

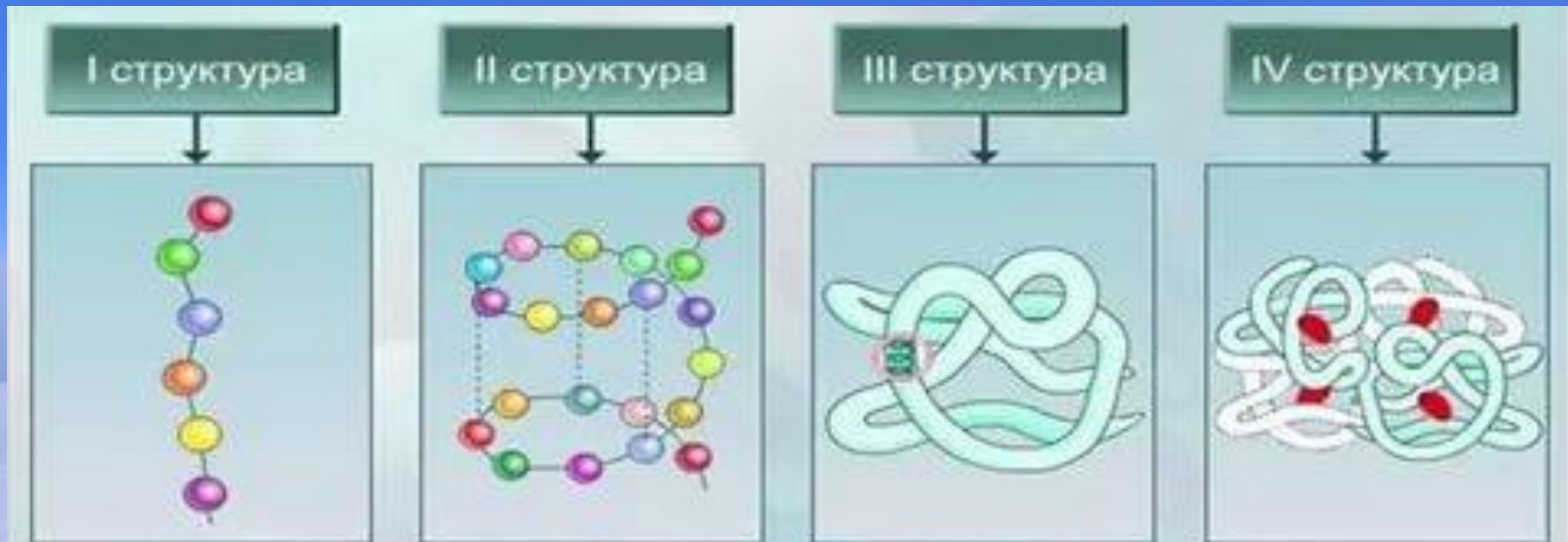
**Секвенирование белков.
Протеомные технологии.
Масс-спектрометрия, ее
разновидности. Пептидный
фингерпринтинг как
диагностическая технология.**

Корсакова И.И.

Каждая живая клетка содержит белки, которые имеют большое значение для всех биологических процессов.

Структура белков очень сложная и включает несколько уровней организации.

Установление структуры белков позволяет определить его функции и механизм работы, является важным инструментом понимания внутриклеточных процессов и позволяет разрабатывать лекарства и другие методы воздействия на работу клеток.

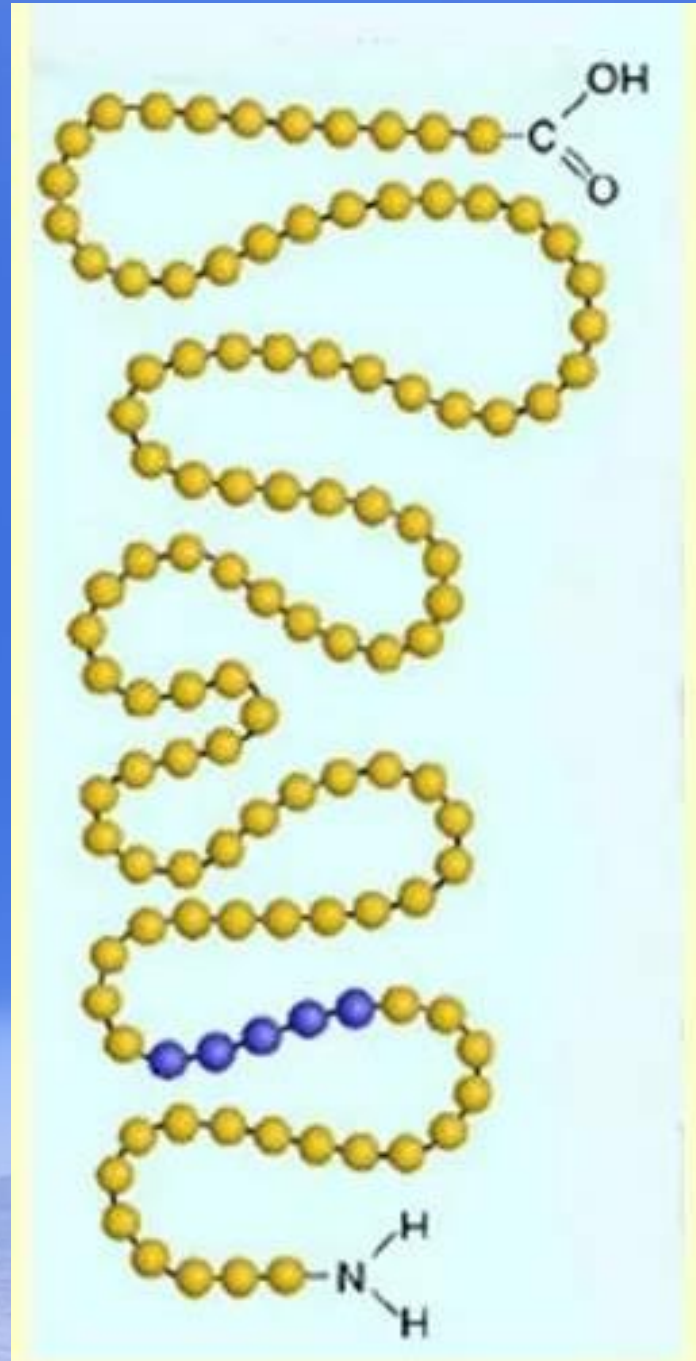


Аминокислотные остатки в пептидной цепи белков чередуются не случайным образом, а расположены в определённом порядке.

Линейную последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называют **первичной структурой белка.**

Первичная структура каждого индивидуального белка закодирована в участке ДНК, называемом геном. В процессе синтеза белка информация, находящаяся в гене, сначала переписывается на мРНК, а затем, используя мРНК в качестве матрицы, на рибосоме происходит сборка первичной структуры белка.

Каждый из 50 000 индивидуальных белков организма человека имеет уникальную для данного белка первичную структуру. Все молекулы данного индивидуального белка имеют одинаковое чередование аминокислотных остатков в белке, что в первую очередь отличает данный индивидуальный белок от любого другого.



Методы изучения первичной структуры белка

Изучение первичной структуры белков имеет важное общебиологическое и медицинское значение. Изучая порядок чередования аминокислотных остатков в индивидуальных белках и сопоставляя эти знания с особенностями пространственного расположения молекулы, можно выявить общие фундаментальные закономерности формирования пространственной структуры белков. Кроме того, многие генетические болезни - результат нарушения в аминокислотной последовательности белков. Информация о первичной структуре нормального и мутантного белка может быть полезна для диагностики и прогнозирования развития заболевания.

Первичная структура белка определяется:

- 1. Природой входящих в молекулу аминокислот.**
- 2. Относительным количеством каждой аминокислоты.**
- 3. Строго определенной последовательностью аминокислот в полипептидной цепи.**

Секвенирование белков (от англ. *Protein sequencing* — «определение последовательности») — набор методов установления первичной структуры белков.

Установление первичной структуры белков включает 2 основных этапа:

- определение аминокислотного состава изучаемого белка;
- определение аминокислотной последовательности в белке.

Секвенирование полипептидов

Основные этапы:

- 1) Расщепление белка на несколько фрагментов длиной, доступной для секвенирования.
- 2) Секвенирование каждого из полученных фрагментов.
- 3) Сборка полной структуры белка из установленных структур его фрагментов

Предварительные исследования перед определением первичной структуры белка

- 1. Очистка белка.**
- 2. Определение молекулярной массы.**
- 3. Определение типа и числа простетических групп (небелковых (неаминокислотных) компонентов сложных белков, необходимых для биологической активности белка).**
- 4. Определение наличия внутри- или межмолекулярных дисульфидных связей. Обычно одновременно определяют наличие в нативном белке сульфгидрильных групп.**
- 5. Предварительная обработка белков, обладающих четвертичной структурой, с целью диссоциации субъединиц, их выделения и последующего изучения.**

Стадии определения первичной структуры белков и полипептидов

- 1. Определение аминокислотного состава (гидролиз, аминокислотный анализатор).**
- 2. Идентификация N- и C-концевых аминокислот.**
- 3. Расщепление полипептидной цепи на фрагменты (трипсин, химотрипсин, бромциан, гидроксилламин и др.).**
- 4. Определение аминокислотной последовательности пептидных фрагментов (секвенатор).**
- 5. Расщепление исходной полипептидной цепи другими способами и установление аминокислотной последовательности фрагментов.**
- 6. Установление порядка расположения пептидных фрагментов по перекрывающимся участкам (получение пептидных карт).**

Определение аминокислотного состава белка

Первый этап в определении первичной структуры белков заключается в качественной и количественной оценке аминокислотного состава данного индивидуального белка. Необходимо помнить, что для исследования нужно иметь определённое количество чистого белка, без примесей других белков или пептидов.

Кислотный гидролиз белка

Для определения аминокислотного состава необходимо провести разрушение всех пептидных связей в белке. Анализируемый белок гидролизуют в 6 М HCl при температуре около 110 °C в течение 24 ч.

В результате такой обработки разрушаются пептидные связи в белке, а в гидролизате присутствуют только свободные аминокислоты.

Кроме того, глутамин и аспарагин гидролизуются до глутаминовой и аспарагиновой кислот (т.е. разрывается амидная связь в радикале и от них отщепляется аминогруппа).

Определение аминокислотного состава белка

Разделение аминокислот с помощью ионообменной хроматографии

Смесь аминокислот, полученных кислотным гидролизом белков, разделяют в колонке с катионообменной смолой. Такая синтетическая смола содержит прочно связанные с ней отрицательно заряженные группы (например, остатки сульфоновой кислоты $-SO_3^-$), к которым присоединены ионы Na^+ .

В катионообменник вносят смесь аминокислот в кислой среде (рН 3,0), где аминокислоты в основном представляют катионы, т.е. несут положительный заряд. Аминокислоты присоединяются к отрицательно заряженным частицам смолы. Чем больше суммарный заряд аминокислоты, тем прочнее её связь со смолой.

Высвобождение аминокислот из колонки осуществляют вымыванием (элюированием) их буферным раствором с увеличивающейся ионной силой (т.е. с увеличением концентрации $NaCl$) и рН. При увеличении рН аминокислоты теряют протон, в результате уменьшается их положительный заряд, а следовательно и прочность связи с отрицательно заряженными частицами смолы.

Каждая аминокислота выходит из колонки при определённом значении рН и ионной силы. Собирая с колонки раствор (элюат) в виде небольших порций, можно получить фракции, содержащие отдельные аминокислоты.

Определение аминокислотного состава белка

Количественный анализ полученных фракций

Количество каждой из аминокислот в данном белке определяют, нагревая отдельные фракции аминокислот с нингидрином, образующим соединение красно-фиолетового цвета. Интенсивность окраски в пробе пропорциональна количеству находящейся в ней аминокислоты, поэтому по спектрофотометрическому измерению света, поглощённого нингидриновыми производными, можно определить содержание каждой аминокислоты в гидролизате данного белка. В настоящее время процесс разделения и количественного определения аминокислот в гидролизате белка полностью автоматизирован и осуществляется в специальном приборе - аминокислотном анализаторе.



Определение аминокислотной последовательности в белке

Методы определения N-концевых аминокислот

1. Метод Сенгера.
2. Метод Эдмана (реализован в секвенаторе).
3. Реакция с дансилхлоридом.
4. Метод с применением аминопептидазы.

Метод Эдмана

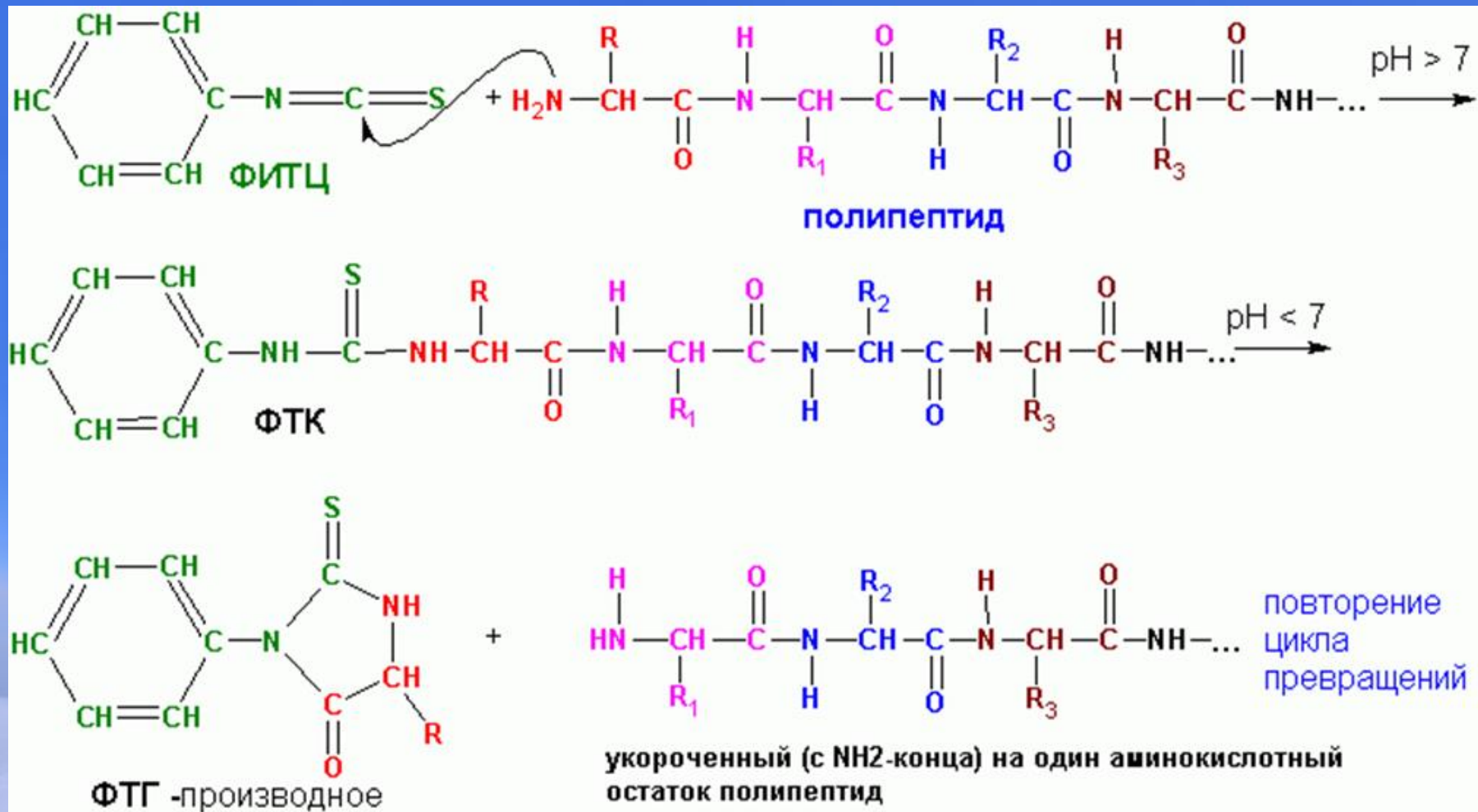
Фенилизотиоционат (ФИТЦ) - реагент, используемый для определения N-концевой аминокислоты в пептиде. Он способен реагировать с α -аминогруппой и α -карбоксильной группой свободных аминокислот, а также с N-концевой аминокислотой в пептидах.

В результате взаимодействия с N-концевой аминокислотой полипептида образуется фенил-тиогидантионое производное, в котором дестабилизирована пептидная связь между α -карбоксильной группой N-концевой аминокислоты и α -аминогруппой второй аминокислоты в пептиде. Эта связь избирательно гидролизуется без повреждения других пептидных связей.

После реакции выделяют комплекс ФИТЦ-АК1, идентифицируют его хроматографическими методами. ФИТЦ можно использовать вновь с укороченным пептидом, полученным в предыдущем цикле, для определения следующей аминокислоты.

Определение аминокислотной последовательности в белке

Метод Эдмана



Определение аминокислотной последовательности в белке

Метод Эдмана

Процесс ступенчатого расщепления пептида с N-конца был автоматизирован и реализован в приборе - секвенаторе, с помощью которого можно определять последовательность аминокислотных остатков в олигопептидах, состоящих из 10-20 аминокислот.

Многие полипептиды имеют первичную структуру, состоящую более чем из 100 аминокислот. Так как с помощью секвенаторов наиболее продуктивно определяют аминокислотную последовательность лишь небольших пептидов, молекулы полипептида расщепляют по специфическим местам на фрагменты.

Используя несколько разных расщепляющих агентов (ими могут быть ферменты или химические вещества) в разных пробах очищенного полипептида, можно получить частично перекрывающиеся друг друга фрагменты с установленной аминокислотной последовательностью. С их помощью можно воссоздать правильный порядок фрагментов и получить полную последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

Определение аминокислотной последовательности в белке

Аминокислотный секвенатор



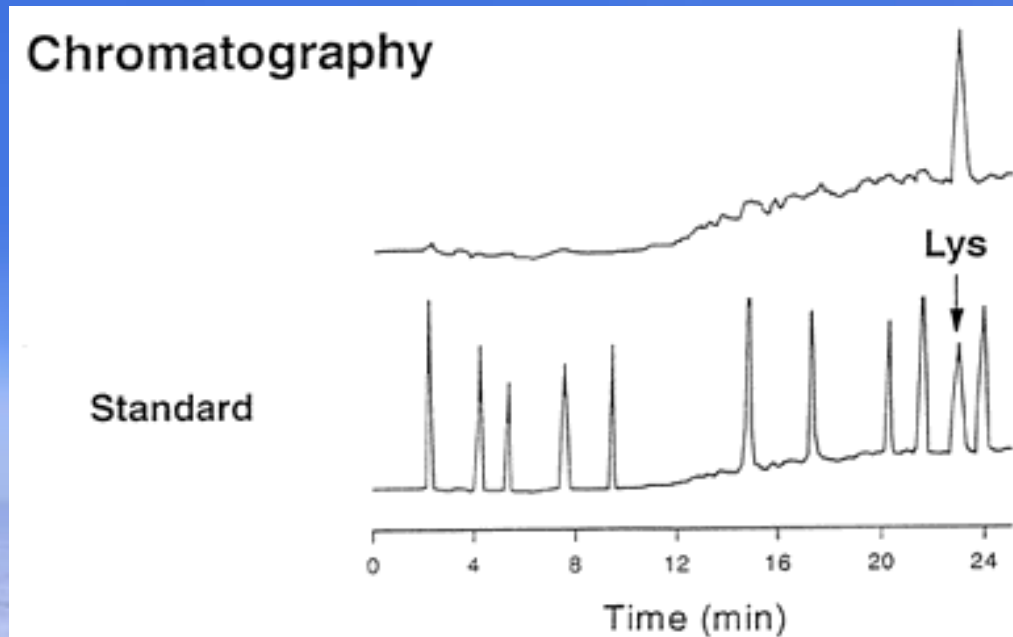
Определение аминокислотной последовательности в белке

Методы определения С-концевых аминокислот

1. Метод Акабори.
2. Метод с применением карбоксипептидазы.
3. Метод с применением боргидрида натрия.

Метод с применением карбоксипептидазы

Обработка полипептида карбоксипептидазой, которая разрывает пептидную связь с того конца пептида, где содержится свободная COOH -группа, приводит к освобождению С-концевой аминокислоты, природа которой может быть идентифицирована методом хроматографии.

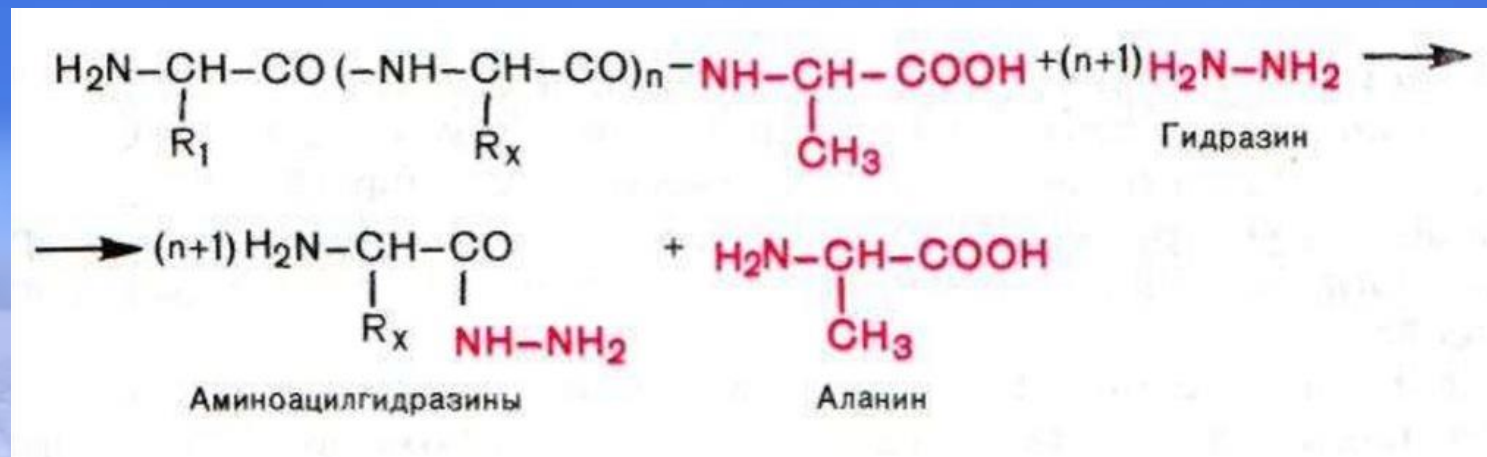


Определение аминокислотной последовательности в белке

Метод Акабори

Это химический метод, который основан на гидразинолизе полипептида в безводной среде при 100 °С.

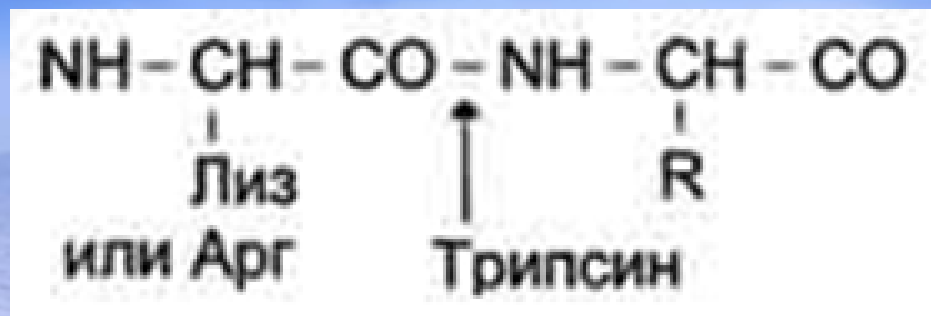
Гидразин, вызывая распад чувствительных к нему пептидных связей полипептида, реагирует со всеми аминокислотами, за исключением С-концевой аминокислоты, поскольку ее карбоксильная группа не участвует в образовании пептидной связи. При этом образуется смесь аминоксилгидразинов и свободной С-концевой аминокислоты. Последнюю после обработки всей смеси ДНФБ отделяют и идентифицируют хроматографически.



Определение аминокислотной последовательности в белке

Ферментативное расщепление полипептида по специфическим участкам

Для специфического расщепления пептидных связей в белке можно использовать несколько разных ферментов. Наиболее широко используют ферментативный гидролиз полипептида протеолитическим ферментом - трипсином, который относят к группе пищеварительных ферментов (его вырабатывает поджелудочная железа). Фермент обладает высокой специфичностью действия. Он расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвует карбоксильная группа остатков лизина или аргинина. Исходя из установленного количества остатков лизина и аргинина, можно предсказать количество получаемых при гидролизе трипсином фрагментов. Так, если в полипептидной цепи 6 остатков аргинина и лизина, то при расщеплении трипсином можно получить 7 фрагментов. Затем в каждом фрагменте устанавливают аминокислотную последовательность.



Определение аминокислотной последовательности в белке

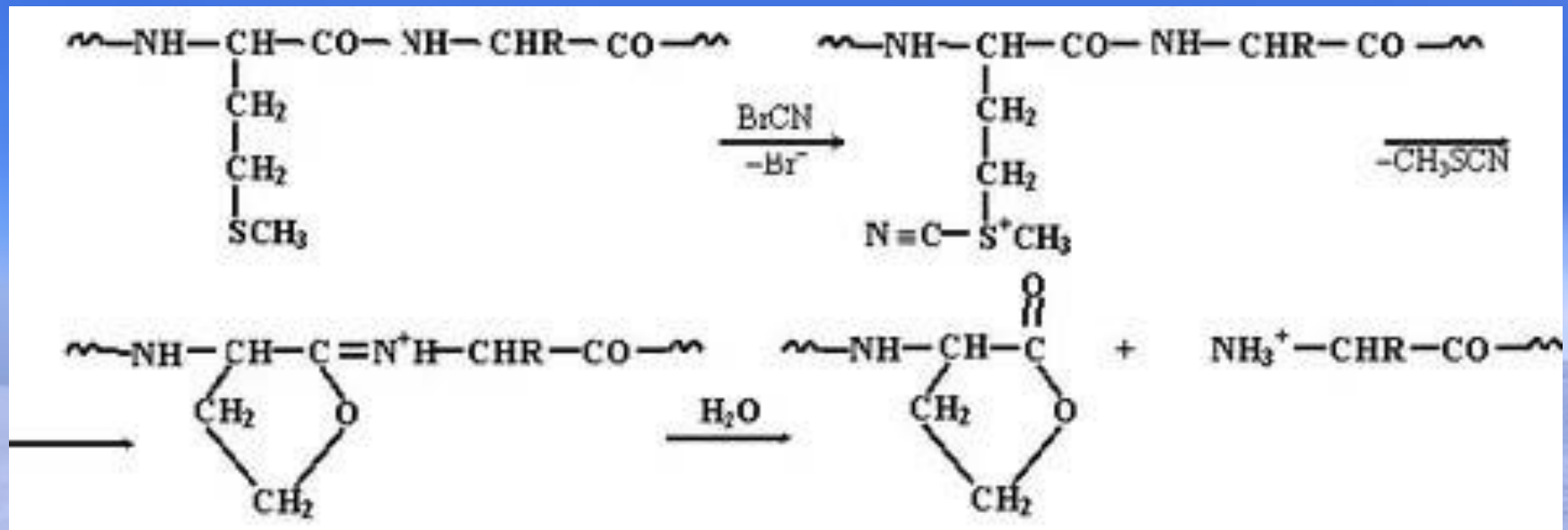
Ферментативное расщепление полипептида по специфическим участкам



Определение аминокислотной последовательности в белке

Химическое расщепление полипептида по специфическим участкам

В некоторых случаях предпочтителен не ферментативный, а химический гидролиз. Так, реагент бромциан расщепляет только пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит остатку метионина. Зная количество остатков метионина в полипептидной цепи, легко установить количество получаемых фрагментов. Далее для каждого фрагмента в секвенаторе также устанавливают аминокислотную последовательность.



Определение аминокислотной последовательности в белке

Получение аминокислотной последовательности полипептида с помощью перекрывающихся фрагментов

Для успешного установления последовательности полученных фрагментов полипептида необходимо получить пептиды с перекрывающимися аминокислотными последовательностями. Это достигается обработкой отдельных проб данного полипептида разными реагентами, расщепляющими белок в разных местах.

Необходимо провести столько расщеплений, чтобы получить набор пептидов, обеспечивающих перекрывание всех участков, необходимых для определения последовательности исходного полипептида.



Протеомные технологии

По мере стремительного увеличения числа новых генов, все более очевидным становится недостаток имеющихся данных об их функциях и, прежде всего, о функциональной значимости тех белков, которые они кодируют. Из более 30 тыс. генов, уже идентифицированных на физической карте генома человека, на сегодняшний день изучены в функциональном отношении не более 10 – 11 тыс. Число кодируемых в геноме белков – порядка миллиона. Многообразие белков обусловлено наличием таких сложнорегулируемых процессов, как процессинг мРНК, посттрансляционные модификации и процессинг белков.

Невозможность получения полной информации о составе белков организма с помощью геномики явилось основной предпосылкой развития постгеномных исследований и возникновения новой науки – протеомики, изучающей состав, структуру и функции экспрессированных геномом белков и белковых комплексов.

Протеомика – это системное изучение «протеома», то есть всех белков, синтезирующихся в клетке или другом объекте (органе, организме).

Протеомные технологии

Клетка реагирует на изменения внешней среды изменением протеома (набора белков): в ответ на воздействие синтез одних белков увеличивается, а других уменьшается. Следовательно, протеом отражает информацию о состоянии организма при определенных физиологических условиях и в определенный момент времени. Именно протеом обуславливает в итоге функцию каждой клетки.

В 2001 г. была создана Международная организация по изучению протеома человека HUPO (Human Proteome Organization), а в 2008 г. – одобрен международный исследовательский проект «Протеом человека». В выполнении этого проекта задействованы научные центры всего мира.

Цель данной инициативы – инвентаризация (идентификация и каталогизация) всех белков человека в норме и при патологии, построение белковых атласов клеток, органов и тканей, схем межбелковых взаимодействий, идентификация новых маркеров заболеваний человека.

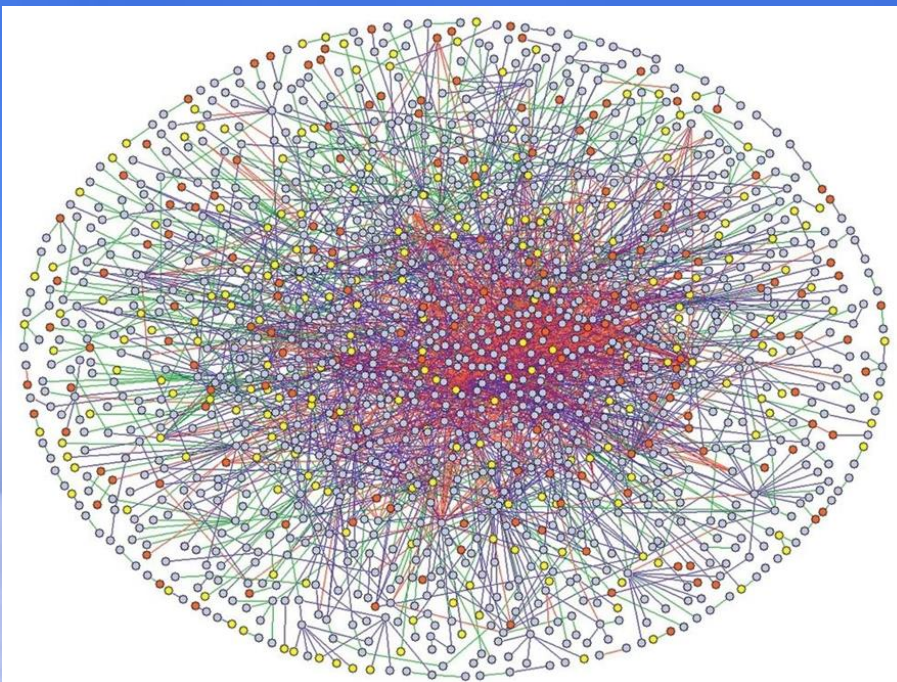
Белковая патология является причиной 98,5% известных заболеваний, 95% всех фармакологических средств адресовано белкам. Следовательно, особый интерес представляют медицинские аспекты реализации протеомных исследований. Поэтому усилия ученых направлены на поиск белков – маркеров заболеваний, имеющих диагностическое и терапевтическое значение, и на разработку новых эффективных диагностических методов и лекарственных средств.

Протеомика (англ. proteomics) — наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также структурно-функциональные свойства белковых молекул.

Ее задачей является идентификация и количественное определение совокупных индивидуальных белков, которые содержатся в биологических образцах (сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча, биоптаты) на разных стадиях развития заболевания, а также на фоне проводимой терапии.

Совокупность всех белков организма, т.е., по сути, его белковый профиль, носит название «протеом».

Протеом человека



Протеом – белковый портрет клетки



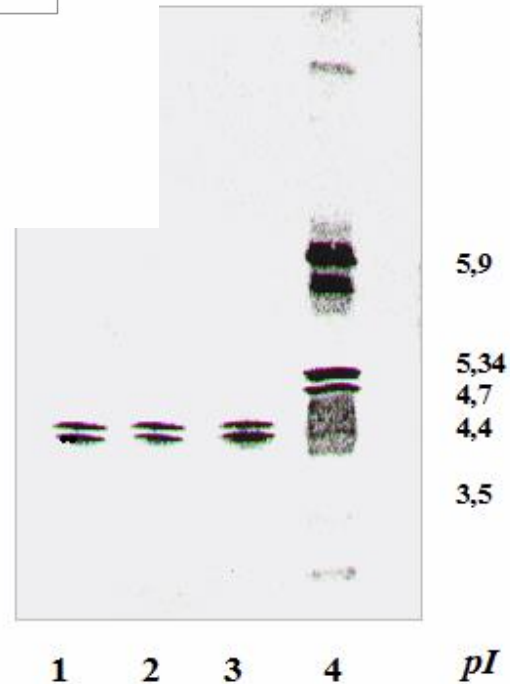
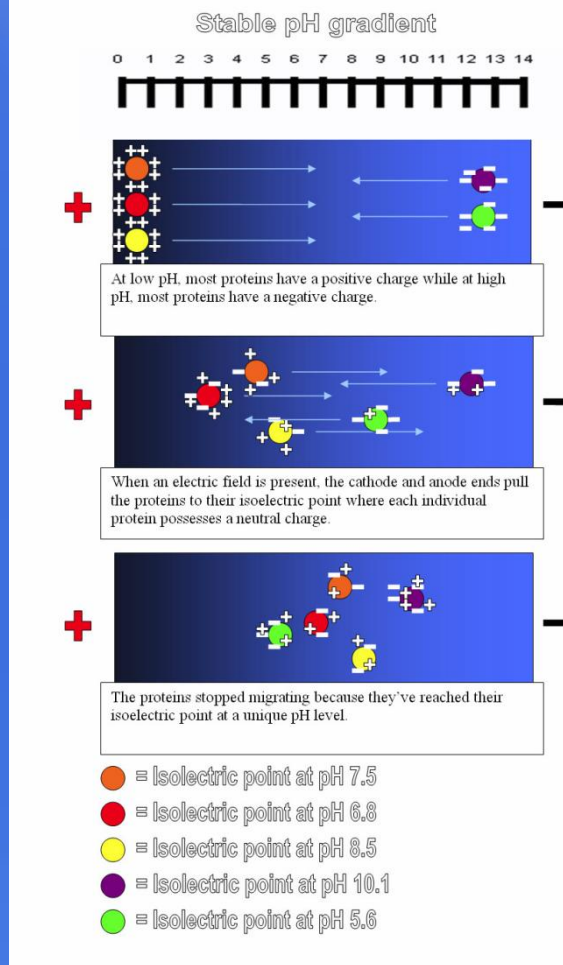
Протеомные технологии

Комплексное изучение «протеома» проводится методами и технологиями, направленными на одновременное разделение, а также последующую идентификацию и анализ всех белков, синтезирующихся в клетке или другом объекте (органе, организме).

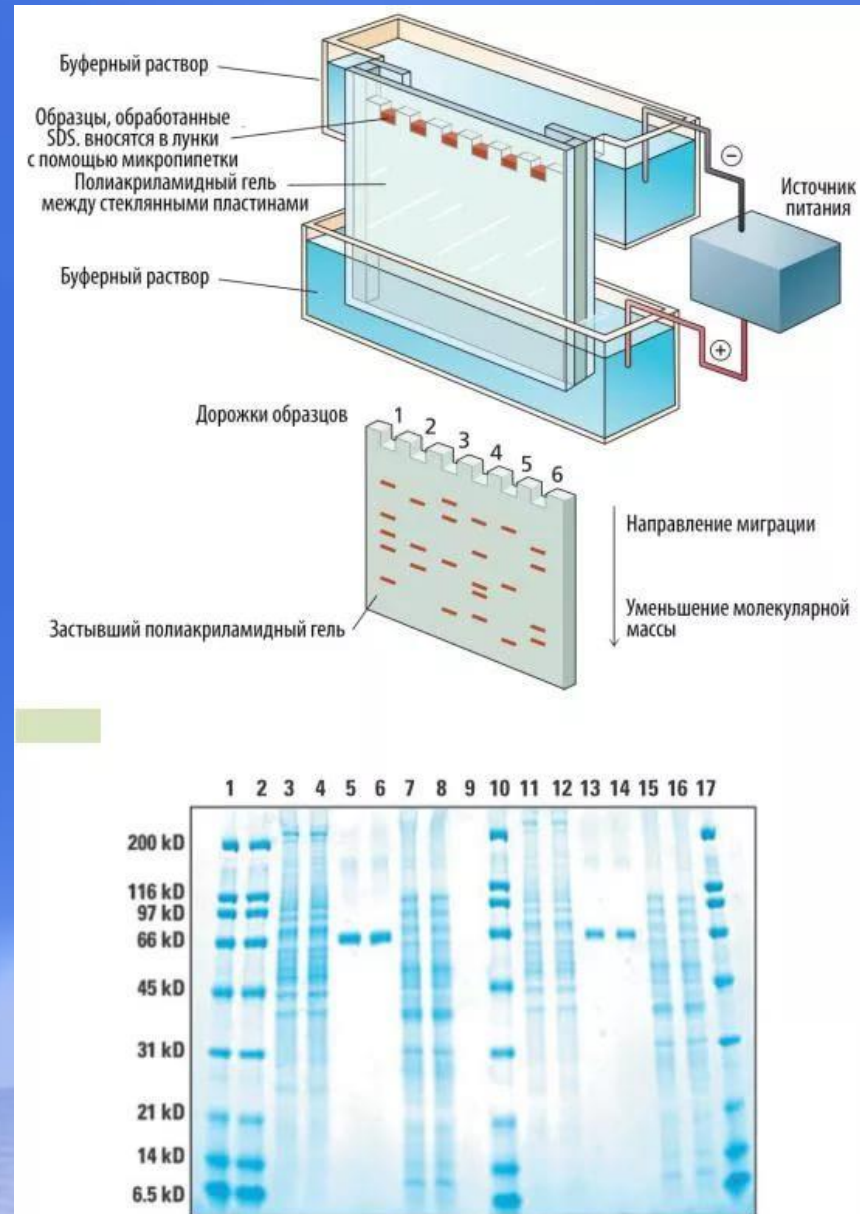
К протеомным технологиям относят ряд методов:

- 1. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ).**
- 2. Вертикальный электрофорез в ПААГ-SDS по Лэмли.**
- 3. Идентификация микросеквенированием.**
- 4. Масс-спектрометрия.**
- 5. Капиллярный электрофорез.**
- 6. Капиллярное изоэлектрофокусирование.**
- 7. Двумерный электрофорез.**
- 8. Жидкостная хроматография высокого давления (HPLC) и высокого разрешения.**
- 9. Методы иммунохимического тестирования с использованием моноклональных антител к индивидуальным антигенным детерминантам.**

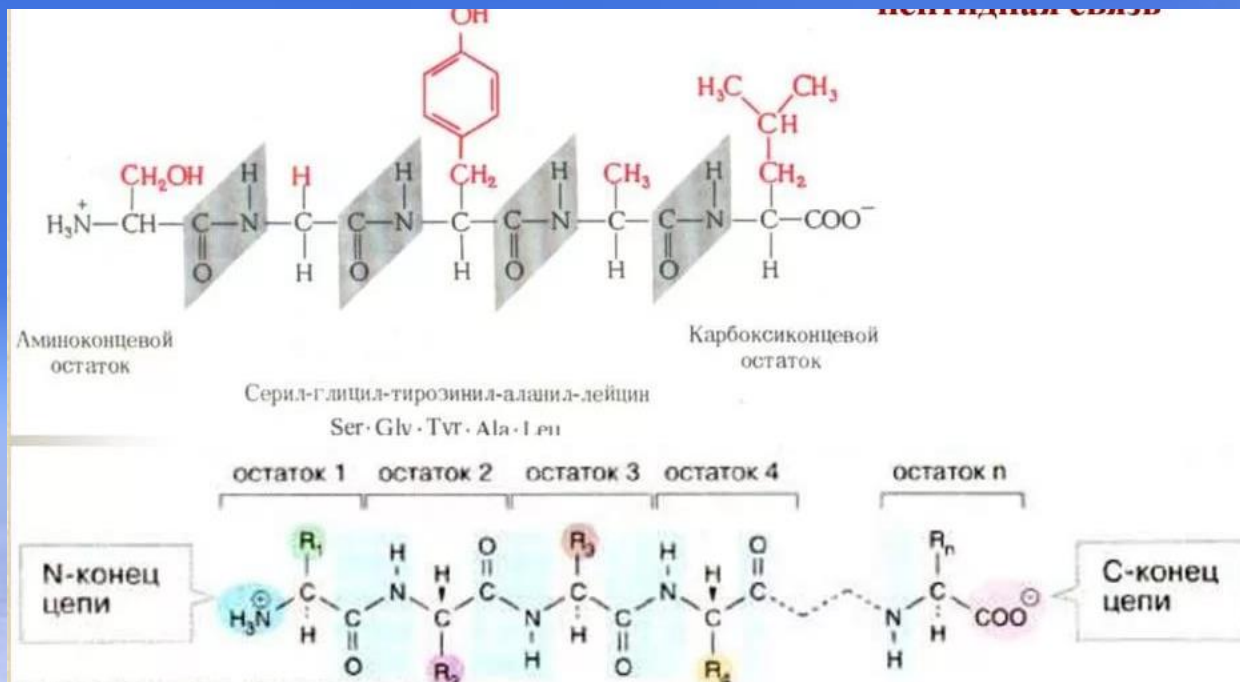
Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) - разработанный в начале 60-х годов метод разделения белков под действием электрического поля в среде с градиентом рН, который создается специальными амфотерными веществами – «амфолитами», способными переносить ток (хорошая проводимость), а также создавать локально и поддерживать рН (хорошая буферная емкость). Появление наборов полиаминополикарбоновых кислот (амфолинов) обеспечило высокую эффективность фракционирования белков с помощью ИЭФ, при этом разделение осуществлялось за счет различий в рI.



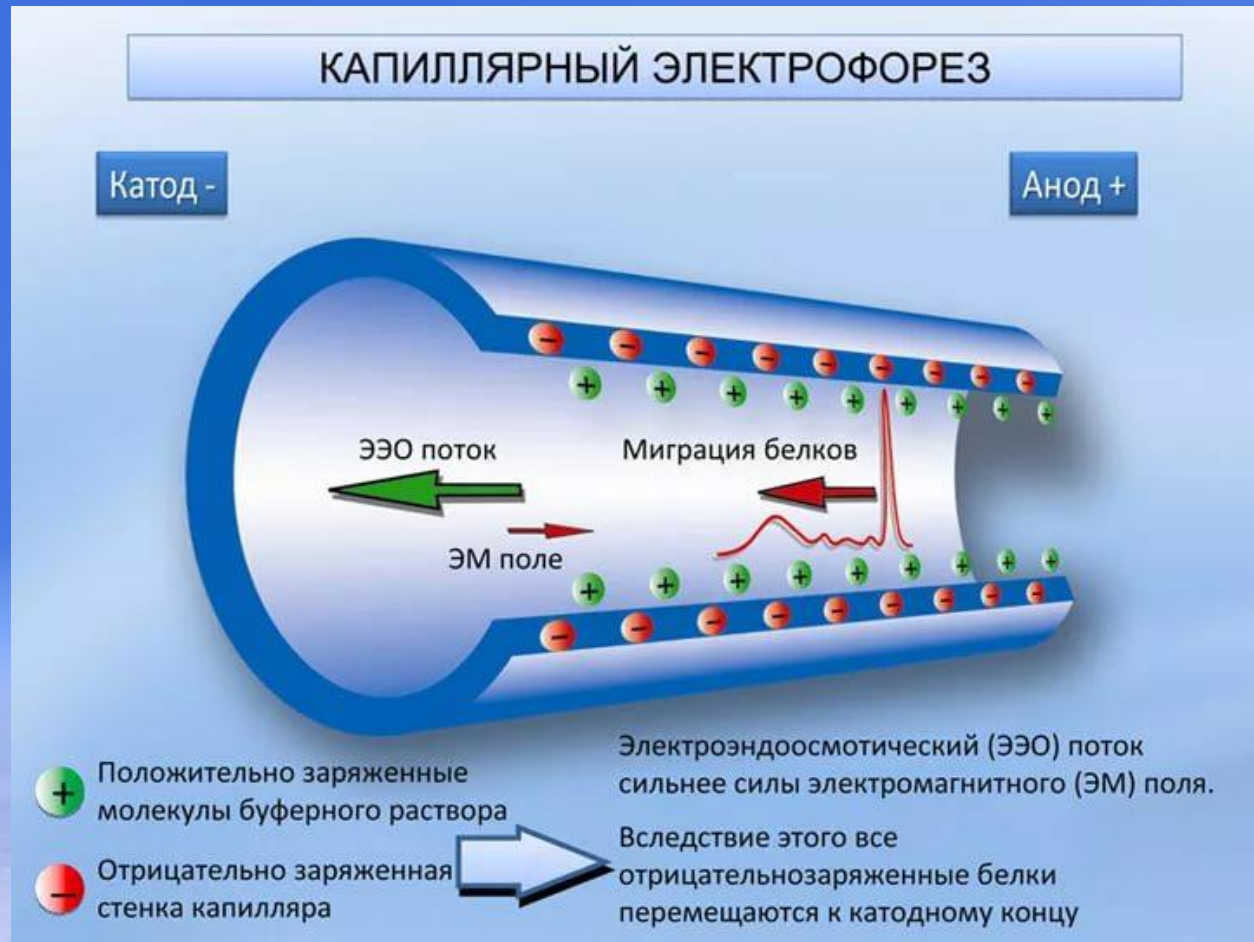
Вертикальный электрофорез по Лэммли с градиентом концентрации полиакриламидного геля и использованием ионного детергента — додецилсульфата Na (ПААГ-SDS). За счет гидрофобных взаимодействий используемый детергент практически одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг SDS на 1 мг белка. Огромный избыток полностью диссоциированных остатков сульфокислоты делает несущественной роль заряда самого белка. Электрофоретическая подвижность комплекса белок-SDS в градиентном геле оказывается линейно связана с десятичным логарифмом его молекулярной массы. Таким образом, эта система обеспечивает разделение белков по различиям в молекулярной массе.



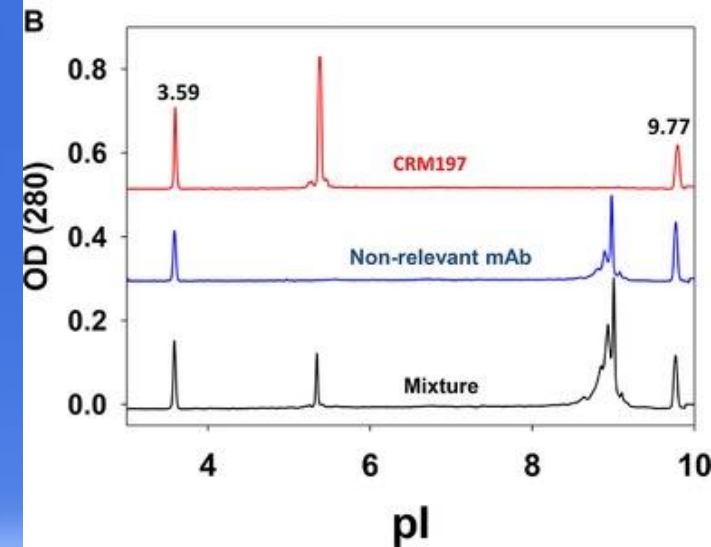
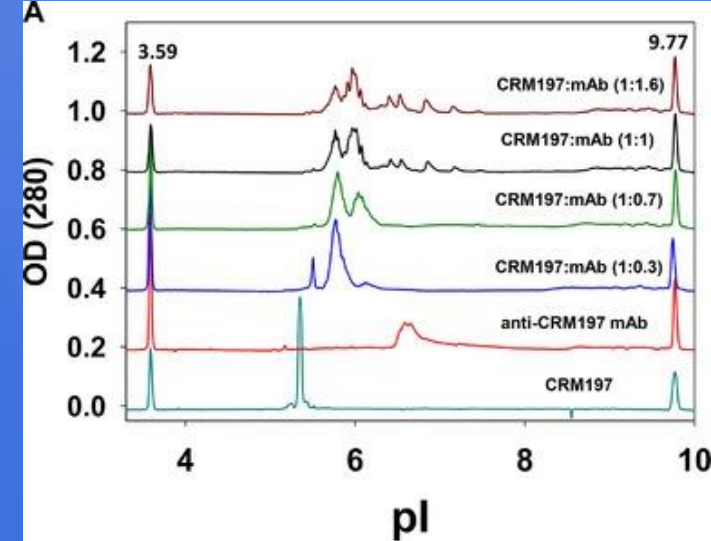
Идентификация микросеквенированием основана на определении (расшифровке) части аминокислотной последовательности белка. Методы микросеквенирования позволяют работать с очень малыми количествами пептидов - вплоть до нанограммовых. Это важно, так как определение даже короткого фрагмента аминокислотной последовательности часто оказывается решающим для идентификации целого белка. В настоящее время возможно как проведение прямого N-концевого секвенирования белка, перенесенного на инертную мембрану, так и секвенирование отдельных пептидов, полученных из изучаемого белка после его ферментативного расщепления и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Микросеквенирование позволяет выявлять одиночные аминокислотные замены в анализируемых белках.



Капиллярный электрофорез - это метод анализа сложных смесей, использующий электрокинетические явления – электромиграцию ионов и других заряженных частиц и электроосмос – для разделения и определения компонентов. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты. Модификацией метода является капиллярный электрофорез в чипах.



**Метод капиллярного
изоэлектрофокусирования сочетает
достоинства капиллярного
электрофореза и
изоэлектрофокусирования.
Проводится в специальных
капиллярах, обладает высокой
разрешающей способностью,
позволяет разделять смеси белков,
пептидов, их различных вариантов
по изоэлектрической точке.
Не требует окраски геля,
полосы непосредственно после
разделения детектируются при 280
нм УФ-датчиком, возможна
автоматизация процесса и
одновременное исследование
большого количества образцов.**



Двумерный электрофорез (2Д электрофорез) позволяет:

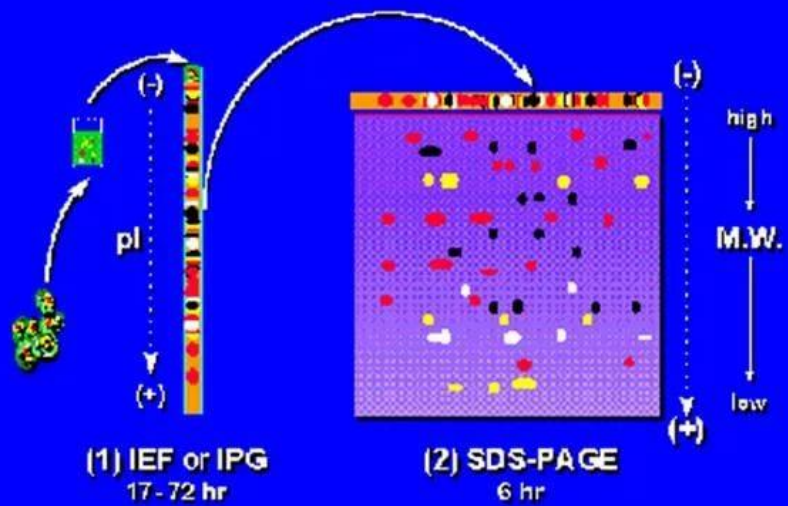
- **обеспечить воспроизводимое разделение основных известных белков, характерных для данной ткани;**
- **показать присутствие известных минорных белков;**
- **выявить и идентифицировать маркерные белки, характеризующие известные изменения в данной ткани.**

При осуществлении 2Д-электрофореза белки разделяют по двум различным физико-химическим свойствам. Вначале белки разделяют в первом направлении по заряду согласно их изоэлектрической точке путем изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), а затем во втором направлении – согласно их молекулярной массе с помощью электрофореза в ПААГ. Обе процедуры проводят в полиакриламидном геле.

В результате проведения 2Д-электрофореза получают электрофореграмму, на которой представлено много пятен белков, которые можно выявлять различными методами окраски.

Результаты представляются в виде стандартизированного описания белков на двумерных электрофореграммах в системе прямоугольных координат, в которых одна из координат является функцией молекулярной массы, а другая – изоэлектрической точкой для каждого вида полипептидных цепей.

Two Dimensional Electrophoresis



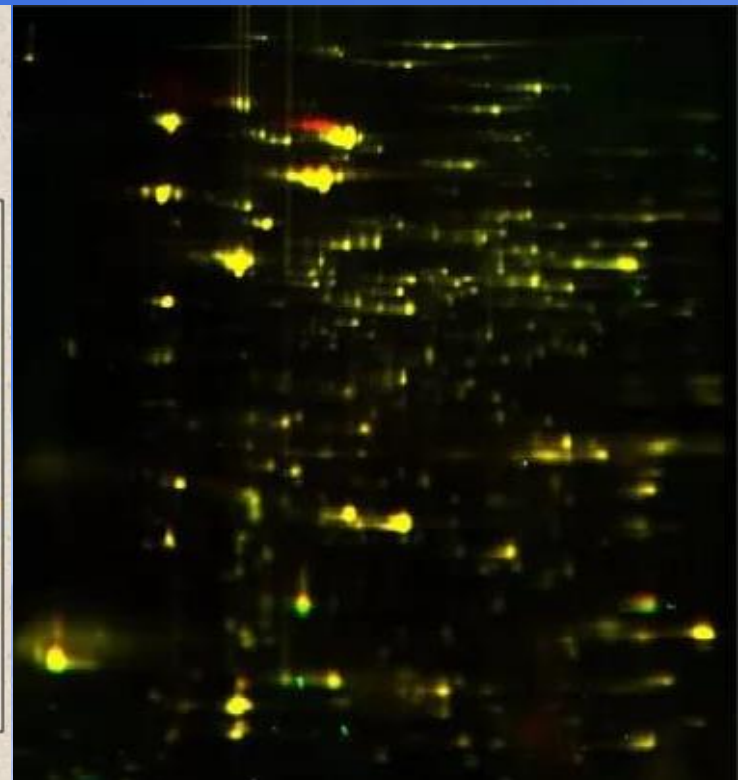
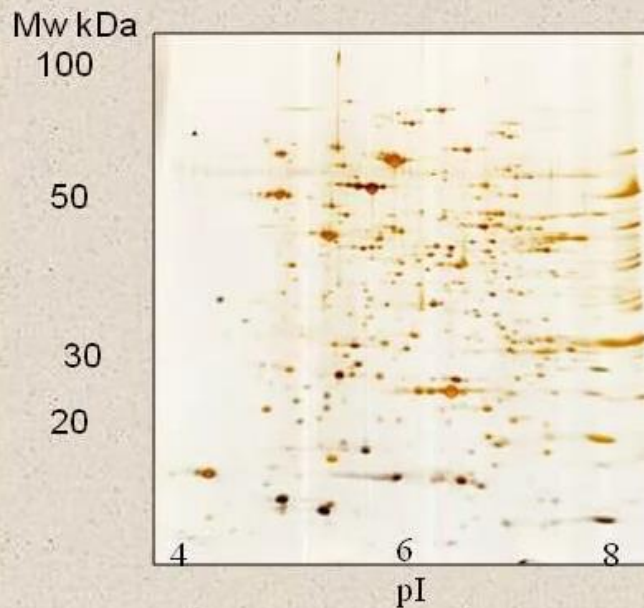
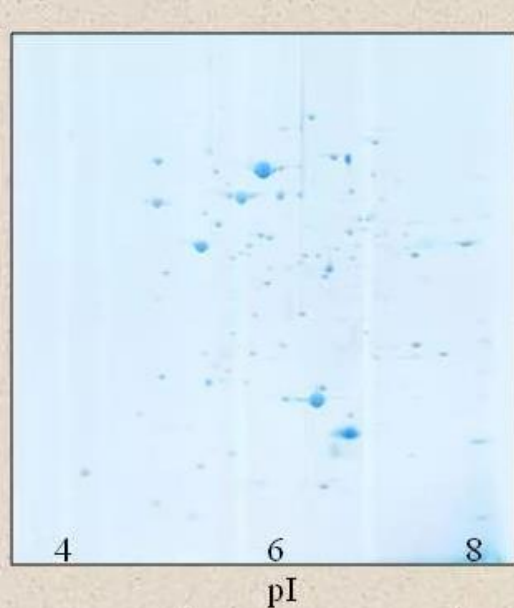
Двумерный электрофорез (2Д электрофорез)

Окраска:

- Кумасси голубым
- Серебром, совместимая с MS анализом
- Серебром, классическая

Чувствительность:

- 50 нг/пятно
- 1 нг/пятно
- 0.1 нг/пятно



Двумерный электрофорез (2Д электрофорез)

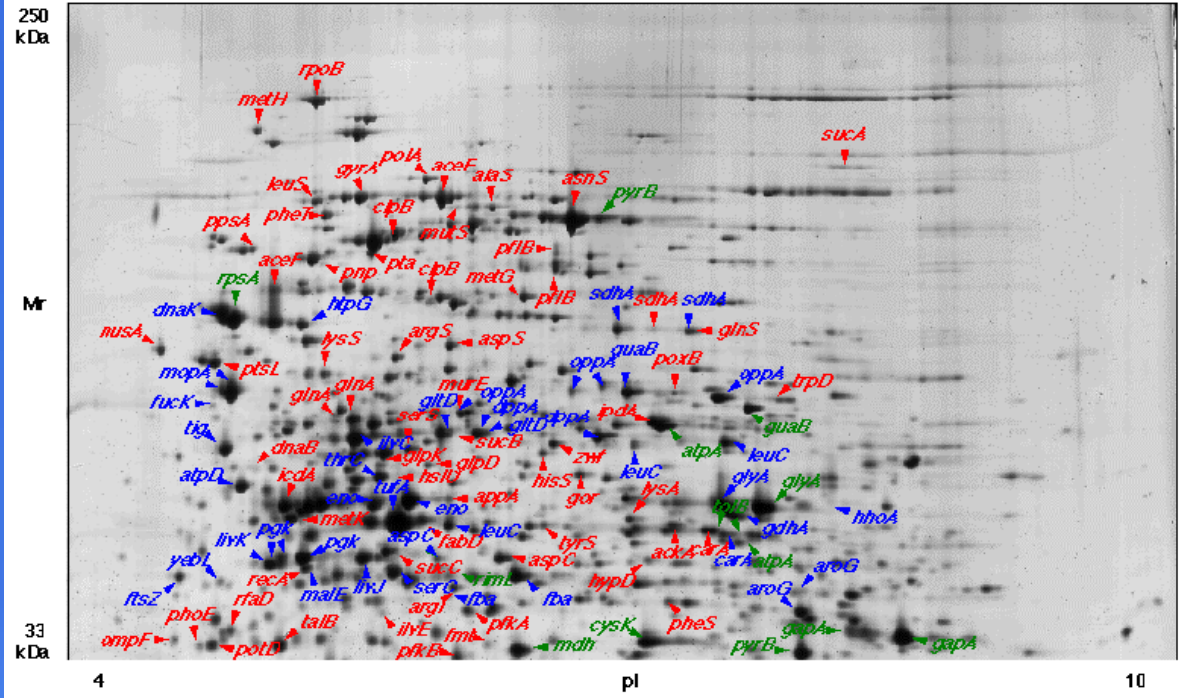
Установление координат белковой фракции на двумерных электрофореграммах становится первым шагом к системному объективному описанию белковых продуктов генной экспрессии конкретного объекта. Важным этапом данной стадии анализа является получение по многим адекватным двумерным электрофореграммам обобщенного (синтетического) изображения распределения белков – «белкового портрета» изучаемого объекта, на основании которых строятся «двумерные карты» – стандартизованные схемы распределения белков.

Для построения таких карт используются методы биоинформатики: специальные программы компьютерного анализа изображений.

Информативность и возможности использования «двумерных карт» возрастают при идентификации на них уже известных белков. Итоговый массив информации о выявленных белках систематизируют и обобщают в форме специализированного компьютерного банка данных.

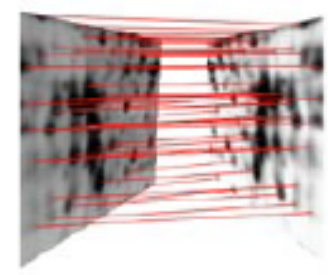
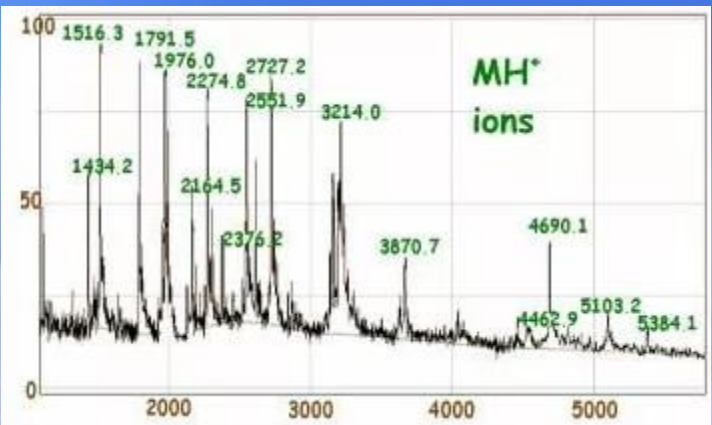
Получаемые с помощью электрофореза **фингерпринтовые карты сложных белковых смесей – основной метод протеомики.**

Метод составления пептидных карт, получивший образное название «метод отпечатков пальцев», используется при определении сходства или различия гомологичных белков по первичной структуре.

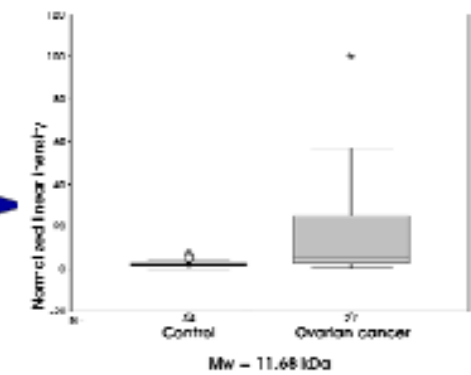


Двумерный электрофорез (2Д электрофорез)

Анализ изображений электрофореграмм



Выравнивание,
сопоставление
изображений



Статистический
анализ различий
экспрессии белка

Одним из наиболее перспективных методов идентификации белков является масс-спектрометрия (масс-спектроскопия, масс-спектральный анализ, МС) – метод анализа вещества путем определения массы (чаще, отношения массы к заряду m/z) и относительного количества ионов, получаемых при ионизации исследуемого вещества, или уже присутствующих в изучаемой смеси. Для этого используются законы движения заряженных частиц материи в магнитном или электрическом поле.

Масс-спектрометрия устанавливает, какие атомы входят в состав молекулы, какова структура их расположения и изотопный состав, а также какова масса молекулы.

Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия имеет дело с самими частицами вещества.

Масс-спектрограмма состоит из отдельных полос, высота которых соответствует относительному содержанию определенных ионов анализируемого соединения как функции массы. Эти ионы несут информацию о Мм наиболее электронно-стабильных фрагментов исходной молекулы. По масс-спектрограмме можно, основываясь на атомной структуре, охарактеризовать молекулу анализируемого соединения. Page 34

Масс-спектрометрию можно рассматривать как совокупность трех процессов: ионизации, разделения ионов по массам и регистрации образующихся ионов.

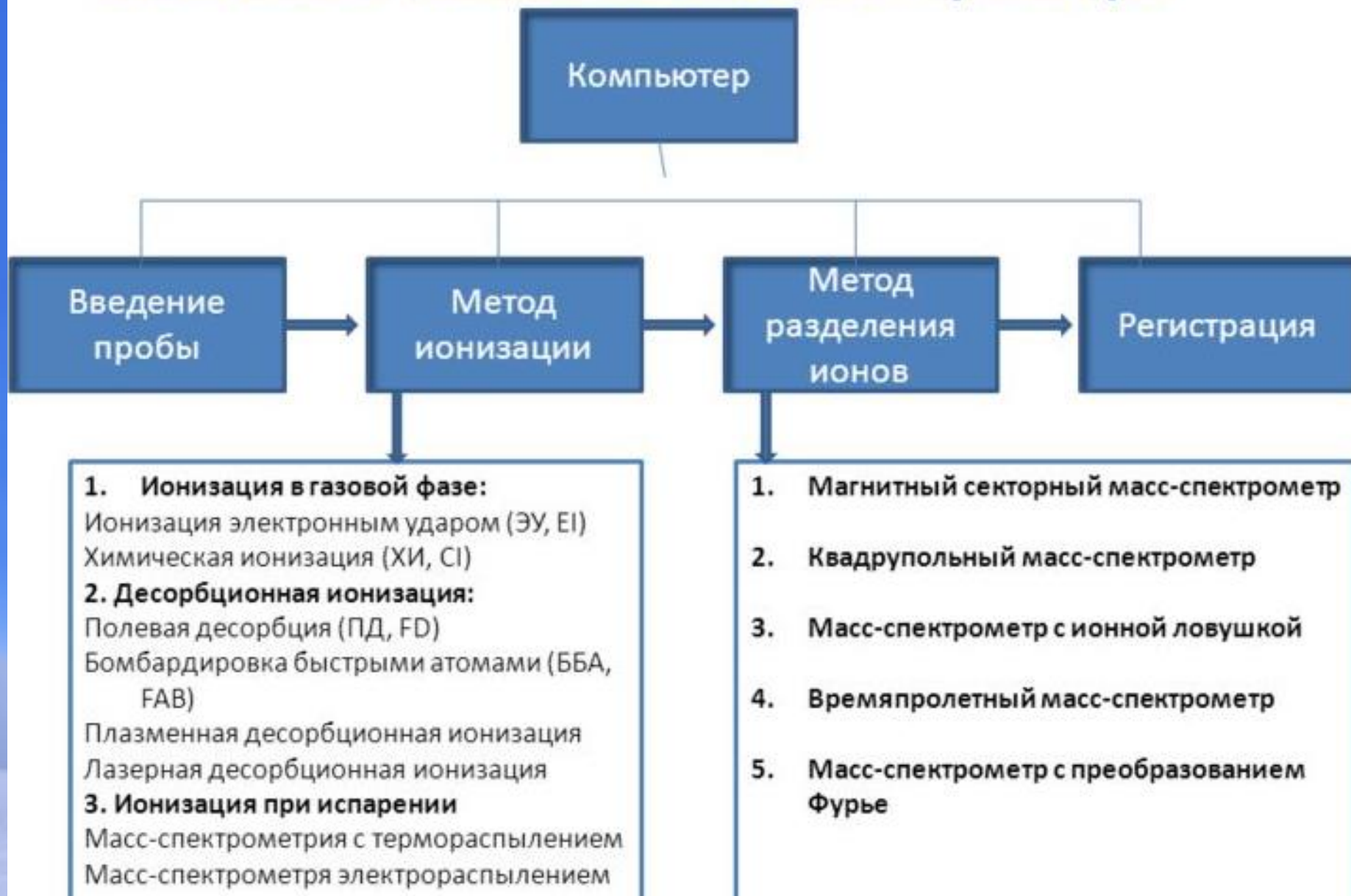
Многочисленные методы ионизации (электронный удар, химическая ионизация, бомбардировка быстрыми атомами, ESI, MALDI) можно сочетать с различными способами разделения ионов в зависимости от поставленных задач: в магнитном или электрическом поле, с помощью ионной ловушки, а также на основе ТОФ и ион-циклотронного механизма.

Основными звеньями любого масс-спектрометра являются вакуумная система, система для ввода анализируемого образца, система ионизации и разделения ионов по массам, система для регистрации и компьютерной обработки полученных результатов, включая программное обеспечение.

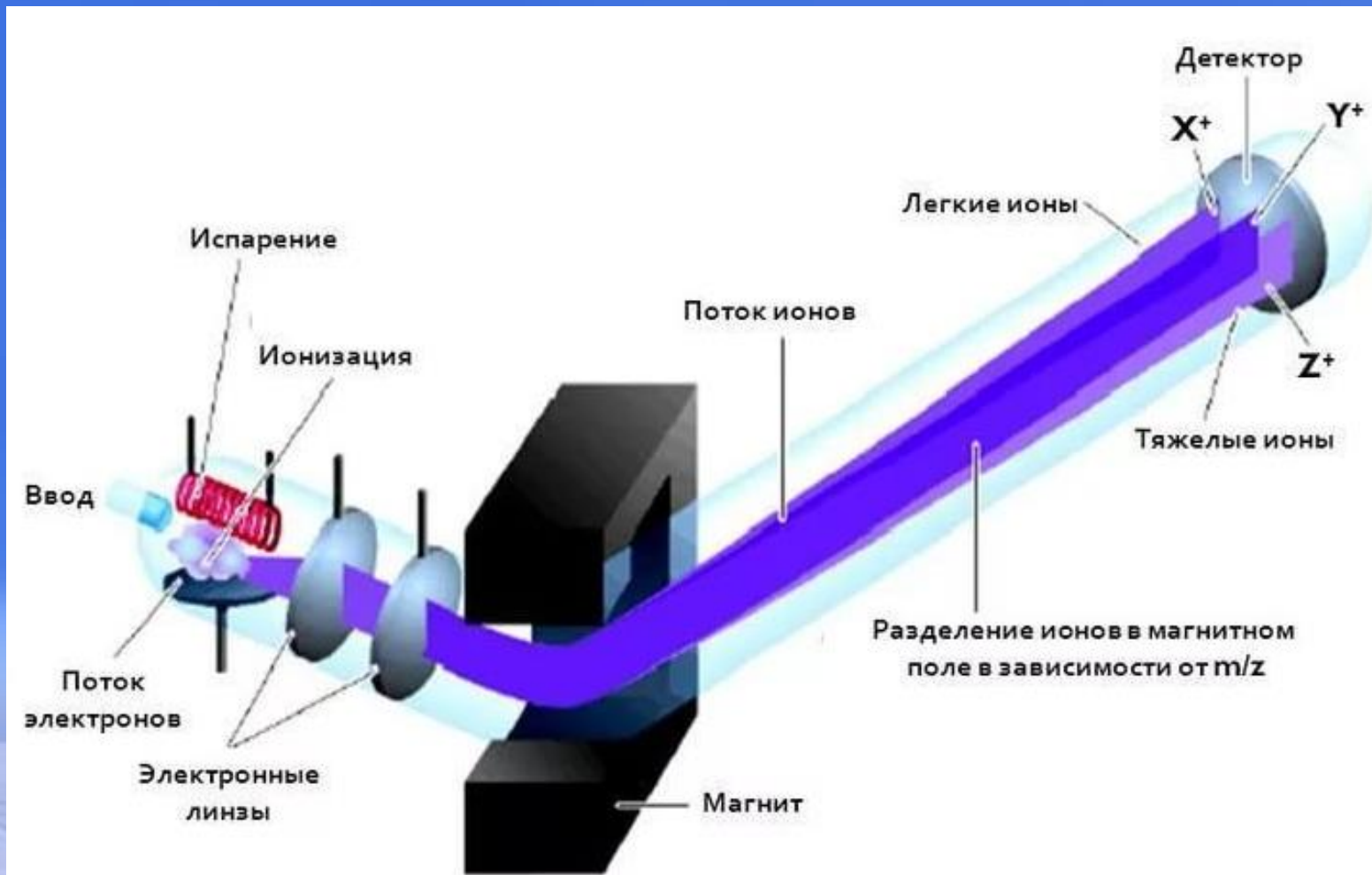
Ключевым компонентом масс-спектрометра является масс-анализатор, в котором под действием электрического и магнитного поля происходит процесс разделения пучка ионов на фракции с одинаковым отношением m/z .

В большинстве случаев необходимо исследовать нейтральные частицы, которые должны быть переведены в ионы. Для этого служит ионный источник, в котором нейтральные частицы подвергаются ионизации.

Блок-схема типичного масс-спектрометра



Принципиальная схема устройства масс-спектрометра включает в себя инжектор (дозатор) проб, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов. Сначала проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются. Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Чтобы предотвратить столкновение с молекулами газа, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов обычно работают в вакууме.



Существуют различные модификации масс-спектрометрии, которые подразделяются в зависимости от используемых методов ионизации и детекции частиц.

Метод ионизации, получивший название «электрораспыление» («электроспрей», ESI), часто называют электродинамическим. Ионизация происходит при взаимодействии сильного электростатического поля с поверхностью жидкости на конце капиллярной трубки.

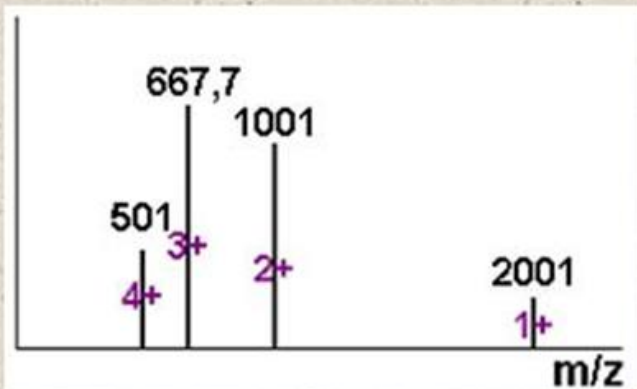
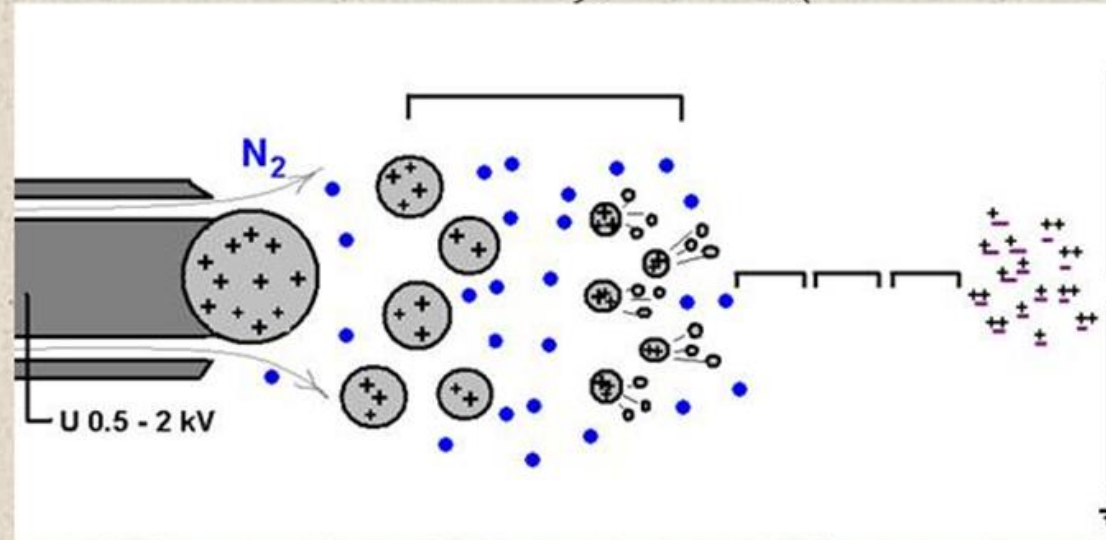
Техника ионизации ESI в сочетании с наиболее мощными современными масс-анализаторами позволяет успешно определять Мм таких молекул, как мРНК в диапазоне масс 25 000 Da, ДНК для последовательности в 100 нуклеотидов в диапазоне масс 31 000 Da, белок альбумин – масса в районе 66 000 Da. При некотором снижении разрешающей способности достижимый диапазон масс составляет несколько сот тысяч Da.

ESI – электрораспыление и ионизация

Анализируемое вещество подается в растворе через капилляр с поданным на него напряжением.

Растворители:
вода, ацетонитрил, метанол

несколько последовательных
«упариваний-взрывов» микрокапель



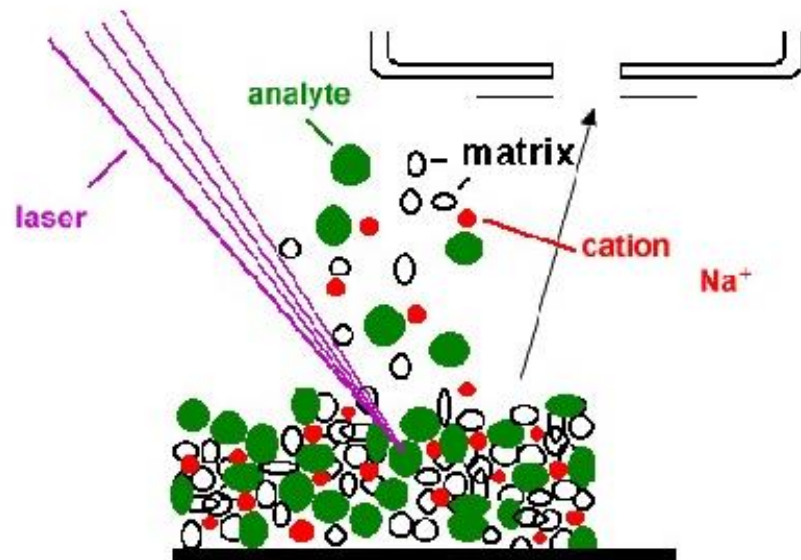
В результате получают многозарядные газофазные ионы, захватившие на себя разное количество протонов, вплоть до максимально возможного.

Основной принцип матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI-ионизации) состоит в том, что, при смешивании после специфической пробоподготовки образца на планшете с соответствующей матрицей, абсорбирующей длину волны лазера, возникает кристаллизация матрицы и анализируемого материала после испарения сольвента. Включение молекул образца в структурную решетку матрицы создает условия для работы процесса лазерной десорбции/ионизации.

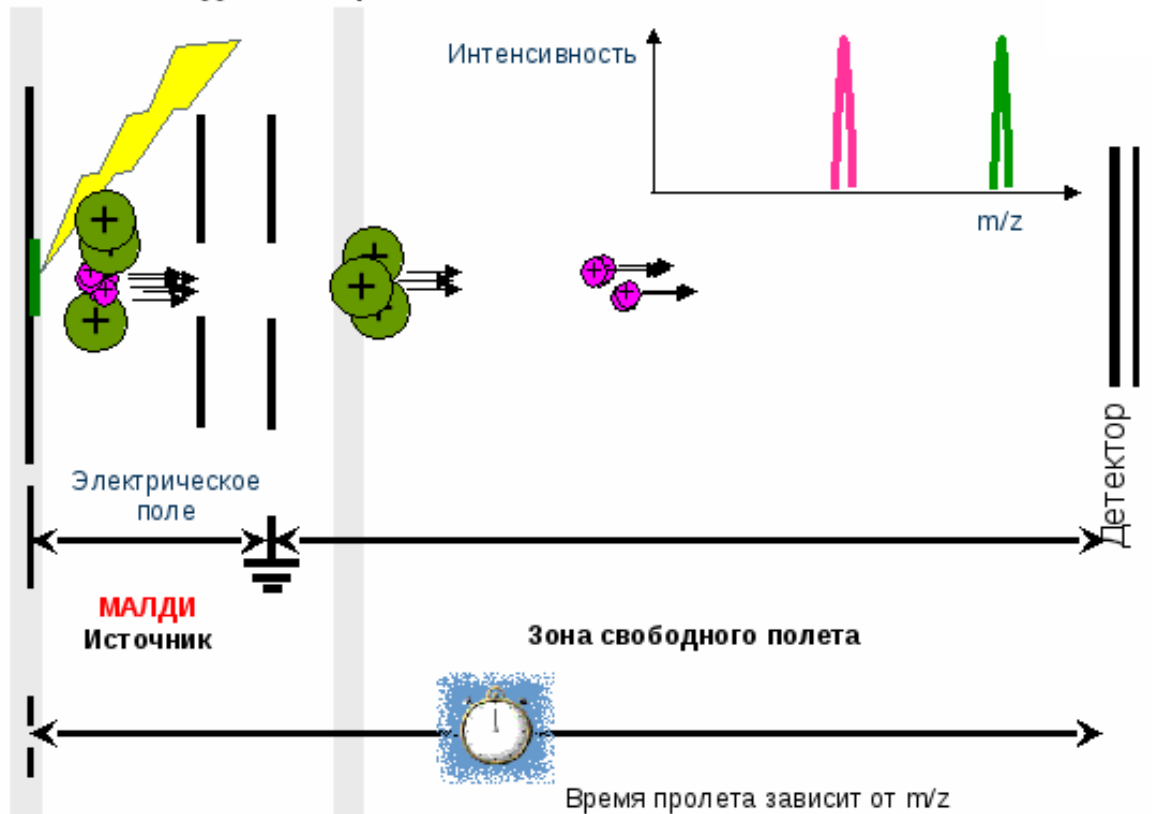
Кристаллизованная поверхность подготовленного образца подвергается воздействию лазера в импульсном режиме в абсолютном вакууме. Этот процесс происходит в ионном источнике масс-спектрометра. Электрод, который располагается в нескольких миллиметрах напротив образца, применяется для формирования электростатического поля. В зависимости от полярности (положительные или отрицательные ионы) ионы достигают анализатора с поверхности образца.

MALDI позволяет анализировать такие биополимеры, как полисахара, пептиды и макромолекулы, без риска повредить их структуру. Ионизация производится лазерным пучком, а матрикс используется для защиты молекул от разрушающего действия лазера. Матрикс состоит обычно из кристаллов кислот в смеси с органическим растворителем.

MALDI-ионизация



Высокий вакуум 10^{-7} мбар



Масс-анализаторы

Полученные при ионизации ионы с помощью электрического поля переносятся в масс-анализатор. Там начинается второй этап масс-спектрометрического анализа — сортировка ионов по массам (точнее по отношению массы к заряду, или m/z).

Существуют следующие типы масс-анализаторов:

1) Непрерывные масс-анализаторы

- Магнитный и электростатический секторный масс-анализатор (англ. Sector instrument)
- Квадрупольный масс-анализатор (англ. Quadrupole mass analyzer)

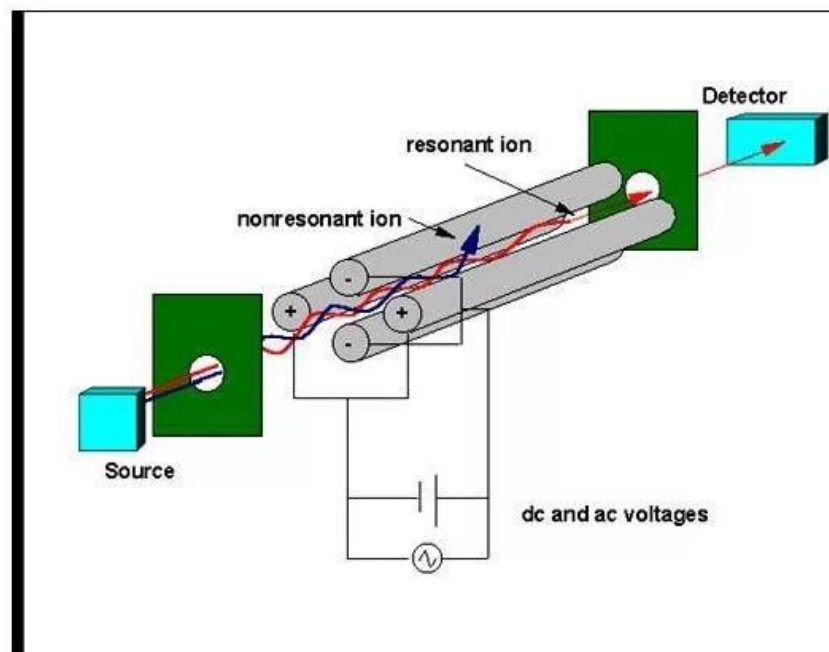
2) Импульсные масс-анализаторы

- Времяпролётный масс-анализатор (англ. Time-of-flight mass analyzer)
- Ионная ловушка (англ. Ion trap)
- Квадрупольная линейная ловушка (англ. Quadrupole ion trap)
- Масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (англ. Fourier transform ion cyclotron resonance)
- Орбитрэп (англ. Orbitrap)

Квадрупольный масс-анализатор — один из основных видов масс-анализаторов. Масс-спектрометры с таким масс-анализатором называют квадрупольными, которые различают как одноквадрупольные (Q) и трехквадрупольные (QQQ).

Квадрупольный масс-анализатор служит для разделения ионов по их соотношению массы к заряду (m/z), которое в свою очередь определяется траекториями движения ионов, задаваемыми переменным электрическим полем.

- В квадрупольном масс-анализаторе ионный пучок направляют в пространство между четырьмя параллельными электродами
- Это стержни (0,6 x 15 см) из нержавеющей стали, одна пара по диагонали противоположных стержней заряжена положительно, другая - отрицательно
- Одновременно на электроды наложено высокочастотное переменное напряжение

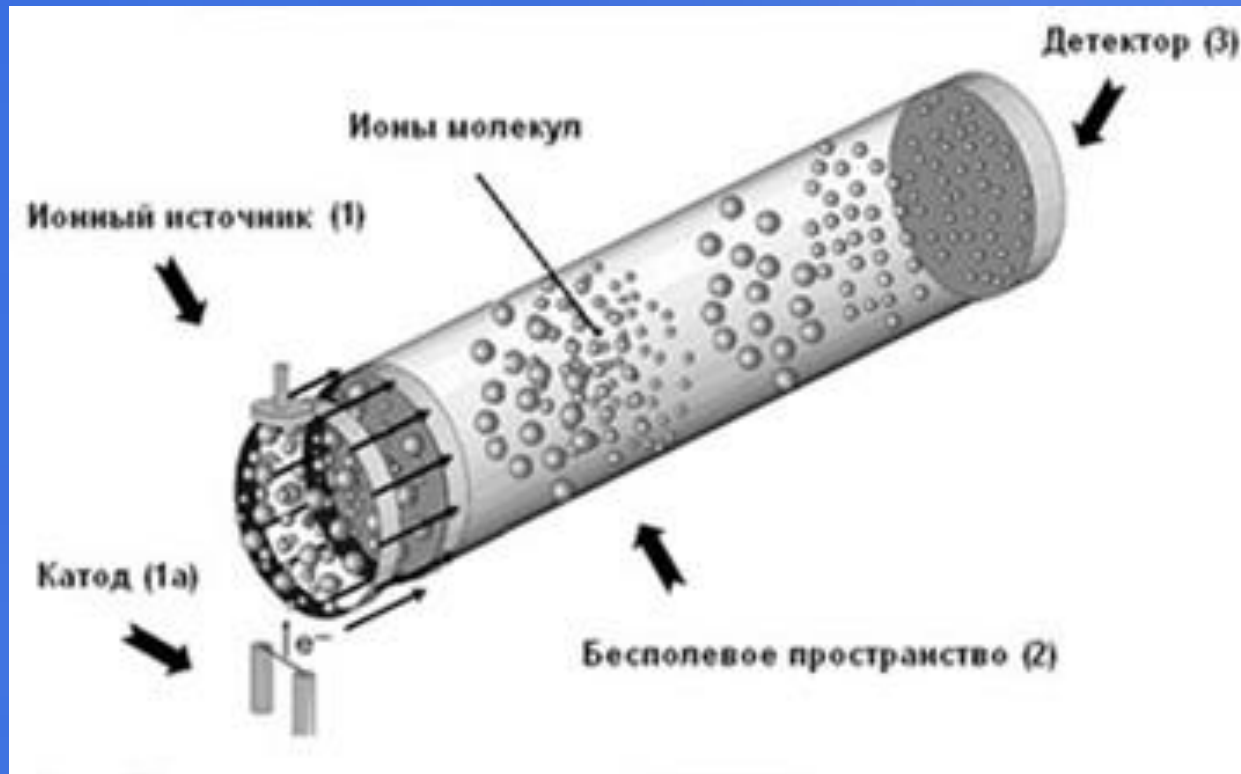


Времяпролётный масс-анализатор — простейший вид масс-анализатора. Во времяпролётном масс-анализаторе ионы вылетают из источника и попадают во времяпролётную трубу, где отсутствует электрическое поле (бесполевой промежуток). Пролетев некоторое расстояние, ионы регистрируются детектором ионов с плоской или почти плоской регистрирующей поверхностью. Регистрируются отдельные ионы с указанием значения отношения массы к заряду (m/z) иона, числа ионов и времени пролета ионов от источника до детектора ионов.

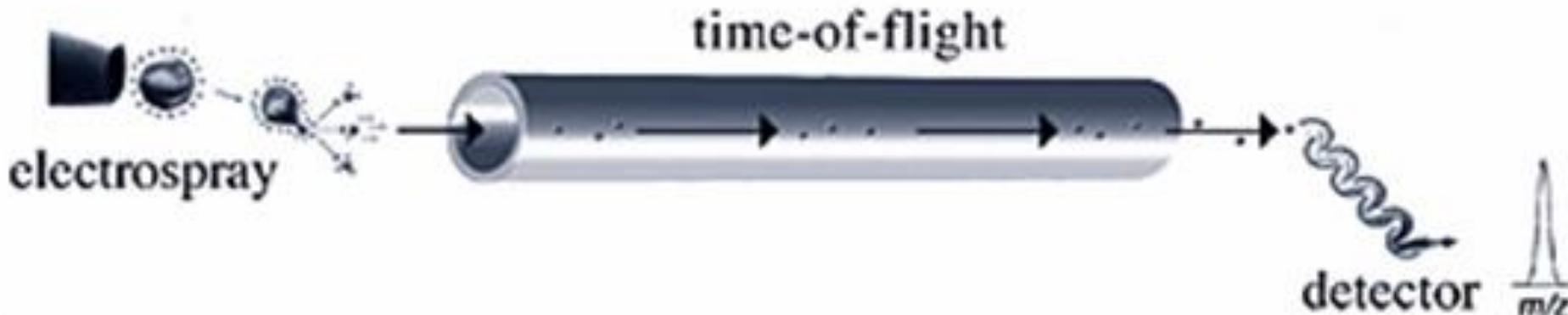
Времяпролётный масс-детектор используется для идентификации неизвестных соединений, а также для количественного анализа. В отличие от квадрупольных детекторов и ионных ловушек этот прибор обеспечивает гораздо более точное измерение масс ионов и демонстрирует существенно более высокую скорость сбора данных, являясь самым перспективным детектором. Большой диапазон масс (12 000 m/z и выше) и высокое разрешение (более 13 000) делают этот детектор незаменимым для изучения состава макромолекул, прежде всего белков и пептидов, олигонуклеотидов и других полимеров природного или искусственного происхождения.

Этот прибор применяется в области протеомики, криминалистики, наркологии, судебной медицины, для анализа пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Времяпролётный масс-анализатор



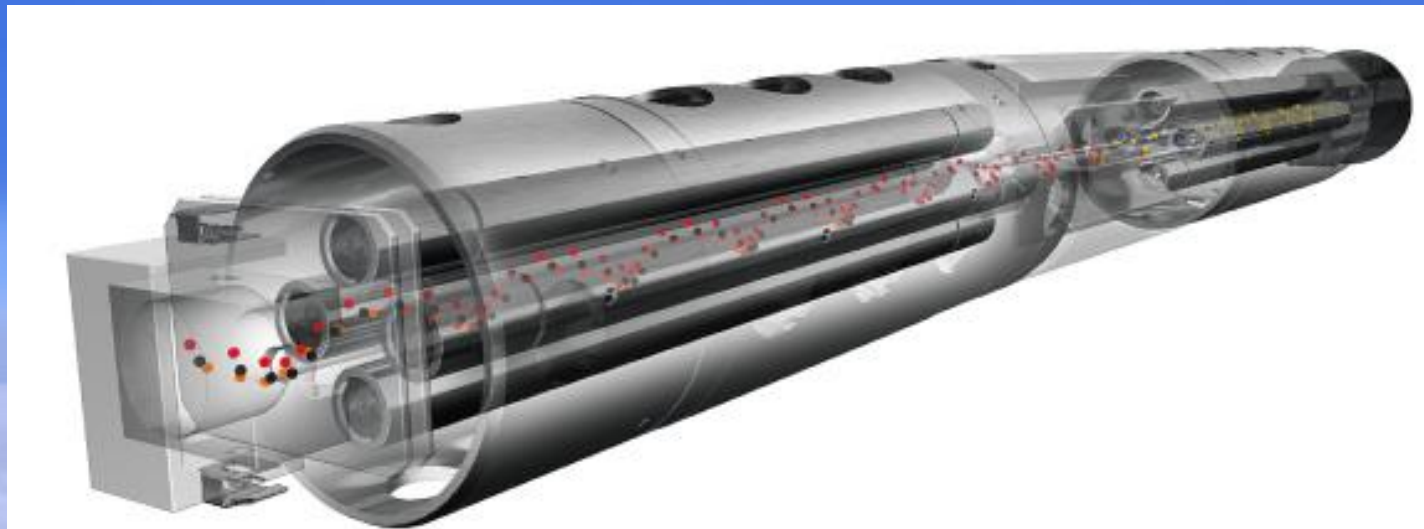
Time-of-Flight Mass Analyzer



Тандемная масс-спектрометрия (MS/MS) проводится на приборе, который объединяет несколько анализаторов, позволяющих последовательно изолировать один пептид, стабилизировать ионы, составляющие его и идентифицировать фрагменты. Используется в идентификации белковых пятен после 2Д электрофореза.

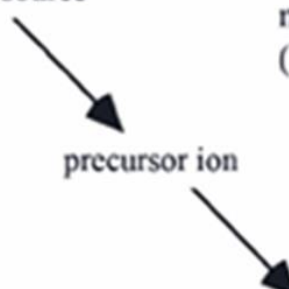
Первый масс-анализатор анализирует молекулярные ионы. Покидая его, молекулярные ионы фрагментируются под действием соударений с молекулами инертного газа или излучения лазера, после чего их фрагменты анализируются во втором масс-анализаторе.

Наиболее распространёнными конфигурациями тандемных масс спектрометров являются квадруполь-квадрупольная и квадруполь-времяпролётная.





ion source

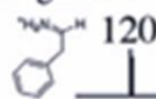


mass selection of precursor ion (MS)

fragmentation of precursor ion and analysis of fragment ions (MS²)

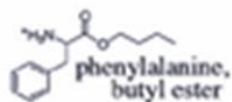
fragment ions

fragment



120

m/z

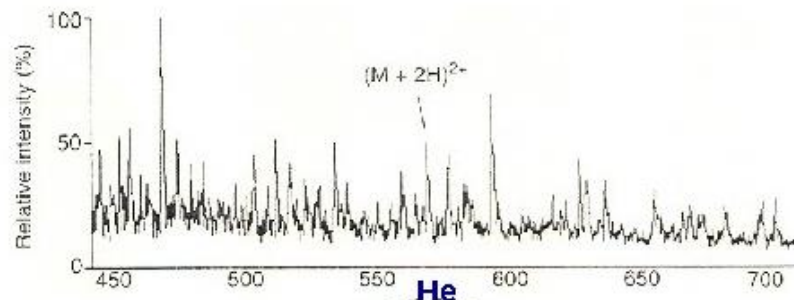


phenylalanine, butyl ester

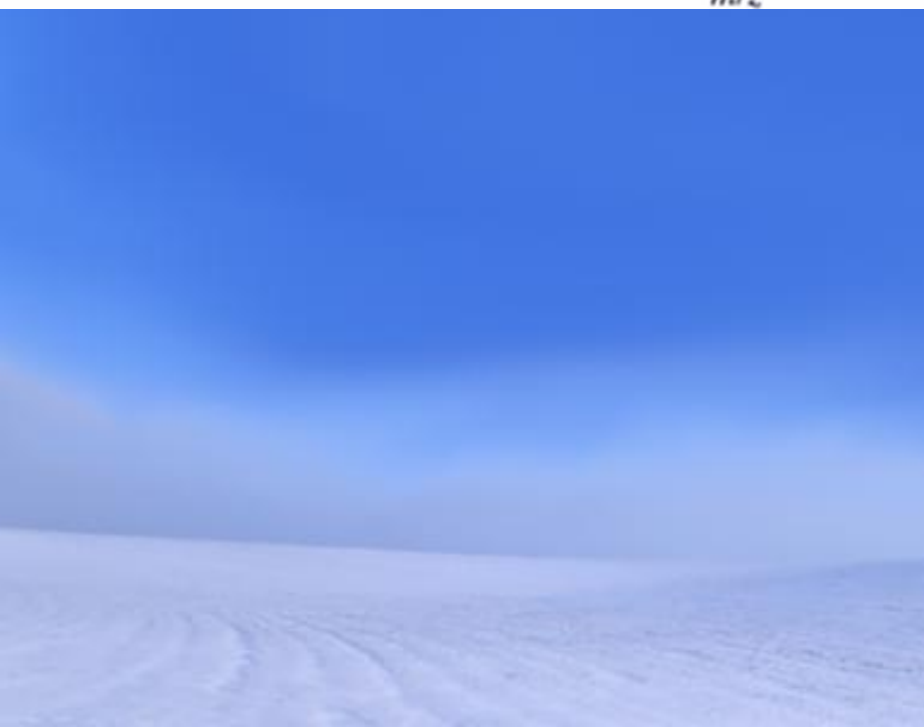
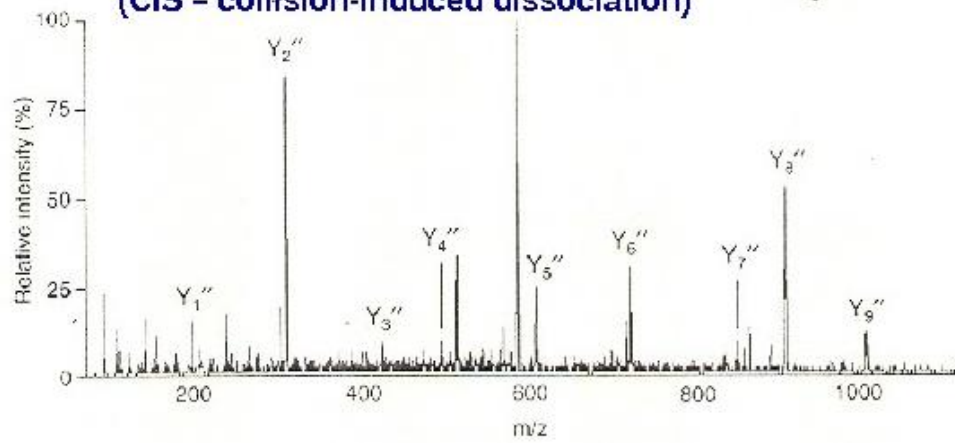
precursor ion

222

Тандемная масс-спектрометрия (MS/MS)



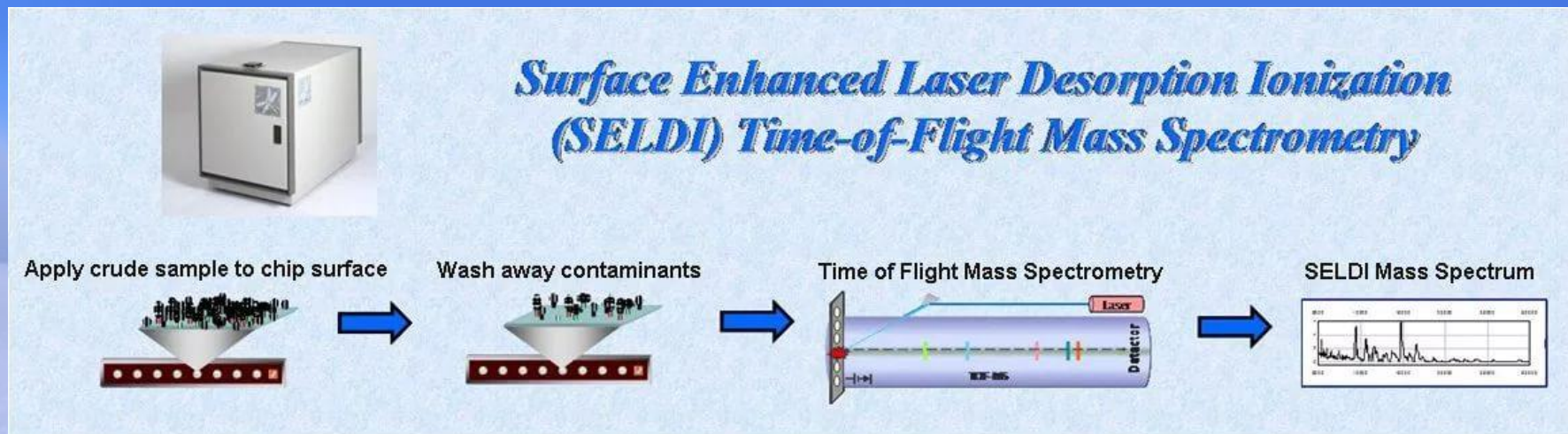
ДАС - диссоциация, активированная соударениями (CIS - collision-induced dissociation)



Времяпролетная масс-спектрометрия с усиливаемой поверхностью лазерной десорбцией-ионизацией (SELDI-TOF MS, surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) - в качестве масс-спектрометрической мишени используются селективные поверхности, избирательно связывающие белки на основе адсорбционных, электростатических или специфических аффинных взаимодействий.

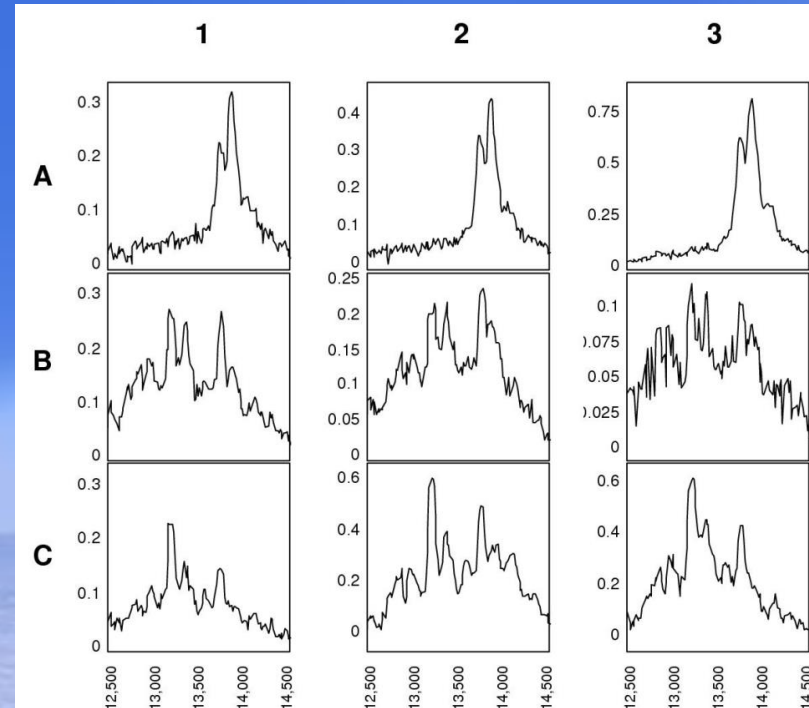
Фракционирование сложных смесей биологических молекул происходит прямо на поверхности масс-спектрометрической мишени, которую после процедуры связывания целевых веществ с поверхностью и отмывки от примесей помещают в масс-спектрометр для анализа.

Масс-спектры образцов, полученных в динамике или по сравнению с контрольной группой, сравнивают между собой при помощи специализированного программного обеспечения с привлечением методов математической статистики.



Ограничения SELDI-TOF MS

- фракционирование на модифицированной поверхности масс-спектрометрической мишени SELDI менее чувствительно, чем фракционирование в объеме, что обусловлено значительно меньшей площадью поверхности плоской масс-спектрометрической мишени для SELDI, на которой происходит разделение (обогащение) образца;
- разрешение и чувствительность масс-спектрометров для SELDI значительно уступают таковым современных MALDI масс-спектрометров;
- специфичность и селективность определения в сыворотке крови маркеров соответствующих заболеваний методом SELDI редко достигают 90 % (как правило, эти значения находятся в диапазоне 80-85 %), в то время как при фракционировании сыворотки крови на магнитных микрочастицах или микроколонках эти величины приближаются к 95-97 %.



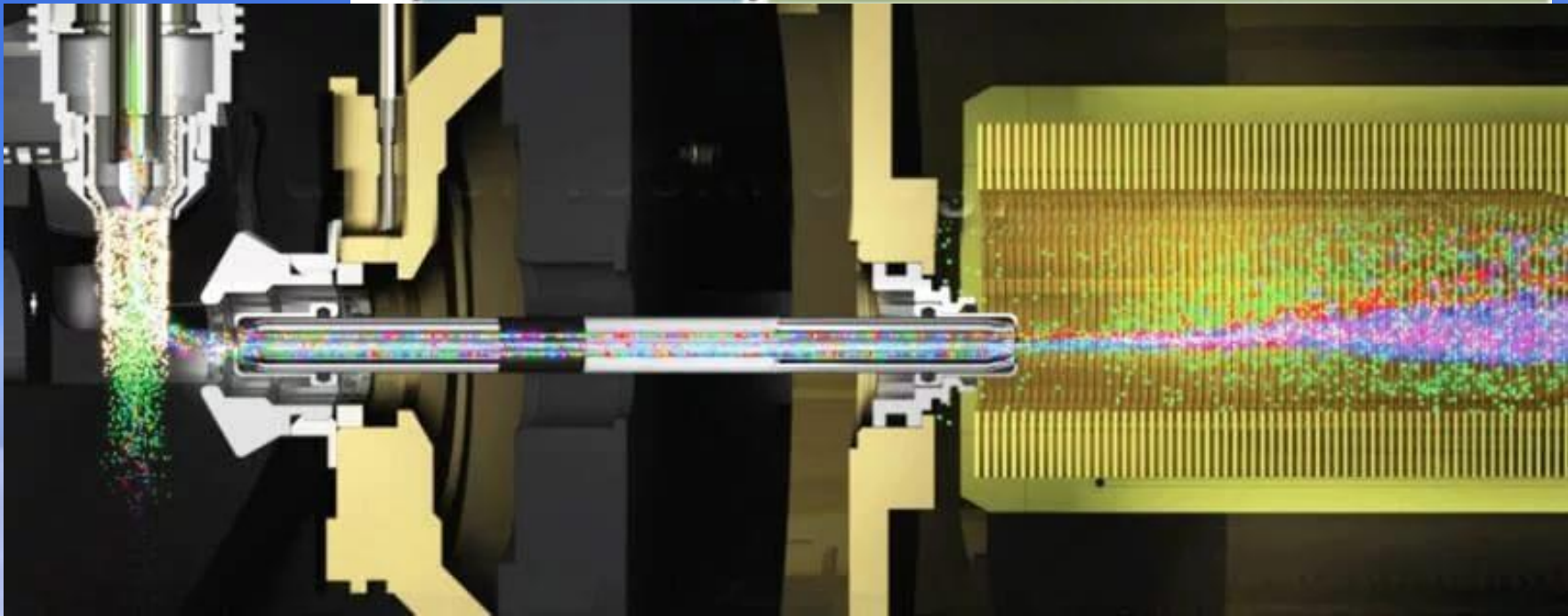
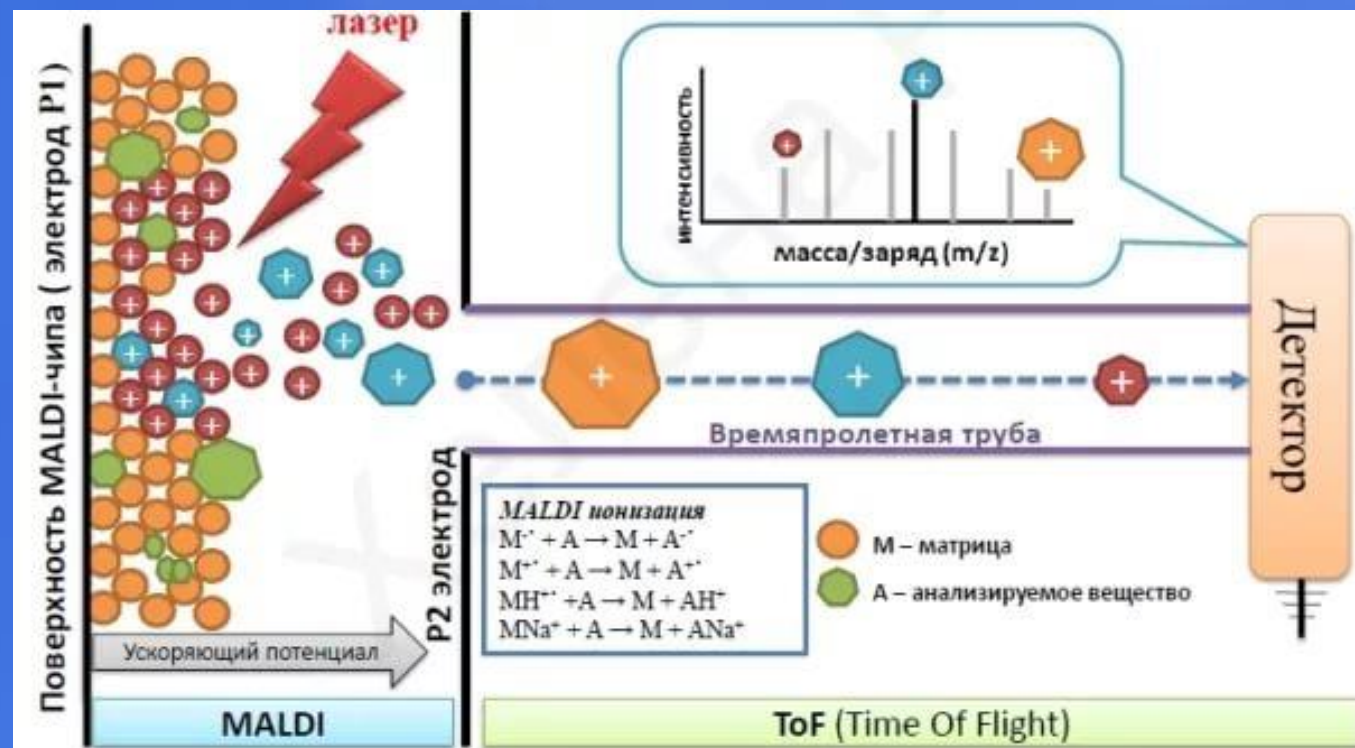
Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества с помощью лазерного излучения в присутствии вспомогательного вещества – матрицы с последующим разделением ионов во времяпролетном масс-анализаторе.

Под воздействием лазерных импульсов матрица, сокристаллизованная с исследуемым веществом, активно поглощает излучение лазера, что приводит к ее десорбции. Переходя в газовую фазу, матрица увлекает за собой молекулы исследуемого вещества, а также способствует их ионизации с образованием преимущественно однозарядных ионов.

Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т.е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев».

Идентификация микроорганизмов происходит по наилучшему совпадению пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных суперспектров, находящихся в базе данных, при этом не происходит идентификация конкретных белков.

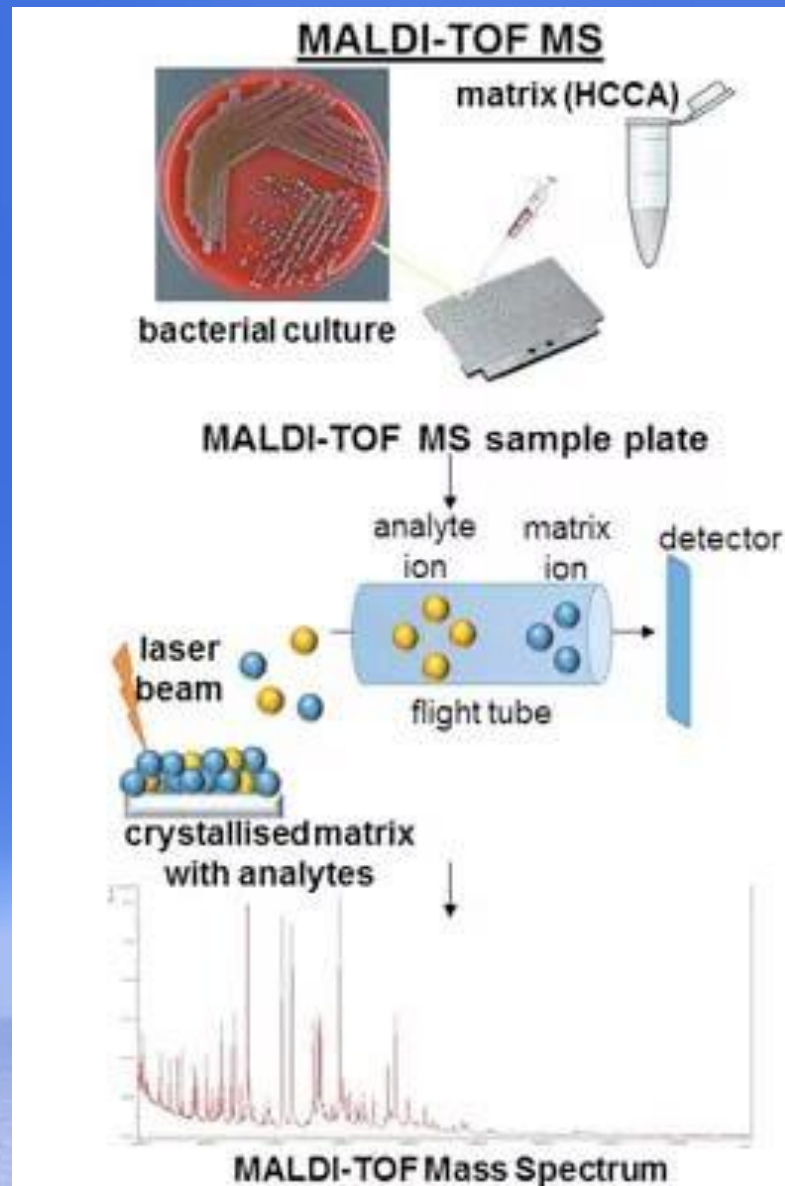
Времяпролетная MALDI TOF масс- спектрометрия



Применение MALDI-TOF MS

в медицине

- Идентификация микроорганизмов по масс-спектру рибосомальных белков
- Белковое профилирование сывороточных и тканевых биомаркеров
- Генотипирование единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP)
- Антибиотикорезистентность
- Генетический риск развития заболеваний человека



Типовая последовательность операций при протеомных исследованиях

- отбор образца (клетки, ткань, биологическая жидкость);
- приготовление образца (лизис клеток, экстракция белков);
- одномерный или двумерный электрофорез в полиакриламидном геле;
- проявление белковых пятен на геле;
- анализ электрофореграммы (число пятен, их расположение);
- выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна;
- расщепление индивидуальных белков (трипсинизация) непосредственно в геле;
- хроматографическая очистка;
- масс-спектрометрический анализ (определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков);
- идентификация каждого белка и измерение его концентрации, документирование, обработка результатов;
- интерпретация полученных данных с помощью методов биоинформатики — анализ баз данных, получение дифференциального профиля белков.

Стратегия анализа: 1D - LC + ESI-MS/MS



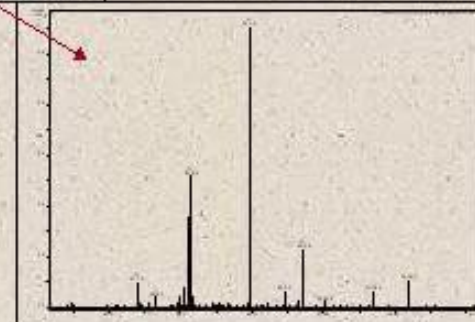
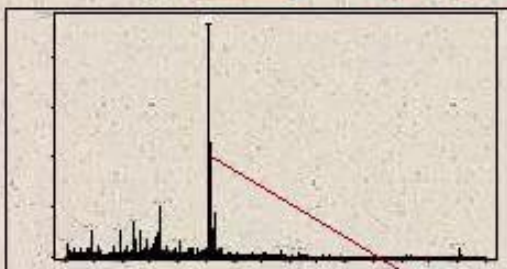
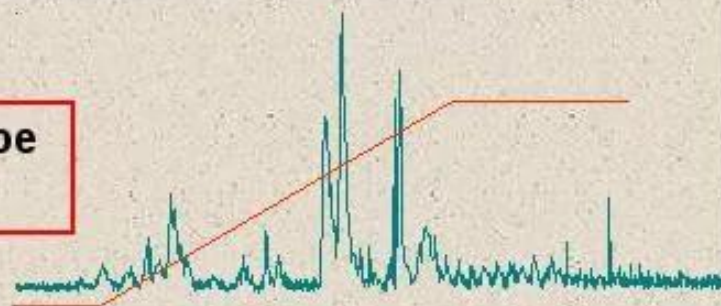
1D электрофорез белков

Вырезание и трипсинолиз белков в полосах геля

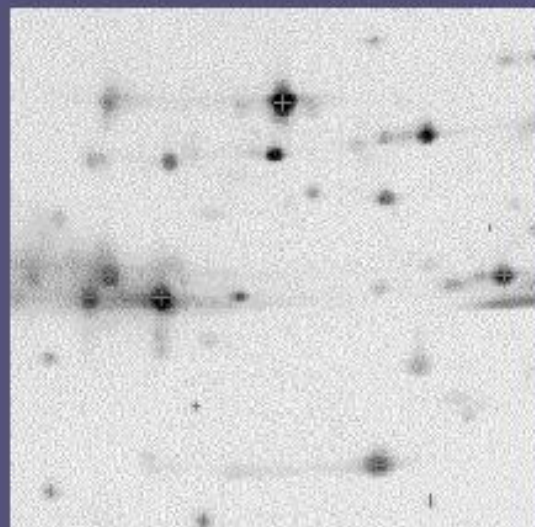
Экстракция и хроматографическое разделение пептидов

Получение масс-спектров пептидов и их фрагментации

Объединение данных и анализ



Стратегия анализа: 2DE + MALDI-MS



2D электрофорез белков



Компьютерный анализ изображений гелей



Вырезание и трипсинолиз белков в
фрагментах геля



Экстракция пептидов и получение
MALDI масс-спектра суммарного
гидролизата



Поиск в базе данных измеренных
масс пептидов
(пептидный фингерпринт)



Post Source Decay-MS, TOF-TOF
фрагментация отдельных пептидов



Поиск в базе данных измеренных
масс фрагментов

Фингерпринтинг масс пептидов (белковый фингерпринтинг) – аналитический метод идентификации белков.

Принципы этого метода состоят в следующем:

- 1. Получение биологического образца.**
- 2. Подготовка биологического образца к исследованию.**
- 3. Аналитический 1D или 2D-SDS-PAGE с окраской гелей нитратом Ag или Coomassie Brilliant Blue.**
- 4. Получение набора триптических пептидов, для чего образец белка, например из двумерного геля, расщепляют ферментом (протеазой, трипсином).**
- 5. Анализ полученных пептидов методом MALDI-TOF MS.**
- 6. Определение молекулярных масс пептидов.**
- 7. Поиск полученных молекулярных масс пептидов в базах данных белков при помощи поискового алгоритма (MS-BLAST). Алгоритм осуществляет виртуальный гидролиз трипсином всех белков в базе данных и вычисляет массы соответствующих (т.е. предсказанных) триптических пептидов. Затем делаются попытки установить соответствие между этими предсказанными массами и молекулярными массами, полученными экспериментально.**

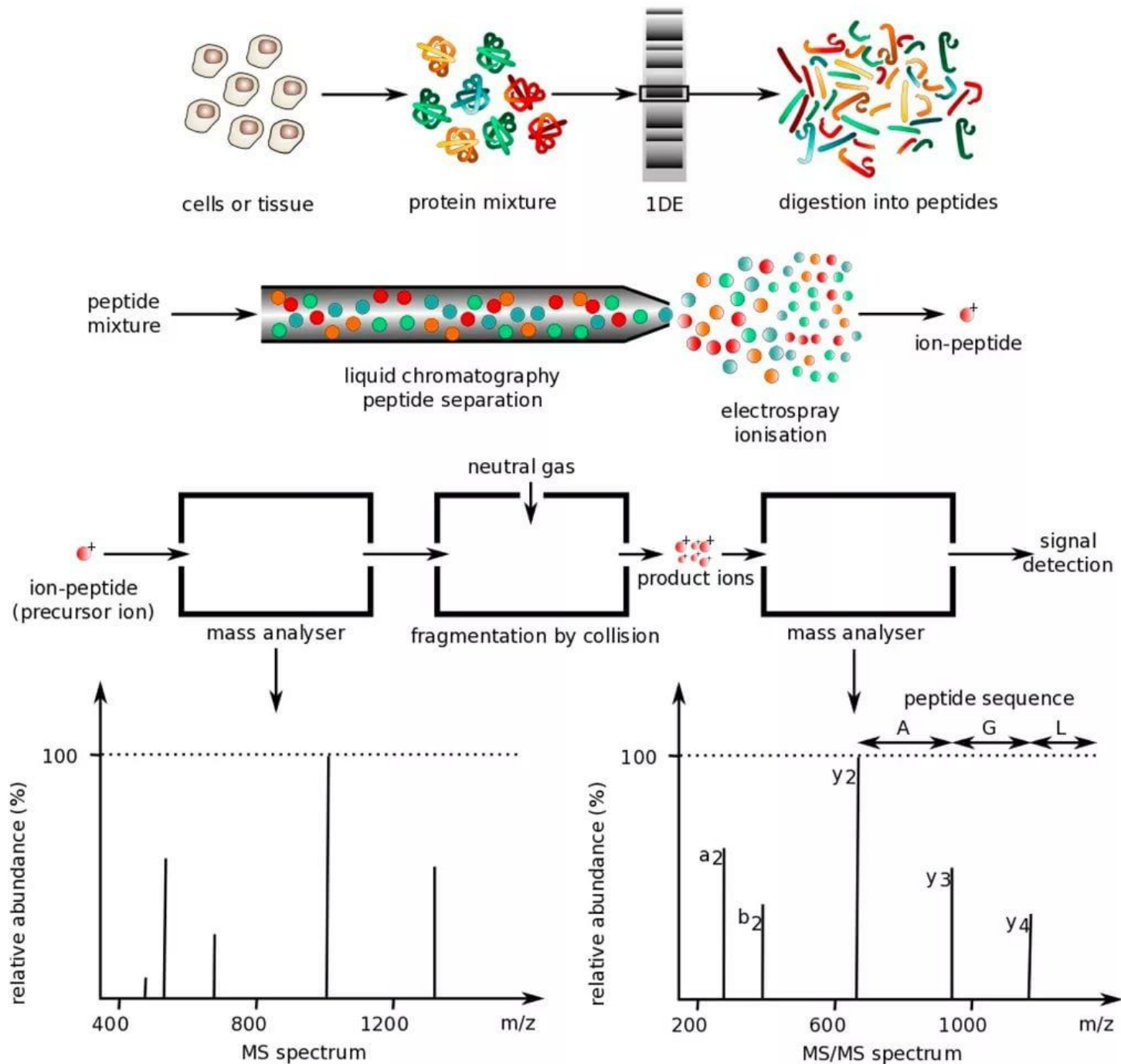
Фингерпринтинг масс пептидов

8. Создание списка соответствий. Если несколько пептидов соответствуют одному и тому же белку в базе данных, появляется основание утверждать, что получено полное соответствие. Соответствие может быть найдено не для всех пептидов из-за существования непредвиденных посттрансляционных модификаций, различных вариантов сплайсинга и полиморфизма.

В тех случаях, когда соответствия не могут быть получены, можно использовать более жесткие методы тандемной масс-спектрометрии (MS/MS) для фрагментации пептидов и вычисления масс фрагментированных ионов. И тогда можно проводить поиск по базам данных менее сложных белковых последовательностей для получения частичного соответствия.

Фрагменты также могут быть собраны в «лестницы» пептидов, массы которых можно сравнивать со стандартными таблицами аминокислот, с целью определения последовательности *de novo*.

Фингерпринтинг масс пептидов



Массы пептидов можно сравнивать и с базами данных геномов. Это достигается с использованием компьютерных программ, которые транслируют известные последовательности геномов организмов в белки, затем теоретически *in silico* разрезают ферментами эти белки на пептиды и вычисляют абсолютные массы пептидов для каждого белка. Далее программа сравнивает массы пептидов неизвестного белка с теоретически установленными массами пептидов каждого белка, закодированного в геноме. Результаты анализируются с использованием статистических методов для установления наилучшего совпадения.

Фингерпринтинг масс пептидов

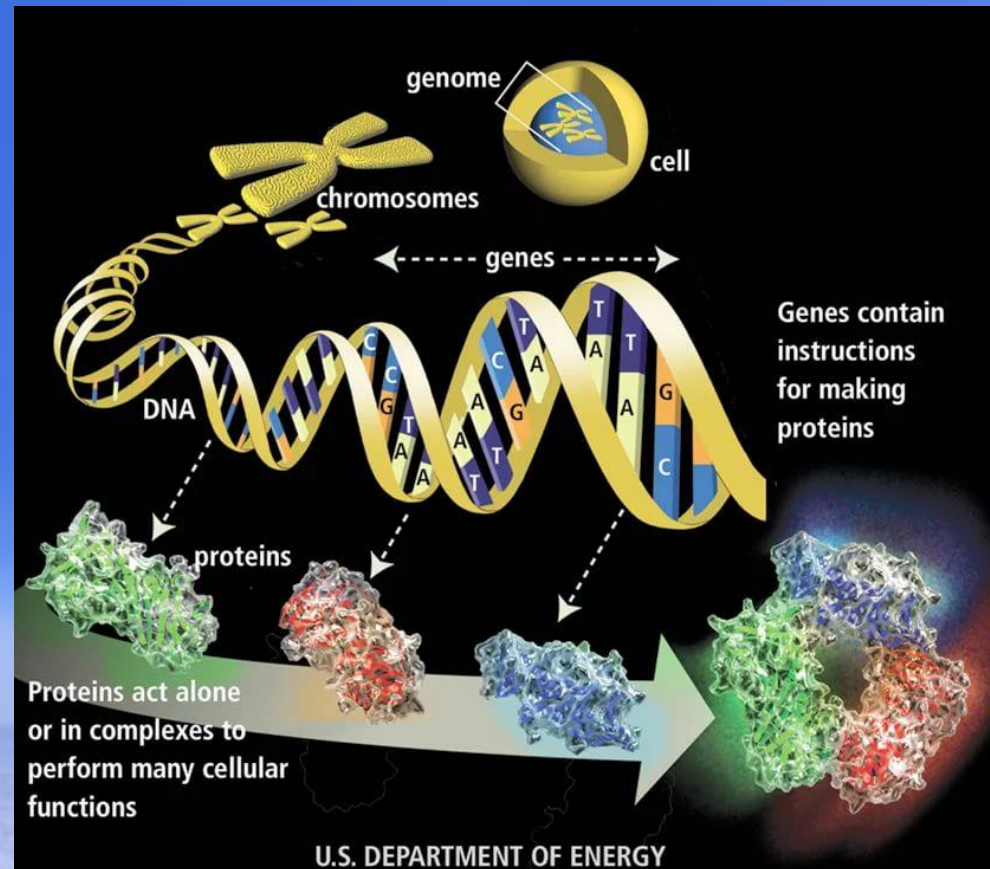
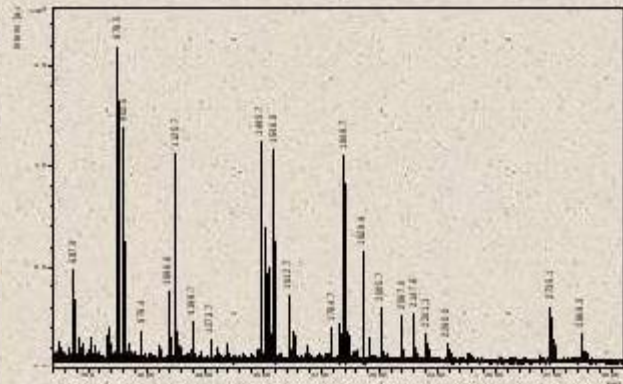


Схема проведения идентификации белка по его пептидному фингерпринту



Вырезание отдельных белковых пятен (>20 нг/мм²)
Трипсинолиз белков в фрагментах геля
Получение масс-спектра



Фингерпринтинг масс пептидов

Преимущество метода – нужно знать только массы белков, длительная процедура секвенирования белков de novo не требуется.

Недостатки метода:

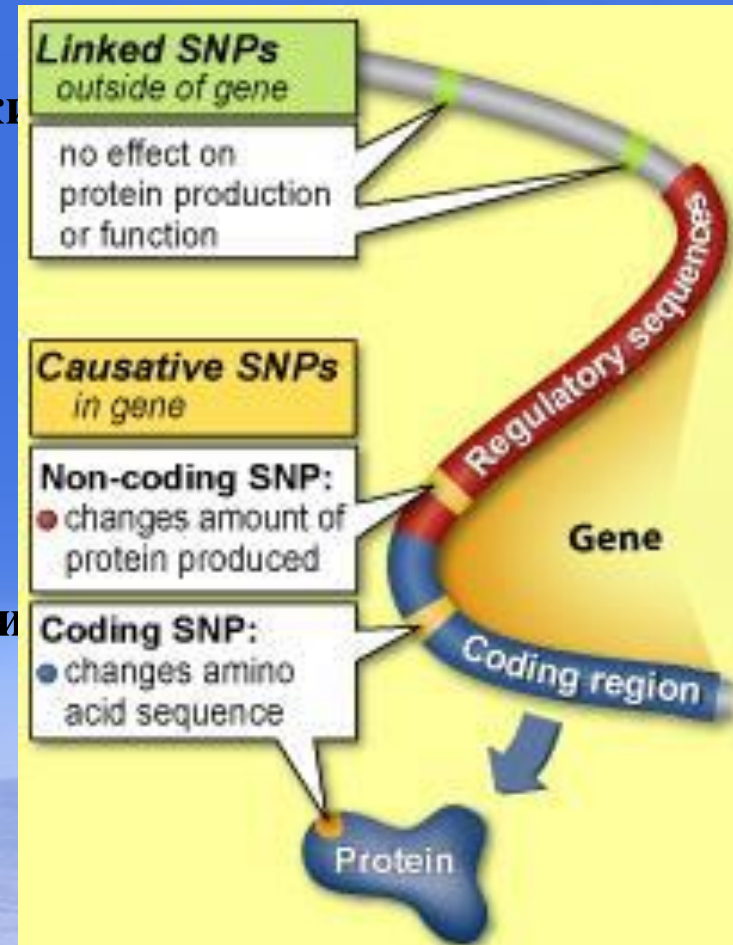
- **Необходимо наличие последовательности изучаемого белка в базах данных.**
- **Большинство алгоритмов настроены на изучение одного белка, изолированного из ПААГ после 1D или 2D электрофореза, наличие смеси 2-3 протеинов значительно усложняет анализ и дает неверные результаты. В таких случаях используют дополнительную идентификацию белков методами тандемной масс-спектрометрии.**

Фингерпринтинг масс пептидов: применение в медицине

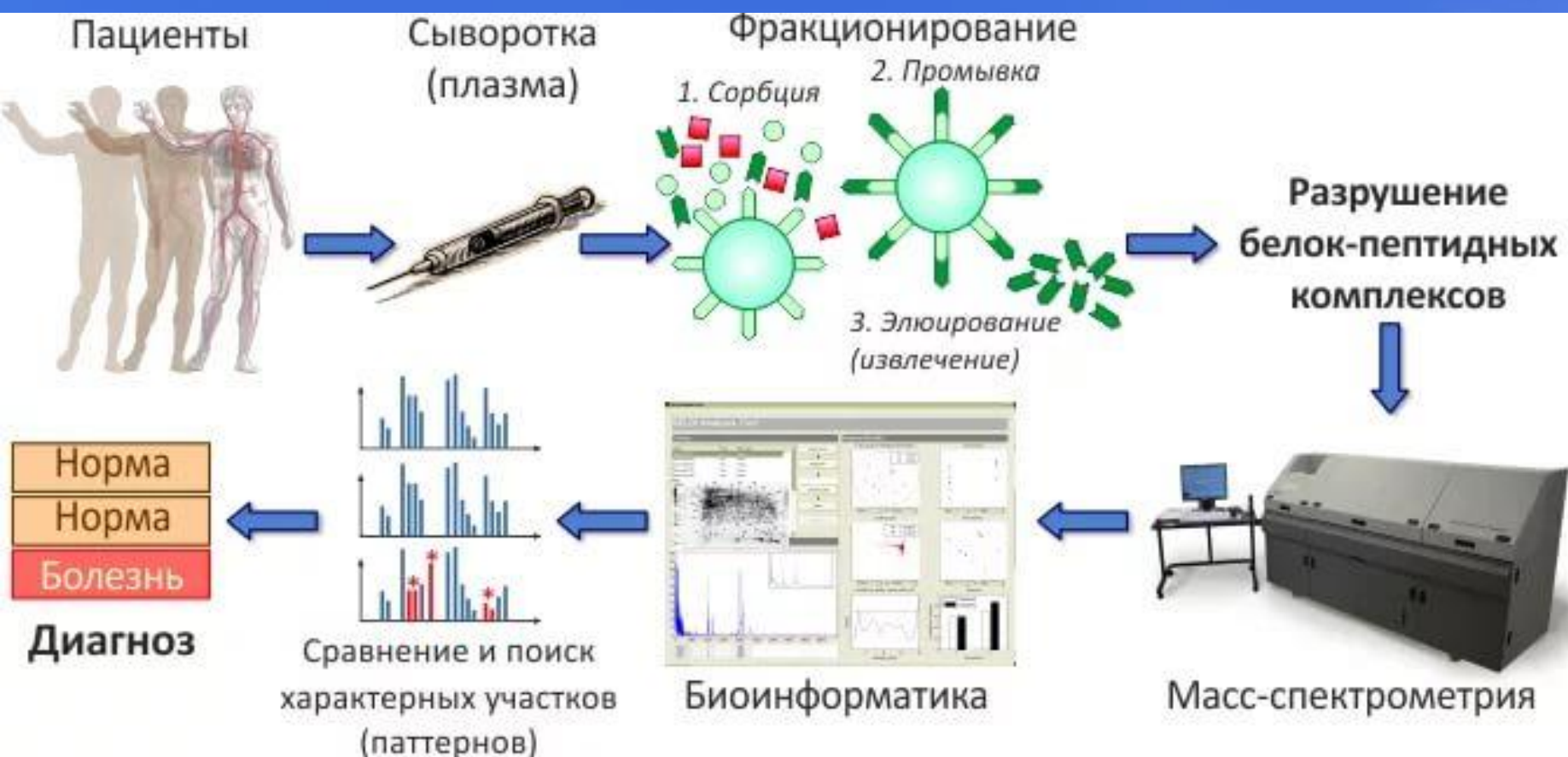
Анализ масс-спектрометрических данных большого количества протеомных экспериментов позволяет получить представление о вариабельности протеома человека.

Например, выявлены одноаминокислотные полиморфизмы, подтверждающие на протеомном уровне трансляцию генетических мутаций, ассоциированных с тяжелыми формами заболеваний:

- дефекты кератинов, вызывающие заболевания кожи;
- амилоидозы, связанные с накоплением транстиретина;
- боковой амиотрофический склероз;
- нарушения в системе свертываемости крови;
- онкологические заболевания;
- сердечно-сосудистые заболевания.



Фингерпринтинг масс пептидов: применение в медицине



FUNCTIONAL GENOMICS

Genome

Transcriptome

Proteome

DNA

RNA — mRNA

Proteins —

Modified proteins

Biological function

- alternative splicing
- mRNA editing
- polyadenylation

- post-translational modifications
- compartmentalization
- proteolysis



~30 000 genes — > 1 000 000 proteins — much more functions related to a protein

Благодарю за
внимание!

