



МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОРОТКИХ И СРЕДНИХ ПЕПТИДОВ В СИСТЕМЕ ESI-о-TOF ВМЕСТО МС/МС. 2. ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДАНСИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ С ПРЕИМУЩЕСТВЕННЫМ ОБРАЗОВАНИЕМ *b*-ИОНОВ¹

© 2019 г. И. В. Назимов*.,# , Р. А. Бубляев**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Россия, 117997, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН, Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А

Поступила в редакцию 07.05.2018 г.

После доработки 15.07.2018 г.

Принята к публикации 05.09.2018 г.

Предложена схема анализа масс-спектров фрагментных пептидов, включающая химическую модификацию *N*-концевой аминогруппы пептида 5-(*N,N*-диметиламино)нафтален-1-сульфонилхлоридом с последующей ионизацией дансилированного пептида методом электрораспыления и его фрагментацией в зоне низкого вакуума узла ввода раствора образца в масс-спектрометр (схема ESI-о-TOF). Показано, что получаемые ионы фрагментируются с преимущественным образованием *b*-ионов, содержащих Dns-группу. Указанным способом удается получить высокоинтенсивные *b*-ионы (соотношение интенсивности пик/фон: 10/1–100/1), в том числе особенно ценные для расшифровки структуры *b*₁- и *b*₂-ионы. В сочетании с предложенным ранее способом получения информативных *y*-ионов указанный подход позволяет достоверно определять полную аминокислотную последовательность пептидов, содержащих до 10 а.о., без использования компьютерных программ анализа фрагментного состава пептидов.

Ключевые слова: пептиды, дансирование, сиквенс, ESI-о-TOF, *b*-ионы

DOI: 10.1134/S0132342319010111

ВВЕДЕНИЕ

Для решения проблемы достоверности масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности в пептидах испробовано множество методов ионизации их молекул и фрагментации ионизированных молекулярных ионов. При этом основными недостатками используемых методов с точки зрения расшифровки масс-спектров являются неполнота перекры-

вания диапазона получаемых масс, низкая интенсивность пиков фрагментных ионов.

В масс-спектрах пептидов наиболее информативными являются ионы продуктов расщепления молекулы по скелетным амидным связям, содержащие заряд либо на *N*-концевом фрагменте исходного пептида (*b*-ионы), либо на *C*-концевом (*y*-ионы). Ввиду особенностей механизма распада молекулярного иона пептида в камере столкновения в фрагментных масс-спектрах более интенсивными бывают *y*-ионы, особенно в случае триптических пептидов [2]. Известные из литературы попытки повышения интенсивности *b*-ионов (особенно в области низких масс – ионов *b*₁, *b*₂, ключевых для идентификации ионов *b*-серии), не всегда оказываются эффективными [3].

Из-за высокого уровня фона наиболее трудна для идентификации область ионов с $m/z < 300$, что делает невозможным прямое масс-спектрометрическое определение структуры пептидов в классическом варианте метода MALDI. Это обстоятельство привело к усложнению аппаратуры

¹ Сообщение I см. [1].

Сокращения: M^+ – квазимолекулярный ион; МС – масс-спектрометрия; МС/МС – тандемная масс-спектрометрия; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; Dns – 5-*N,N*-диметиламино-1-нафталинсульфонилхлорид, дансил; ESI-о-TOF – времяпролетный масс-спектрометр с ортогональным вводом пробы и с источником ионов типа электроспрей; Q – квадруполь, квадрупольный; q – камера столкновений тандемного масс-спектрометра; TOF, time of flight, – времяпролетный; ΔU разность потенциалов между соплом и скиммером источника ионов; U_{rf} – радиочастотное напряжение транспортирующего квадруполя.

Автор для связи: (эл. почта: nazimov@ibch.ru).

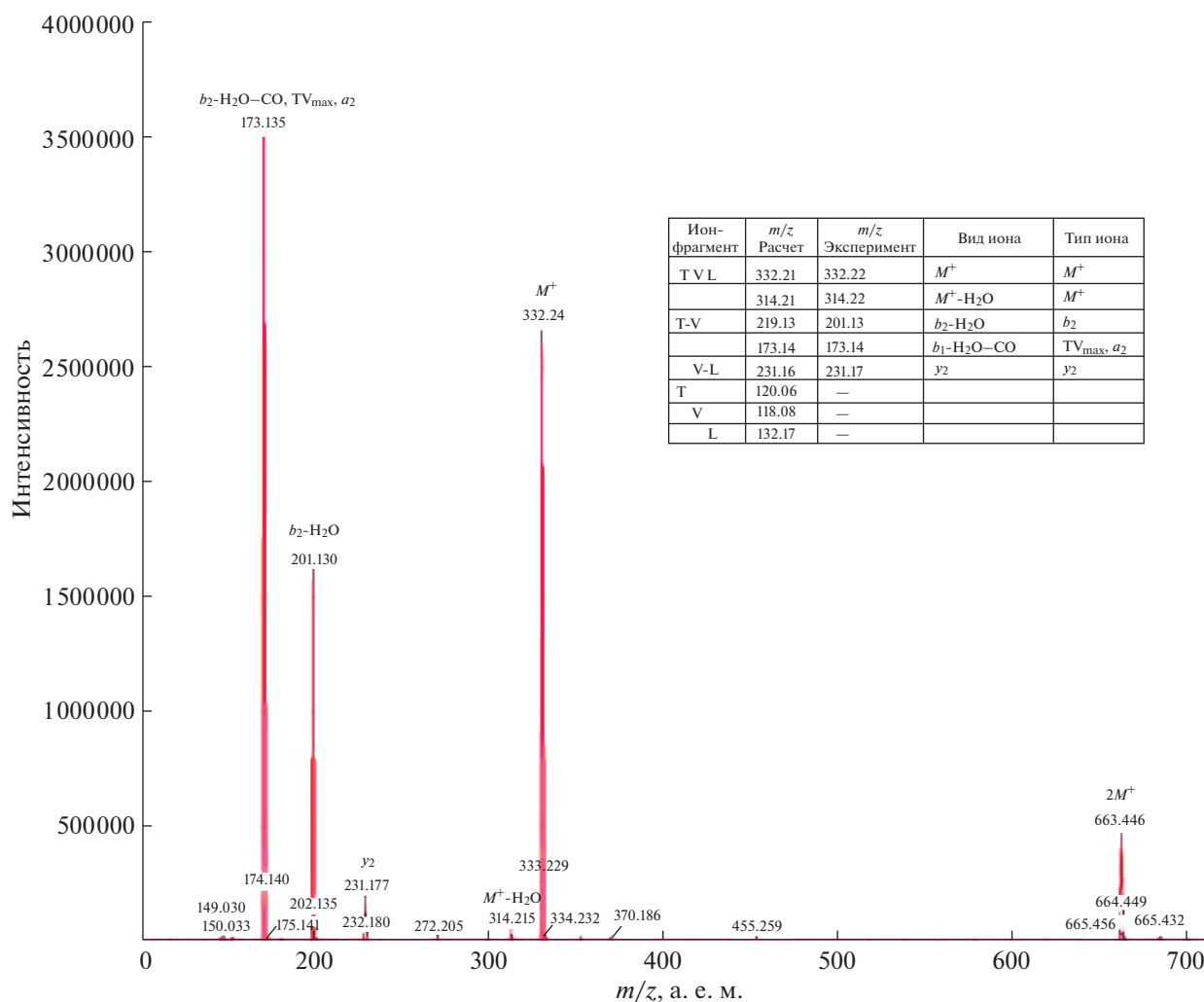


Рис. 1. Масс-спектр пептида TVL ($U_{гф}$ 800 В).

и методологии анализа (разработка и широкое использование дорогостоящего многостадийного метода MS/MS, вплоть до MS/MSⁿ) [4–6].

Недостатками МС/МС-способа являются следующие:

- сложность и, следовательно, высокая стоимость оборудования;

- низкая интенсивность образующихся b -ионов (особенно в области низкомолекулярных фрагментов), что затрудняет однозначную интерпретацию масс-спектра;

- циклизация коротких линейных пептидов, образующихся при фрагментации исходного пептида, за счет взаимодействия N -концевой аминогруппы пептида с карбонильными группами скелетных амидных связей [7–9]. Чаще всего химической причиной образования циклов является нуклеофильная атака свободной N -концевой аминогруппы пептида на C -концевой карбонил того же пептида [10].

Подобные процессы перегруппировок типичны для электрораспылительной масс-спектро-

метрии с квадрупольной ячейкой столкновений (тройной квадруполь) из-за большого времени столкновения с молекулами инертного газа в ячейке.

Для повышения информативности масс-спектров проводят химическую модификацию N -концевой аминогруппы анализируемых пептидов [8, 10, 11].

Нами был предложен более простой в приборном и методическом исполнении способ масс-спектрометрического секвенирования пептидов и получения их аминокислотных последовательностей [12], заключающийся в том, что масс-спектрометрическая фрагментация молекулярного иона пептида происходит в области низкого вакуума между соплом и скиммером источника ионов под воздействием электрического поля в присутствии остаточного газа. Предлагаемый подход позволяет получать информативные u -ионы, по интенсивности в 5–100 раз превышающие уровень фона, что позволяет определять последовательность аминокислот пептида, содержащего до 10 а.о., без использования компьютерных про-

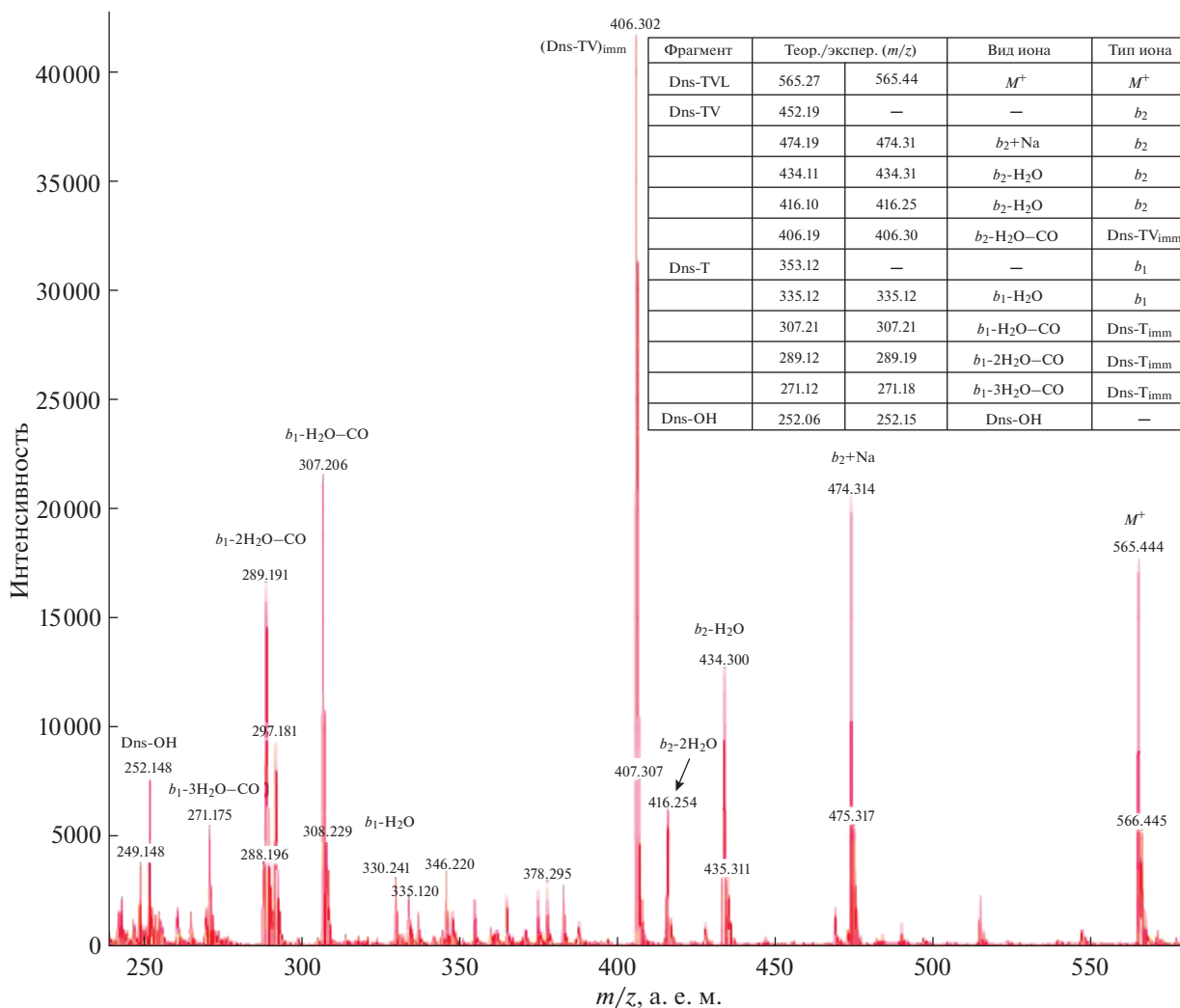


Рис. 2. Масс-спектр Dns-TVL (U_{rf} 1000 В).

грамм или определять сиквенс более длинных пептидов, проводя компьютерный анализ фрагментации и сравнение полученной аминокислотной последовательности с существующими базами первичных структур белков и пептидов [12].

Особенностью этого способа фрагментации пептидов является то, что в фрагментных масс-спектрах преобладают высокоинтенсивные информативные y -ионы, а интенсивность b -ионов, хотя и возрастает, но в гораздо меньшей степени, чем для y -ионов.

Целью данной работы являлось создание способа получения высокоинтенсивных b -ионов всех образующихся дансированных фрагментов пептида с последующей однозначной идентификацией аминокислотной последовательности пептида с использованием преимущественно Dns- b -ионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продукты реакции дансирования N -концевой аминогруппы пептидов дансилхлоридом разделяют хроматографически, элюат подают в источник ионов масс-спектрометра в режиме *on-line* с последующей управляемой фрагментацией дансированного пептида [11, 12].

При наличии в масс-спектрах пиков Dns-фрагментов, превышающих по интенсивности пики остальных ионов спектра, становится возможным определение полной аминокислотной последовательности пептида с использованием лишь пиков b -ионов и легко идентифицируемых продуктов их распада (отщепление молекул H_2O , CO).

В данной работе представлены масс-спектры исходного недансированного пептида Thr-Val-Leu (TVL, рис. 1) и его дансированного производного Dns-TVL (рис. 2, 3), а также аналогичные масс-спектры даларгина (Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-

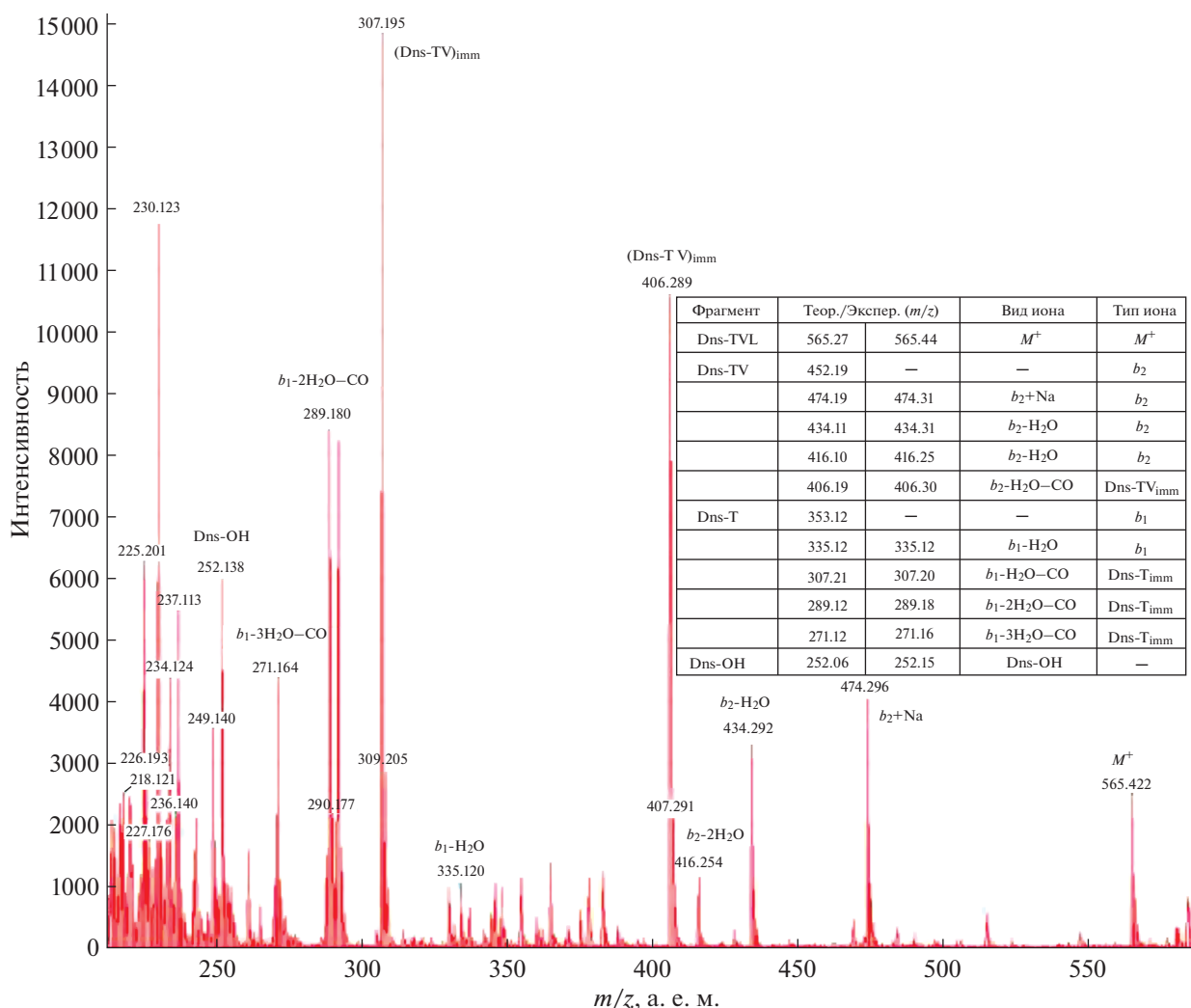


Рис. 3. Масс-спектр Dns-TV_L (U_{rf} 300 В).

Arg, Y-A-G-F-L-R (Dal) (рис. 4), и Dns-даларгина Dns-Dal (рис. 5–7). Во всех масс-спектрах для наглядности обозначены и Dns-содержащие b -фрагменты, и ионы внутренней фрагментации пептидов.²

В масс-спектре немодифицированного пептида TVL присутствует ограниченное число пиков b - и y -ионов. С одной стороны, это упрощает вид масс-спектра, но с другой — лишает дополнительной информации, необходимой для определения структуры пептида.

При фрагментации немодифицированного пептида даларгина(II) интенсивность b -ионов ничтожно мала по сравнению с интенсивностью y -ионов (рис. 4). В то же время в масс-спектрах Dns-(I) (рис. 2, 3) и Dns-(II) (рис. 5–7) преоблада-

ют пики, соответствующие Dns-производным b -ионов.

При этом нет необходимости учитывать низкомолекулярные ионы масс-спектра т.к. минимальный наименьший из всех возможных информативных Dns-ионов — иммониевый ион Dns-Gly (+Dns-NH=CH₂) имеет m/z 263, что позволяет исключить из рассмотрения пики ионов с $m/z < 263$.

Как известно, изменение радиочастотного напряжения U_{rf} на транспортирующем квадруполе времяпролетного масс-спектрометра позволяет изменять диапазон масс детектируемых ионов. При обычном рабочем напряжении $U_{rf} \approx 1000$ В, низкомолекулярные ионы не попадают на детектор и не видны в масс-спектре (см. рис. 1). Но при снижении U_{rf} до 300–500 В, массовое окно спектрометра смещается в область более низких масс, и легкие ионы детектируются с хорошей интен-

² Фрагменты внутренней расщепления, не содержащие Dns-группы, на масс-спектрах отмечены как $y^{\#}$.

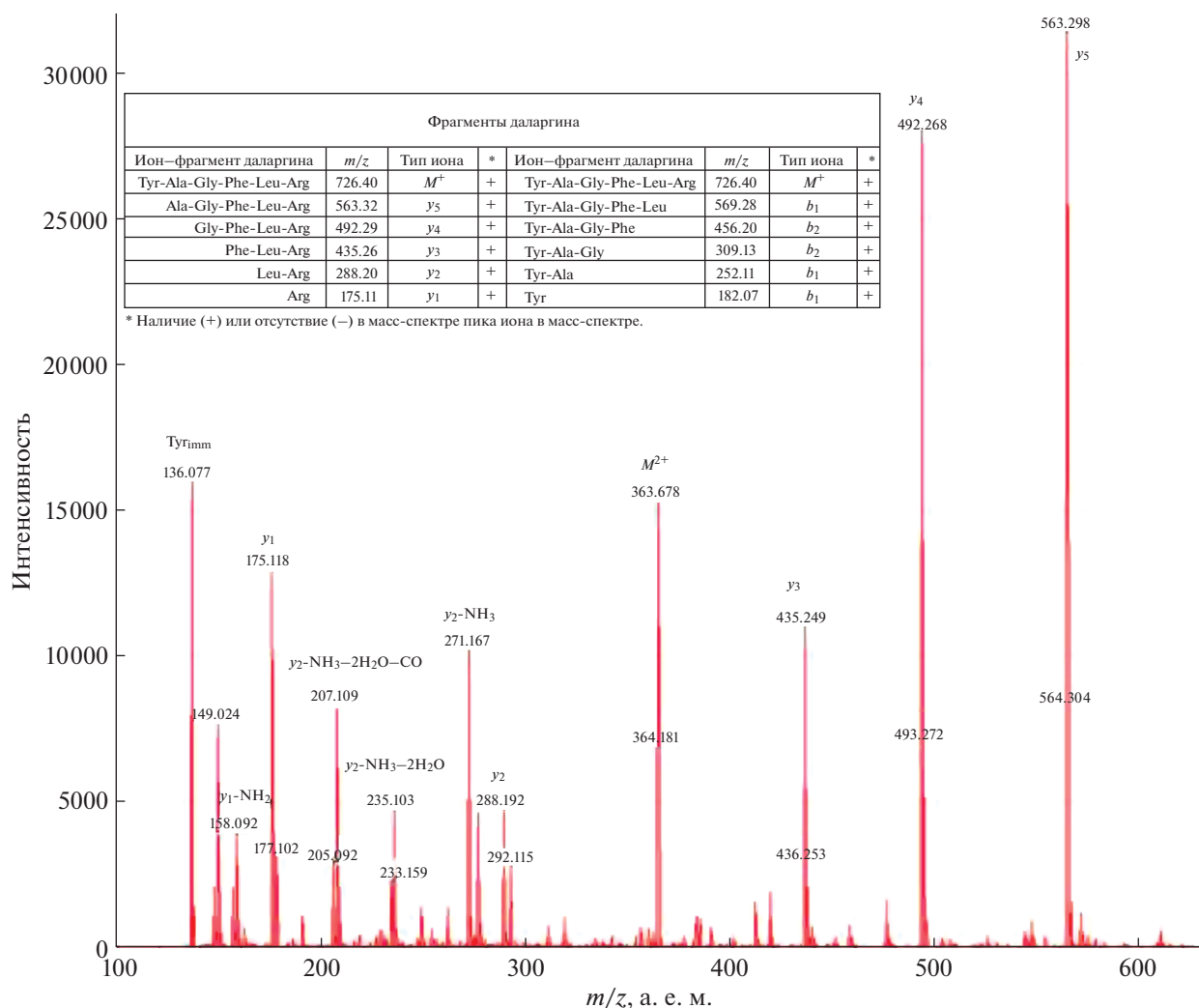


Рис. 4. Масс-спектр даларгина (Dal) m/z 100–620 (есть пики всех y -ионов, пики b -ионов отсутствуют).

сивностью. Однако при этом выпадают из рассмотрения тяжелые ионы. Поэтому для сравнения качества масс-спектров и возможности детектировать и родительские тяжелые ионы, и легкие ионы их фрагментов в данной работе приходилось перенастраивать U_{ff} .

В масс-спектрах образцов, имеющих Dns-метку и снятых при разных значениях U_{ff} (300 или 1000 В, рис. 2, 3), нет существенного различия ни в насыщенности масс-спектров пиками фрагментных ионов, ни в интенсивности самих пиков. Это позволяет проводить съемку масс-спектра при одном значении U_{ff} , без дополнительной фрагментации. В стандартном МС/МС-методе чаще всего это делают для целенаправленного получения низкомолекулярных иммониевых ионов N -концевых аминокислот и коротких пептидов (a_1 -, a_2 -продуктов вторичной фрагментации первичных b -ионов).

В масс-спектре свободного даларгина присутствуют исключительно пики y -ионов, а пики b -ионов отсутствуют, (кроме пика Tyr_{imm} , производного от b_1 , рис. 4). В спектре Dns-даларгина получены пики всех b -ионов (рис. 5, 6).

За счет большей энергии диссоциации сульфамидной связи ($-SO_2-NH-$) дансильного радикала с α -аминогруппой пептида по сравнению с энергией диссоциации амидного скелета пептида ($CO-NH$) в условиях фрагментации полипептидной цепи предотвращается гидролиз сульфамидной связи и сохраняются все Dns-содержащие фрагменты масс-спектра. При этом за счет большого сродства N,N -диметиламиногруппы Dns-радикала к протону обеспечивается высокая интенсивность сигнала каждого Dns-фрагмента (соотношение сигнал/шум = 10/1 и более).

Наряду с преимущественным образованием высокоинтенсивных пиков ионов Dns- b -фрагментов пептида, в масс-спектрах обнаруживают-

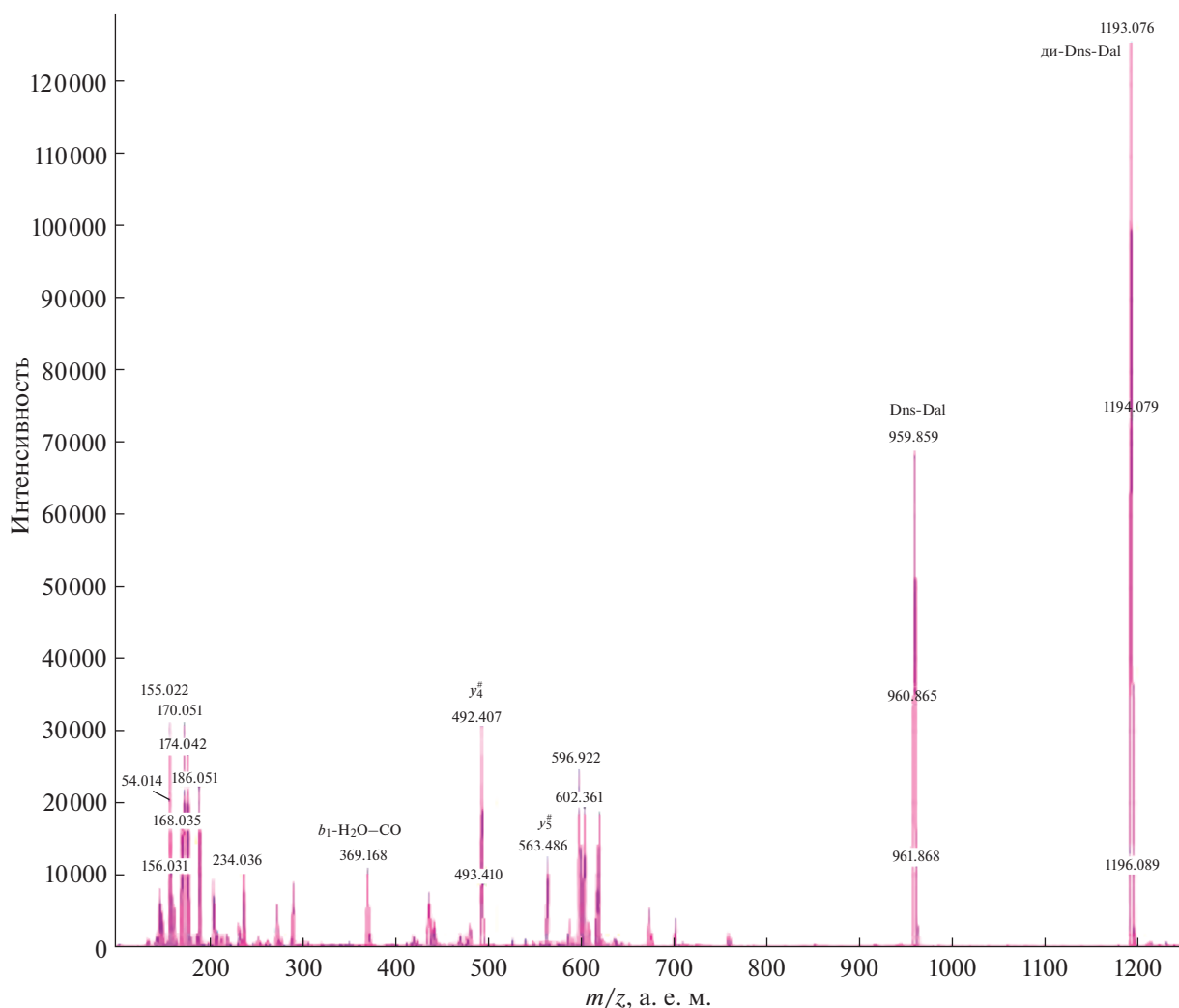


Рис. 5. Масс-спектр ди-Dns-Dal (m/z 100–1200).

ся немодифицированные фрагменты внутреннего расщепления Dns-пептида, т.е. не имеющие Dns-группы в своей структуре, но дающие дополнительную информацию о строении пептида (табл. 1, 2).

Отдельно стоит отметить, что в масс-спектре Туг-содержащего даларгина, наряду с M^+ -ионом моно-Dns-даларгина присутствует M^+ -ион ди-Dns-даларгина. При этом в фрагментных масс-спектрах видны ионы фрагментов только моно-Dns-даларгина и отсутствуют ионы ди-Dns-фрагментов (рис. 5–7).

Таким образом, показана принципиальная возможность получения высокоинтенсивных пиков b -ионов (в том числе и для обычно малоинтенсивных ионов b_1 и b_2) путем фрагментации дансильированных пептидов в узле ввода пробы, а не в отдельной столкновительной камере (q) масс-спектрометра, что позволяет обойтись без дорогостоящего МС/МС-принципа фрагментации.

Благодаря наличию в масс-спектрах ограниченного числа высокоинтенсивных Dns- b -ионов сильно упрощается вид масс-спектра и появляется возможность проводить расшифровку масс-спектров вручную, без использования дорогостоящего масс-спектрометрического программного обеспечения (по крайней мере, для пептидов, содержащих до 10 а.о., обычно составляющих основную часть ферментативных гидролизатов целевых белков и объектов пептидомного анализа).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для растворения образцов и хроматографического анализа использовали ацетонитрил (сорт 0 или 1, Криохром, Санкт-Петербург), муравьиную кислоту (Merck, ФРГ). Тридистиллят воды, используемой для приготовления растворов, и ацетонитрил, пропустили через фильтры 0.45 мкм (фирма “Millipore”, США). Хроматографию пептидов проводили на микроколоночном хроматографе “Милихром А-02” (Институт хроматогра-

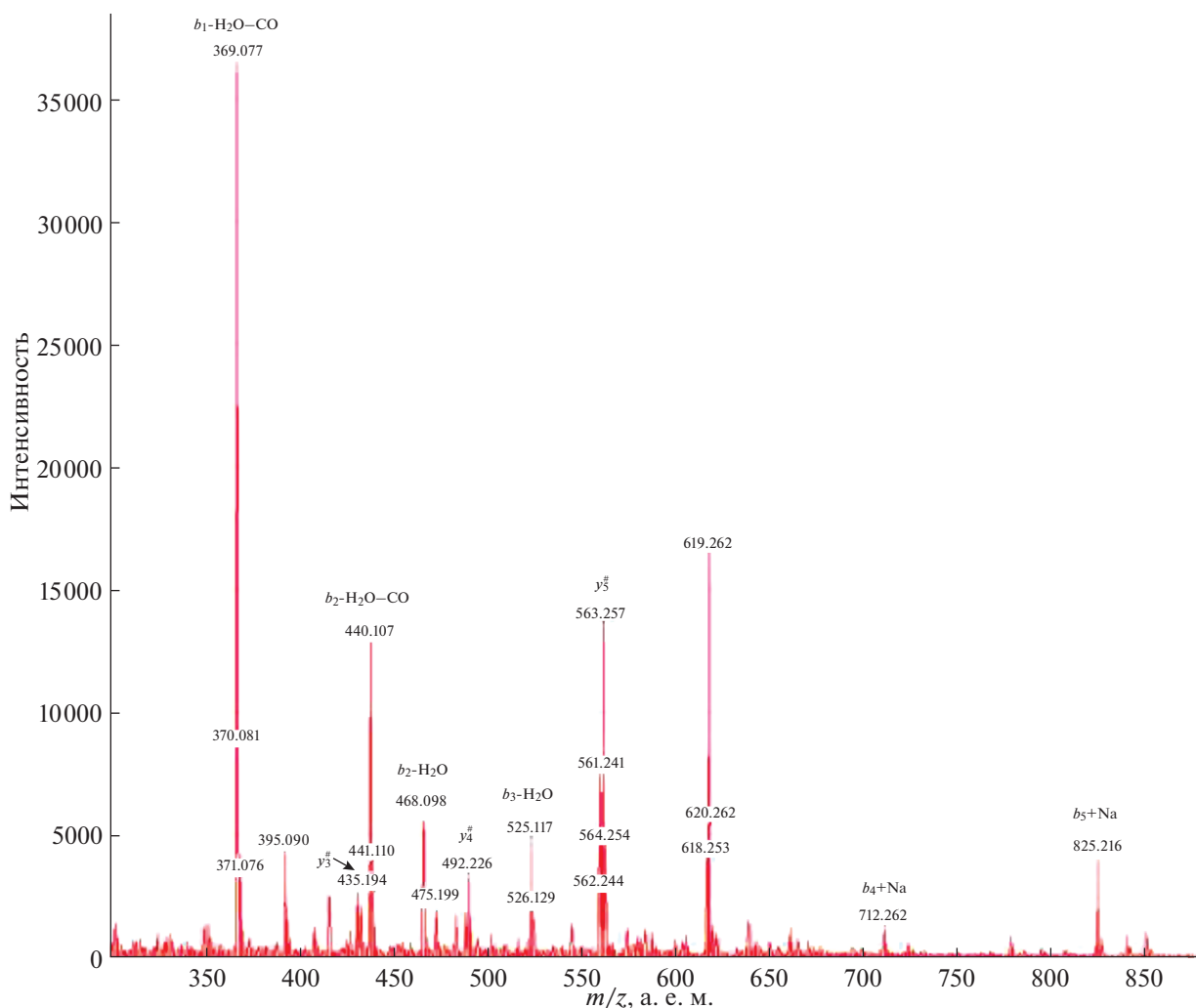


Рис. 6. Масс-спектр Dns-Dal (m/z 300–880). Символами $y^\#$ обозначены продукты внутренней фрагментации даларгина, не содержащие Dns-группы.

Таблица 1. Характеристика продуктов фрагментации даларгина

Непротонированные фрагменты даларгина и их массы (расчет)	m/z фрагментов даларгина (эксперимент)	Вид иона (эксперимент)
Тыр-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg 725.39	366.68	M^{2+}
Тыр-Ala-Gly-Phe-Leu 569.28	—	—
Тыр-Ala-Gly-Phe 456.20	—	—
Тыр-Ala-Gly 309.13	—	—
Тыр-Ala 252.11	—	—
Тыр 181.07	—	—
Ala-Gly-Phe-Leu-Arg 562.32	563.26	y_5
Gly-Phe-Leu-Arg 491.29	492.23	y_4
Phe-Leu-Arg 434.26	435.19	y_3
Leu-Arg 287.20	288.21	y_2
	271.17	y_2-NH_3
	235.10	$y_2-NH_3-2H_2O$
	207.11	$y_2-NH_3-2H_2O-CO$
Arg 174.11	175.09	y_1
	158.09	y_1-NH_3
	136.08	b_1-H_2O-CO

Таблица 2. Характеристика продуктов фрагментации дансилированного даларгина

Дансилированные фрагменты Dns-даларгина	m/z фрагментов Dns-Dal (расчет)	m/z фрагментов Dns-Dal и вид иона (эксперимент)
Dns-Тур-Ала-Гли-Фен-Лей-Арг (Dns-Dal)	959.45	959.86 M^+
Dns-Тур-Ала-Гли-Фен-Лей	803.34	825.22 $b_5 + Na$
Dns-Тур-Ала-Гли-Фен-	690.26	712.26 $b_4 + Na$
Dns-Тур-Ала-Гли	543.19	525.12 b_3-H_2O
Dns-Тур-Ала	486.17	468.10 b_2-H_2O
		440.11 b_2-H_2O-CO
Dns-Тур	415.13	369.08 b_1-H_2O-CO

фии “Эконова”, Новосибирск). Для анализа использовали пептидные стандарты (Thr-Val-Leu, фирма “Serva”, ФРГ), (даларгин, Calbiochem, США). Дансилирование пептидов проводили,

как указано ранее [13]. Образцы растворов Dns-пептидов хроматографировали на колонке с обращенной фазой (ProntosilC₁₈, 120 мкм, 2.0 × 75–150 мм, Институт хроматографии “Эконо-

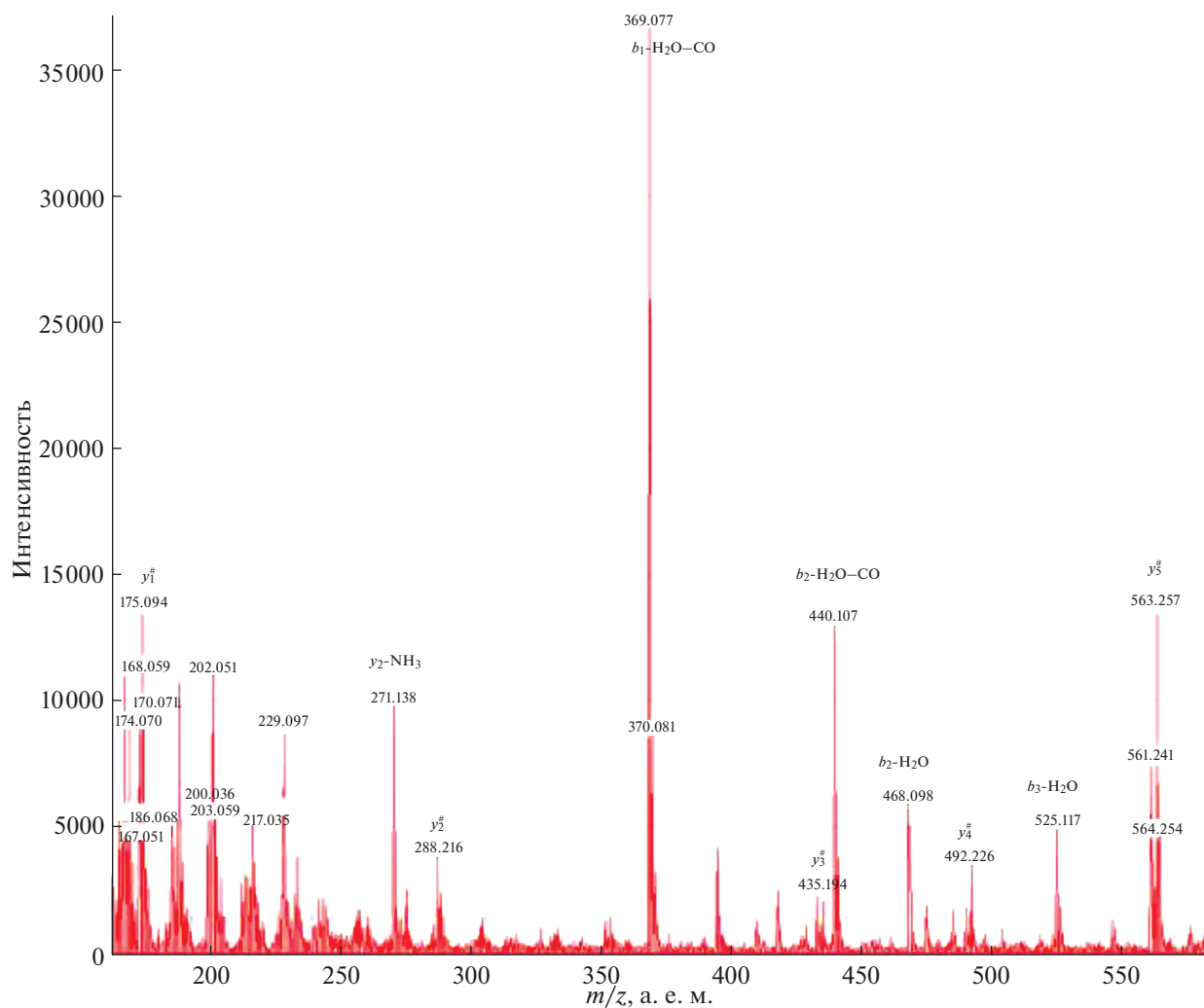


Рис. 7. Масс-спектр Dns-даларгина (m/z 150–590).

ва”, г. Новосибирск) в 0.2% муравьиной кислоте с градиентом концентрации ацетонитрила. Элюат, содержащий компоненты смеси, через металлический капилляр диаметром 100 мкм подавался в источник ионов электроспрей со скоростью 2–50 мкл/мин без нагрева узла ввода. В качестве столкновительного газа использовался азот воздуха.

Масс-спектры снимали на масс-спектрометре МХ 5310 (ИАП РАН, Санкт-Петербург): анализатор – времяпролетный рефлектор с двухступенчатым зеркалом, рабочий диапазон масс – до 10000 Да. Масс-спектры всех пептидов снимали при фиксированном напряжении на капилляре (3100–3400 В) и изменяемом напряжении на сопле с шагом 20–30 В в диапазоне 50–300 В и на скиммере в диапазоне 40–80 В.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят С.В. Шабельникова (ЦИН РАН, Санкт-Петербург) за содействие в проведении эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назимов И.В., Бубляев Р.А. // Биоорганич. химия. 2018. Т. 44. № 5. С 481–491. [Bublyayev R. A. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. V. 44. P. 481–491.]
2. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. // Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. Москва. Техносфера, 2012. С. 49.
3. Summerfield S.G., Bolgar M.S., Gaskell S.J. // Int. J. Mass Spectrom. 1997. V. 32. P. 225–231.
4. Baldwin M.A. Methods in Enzymology. California, San Diego, Academic Press Inc., 2005. V. 402. P. 33–48.
5. Bieman K. Methods in Enzymology. California, San Diego, Academic Press Inc., 1990. V. 193. P. 455–479.
6. Веренчиков А.Н. // Научное приборостроение. 2004. Т. 14. № 2. С. 4–23.
7. Harrison A.G. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2008. V. 19. P. 1776–1780.
8. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. // Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. Москва. Техносфера, 2012. С. 110.
9. Yague J., Paradela A., Ramos M., Ogueta S., Marina A., Barahona F., de Castro J.A.L., J. Vasquez J. // Anal. Chem. 2003. V.75. P. 1524–1535.
10. Harrison A.G. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009. V. 20. P. 2248–2253.
11. Samyn B., Debyser G., Sergeant K., Devreese B., Van Beeumen J. // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2004. V. 15. P. 1838–1852.
12. Назимов И.В., Краснов Н.В., Мурадымов М.З., Бубляев Р.А., Гаврик М.А., Присяч С.С. Пат. РФ RU 2498443 С2 от 31.08.2011.
13. Levina N.B., I.V. Nazimov I.V. // J. Chromatogr. A. 1984. V. 286. P. 207–216.

Mass Spectrometric Sequencing of Short and Middle Size Peptides by ESI-o-TOF of Instead of MS/MS Fragmentation. 2. Directed Fragmentation of Dansylated Peptides with Primary Formation of *b*-Ions

I. V. Nazimov*,# and R. A. Bublyayev**

#e-mail: nazimov@ibch.ru, bub-slava@yandex.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Peterburg, Russia

The scheme of MS analysis of peptides proposed including chemical modification of peptide N-terminal amino group by 5-dimethylamino-1-naphthalene-sulphonyl chloride (Dns-Cl). Peptides were dansylated and then separated on microbore column by RP HPLC connected on line with MS electrospray ion source which was feeded with eluate flow. Changing of the voltage between nozzle and skimmer of the mass spectrometer results in regulated Dns-peptide fragmentation in ion source. Fragmentation of such a peptide takes place in low vacuum zone of ESI-o-TOF mass spectrometer. It is shown that original peptide quasimolecular ions fragmentate with formation for the most part *b*-ions as well as their fragments bearing Dns-group. A set of intensive Dns-*b*-ion peaks was registered, corresponding to the sequential cleavage of all the peptide amino acids. High intensity *b*-ions are formed by using this approach (peak / background ratio is 10–100/1), including very important for sequence determination *b*₁ and *b*₂ ions. In combination with fragmentation approach suggested before for regulated formation of *y*-ions the method described allows to sequence completely and sure peptides consisting of up to 10 amino acids without computer analysis of peptides fragment pool. The principal opportunity of peptides MS sequencing without traditional MS/MS approach is shown experimentally.

Keywords: peptides, dansylation, ESI-o-TOF, *b*-ions, sequence