

УДК 543.51

ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБРАЗУЮЩЕЙ ДОБАВКИ ДЛЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

О.В. Севериновская^{1*}, О.А. Варзацкий², С.В. Шульга², В.А. Покровский¹, Т.Ю. Громовой¹

¹ *Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, Киев 03164, Украина*

² *Институт общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского Национальной академии наук Украины
просп. Академика Палладина 32/34, Киев 03142, Украина*

Методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации исследовано применение бис-трифторметилсульфонимида цезия в качестве ионообразующей добавки для изучения структуры и свойств белков лизоцима и инсулина. Показано, что в случае лизоцима взаимодействие белка происходит с анионом, а в случае инсулина – с катионом ионообразующей добавки. Сделан вывод о возможном специфическом характере взаимодействия ионообразующей добавки с белками, что позволило предложить этот метод в качестве альтернативного подхода для функционального исследования биомолекул.

ВСТУПЛЕНИЕ

Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) нашел широкое применение в анализе полипептидов, белков, полисахаридов и других биологических объектов, что обусловлено экспрессностью, точностью, малой фрагментацией в процессе ионизации. В этом методе ионизацию при малой фрагментации лабильных высокомолекулярных соединений обеспечивает применение матриц, как правило, полигидроксикарбоновых кислот. Матрицы сокристаллизуются с исследуемым веществом, что уменьшает ассоциацию, "слипание" и денатурацию аналита. Применяемые матрицы имеют интенсивное поглощение в области используемого лазерного излучения, за счет чего обеспечивается мягкий эффективный перенос энергии стимулирующего излучения на молекулы аналита и его десорбцию/ионизацию. Важным свойством используемых матриц является наличие протонсодержащих ионообменных групп, обеспечивающих возможность протекания серии реакций протонирования/депротонирования аналита в газовой и конденсированной фазе, что необходимо для получения и экстракции в анализатор однозарядного иона анализируемого вещества.

Кроме стандартного набора матриц, в масс-спектрометрии находят применение некоторые ионные соединения в качестве специфических

матриц и ионообразующих добавок. Например, использование хлорида цезия для анализа фторсодержащих аминокислот позволило значительно уменьшить декарбоксилирование и фрагментацию анализируемого вещества, однако образование цезиевой соли карбоновой кислоты зафиксировано не было. Эффективность этой матрицы, возможно, обусловлена понижением равновесной концентрации цвиттер-ионной формы анализируемой аминокислоты, что, с одной стороны, может способствовать переходу ионов кислот в газовое состояние, а с другой – препятствовать их декарбоксилированию [1]. Для веществ с высоким потенциалом окисления, склонных к ассоциации и пр., которые не подвергаются ионизации в стандартных условиях или ионизируются со значительной фрагментацией, целесообразным является использование катионных матриц, например, солей щелочных металлов, поскольку они имеют не только высокую относительную масс-спектрометрическую чистоту, но и хорошую ионизирующую способность, обусловленную возможностью образования ион-молекулярных ассоциатов [2]. В данной работе показана возможность идентификации электро-нейтральных клатрохелатов методом МАЛДИ путем образования ион-молекулярных комплексов под действием ионообразующей добавки – бис-трифторметилсульфонимида цезия (ТФИ).

Мы предположили, что применение ионообразующих добавок (ИОД) для идентификации

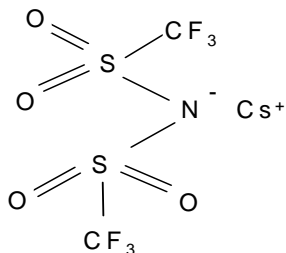
* контактный автор sever_olga@ukr.net

сложных биологических объектов методом МАЛДИ может иметь значительные перспективы в связи с возможностью образования серии дочерних ионов – ион-молекулярных ассоциатов исследуемого соединения с катионными или анионными фрагментами ИОД. Таким образом, вместо единичного пика молекулярного иона исследуемого соединения мы сможем наблюдать характеристические серии пиков ассоциатов анализируемого объекта, что в случае селективного взаимодействия аналита и ИОД даст возможность классификации анализируемого вещества по типу взаимодействия и однозначной идентификации по серии пиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Были приготовлены водные растворы фермента лизоцима ("Fluka", Швейцария, $M^+ \approx 14\,500$ Да) и гормона пептидной природы инсулина ("Fluka", Швейцария, $M^+ \approx 5\,500$ Да) концентрацией $C = 1$ мг/мл. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (25 мг в 0,6 мл водно-ацетонитрильной смеси (1:2). Вначале на стандартную стальную подложку наносили одинаковые объемы растворов солей, на которые, после их высыхания, наносили растворы матрицы с аналитом.

В качестве ИОД использовали спиртовые растворы ТФИ, полученные по методике, описанной в [2], ($M^+ = 413$ Да) концентрацией $C = 2$ мг/мл и $C = 50$ мг/мл.



Бис-трифторметилсульфонимид цезия

Масс-спектры были сняты в положительном и отрицательном режимах регистрации ионов методом МАЛДИ на приборе Autoflex II ("Bruker", Германия), оборудованном азотным лазером ($\lambda = 337$ нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведен масс-спектр белка катионной природы лизоцима, как индивидуального, так и в присутствии ТФИ. Масс-спектр индивидуального лизоцима характеризуется наличием пика молекулярного иона $[M]^+ = 14\,331,8$ Да, а также серии его мультимеров (димер $[2M]^+ = 28\,663,6$ Да, тример $[3M]^+ = 42\,995,5$ Да, тетрамер

$[4M]^+ = 57\,327,3$ Да). Наличие в системе ТФИ не приводит к кардинальным изменениям в масс-спектре лизоцима (рис. 1б), однако ведет к уменьшению разрешения пиков мультимеров за счет появления серии характеристических пиков, обусловленных взаимодействием белка с анионом [ТФИ] (табл. 1).

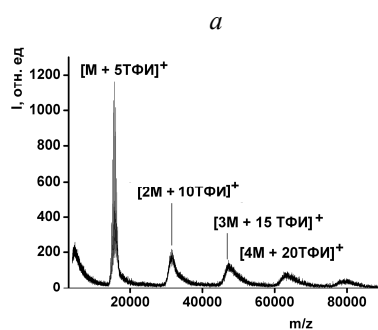
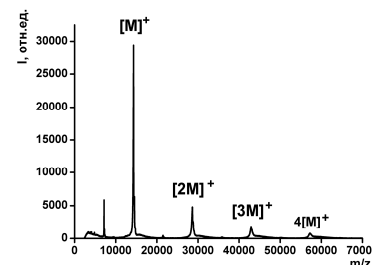


Рис. 1. Масс-спектры МАЛДИ индивидуального лизоцима (а) и лизоцима в присутствии ТФИ ($C = 2$ мг/мл) (б), снятые при положительном режиме регистрации ионов (значения масс приведены для пиков с наибольшей интенсивностью в соответствующем мультиплете)

Табл. 1. Массы основных детектируемых ионов индивидуального лизоцима и лизоцима в присутствии ТФИ

Ионы	Лизоцим, Да	Лизоцим+ТФИ, Да	$\Delta[M]$, Да
$[M]^+$	14 331,8	15 731,8	1 400
$[2M]^+$	28 663,6	31 463,6	2 800
$[3M]^+$	42 995,5	47 195,4	4 200
$[4M]^+$	57 327,3	62 926,4	5 600

Следует отметить тот факт, что добавление в систему ТФИ не приводит к значительному изменению соотношения между интенсивностями пиков мультимеров. Это говорит о том, что ИОД не нарушает белок-белковых взаимодействий.

При более подробном рассмотрении мультиплетов (на примере мономера, рис. 2) наряду с малоинтенсивным пиком молекулярного иона наблюдается ряд мультиплетных пиков с массами 14 891,3; 15 171,9; 15 451,6; 15 731,8; 16 011,4; 16 291,7; 16 571,8; 16 852,0; 17 131,2 Да (табл. 2). Разница масс между этими пиками составляет

280 Да, что соответствует молекулярной массе аниона [ТФИ]⁻. Таким образом, мы наблюдаем присоединение к индивидуальной молекуле лизоцима 10 анионных остатков ИОД. В случае димера, тримера и тетрамера наблюдалось присоединение анионов в кратных количествах.

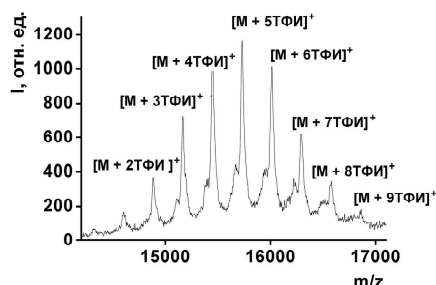


Рис. 2. Фрагмент масс-спектра лизоцима в присутствии ИОД

Табл. 2 Массы основных компонентов мультиплекта лизоцима в интервале 14 000–17 000 Да

Ионы	Лизоцим+[ТФИ], Да	Δ[M], Да
[M + ТФИ] ⁺	14 891,3	280
[M + 2ТФИ] ⁺	15 171,9	280
[M + 3ТФИ] ⁺	15 451,6	280
[M + 4ТФИ] ⁺	15 731,8	280
[M + 5ТФИ] ⁺	16 011,4	280
[M + 6ТФИ] ⁺	16 291,7	280
[M + 7ТФИ] ⁺	16 571,8	280
[M + 8ТФИ] ⁺	16 852,0	280
[M + 10ТФИ] ⁺	17 131,2	280

Такой вид и форма мультиплекта указывает на специфическое взаимодействие анализируемого белка с ионообразующей добавкой. Связывание белка в случае лизоцима происходит с анионами ИОД, что характерно для катионных белков. Интересным является образование выраженного мультиплекта ион-молекулярных ассоциатов с анионами ТФИ, что не может быть объяснено статистическим ион-парным взаимодействием. Отсутствие связывания с анионами матрицы и другими анионами, присутствующими в анализе свидетельствует о специфическом связывании ИОД с катионными центрами белка.

Мы предполагаем наличие ион-рецепторных свойств у аниона ТФИ за счет образования системы многоцентровых водородных связей с катионами гуанидина (аргининовыми остатками). Следует отметить, что в составе лизоцима кроме аргининовых остатков также присутствуют аминокислоты лизина, катионы которых также могут взаимодействовать с рецепторным анионом [ТФИ]⁻. Количественное изучение ион-рецепторных свойств и определение конкретных сайтов связывания

требует дальнейшего изучения, поскольку поиск и применение специфических реагентов может стать инструментом для обнаружения, классификации и идентификации белковых молекул без применения ферментативного секвенирования белков, то есть дать практически полезный результат.

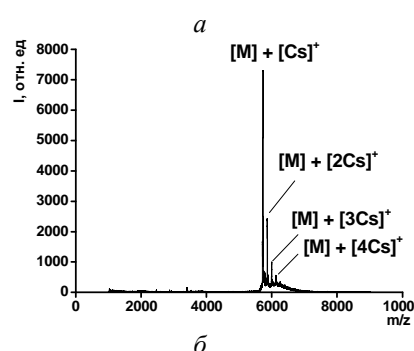
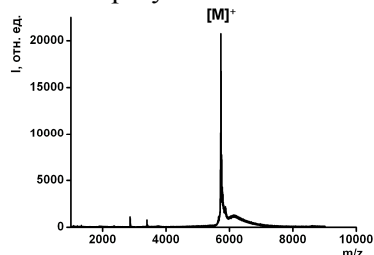


Рис. 3. Масс-спектры МАЛДИ индивидуального инсулина (а) и инсулина в присутствии ТФИ (C = 2 мг/мл) (б), снятые при положительном режиме регистрации ионов

Табл. 3. Массы основных детектируемых ионов инсулина, индивидуального и в присутствии ТФИ

Ионы	Инсулин, Да	Инсулин+ТФИ, Да	Δ[M], Да
[M] ⁺	5 729,0	5 729,0	0
[M + Cs] ⁺	–	5 861,9	132,9
[M + 2Cs] ⁺	–	5 994,8	132,9
[M + 3Cs] ⁺	–	6 127,7	132,9
[M + 4Cs] ⁺	–	6 260,6	132,9

Подобный эксперимент был проведен и с белком анионного типа – гормоном пептидной природы инсулином. В спектре, приведенном на рис. 3а, наблюдается пик с массой 5 729,0 Да, что соответствует однозарядному молекулярному иону инсулина. После взаимодействия с ТФИ характер спектра изменяется: появляется группа ярко выраженных пиков с массами 5 861,9; 5 994,8; 6 127,7; 6 260,6 Да, разница масс между которыми составляет 132,9 Да, что соответствует молекулярной массе катиона ТФИ – цезия (рис. 3б). Этот факт объясняется образованием ионных ассоциатов инсулина с соответственно одним, двумя, тремя и четырьмя катионами ИОД (табл. 2).

В отличие от масс-спектра лизоцима, в общем спектре инсулина отсутствуют пики, отвечающие ассоциатам с анионами ИОД.

ВЫВОДЫ

Обнаружено специфическое взаимодействие инсулина и лизоцима с трифлиимидом цезия, что определяет возможность использования ионообразующих соединений различной природы для функционального исследования биологических молекул.

Показано, что использование ионообразующих добавок в масс-спектропии дает возможность идентификации индивидуальных белков по характеристическим мультиплетным сигналам.

Полученные результаты дают возможность расширить область применения метода МАЛДИ для выяснения особенностей структуры и свойств биомолекул.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fernandez-Lima F.A., Ponciano C.R., Silveira E.F.* UV laser induced desorption mechanism analyzed through ion recombination in alkali halide plume // *J. Mass. Spectrom.* – 2008. – V. 43. – P. 587–593.
2. *Шульга С.В., Севериновская О.В., Варзацкий О.А. и др.* Масс-спектрометрия (MALDI) макробциклических трисдиоксиматов железа (II) // *Укр. химич. журн.* – 2011. – Т. 77, № 3. – С. 3–7.
3. *Громовой Т.Ю., Бондаренко В.Н., Титов В.Е. и др.* Влияние природы мишени на эффективность генерирования мономолекулярных ионов фторсодержащих аминокислот при лазерной десорбционной ионизации // *Теорет. эксперим. химия.* – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 167–172.

Поступила 26.05.2011, принята 06.06.2011

Застосування іоноутворюючої добавки для мас-спектрометричного аналізу та ідентифікації біологічних об'єктів

О.В. Севериновська, О.А. Варзацький, С.В. Шульга, В.О. Покровський, Т.Ю. Громовий

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, Київ 03164, Україна, sever_olga@ukr.net*

*Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського Національної академії наук України
просп. Академіка Палладіна 32/34, Київ 03142, Україна*

Методом матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації досліджено застосування біс-трифторметилсульфоніміду цезію як іоноутворюючої добавки для вивчення структури та властивостей білків лізоциму та інсуліну. Показано, що у випадку лізоциму взаємодія білка відбувається з аніоном, а у випадку інсуліну – з катіоном іоноутворюючої добавки. Зроблено висновок про можливий специфічний характер взаємодії іоноутворюючої добавки з білками, що дозволило запропонувати цій метод як альтернативний підхід для функціонального дослідження біомолекул.

Application of Ion-Forming Additive to Mass Spectrometric Analysis and Identification of Biological Objects

O.V. Severinovskaya, O.A. Varzatskiy, S.V. Shulga, V.A. Pokrovskiy, T.Yu. Gromovoy

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Street, Kyiv 03164, Ukraine, sever_olga@ukr.net*

*Vernadsky Institute of General and Inorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
32/34 Academician Palladin Avenue, Kyiv 03142, Ukraine*

Application of bis-trifluorsulphonimide as ion-forming additive to study of proteins (lysozyme and insulin) by matrix-assisted laser desorption/ionization technique was investigated. It has been shown that in the case of lysozyme interaction occurs with anions while in the case of insulin - with cations of ion-forming additive. It has been concluded that interaction between proteins and ion-forming additive has a specific character. Thus, the technique may be proposed as alternative approach to biomolecules investigations.