процедуры иммуноферментного анализа ELISA. В стандартной методике белки-антигены адсорбируются на пластиковых поверхностях планшета случайно, часть активных сайтов присоединения антител (эпитопов белка) маскируется. ELISA с применением металл-аффинного подхода позволяет отбирать конформационно-зависимые моноклональные антитела [20] и проводить иммуносорбцию с повышенной чувствительностью [21].

Иммобилизация His-меченных белков на поверхности чипа для исследования взаимодействия с другими молекулами, например, в методе SPR является широко используемым методом характеристики белка или межбелковых взаимодействий. Фактор устойчивого закрепления и стабильности на поверхности чипа для плазмонного резонанса может быть важен для снижения утечки молекул белка с поверхности [11, 22]. Существенные улучшения в стабильности функциональной иммобилизации His-меченных белков на стеклянных поверхностях даже при низкой концентрации были достигнуты в соответствии с концепцией мультивалентных хелатирующих головок, где одна молекула лиганда несет три фрагмента NTA (tris-NTA) [23, 24]. Эта разработка позволяет использовать His-меченные белки без маркировки биотином после очистки.

Металл-аффинные лиганды также успешно используют в качестве детектирующего соединения в методе иммуноблоттинга, заменяя дорогостоящие антитела. His-меченные белки, перемещенные в нитроцеллюлозную мембрану, могут быть обнаружены с помощью Ni-NTA, сопряженной со щелочной фосфатазой или с особыми указывающими ферментами [25] по хромогенной или хемилюминесцентной реакции или с квантовыми точками для флуоресцентной детекции [26]. Такой подход представляет собой быструю и экономически выгодную альтернативу реакции обнаружения на основе антител в случаях, когда высокая специфичность антител не требуется. Специфичность обнаружения при использовании сопряженной NTA была увеличена на порядок при использовании tris-NTA [27, 28].

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Как было описано выше, МАХ первоначально была разработана как метод разделения металл- и гистидин-содержащих белков [1], но сегодня эти возможности используют и в других протеомных исследованиях, в которых снижение сложности (компонентности) системы является необходимым условием при анализе и идентификации малораспространенных белков. МАХ прочно заняла свое место среди других методов предварительного разделения сложных смесей, таких как жидкостная обращенно-фазовая, ионообменная, аффинная хроматографии и гель-электрофорез [29, 30]. В зависимости от целей и задач в процессе пробоподготовки МАХ комбинируют с двухмерным гель-электрофорезом при анализе белков или обращенно-фазовой хроматографией для дополнительного разделения пептидов.

Таким образом, в протеомике металл-аффинную хроматографию используют в исследованиях, где фракции клеточного белкового пула обогащают для дальнейшего анализа. Так, например, белки со сродством к металлам могут быть обогащены либо с учетом их способности связываться с определенным иммобилизованным ионом металла (например,  $Me^{2+}$ -NTA), либо путем связывания иона металла с белком ( $Me^{2+}$ -белок) на незаряженном металл-аффинном лиганде (например, NTA) [31, 32]. В качестве ионов, пригодных для металл-аффинного анализа металло-протеома, чаще всего используют  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ .

Также этот метод может быть использован для связывания и разделения моно- и динуклеотидов за счет сложного явления, объясняемого дифференциальным взаимодействием потенциальных сайтов связывания — кислорода в фосфатной

группе, азота и кислорода на азотистых основаниях, гидроксильных групп в рибозе с иммобилизованным металлом [33].

Совершенно иным представляется применение МАХ для очищения антител, основанное на сорбции последних к ионам металлов. Молекулярные основы такого взаимодействия металл-содержащих сайтов на тяжелой цепи были рассмотрены авторами [34]. Об адсорбции иммуноглобулинов из различных образцов на металл-аффинных сорбентах сообщалось многими авторами (humanized murine IgG [34], человеческий IgG [35], козий IgG [36]). Очистка антител успешно осуществляется с помощью различных форматов МАХ, включая гели [34, 37], полиметакрилат [38] и мембранные полые волокна ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) [39]. Мягкий способ элюирования белка солями, низкая стоимость и высокая надежность металл-аффинных сорбентов определенно способствовали увеличению популярности этого метода по сравнению с традиционными подходами [39].

Однако на сегодняшний день основным приложением МАХ является фосфопротеомика [31]. Обратимое фосфорилирование белков по остаткам серина, треонина и тирозина имеет важное биологическое значение. Как правило, ферментативное фосфорилирование /дефосфорилирование клеточных белков контролирует ключевые внутриклеточные процессы, связанные с делением, дифференцировкой или гибелью клеток. Направление протеомики, которое занимается анализом таких посттрансляционных модификаций белков, как фосфорилирование, получило название "фосфопротеомика". Активно развиваемая отрасль подобных исследований — изучение пула модифицированных белков при различных клеточных состояниях и в различных субклеточных компартментах позволяет вычлнять ключевое событие в каскаде фосфорилирований /дефосфорилирований.

Металл-аффинная хроматография была предложена как простой, экономичный и универсальный метод выделения различных типов фосфорилированных пептидов [23, 41, 42] и быстро нашла свое применение в исследованиях фосфопротеома [43, 44]. Как было указано выше, самыми распространенными хелатирующими лигандами в металл-аффинных сорбентах являются нитрилотриуксусная (NTA) и иминодиуксусная (IDA) кислоты. Эти кислоты хелатируют ионы  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  и др. [41, 45–47], при этом свободные орбитали атомов металлов способны участвовать в координационном взаимодействии с отрицательно заряженными пептидами, в частности с фосфорилированными пептидами. Было отмечено, что сорбент на основе  $\text{Fe}^{3+}$ -NTA показывает более высокую селективность к фосфопептидам по сравнению с  $\text{Fe}^{3+}$ -IDA [42]. Однако серьезным недостат-

ком метода МАХ является неспецифичное связывание с сорбентом таких кислых аминокислот, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, гистидин и цистеин, и других отрицательно заряженных соединений. На протяжении последних десятилетий предпринимаются попытки уменьшить неспецифическую сорбцию различными способами [49]. Так, можно варьировать pH раствора, в котором происходит связывание (связывающий буфер) [41, 45], или pH промывочного раствора [46, 47]. Несмотря на успешное применение этого подхода на стандартных белках, при переходе на уровень протеома селективность метода снижается до 60–70 %, что приводит к недостаточной эффективной идентификации фосфорилированных белков. Альтернативно возможно использование реакции этерификации для получения метиловых эфиров пептидов, что позволяет определять большее число сайтов фосфорилирования в сложных биологических смесях [46, 48–50]. Однако введение дополнительной реакции может привести к большим потерям в образце [51, 52].

Недавно были разработаны методики предварительной очистки образцов катион- или анион-обменной хроматографией [53, 54]. Такой подход позволил увеличить селективность МАХ до 75 %. Однако к недостаткам такого метода можно отнести возможность слишком сильного удерживания непольностью ферментативно гидролизованных пептидов, а также значительное удерживание других модифицированных пептидов, например N-ацетилированных пептидов и гликопептидов. Кроме того, было показано, что нормальнофазовая хроматография в качестве предварительного этапа пробоподготовки может быть эффективна при фосфопротеомной идентификации [55]. Поскольку фосфатная группа является сильно гидрофильной, фосфорилированные пептиды слабо удерживаются на нормальной фазе, что приводит после металл-аффинного обогащения к 99 % селективности.

На сегодняшний день наиболее успешной оказалась разработка так называемого метода металлооксидной аффинной хроматографии (МОАХ) на основе оксида титана  $\text{TiO}_2$  [56]. При использовании предколонки с  $\text{TiO}_2$ , соединенной с обращеннофазовой капиллярной колонкой, авторами [56] была показана возможность извлечения фосфорилированных пептидов казеина из гидролизата суммарного белка молока коровы. Однако селективность этого метода была снижена из-за неспецифического связывания кислых нефосфорилированных пептидов. В работе [57] авторы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) для удаления неспецифично связавшихся пептидов, что повысило селективность и чувствительность метода. В работе [58] была впервые показана возможность приме-

нения оксида циркония при МОАХ, причем  $ZrO_2$  имеет большую селективность к монофосфорилированным пептидам, тогда как  $TiO_2$  — к мультифосфорилированным. Был сделан вывод, что комбинация двух сорбентов имеет потенциал для извлекающего профилирования фосфопротеома [59]. При добавлении в связывающий и промыточный буферы молочной кислоты в элюате после МОАХ на  $TiO_2$  содержится, как правило, более 90 % фосфорилированных пептидов; для  $ZrO_2$  это значение ниже [60].

Сорбенты на основе оксидов металлов могут быть использованы в различном аппаратурном исполнении. Наиболее распространен "офф-лайн" вариант, обеспечивающий гибкость в подборе растворителей и масштабируемости эксперимента. Частицы оксидов металлов могут быть упакованы в носики для автоматических пипеток (сорбция достигается путем многократного пропускания образца через сорбент) [61] либо помещены в спиновые колонки (образец пропускают через сорбент с помощью центрифуги). Альтернативно возможен batch-вариант, в котором сорбент помещен в микропробирку, что позволяет веществу дольше взаимодействовать с ним. В "он-лайн"-режиме оксиды металлов помещают в предколоники для ВЭЖХ-систем [62].

Недавно появились разработки наночастиц на основе оксидов металлов, в которых на наноразмерные магнитные шарики или на полимерную подложку наносят тонкий слой оксида [63, 64]. Такая структура обладает большой удельной поверхностью и повышенной сорбционной емкостью по сравнению с традиционными металл-аффинными сорбентами, однако есть сомнения по поводу воспроизводимости таких структур. Также имеются сведения о создании модифицированных сорбентов мишеней для MALDI-масс-спектрометрии [65, 66].

Сравнение методов МАХ и МОАХ вызывает все больший интерес. Так, было показано [60], что оксид титана более устойчив к влиянию солей, детергентов и малых молекул, чем классические металл-аффинные сорбенты. Добавление детергента в связывающий буфер может увеличить производительность МАХ из-за уменьшения адгезии на поверхности микропробирок и, более того, благоприятствовать обогащению мультифосфорилированных пептидов по сравнению с  $TiO_2$ . Авторы [67] показали новый подход — последовательное элюирование с сорбента для разделения моно- и мультифосфорилированных пептидов при варьировании элюентов. По сравнению с проточным вариантом МОАХ batch-анализ (в пробирке) продемонстрировал прекрасную степень извлечения и моно-, и мультифосфорилированных пептидов. Таким образом, экспериментальные условия силь-

но влияют на производительность и селективность МАХ. Масштабное сравнение МАХ и МОАХ  $TiO_2$  при профилировании фосфопротеома клеток *Drosophila melanogaster* Kc167 было проведено авторами [68]. МАХ с предварительным метилированием пептидной смеси продемонстрировала 80 % селективность, так же как и МОАХ. Особенно важно небольшое перекрытие результатов идентификации фосфорилированных белков (35 %), что говорит о возможности комбинирования двух методов для более полного профилирования. Авторы работы [69] использовали последовательное элюирование 5 % водным аммиаком, 5 % пиперидином и 5 % пирролидином, что существенно увеличило число идентифицированных фосфорилированных белков в клеточной линии HeLa.

К настоящему времени известно об использовании в качестве металл-аффинных сорбентов оксидов многих металлов. Самым распространенным является  $TiO_2$ , которому посвящено большое число работ по оптимизации условий проведения анализа [70–73], также много внимания уделено  $ZrO_2$  [74, 75]. Были предприняты успешные попытки использовать в качестве сорбента для обогащения фосфорилированных пептидов гидроксид алюминия  $Al(OH)_3$  [76], оксид галлия  $Ga_2O_3$  [77], оксид ниобия  $Nb_2O_5$  [78], оксид олова  $SnO_2$ , который показал более низкий уровень неспецифического связывания по сравнению с  $TiO_2$  [79], оксид тантала  $Ta_2O_5$  [80]. Также перспективным следует признать использование оксида железа как в варианте магнитных шариков  $Fe_3O_4$  [81], так и микроразмерного  $Fe_2O_3$  [82]. Метод МОАХ имеет большое значение в фосфопротеомных исследованиях для выделения фосфорсодержащих пептидов без дополнительных процедур пробоподготовки, таких как этерификация и ионообменная хроматография [83].

Широкое развитие хромато-масс-спектрометрических методов в фосфопротеомике привело к возможности изучения и решения таких фундаментальных задач в биологии, как передача сигналов в клетках и их механизм регулирования, а также исследование различных заболеваний, при которых меняется качественный и количественный состав фосфорилированных белков, и других биохимических задач. Обратимый процесс фосфорилирования / дефосфорилирования белков чрезвычайно важен для проведения межклеточных сигналов. Нарушение сигнальных систем приводит к таким тяжелым заболеваниям, как диабет [84, 85], рак [86], болезнь Альцгеймера [86, 87], сердечная недостаточность [87], и многим другим.

Поскольку клеточные сигнальные системы, в которых большую роль играют фосфобелки, существуют практически во всех живых системах, включая высокоразвитые организмы, фосфопро-

омные исследования таких систем имеют огромное значение. Немаловажное место среди методов пробоподготовки занимает металл-аффинная хроматография. Например, применение МОАХ  $\text{TiO}_2$  для обогащения фосфолипидов позволило установить типы киназ, задействованных в развитии эмбрионов рыбы данио-рерио [88].

Фосфорилирование белков в тканях мышей (мозг, сердце, печень и пр.) было изучено с применением металл-аффинного сорбента, содержащего железо (идентифицировано 12 000 белков и 36 000 сайтов фосфорилирования), и позволило, во-первых, установить специфичность фосфорилирования в различных тканях, во-вторых, определить активность нескольких киназ, что позволило авторам в конечном итоге создать атлас фосфо-белков мыши [89].

Важной областью биомедицины, в которой задействована фосфопротеомика, является изучение стволовых клеток, а именно понимание сигнальных механизмов в них. В работе [90] рассмотрены протеомный и фосфопротеомный (с использованием комбинации ион-обменной хроматографии и МОАХ  $\text{TiO}_2$ ) ответ стволовых клеток человеческих эмбрионов при дифференцировании. А в работе [91] приведены данные о 10 844 сайтах фосфорилирования белков стволовых клеток. Эти данные помогают установить природу уникальности стволовых клеток.

В последние годы активно развивается направление, связанное с анализом посттрансляционных модификаций белков различными токсикантами и ксенобиотиками, которое получило собственное название — "аддуктомика", в рамках которого методы МАХ и МОАХ также нашли свое применение.

Особое внимание уделяется аддуктам бутирилхолинэстеразы (БХЭ) с фосфорсодержащими соединениями, в том числе и с ОВ, такими как зарин и зоман [92, 93]. Было показано, что специфичное выделение аддукта БХЭ с остатком 3-орто-крезил фосфата из образца плазмы или сыворотки крови на  $\text{TiO}_2$  возможно даже в случае ингибирования 0.05 % БХЭ [92].

Кроме БХЭ мишенью присоединения фосфорорганических соединений является сывороточный альбумин. Причем зачастую можно обнаружить несколько сайтов модификации альбумина фосфорорганическими соединениями. Возможность обогащения образцов аддуктами пептидов сывороточного альбумина методом МАХ на сорбенте с иммобилизованными ионами железа (III) была показана на примере параоксона [93]. Авторы работы [94] успешно идентифицировали пептиды сывороточного альбумина человека, модифицированные заринном и зоманом, после их выделения из образца с помощью  $\text{TiO}_2$ .

Кроме того, авторами [95] была показана принципиальная возможность применения металл-аффинной хроматографии для специфичной сорбции алкилированных аддуктов сернистого иприта с глобином на сорбенте, содержащем ионы  $\text{Cu}^{2+}$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, металл-аффинная хроматография является специфичным, надежным и воспроизводимым методом. Несмотря на относительно недолгую историю существования, метод получил быстрое развитие во многих направлениях биоорганического анализа, и последние годы круг задач, решаемых с помощью МАХ и МОАХ, стремительно расширяется. В ближайших перспективах можно ожидать, что метод будет широко использоваться в ретроспективном токсикологическом анализе, для разработки новых методов диагностики различных заболеваний, производстве новых лекарственных препаратов. В то же время появление современных высокотехнологичных материалов и нанотехнологий позволяет надеяться, что будут разрабатываться и производиться новые эффективные металл-аффинные сорбенты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.* Metal-chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation // *Nature*. 1975. V. 258. P. 598–599.
2. *Takeda N., Matsuoka T., Gotoh M.* Potentiality of IM-AC as sample pretreatment tool in food analysis for veterinary drugs // *Chromatographia*. 2010. V. 72. P. 127–131.
3. *Felix K., Fakelman F., Hartmann D. et al.* Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer cachexia // *Life Sci*. 2001. V. 88. P. 218–225.
4. *Wu C., Wang Z.F., Liu L.J. et al.* Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: new diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma // *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2009. V. 24. P. 55–62.
5. *Block H., Maertens B., Priestersbach A. et al.* Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review // *Methods Enzymol*. 2009. V. 463. P. 439–473.
6. *Cheung R.Ch.F., Wong J.H., Ng T.B.* Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2012. V. 96, N 6. P. 1411–1420.
7. *Chaga G., Hopp J., Nelson P.* Immobilized metal ion affinity chromatography on  $\text{Co}^{2+}$ -carboxymethyl-aspartate-agarose. Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle // *Biotechnol. Appl. Biochem*. 1999. V. 29. P. 19–24.
8. *Andersson L., Porath J.* Isolation of phosphoproteins by immobilized metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ) affinity-chromatography // *Anal. Biochem*. 1986. V. 154. P. 250–254.



9. Muszynska G., Andersson L., Porath J. Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate // *Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 6850–6853.
10. Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F.E. Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine-containing peptide fragments // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 984. P. 97–103.
11. Knecht S., Ricklin D., Eberle A.N., Ernst B. Oligohistags: Mechanisms of binding to Ni<sup>2+</sup>-NTA surfaces // *J. Mol. Recognit.* 2009. V. 22. P. 270–279.
12. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques*. 1991. V. 10. P. 506–513.
13. Hochuli E., Bannwarth W., Dobeli H., Gentz R., Studer D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent // *Biotechnology*. 1988. V. 6. P. 1321–1325.
14. Jungbauer A., Kaar W., Schlegl R. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004. V. 15. P. 487–494.
15. Bornhorst J.A., Falke J.J. Purification of protein using polyhistidine affinity tags // *Methods Enzymol.* 2000. V. 326. P. 245–254.
16. Grashund S., Nordlund P., Weigelt J. et al. Protein production and purification // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. P. 135–146.
17. Cass B., Pham O.L., Kamen A., Durocher Y. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 40. P. 77–85.
18. Derewenda Z.S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization // *Methods*. 2004. V. 34. P. 354–363.
19. Matiasson B., Kumar A., Ivanov A.E., Galaev I.Y. Metal-chelate affinity precipitation of proteins using responsive polymers // *Nat. Protocols*. 2007. V. 2. P. 213–220.
20. Padan E., Venturi M., Michel H., Hunte C. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against native epitopes of NhaH, the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *E. coli* // *FEBS Lett.* 1998. V. 441. P. 53–58.
21. Mateo C., Fernandez-Lorente G., Pessela B.C.C. et al. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 915. P. 97–106.
22. Nieba L., Nieba-Axamann S.E., Persson A. et al. Biacore analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip // *Anal. Biochem.* 1997. V. 252. P. 217–228.
23. Lata S., Piehler J. Stable and functional immobilization of histidine-tagged proteins via multivalent chelator headgroups on a molecular poly(ethylene glycol) brush // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 1096–1105.
24. Zhaohua H., Park J.I., Watson D.S. et al. Facile synthesis of multivalent nitrilotriacetic acid (NTA) and NTA conjugates for analytical and drug delivery applications // *Bioconjug. Chem.* 2006. V. 17. P. 1592–1600.
25. Jin S., Issel C.J., Montelaro R.C. Serological method using recombinant S2 protein to differentiate equine infectious anemia virus (EIAV)-infected and EIAV-vaccinated horses // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. V. 11. P. 1120–1129.
26. Kim M.J., Park H.-Y., Kim J. et al. Western blot analysis using metal-nitrilotriacetate conjugated CdSe/ZnS quantum dots // *Anal. Biochem.* 2008. V. 379. P. 124–126.
27. Lata S., Gavutis M., Tampe R., Piehler J. Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 2365–2372.
28. Reichel A., Schaible D., Al Furoukh N., Cohen M., Schreiber G., Piehler J. Noncovalent, site-specific biotinylation of histidine-tagged proteins // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 8590–8600.
29. Lv G.S., Hua G.C., Fu X.Y. Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli* // *J. Dairy Sci.* 2003. V. 86. P. 1927–1931.
30. Stasyk T., Huber L.A. Zooming in: Fractionation strategies in proteomics // *Proteomics*. 2004. V. 4. P. 3704–3716.
31. Sun X., Chiu J.-F., He Q.-Y. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics // *Expert Rev. Proteomics*. 2005. V. 2. P. 649–657.
32. Shi W., Chance M.R. Metallomics and metalloproteomics // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. P. 3040–3048.
33. Loo J.A. The tools of proteomics // *Adv. Protein Chem.* 2003. V. 65. P. 353–369.
34. Hale J.E., Beidler D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography // *Anal. Biochem.* 1994. V. 222. P. 29–33.
35. Porath J., Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions // *Biochemistry*. 1983. V. 29. P. 1621–1630.
36. Hubert P., Porath J. Metal chelate affinity chromatography. II. Group separation of mono- and dinucleotides // *J. Chromatogr.* 1981. V. 206. P. 164–168.
37. Vancan S., Miranda E.A., Bueno, S.M.A. IMAC of human IgG: Studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems // *Process Biochem.* 2002. V. 37. P. 573–579.
38. Boden V., Winzerling J.J., Vijayalakshmi M., Porath J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography // *J. Immunol. Methods*. 1995. V. 181. P. 225–232.
39. Serpa G., Augusto E.F.P., Tamashiro W.M.S.C. et al. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody // *J. Chromatogr. B*. 2005. V. 816. P. 259–268.
40. Meszarosova K., Tishchenko G., Bouchal K., Bleha M. Immobilized-metal affinity sorbents based on hydrophilic methacrylate polymers and their interaction with immunoglobulins // *React. Funct. Polym.* 2003. V. 56. P. 27–35.
41. Posewitz M.C., Tempst P. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides // *Anal. Chem.* 1999. V. 71, N 14. P. 2883–2892.
42. Neville D.C.A., Rozanas C.R., Price E.M. et al. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using

- a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry // *Protein Sci.* 1997. V. 6, N 11. P. 2436–2445.
43. *Gruhler A., Olsen J.V., Mohammed S. et al.* Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4, N 3. P. 310–327.
  44. *Andersson L., Porath J.* Isolation of phosphoproteins by immobilized metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ) affinity chromatography // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154, N 1 P. 250–254.
  45. *Corthals G.L., Aebersold R., Goodlett D.R., Burlingame A.L.* Identification of phosphorylation sites using microimmobilized metal affinity chromatography // *Methods in Enzymology.* N.Y.: Academic Press, 2005. V. 405. P. 66–81.
  46. *Ndassa Y.M., Orsi C., Marto J.A., Chen S., Ross M.M.* Improved immobilized metal affinity chromatography for large-scale phosphoproteomics // *Applications J. Proteome Res.* 2006. V. 5, N 10. P. 2789–2799.
  47. *Kokubu M., Ishihama Y., Sato T., Nagasu T., Oda Y.* Specificity of immobilized metal affinity-based IM-AC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis // *Anal. Chem.* 2005. V. 77, N 16. P. 5144–5154.
  48. *Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T. et al.* Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae* // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20, N 3. P. 301–305.
  49. *Lee J., Xu Y., Chen Y. et al.* Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS // *Mol. Cell. Proteomics.* 2007. V. 6, N 4. P. 669–676.
  50. *Kim J.E., Tannenbaum S.R., White F.M.* Global Phosphoproteome of HT-29 human colon adenocarcinoma cells // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4, N 4. P. 1339–1346.
  51. *Stewart I. I., Figeys T. T. D.*  $^{18}\text{O}$  Labeling: a tool for proteomics // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. V. 15, № 24. P. 2456–2465.
  52. *Speicher K.D., Kolbas O., Harper S., Speicher D.W.* Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies // *J. Biomol. Tech.* 2000. V. 11, N 2. P. 74–86.
  53. *Villen J., Beausoleil S.A., Gerber S.A., Gygi S.P.* Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. V. 104, N 5. P. 1488–1493.
  54. *Tsai C.F., Wang Y.T., Chen Y.R. et al.* Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 4058–4069.
  55. *McNulty D.E., Annan R.S.* Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection // *Mol. Cell. Proteomics.* 2008. V. 7, N 5. P. 971–980.
  56. *Pinkse M.W.H., Uitto P.M., Hilhorst M.J., Ooms B., Heck A.J.R.* Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns // *Anal. Chem.* 2004. V. 76, N 14. P. 3935–3943.
  57. *Larsen M.R., Thingholm T.E., Jensen O.N., Roepstorff P., Jorgensen T.J.D.* Highly Selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4, N 7. P. 873–886.
  58. *Kweon H.K., Hakansson K.* Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis // *Anal. Chem.* 2006. V. 78, N 6. P. 1743–1749.
  59. *Sugiyama N., Masuda T., Shinoda K., Nakamura A., Tomita M., Ishihama Y.* Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications // *Mol. Cell. Proteomics.* 2007. V. 6, N 6. P. 1103–1109.
  60. *Sugiyama N., Nakagami H., Mochida K., Daudi A., Tomita M., Shirasu K., Ishihama Y.* Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis* // *Mol. Sys. Biol.* 2008. V. 4. P. 193.
  61. *Miyazaki S., Morisato K., Ishizuka N., Minakuchi H., Shintani Y., Furuno M., Nakanishi K.* Development of a monolithic silica extraction tip for the analysis of proteins // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1043. P. 19–25.
  62. *Pinkse M.W.H., Mohammed S., Gouw L.W. et al.* Highly robust, automated, and sensitive online TiO<sub>2</sub>-based phosphoproteomics applied to study endogenous phosphorylation in *Drosophila melanogaster* // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 687–697.
  63. *Hsieh H.-C., Sheu C., Shi F.-K., Li D.-T.* Development of a titanium dioxide nanoparticle pipette-tip for the selective enrichment of phosphorylated peptides // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1165. P. 128–135.
  64. *Rainer M., Sonderegger H., Bakry R. et al.* Analysis of protein phosphorylation by monolithic extraction columns based on poly(divinylbenzene) containing embedded titanium dioxide and zirconium dioxide nano-powders // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 4593–4602.
  65. *Blacken G.R., Volný M., Diener M. et al.* Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopeptide enrichment // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009. V. 20. P. 915–926.
  66. *Torta F., Fusi M., Casari C.S., Bottani C.E., Bachi A.* Titanium dioxide coated MALDI plate for on target analysis of phosphopeptides // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 1932–1942.
  67. *Thingholm T.E., Jensen O.N., Robinson P.J., Larsen M.R.* SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides // *Mol. Cell. Proteomics.* 2008. V. 7, N 4. P. 661–671.
  68. *Bodenmiller B., Mueller L.N., Mueller M., Doman B., Aebersold R.* Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome // *Nat. Methods.* 2007. V. 4, N 3. P. 231–237.
  69. *Kyono Y., Sugiyama N., Imami K., Tomita M., Ishihama Y.* Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 4585–4593.
  70. *Chen C.-T., Chen Y.-C.* Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO<sub>2</sub> Surface-Assisted Laser

- Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5912–5919.
71. Liang S.-S., Makamba H., Huang S.-Y., Chen S.-H. Nano-titanium dioxide composites for the enrichment of phosphopeptides // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1116. P. 38–45.
  72. Qiao L., Roussel C., Wan J., Yang P., Girault H.H., Liu B. Specific on-plate enrichment of phosphorylated peptides for direct MALDI-TOF MS Analysis // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 4763–4769.
  73. Lin B., Li T., Zhao Y., Huang F.-K., Guo L., Feng Y.-Q. Preparation of a TiO<sub>2</sub> nanoparticle-deposited capillary column by liquid phase deposition and its application in phosphopeptide analysis // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1192. P. 95–102.
  74. Lo C.-Y., Chen W.-Y., Chen C.-T., Chen Y.-C. Rapid enrichment of phosphopeptides from tryptic digests of proteins using iron oxide nanocomposites of magnetic particles coated with zirconia as the concentrating probes // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 887–893.
  75. Li Y., Leng T., Lin H., Deng C., Xu X., Yao N., Yang P., Zhang X. Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ZrO<sub>2</sub> core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 4498–4510.
  76. Röhrig H., Colby T., Schmidt J., Harzen A., Facchinelli F., Bartels D. Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from *Craterostigma plantagineum* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 3548–3560.
  77. Li Y., Lin H., Deng C., Yang P., Zhang X. Highly selective and rapid enrichment of phosphorylated peptides using gallium oxide-coated magnetic microspheres for MALDI-TOF-MS and nano-LC-ESI-MS/MS/MS analysis // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 238–249.
  78. Lin H.-Y., Chen W.-Y., Chen Y.-C. Iron oxide/niobium oxide core-shell magnetic nanoparticle-based phosphopeptide enrichment from biological samples for MALDI MS Analysis // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009. V. 5. P. 215–223.
  79. Sturm M., Leitner A., Småtå J.-H., Lindén M., Lindner W. Tin Dioxide Microspheres as a Promising Material for Phosphopeptide Enrichment Prior to Liquid Chromatography-(Tandem) Mass Spectrometry Analysis // *Adv. Funct. Mater.* 2008. V. 18. P. 2381–2389.
  80. Qi D., Lu J., Deng C., Zhang X. Development of core-shell structure Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> microspheres for selective enrichment of phosphopeptides for mass spectrometry analysis // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 5533–5539.
  81. Lee A., Yang H.-J., Lim E.-S., Kim J., Kim Y. Enrichment of phosphopeptides using bare magnetic particles // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. P. 2561–2564.
  82. Han L., Shan Z., Chen D., Yu X., Yang P., Tu B., Zhao D. Mesoporous Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> microspheres: Rapid and effective enrichment of phosphopeptides for MALDI-TOF MS analysis // *J. Colloid Interface Sci.* 2008. V. 318. P. 315–321.
  83. Leitner A. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2010. V. 29. P. 177–185.
  84. Iwai L.K., Benoist C., Mathis D., White F.M. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling in diabetes prone and resistant mice // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9, N 6. P. 3135–3145.
  85. Fedjaev M., Parmar A., Xu Y. et al. Global analysis of protein phosphorylation networks in insulin signaling by sequential enrichment of phosphoproteins and phosphopeptides // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8, N 5. P. 1461–1471.
  86. Yalak G., Vogel V. Extracellular phosphorylation and phosphorylated proteins: not just curiosities but physiologically important // *Sci. Signal.* 2012. V. 5. P. 255.
  87. Hong-Qi Y., Zhi-Kun S., Sheng-Di C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Aβ and tau // *Transl. Neurodegener.* 2012. V. 1, N 1. P. 21.
  88. Lemeer S., Pinkse M.W.H., Mohammed S. et al. Online Automated in vivo zebrafish phosphoproteomics: from large-scale analysis down to a single embryo // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 1555–1564.
  89. Huttlin E.L., Jedrychowski M.P., Elias J.E. et al. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression // *Cell.* 2010. V. 143. P. 1174–1189.
  90. Rigbolt K.T.G., Prokhorova T.A., Akimov V. et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation // *Sci. Signal.* 2011. V. 4, N 164. P. rs3.
  91. Swaney D.L., Wenger C.D., Thomson J.A., Coon J.J. Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 995–1000.
  92. Liyasova M., Li B., Schopfer L.M. et al. Exposure to tri-o-cresyl phosphate detected in jet airplane passengers // *J. Toxicology and Applied Pharmacology.* 2011. V. 256. P. 337–347.
  93. Гладилевич В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П. и др. Идентификация пептидов сывороточного альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // *Научное приборостроение.* 2010. Т. 20, № 4. С. 84–92.
  94. Мурашко Е.А., Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Идентификация аддуктов фосфорорганических отравляющих веществ с белками крови методами фосфопротеомтики // *Медицинский академический журнал.* 2012. Т. 12, № 3. С. 77–79.
  95. Дубровский Я.А., Гладилевич В.Д., Краснов И.А. и др. Металл-аффинная хроматография для выделения алкилированных аддуктов гемоглобина крысы // *Биоорганическая химия.* 2012. Т. 38, № 1. С. 52–57.
- Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург** (Кельциева О.А., Гладилевич В.Д., Подольская Е.П.)
- Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург** (Гладилевич В.Д., Подольская Е.П.)

Контакты: Кельцьева Ольга Александровна,  
keltcieva@gmail.com

Материал поступил в редакцию 8.01.2013

## IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY (IMAC). PRINCIPLE AND APPLICATIONS

**О. А. Keltsieva<sup>1</sup>, V. D. Gladilovich<sup>1,2</sup>, Е. Р. Podolskaya<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

<sup>2</sup>*Institute of Toxicology Federal Medico-Biological Agency of Russia, Saint-Petersburg*

This article reviews the basic principle of operation and the possibility of using immobilized metal affinity chromatography which include cleaning of histidine-tagged proteins, metal-binding proteins and antibodies. The advantages and disadvantages of this method and various sorbents are described.

*Keywords:* immobilized metal affinity chromatography (IMAC), sorbents, protein purification, phosphoproteomics