

А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина

**ОСНОВЫ  
масс-спектрометрии  
белков и пептидов**

Техносфера  
ВМСО  
Москва  
2012

УДК 543.51  
ББК 24.4  
ЛЗЗ

ЛЗЗ Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю.  
**Основы масс-спектрометрии белков и пептидов**  
**Москва: Техносфера, 2012. – 176 с.+ 4 с. цв. вкл.**

ISBN 978-5-94836-334-9

Книга представляет собой первое учебное пособие на русском языке по основам масс-спектрометрии белков и пептидов. Цель настоящего издания – заинтересовать молодых исследователей информативной, красивой и востребованной во всем мире дисциплиной, дать возможность более эффективно применять масс-спектрометрию для решения фундаментальных и прикладных научных задач. Книга написана в формате лекций для начинающих, хорошо иллюстрирована и сопровождается представительным списком цитированной литературы.

Издание рассчитано на студентов и аспирантов химических, физико-химических, био-логических и медицинских специальностей; будет полезно научным сотрудникам, уже работающим в области исследований белков и пептидов или интересующимся этим научным направлением.

УДК 543.51  
ББК 24.4

© 2012, Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю.  
© 2012, ВМСО, оригинал-макет  
© 2012, ЗАО «РИЦ «Техносфера», оформление

ISBN 978-5-94836-334-9

**Посвящается**  
**профессорам химического факультета**  
**МГУ им. М.В. Ломоносова**  
**Александру Леонидовичу Курцу**  
**Киму Петровичу Бутину**



# Оглавление

|   |    |
|---|----|
| <b>Предисловие</b> .....  | 7  |
| <b>Использованные сокращения</b> .....  | 9  |
| <b>Введение</b> .....   | 11 |
| <b>Глава 1. Методы ионизации молекул пептидов и белков</b> .....  | 14 |
| 1.1. Бомбардировка быстрыми атомами, ББА (Fast Atom Bombardment, FAB) .....   | 14 |
| 1.2. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, МАЛДИ (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) ..... | 16 |
| 1.3. Ионизация электрораспылением, ИЭР (Electrospray Ionization, ESI) .....   | 19 |
| <b>Глава 2. Измерение молекулярной массы пептидов и белков</b> .....  | 25 |
| <b>Глава 3. Установление первичной структуры пептидов</b> .....   | 34 |
| 3.1. Деградация по Эдману .....   | 34 |
| 3.2. Идентификация пептидов по сиквенсу кДНК .....  | 36 |
| 3.3. Леддерное секвенирование .....   | 37 |
| <b>Глава 4. Масс-спектрометрическое секвенирование</b> .....  | 39 |
| 4.1. Номенклатура фрагментных ионов пептидов .....  | 39 |
| 4.2. Масс-спектры отрицательных ионов .....   | 45 |
| 4.3. Методы инициирования фрагментации молекулярных ионов .....   | 46 |
| 4.3.1. Диссоциация, активированная соударениями, ДАС (Collisionally Activated Dissociation, CAD) .....                      | 47 |
| 4.3.2. Диссоциация индуцированная столкновениями с поверхностью, ДИП (Surface Induced Dissociation (SID)) .....             | 56 |
| 4.3.3. Диссоциация при захвате электрона, ДЗЭ (Electron Capture Dissociation, ECD) .....                                    | 59 |
| 4.3.4. Диссоциация при переносе электрона, ДПЭ (Electron Transfer Dissociation, ETD) .....                                  | 64 |
| 4.3.5. Фотоактивация диссоциации .....  | 65 |
| 4.3.6. Диссоциация, активированная электронами .....  | 69 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3.7. Диссоциация отрицательных ионов при отрыве электрона .....  | 70         |
| 4.4. Методы секвенирования пептидов на приборах с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией .....   | 71         |
| 4.4.1. Метод задержанной экстракции. Распад в источнике, РВИ (In Source Decay, ISD) .....  | 71         |
| 4.4.2. Распад за пределами источника, РПИ (Post Source Decay, PSD) .....   | 72         |
| <b>Глава 5. Идентификация белков и пептидов .....</b>  | <b>76</b>  |
| 5.1. Идентификация с использованием баз данных .....   | 76         |
| 5.1.1. Метод идентификации белков «снизу вверх» («Bottom-up») .....  | 76         |
| 5.1.2. Метод идентификации белков «сверху вниз» («Top-down») .....   | 91         |
| 5.2. Ручная идентификация пептидов .....   | 94         |
| <b>Глава 6. Основные сложности масс-спектрометрического секвенирования пептидов и пути их преодоления .....</b>  | <b>97</b>  |
| 6.1. Покрытие сиквенса .....   | 98         |
| 6.2. Аминокислоты с одинаковой целочисленной массой .....  | 102        |
| 6.2.1. Лизин и глутамин .....  | 102        |
| 6.2.2. Фенилаланин и окисленный метионин .....   | 104        |
| 6.3. Изомерные аминокислоты: лейцин и изолейцин .....  | 106        |
| 6.4. Циклизация коротких пептидов .....  | 108        |
| 6.5. Пептиды, содержащие дисульфидную связь .....  | 116        |
| <b>Глава 7. Использование для секвенирования масс-спектров отрицательных ионов .....</b>   | <b>121</b> |
| <b>Глава 8. Количественный анализ белков с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии. Количественная протеомика .....</b> | <b>126</b> |
| 8.1. Сравнительная (количественная) протеомика .....   | 129        |
| 8.1.1. Безизотопный метод .....  | 129        |
| 8.1.2. Изотопные методы .....  | 132        |
| 8.2. Установление абсолютных количеств .....   | 145        |
| <b>Список литературы .....</b>   | <b>149</b> |
| <b>Приложение. Bruker: Многомерный путь к разгадке протеома .....</b>  | <b>163</b> |

# Предисловие

Важнейшие достижения масс-спектрометрии за последние 20 лет связаны с исследованиями природных соединений, включая биополимеры. С появлением методов ионизации электрораспылением и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации для масс-спектрометрии стали доступны сахара, нуклеиновые кислоты, белки, липиды и прочие биоорганические макромолекулы. Безусловно, наибольших успехов удалось достичь в исследовании белков. Благодаря чувствительности, информативности, экспрессности, возможности работать со смесями, масс-спектрометрия сегодня — основной метод анализа этих сложных для изучения объектов.

Пожалуй, можно признать, что современная масс-спектрометрия выиграла конкурентную борьбу с классическим методом установления первичной последовательности аминокислот в пептидах по Эдману, поскольку масс-спектрометрическое секвенирование оказалась существенно быстрее, чувствительнее, информативнее и даже дешевле. Быстрое и надежное определение первичной структуры белков, т.е. последовательности аминокислотных звеньев, само по себе уже превосходный результат. Однако масс-спектрометрия способна изучать структуры более сложных порядков (от 2 до 4), включая нековалентные взаимодействия белков с появлением надбелковых образований, устанавливая тип и место посттрансляционных модификаций, работать с гликопротеинами, липопротеинами, фосфопротеинами и т.д. Масс-спектрометрия стала незаменимой в медицине, поскольку способна быстро и надежно диагностировать сердечно-сосудистые, генетические и онкологические заболевания. Именно успехи масс-спектрометрии привели к формированию в конце прошлого века нового научного направления — протеомики. Огромна роль метода и в метаболомике.

К сожалению, в русскоязычной литературе до сих пор не существовало учебных пособий или монографий по этой важнейшей и многогранной по своему применению тематике. Россия кардинально отстает от развитых стран и по изучению этой дисциплины, и по использованию ее достижений. Масс-спектрометристам, работающим в России, приходится ориентироваться на англоязычные издания книг, оригинальные статьи и обзоры. В 2012 г. на русском языке была издана книга «Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам» под редакцией Дж. Ласкин и Х. Лифшиц (перевод с английского, изд-во «Техносфера»), представляющая собой сборник статей ведущих специалистов в области масс-спектрометрии в приложении к биологии. Книга рассчитана на подготовленных читателей. Она предоставляет

хорошую, во многом, заочную возможность познакомиться с современными достижениями в области масс-спектрометрии биомолекул, поскольку большинство описываемых в ней методов пока не используется в нашей стране.

Предлагаемая читателям книга «Основы масс-спектрометрии белков и пептидов» является первым учебным пособием на русском языке, излагающим основы масс-спектрометрии белков и пептидов. Книга написана в формате лекций для начинающих, иллюстрирована большим количеством рисунков, спектров, схем и сопровождается представительным списком цитированной литературы. Она рассчитана на студентов и аспирантов химических, физико-химических, биологических и медицинских специальностей; будет полезна научным сотрудникам, уже работающим в области исследований белков и пептидов или интересующимся этим научным направлением.

Цель издания такой книги — заинтересовать молодых исследователей информативной, очень красивой и востребованной во всем мире дисциплиной, дать возможность более эффективно применять масс-спектрометрию для решения своих собственных фундаментальных и прикладных научных задач.

Основное внимание в учебном пособии уделено методам ионизации белков и пептидов, процессам фрагментации этих соединений в газовой фазе. Достаточно подробно рассматриваются вопросы тандемной масс-спектрометрии, существующие методы инициирования фрагментации. Этот раздел очень важен в современной масс-спектрометрии. Он полезен для исследователей, работающих с любыми химическими соединениями и биополимерами. Несколько глав посвящены идентификации белков и пептидов. Сюда входят варианты автоматизированной идентификации, расшифровка спектров вручную, описание определенных сложностей масс-спектрометрического секвенирования и вариантов их преодоления. Рассмотрены достоинства и недостатки двух основных подходов установления химической структуры белков: масс-спектрометрии «сверху-вниз» и «снизу-вверх». Отдельная глава посвящена вопросам количественного анализа.

Книга посвящена Александру Леонидовичу Курцу и Киму Петровичу Бутину, двум друзьям, замечательным профессорам химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, очень близких нам в человеческом отношении, непосредственно участвовавшим в нашем химическом и гуманитарном образовании. Мы всегда высоко оценивали химическую эрудицию и потрясающие личностные качества этих ученых. Именно общение с этими людьми вдохновило нас в самом начале XXI века начать исследования в области масс-спектрометрии пептидов.

А.Т. Лебедев  
К.А. Артеменко  
Т.Ю. Самгина

## Использованные сокращения

- ББА** — бомбардировка быстрыми атомами (Fast Atom Bombardment, FAB)
- ВЭЖХ** — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГХ/МС** — газовая хроматография/масс-спектрометрия
- ДИП** — диссоциация, индуцированная столкновениями с поверхностью (Surface Induced Decomposition, SID)
- ДАС** — диссоциация, активированная соударениями (Collisionally Activated Decomposition, CAD)
- ДАСПЭ** — ДАС при повышенной энергии (Higher-Energy C-trap Dissociation, HCD)
- ДИИАЧТ** — диссоциация в результате поглощения инфракрасного излучения абсолютно черного тела (Blackbody Infrared Radiative Dissociation, BIRD).
- ДИС** — диссоциация индуцированная соударениями (Collisionally Induced Decomposition, CID)
- ДЗЭ** — диссоциация при захвате электрона (Electron Capture Dissociation, ECD)
- ДПЭ** — диссоциации при переносе электрона (Electron Transfer Dissociation, ETD)
- ДОЭ** — диссоциация при отрыве электрона (Electron Detachment Dissociation, EDD)
- ЖХ/МС** — жидкостная хроматография/масс-спектрометрия
- ДИЭ** — диссоциация при ионизации электронами (Electron Ionization Dissociation, EID)
- ДИЭ** — диссоциация, индуцированная электронами (Electron Induced Dissociation, EID)
- ДЗВЭ** — диссоциация при захвате высокоэнергетических электронов (Hot ECD, HECD)
- ИКМФД** — инфракрасная мультифотонная диссоциация (Infra Red Multi Photon Dissociation, IRMPD)
- ИФА** — иммуноферментный анализ

- МАЛДИ** — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)
- МС/МС** — тандемная масс-спектрометрия  
— Метод точных масс и времен удерживания (Accurate Mass and Time tags, AMT)
- РВИ** — распад в источнике (In-Source Decay, ISD)
- РПИ** — распад за пределами источника (Post Source Decay, PSD)
- ТСХ** — тонкослойная хроматография
- УФФД** — ультрафиолетовая фотодиссоциация при  $\lambda = 157$  нм (UV Photodissociation at  $\lambda = 157$  nm)
- ФСДИС** — фемтосекундная ионизация/диссоциация, индуцированная лазером (Femtosecond Laser-Induced Ionization/Dissociation, fs-LID)
- ФТГ** — фенилтиогидантоиновое производное аминокислоты
- ИЭР** — ионизация электрораспылением (Electrospray Ionization, ESI).
- CIRCA** — Combination of Infrared and Collisional Activation
- ERPA** — Extended Range Proteomic Analysis — протеомный анализ в расширенном диапазоне
- HECD** — Hot ECD диссоциация при захвате высокоэнергетических электронов
- ICAT** — Isotope-Coded Affinity Tag
- iTRAQ** — Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
- NETD** — Negative Electron Transfer Dissociation
- PSAQ** — Protein Standard for Absolute Quantitation
- SILAC** — Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
- SISCAPA** — Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies
- TMPP-Ac** — N-концевые трис(2,4,6-триметоксифенил)фосфониевые производные
- TMT** — Tandem Mass Tag

## Введение

Пептиды (греч. *παιτος* — питательный) — семейство веществ, молекулы которых построены из остатков  $\alpha$ -аминокислот, соединенных в цепь пептидными (амидными) связями  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$  (рис. 1). Первый синтетический пептид получил Т. Курциус в 1881 г., а термин «пептид» предложен Э. Фишером, который к 1905 г. разработал общий метод синтеза этих соединений. Не существует строгого различия между пептидами и белками. Считается, что белки представляют собой пептиды с большой массой и возможной вторичной и третичной структурой. Обычно природные полипептиды с молекулярной массой более 5–6 тысяч Да (иногда 2–3 тысяч Да) называют белками. Эта граница между белками и пептидами удивительным образом совпадает с современными возможностями масс-спектрометрии. Первичная структура (последовательность аминокислотных звеньев) не изучавшихся ранее пептидов может быть установлена в результате прямого масс-спектрометрического анализа исходных молекул. Для новых белков это пока очень сложно (см. Протеомика «сверху-вниз», «top down», раздел 5.1.2), а положительный результат (определение полной последовательности аминокислот) не гарантирован. Часто используется дополнительное расщепление белковых молекул в результате химических или энзиматических реакций на более мелкие фрагменты, которые уже изучаются с помощью масс-спектрометрии.

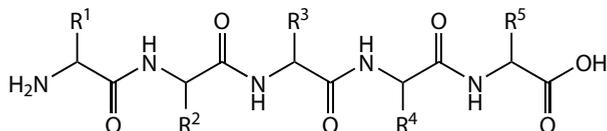


Рис. 1.1. Структурная формула пентапептида.

Аминокислотный остаток пептида, несущий свободную аминогруппу, называется N-концевым, а несущий свободную карбоксильную группу — C-концевым. Название пептида образуется из названия входящих в его состав аминокислотных остатков, перечисляемых последовательно, начиная с N-концевого. При этом используют тривиальные названия аминокислот, в которых окончание «ин» заменяется на «ил». Исключением является C-концевой остаток, название которого совпадает с названием соответствующей аминокислоты. Нумерация аминокислотных остатков осуществляется с N-конца. Для записи первичной структуры пептида (аминокислотной последовательности) используют трехбуквенные и однобуквенные обозначения аминокис-

лотных остатков (например, ASDFG — аланил–серил–аспарагил–фенилаланил–глицин). Эти обозначения, а также структуры и массы аминокислотных остатков самых распространенных природных  $\alpha$ -аминокислот представлены в табл. 4.1. Теоретически существует бесконечное количество аминокислот, поскольку любое органическое соединение с аминной и карбоксильной группами является аминокислотой.

Помимо аминокислот, выстроенных в цепочку, в структуре пептидов, и тем более белков, могут присутствовать определенные модификации, называемые посттрансляционными. Это общее название химических модификаций белка, синтезированного организмом на основе нуклеотидной последовательности, с образованием новой ковалентной связи. Посттрансляционные модификации существенно увеличивают разнообразие белков. На сегодняшний день известно более двухсот вариантов посттрансляционной модификации белков, и, по всей видимости, модификациям подвергается подавляющее большинство белков, причем, один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям. Реализация в организме той или иной посттрансляционной модификации не может быть установлена на основании расшифрованного генома. Определение типов модификаций, их мест в молекуле белка и условий возникновения является задачей протеомики. Среди простейших модификаций можно отметить окисление метионина до сульфоксида, образование дисульфидной связи между двумя цистеиновыми остатками, ацилирование аминогруппы N-конца или C-амидирование (замена гидроксигруппы на аминогруппу на C-конце).

Одной из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций белков является гликозилирование с образованием гликопептидов (гликопротеинов). В случае N-связанных гликанов углевод присоединен к атому азота боковой цепи остатка аспарагина или аргинина; в O-связанных гликанах углеводный фрагмент присоединен к гидроксигруппам боковых цепей остатков серина, треонина, тирозина или гидроксизина. Под реакцией фосфорилирования белков понимают присоединение фосфатной группы через фосфоэфирную связь (O-фосфорилирование) к гидроксигруппе боковой цепи остатка серина, треонина или тирозина. Фосфорилированный пептид называется фосфопептидом. Среди других наиболее распространенных посттрансляционно модифицированных белков можно выделить сульфопротеины, содержащие в своем составе сульфатную группу и липопротеины, образующиеся при взаимодействии белков с липидами. Образуются также аддукты пептидов с самыми разнообразными органическими и металлоорганическими соединениями, в том числе экотоксикантами. Все эти варианты обусловлены посттрансляционными модификациями в живых организмах или природными, физико-химическими факторами. Следует подчеркнуть, что подробное рассмотрение масс-спектрометрического поведения посттрансляционно моди-

фицированных пептидов и белков не входит в рамки данного пособия. В некоторых разделах будет упоминаться возможность определения места посттрансляционных модификаций с помощью того или иного подхода. Несколько подробнее будет рассмотрена проблема раскрытия дисульфидных связей (раздел 6.5). Для интересующихся вопросами применения масс-спектрометрии для детектирования и установления положения посттрансляционных модификаций можно порекомендовать книгу В. Заикина и Дж. Халкета (*V. Zaikin and J. Halket, 2009*).

Первые масс-спектры аминокислот получил Клаус Биман в 1958 г. (*K. Biemann et al., 1959*) методом ионизации электронами. Основной проблемой Бимана было перевести полярные термолабильные молекулы в газовую фазу и ввести их в ионный источник. С появлением химической ионизации, полевой десорбции и полевой ионизации удалось добиться определенных успехов в анализе простых пептидов. Однако эксперименты были трудоемки, характеризовались плохой воспроизводимостью и часто требовали проведения химической дериватизации исходных соединений для повышения их летучести. Достижения масс-спектрометрии в этой области в 1958–1978 гг. изложены в исчерпывающей монографии Б.В. Розынова (*Б.В. Розынов, 1978*), а варианты дериватизации аминокислот, включая современные, можно найти в книге В. Заикина и Дж. Халкета (*V. Zaikin and J. Halket, 2009*).

Возможности электронной и химической ионизации резко уменьшаются при переходе от аминокислот к пептидам в связи с еще меньшей летучестью и повышенной термолабильностью этих соединений. Для анализа простейших пептидов этими методами используются различные виды дериватизации, включая алкилирование, ацилирование, триметилсилилирование и т.д. (*Б.В. Розынов, 1978; V. Zaikin and J. Halket, 2009*). Тем не менее, по этим спектрам уже можно устанавливать последовательность аминокислотных звеньев (*А.А. Kiryushkin et al., 1971; Б.В. Розынов, 1978; C.V. Bradley et al., 1981*).

# Глава 1 Методы ионизации молекул пептидов и белков

Реальный прорыв в масс-спектрометрии пептидов связан с созданием метода бомбардировки быстрыми атомами в середине 70-х годов XX века (Г.Д. Танцырев, Н.А. Клейменов, 1973; A. Benninghoven et al., 1976). Появилась возможность устанавливать молекулярные массы и последовательность аминокислотных звеньев олигопептидов с массами в тысячу и более Дальтон (D.F. Hunt et al., 1981; C.V. Bradley et al., 1982). Еще через 15 лет с появлением метода ионизации электрораспылением (М.Л. Александров и др., 1984; С.М. Whitehouse et al., 1985) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (М. Karas et al., 1987) масс-спектрометрия стала ключевым методом установления первичной структуры пептидов. Возникает новая наука — протеомика (D.C. Liebler, 2002; R. Aebersold, M. Mann, 2003).

## 1.1. Бомбардировка быстрыми атомами

Основоположителем метода ионизации бомбардировкой быстрыми атомами (ББА, Fast Atom Bombardment, FAB) считают Беннингховена благодаря работе (A. Benninghoven et al., 1976). Тем не менее, Г.Д. Танцырев опубликовал свои результаты исследований с применением этого метода существенно раньше — в 1973 г. (Г.Д. Танцырев, Н.А. Клейменов, 1973).

Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами представлена на рис. 1.1. Для получения пучка атомов используется «атомная пушка», а в качестве ионизирующих частиц — атомы инертных газов. На выход ионов анализируемого вещества существенно влияет атомная масса разогнанных частиц первичного пучка. Например, пучок атомов ксенона эффективнее, чем атомов аргона и, тем более, атомов неона.

Пучок ускоренных атомов с энергией 7–9 кэВ направляется на раствор анализируемого вещества в матрице, нанесенный на металлическую подложку, расположенную на конце штока прямого ввода. Взаимодействуя с веществом, атомы создают интенсивный локальный разогрев, в результате которого молекулы поверхностных слоев отрываются в виде плотного газа, содержащего положительные и отрицательные ионы, а также нейтральные частицы, которые могут ионизироваться непосредственно над поверхностью образца.

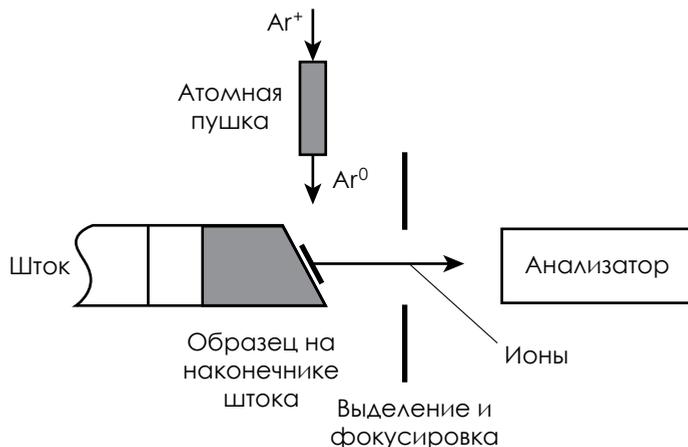


Рис. 1.1. Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами.

Если на штук нанесено сухое вещество, то через короткий промежуток времени наблюдается резкое падение интенсивности пучка генерируемых ионов, так как разрушается поверхностный слой кристаллической решетки вещества. Поэтому используют растворенный образец. Важно, чтобы образец был именно растворен в матрице. Если истинного раствора нет, качество спектров значительно ухудшается. Помочь может добавление солиобилизаторов. Диффузия в жидкой матрице протекает достаточно быстро для того, чтобы обеспечить постоянную концентрацию молекул образца на поверхности. В этом случае пучки ионов образца достаточной интенсивности могут генерироваться в течение длительного времени ( $> 20$  мин). В качестве растворителя (матрицы) используется широкий круг мало летучих соединений; чаще других — глицерин и *m*-нитробензиловый спирт.

Хотя важнейшим достоинством ББА является возможность получать масс-спектры высокомолекулярных соединений, это не такой мягкий метод ионизации, как полевая десорбция или электрораспыление. Бомбардировка образца быстрыми атомами обеспечивает передачу молекулам энергии в широком диапазоне. В результате, наряду с пиками молекулярных ионов в спектре наблюдаются интенсивные пики осколочных и перегруппировочных ионов, что позволяет в ряде случаев не прибегать к тандемной масс-спектрометрии для изучения фрагментации и структуры анализируемых молекул.

Масс-спектры ББА характеризуются четноэлектронными ионами типа  $MH^+$  и  $[M-H]^-$ , но не  $M^{2+}$  и  $M^-$ . Отчасти это является результатом ионно-молекулярных реакций, протекающих в плазме над поверхностью образца, отчасти перенос протона происходит еще в жидкой матрице. Использование в качестве растворителя материалов с большей основностью приводит к образованию ионов  $[M + \text{матрица}]^+$ . Качество спектров можно повышать добавка-

ми, вызывающими образование ионов непосредственно в жидкой фазе. Добавки кислот приводят к увеличению интенсивности пиков в спектрах положительных ионов соединений с центрами основности, а добавки щелочей используются для увеличения выхода отрицательных ионов в спектрах соединений с кислотными группами. В частности, полипептиды с избытком основных аминокислот (*K.L. Busch et al., 1982*) характеризуются спектрами положительных ионов с интенсивными пиками  $MH^+$ . В спектрах полипептидов с избытком кислотных групп интенсивность этого пика мала, тогда как пики депротонированных молекул, напротив, весьма интенсивны. Иногда полезно добавлять к образцу неорганические соли. Например, добавка  $NaCl$  к образцам полипептидов или олигосахаридов в глицериновой матрице (*M. Barber et al., 1982*) приводит к образованию интенсивных пиков ионов  $[M+Na]^+$ .

Бомбардировка быстрыми атомами позволяет надежно устанавливать величины  $m/z$  молекулярного и фрагментных ионов. Время анализа невелико. Однако поскольку диапазон регистрируемых масс обычно не превышает 2000 Да, а для анализа необходимо иметь не менее 100 пикомолей чистого образца, он может применяться только для анализа олигопептидов, причем предварительно очищенных. *m*-Нитробензиловый спирт оказался наилучшей матрицей для этой цели. В качестве растворителя образца используют смесь воды и ацетонитрила с возможными добавками метанола, уксусной и трифторуксусной кислот. Хотя ББА не является «мягким» методом ионизации, и в обычном масс-спектре наблюдается представительный ряд пиков фрагментных ионов, для целей определения последовательности аминокислотных звеньев в пептиде лучше использовать тандемную масс-спектрометрию. В качестве иона предшественника выбирается протонированная молекула пептида, фрагментация которой инициируется соударениями с атомами инертного газа (см. далее «Методы иницирования фрагментации молекулярных ионов», раздел 4.3). С широким внедрением в практику методов матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и ионизации электрораспылением бомбардировка быстрыми атомами используется все реже, а большинство коммерческих масс-спектрометров выпускается уже без соответствующих опций.

## 1.2. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) впервые описан во второй половине 80-х годов прошлого века (*M. Karas et al., 1985; M. Karas et al., 1987; K. Tanaka et al., 1988*). Основные достижения в разработке этого метода

принадлежат Ф. Хилленкампу и М. Карасу. В 1988 г. были опубликованы результаты анализа белков с массами до 70 000 Да (*M. Karas, F. Hillenkamp, 1988*), а в 1990 г. — уже до 116 000 Да (*B. Spengler, R.S. Cotter., 1990*). Рекордные для масс-спектрометрии массы однозарядных ионов в несколько миллионов Дальтон (*F. Hillenkamp et al., 2002*) были зарегистрированы именно с помощью матрично активированной лазерной десорбции/ионизации. Одному из первооткрывателей метода Коичи Танаке (*K. Tanaka*) в 2002 г. присуждена Нобелевская премия в области химии.

Метод МАЛДИ обладает высочайшей чувствительностью (уровень атто- ( $10^{-18}$ ) и зепто- ( $10^{-21}$ ) молей), не требует сложной пробоподготовки и позволяет работать с гетерогенными образцами. Одной из разновидностей МАЛДИ, методом десорбционной ионизации с кремния (Desorption/Ionization on Silicon, DIOS), установлен абсолютный рекорд чувствительности любого аналитического метода. Пик молекулярного иона дез-Arg<sup>9</sup>-брадикинина с изотопным расщеплением зарегистрирован для 800 йоктомолей (480 молекул) этого пептида (*S.A. Trauger et al., 2004*). Повторить этот результат пока никому не удалось, но регистрация аналитов в зептомолярных ( $10^{-21}$ ) количествах описана многими исследователями.

Метод позволяет установить молекулярную массу пептида или белка в сотни тысяч Дальтон с точностью 0.5–0.01%. Для него характерны протонированные молекулы  $MH^+$  и аддукты с катионами щелочных металлов. В спектрах неочищенных от солей образцов пики ионов  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$  часто имеют более высокую интенсивность, чем  $MH^+$ . Метод удобен для скринингового анализа, например, для установления молекулярных масс протеолитических пептидов в смеси после энзиматического расщепления белка. Особенностью метода является образование, прежде всего, однозарядных ионов. Интенсивности пиков двух- и трехзарядных ионов существенно ниже (рис. 1.2). Тем не менее, с увеличением молекулярной массы образца до  $10^5$ – $10^6$  Да наблюдаются и многозарядные ионы (*Y. Cai et al., 2002*). Образованию многозарядных ионов способствует также использование неметаллических подложек (*V. Frankevich et al., 2003*) или источников МАЛДИ с высоким давлением (*P.B. O'Connor, C.E. Costello, 2001*).

Теория МАЛДИ объясняет преимущественное наблюдение однозарядных ионов реакциями первичных многозарядных ионов с нейтральными молекулами матрицы, электронами и анионами в зоне шлейфа (*M. Karas et al., 2000*). Поскольку эти процессы эффективнее, когда в них вовлечены многозарядные ионы, выживают, в основном, именно однозарядные.

Важнейшими варьируемыми параметрами метода являются природа матрицы, количественное соотношение матрица/анализируемое соединение, длина волны, долгота импульса и мощность лазерного излучения, способ пробоподготовки и т.д. (*F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, 2007*).