

ПРОТЕОМИКА

УДК 577.151

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК

А.Т. Копылов, В.Г. Згода, А.И. Арчаков*

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,
ул. Погодинская, д. 10; тел.: 8-926-185-40-49; эл. почта: a.t.kopylov@gmail.com

Проведено исследование зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации анализируемых белков в чистом виде и в смесях. Определены динамические диапазоны линейности этой зависимости для белков от 1 нМ до 1 мкМ. Показано, что кривая зависимости масс-спектрометрической интенсивности от концентрации для каждого белка в диапазоне от 1 нМ до 1 мкМ имеет характеристический тангенс угла наклона. Оценка эффективности данного метода сопоставлена с другими методами количественной протеомики (AQUA и ^{18}O -мечением).

Ключевые слова: количественная протеомика, масс-спектрометрия, линейная корреляция, безметковый метод.

ВВЕДЕНИЕ. Протекание любого биологического процесса сопровождается изменениями химического состава клетки. Изучение таких динамических изменений белкового состава является основной задачей протеомных исследований и решений для понимания биологических процессов. Решение этого вопроса достигается путем сравнительного анализа протеомов, содержание белков, в которых меняться в ответ на какие-либо химические или физиологические воздействия. Именно такие изменения в клеточном составе представляют собой наибольший интерес для дальнейших исследований. В последнее время к протеомике все больше предъявляются требования количественной оценки таких изменений. Андерсон в своем обзоре определяет протеомику прежде всего, как “количественное измерение уровня экспрессии генов для характеристики биологических процессов, то есть процессов протекания заболеваний и эффектов влияния лекарств, и для расшифровки механизмов контроля генной экспрессии” [1]. Однако из-за значительных технических и методических ограничений масс-спектрометрия, которая является основным инструментом современной протеомики, - не способна осуществлять напрямую количественную оценку.

На заре развития количественных методов с применением масс-спектрометрии основные трудности возникали с правильностью интерпретации результатов и большой вариацией масс-спектрометрических сигналов пептидов [2]. Широко используемыми методами количественной оценки по-прежнему остаются химическое мечение цистеинов (ICAT), тотальное мечение белков в культуре

* - адресат для переписки

клеток (SILAC) и ферментативное мечение атомами ^{18}O [3]. Однако, несмотря на высокое разнообразие подходов, у каждого из них остается множество нерешенных проблем. Эти трудности связаны с воспроизводимостью метода, его ограничениями по белковому составу клеток, возможностью применения *in vitro* или *in vivo*, стоимостью и затратностью по времени, сложностью подготовки биологической пробы и, во всех случаях, с обработкой результатов [4, 5].

Авторы [6–8] проводили абсолютную количественную оценку содержания белков в биологических пробах, однако количественный анализ проводился с использованием внутренних стандартов с включением изотопных меток, изобарных меток или ICAT. Широко распространенными стали использование синтетических пептидов с включением изотопов атомов ^{13}C или ^{15}N в точности повторяющих нативные пептиды белков после ферментативного расщепления, а также использование изобарных меток, которые позволили осуществлять абсолютную количественную оценку белков на уровне MS/MS спектров [9, 10]. Параллельно активно велись разработки “безметковых” методов количественной протеомики [11–13]. Методы безметковой количественной протеомики основываются на предположении о существовании зависимости между интенсивностью масс-спектрометрического сигнала и относительным содержанием пептидного иона того или иного белка в биологической пробе [14, 15].

В настоящей работе мы выявили существование зависимости между уровнем интенсивности масс-спектрометрического сигнала и содержанием белка в пробе. Показаны особенности для кривой зависимости, связанные с числом индивидуальных пептидов одного белка и их сочетанием. Оказалось, что на линейность кривой зависимости и на уровень интенсивности в отдельных точках и элементах кривой влияет скорость потока наноэлектроспрея. На основе полученных подходов разработан новый подход в количественном протеомном анализе с применением масс-спектрометрии без использования изотопных меток.

МЕТОДИКА.

Материалы. Для построения калибровочной кривой зависимости интенсивности сигнала от концентрации анализируемого белка в качестве модельных объектов были отобраны 8 коммерчески доступных белков: бычий сывороточный альбумин (“ICN Biomedical”, США), 69,293 кДа; миоглобин кашалота (“Serva”, Германия), 17,331 кДа; пероксидаза хрена (“Reanal”, Венгрия), 11,832 кДа; цитохром 2b4 из ткани печени кролика (“Serva”, Германия), 55,713 кДа; цитохром 3a4 человеческий, экспрессируемый в культуре клеток *E. coli* (“Serva”, Германия), 57,343 кДа; NADPH-цитохром P450-редуктаза из печени кролика (“Sigma”, США), 76,588 кДа; алкогольдегидрогеназа из культуры винных дрожжей (“GIBCO”, США), 36,823 кДа; и цитохром c из клеток сердечной мышцы лошади (“Serva”, Германия), 11,832 кДа. Ацетонитрил (“Acros Organics”, HPLC grade, США), муравьиная кислота 99,99% (“Fluka Analytical”, Германия). Трипсин свиной модифицированный (“Promega”, США), активность 5000 ед/мг.

Маточные (100 мкМ) растворы белков готовили в 20 мМ Tris-буфера (pH 7,4). Затем из них отбирали по 20 мкл (2 нмоль белка) и переносили в чистую пробирку на 200 мкл (Eppendorf, Германия), затем выпаривали в вакуумном испарителе при температуре 30°C 4200 об/мин в течение 45–60 минут и хранили при -80°C.

Проведение гидролитического расщепления белков трипсином в растворе. Сухой остаток белка ресуспендировали в 20 мкл буферного раствора для проведения трипсинолиза (100 мМ аммония гидрокарбоната, 15% ацетонитрила), 0,02% додецилсульфат натрия, в качестве денатурирующих агентов, и 0,5 мМ кальция хлорида для повышения ионной силы раствора, pH 8,0). К каждому раствору белка добавляли по 1 мкл раствора свиного модифицированного трипсина (0,05 мкг/мкл) в соотношении 1 : 400 по массовым частям. Реакцию проводили при температуре 42°C. Через 2 часа после начала реакции к смеси добавляли еще 0,05 мкг фермента и инкубировали смесь при 37°C. Через следующие 2 часа добавляли еще 1 мкл трипсина в концентрации 0,10 мкг/мкл и

оставляли реакционную смесь при 37°C на ночь. По окончании реакцию останавливали добавлением 2 мкл концентрированной трифторуксусной кислоты.

Полученную смесь пептидов высушивали в вакуумном испарителе при 45°C при 4200 об/мин в течение 1,5 часов.

ESI-LC-MS/MS анализа. После полного трипсинолиза, оценивавшегося по теоретически и экспериментально полученному возможному выходу пептидов, пробы содержали смесь пептидов в количестве около 1 нмоль, растворенных в 5% метиловой кислоте. Пробы раститровывали на ряд последовательных разведений по 20 мкл с конечной концентрацией от 100 пмоль/мкл до 1 фмоль/мкл в 5% муравьиной кислоте.

Для анализа проб пептидов и построения калибровочной кривой зависимости использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent 1100 Series HPLC, "Agilent", США), где в качестве детектора использовали масс-спектрометр типа ионная ловушка (Agilent 6330 Series XCT Ultra Chip Cube IT, "Agilent"). Источник ионов и колонка Zorbax с обращенной фазой (40 нл, 75 мкм×43 мм, 5 мкм, C – 18SB – ZX, "Agilent") интегрированы в чип. Каждая проба проходила пять повторов цикла анализа; загрузку 1 мкл пробы проводили в течение 6 минут при скорости потока 3,00 мкл/мин в изократическом растворе С (5% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой) на колонку, предварительно уравновешенную раствором С. Разделение пептидов осуществляли в линейном градиенте смеси растворов А (водный раствор 0,1% муравьиной кислоты) и В (80% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой) при скорости потока 0,3 мкл/мин в течение 80 минут. По окончании цикла колонку уравнивали раствором С в течение 5 минут.

Снятие масс-спектров в режиме MS/MS начинали с восьмой минуты после начала загрузки образца на колонку. При сканировании в MS/MS режиме устанавливали ограничения диапазона m/z от 425 до 1250. Сканирование проводили в режиме положительной полярности при напряжении на капилляре – 2050 В.

Подготовка смеси модельных белков для масс-спектрометрического анализа. Выбор молярных соотношений белков и числа различных белков в смеси. Смеси белков составляли таким образом, чтобы для каждой пробы было совпадение в составе хотя бы по одному белку. Общее количество молярных частей белков, входящих в состав модельной смеси, варьировали от 2 до 31 при соотношениях 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 6, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 30. Для постановки эксперимента были составлены следующие модельные смеси белков:

- а. цитохром *c* / цитохром 2b4 / БСА
- б. NADPH-цитохром P450 редуктаза / цитохром 2b4 / БСА
- в. NADPH-цитохром P450 редуктаза / миоглобин / БСА

Концентрация белков в смесях в молярном выражении варьировала от 1 нМ до 0,6 мМ. Масс-спектрометрический анализ для модельной смеси белков проводился на ионной ловушке в условиях, идентичных для индивидуальных белковых препаратов не менее чем в 4-х повторениях.

Подготовка препарата с включением С-концевого ${}_3[N^{15}]_6[C^{13}]$ -аргинина. При профилировании протеома микросом печени мыши были выбраны три пептида белка MUP3 (Major Urinary Protein), которые идентифицируются с высокой частотой и индексом достоверности. Синтетические пептиды 1410,555 Да (${}^+H_3N - ENIIDLTNVNR^*T$), 1368,475 Да (${}^+H_3N - ENIIDLSNANR^*T - COO^-$) и 1054,639 Да (${}^+H_3N - ENIIDLSNAR^* - COOH^-$) с включением С-концевого ${}_3[N^{15}]_6[C^{13}]$ -аргинина были любезно предоставлены проф. Колесановой Е.Ф. (лаборатория Белковой инженерии, ИБМХ, РАМН, Москва). Пептиды использовали в качестве внутренних и внешних стандартов при количественной оценке методом AQUA.

Мечение белков тяжелыми атомами кислорода O^{18} . Модельные белки смешивали в различных молярных соотношениях по три белка. Высушивали в вакуумном испарителе при температуре 45°C, 4200 об/мин в течение одного часа.

МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПРОБАХ БЕЗ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК

Сухой остаток ресуспендировали в рабочем буфере для проведения трипсинолиза, в присутствии H_2^{18}O : 100 мМ NH_4HCO_3 , 10% ацетонитрила, 0,05% натрия додецилсульфата, pH 8,0. Добавляли 2 мкл трипсина (200 нг/мкл), растворенного в H_2^{18}O воде с 30 мМ уксусной кислоты. Реакционную смесь инкубировали при температуре 45°C в течение 1,5 часов, затем при 37°C в течение 1,5 часов. Спустя 3 часа после начала реакции, добавляли еще 1 мкл трипсина и проводили инкубацию реакционной смеси при 37°C 2 часа, и затем еще 2 мкл фермента и оставляли реакцию при 37°C в течение ночи. Для полного замещения атомов кислорода на их тяжелые изотопы проводили второй этап реакции, в котором ингибировали амидазную активность фермента добавлением неразбавленной трифторуксусной кислоты до pH 4,5–5,0. Добавляли по 1,5 мкл трипсина (200 нг/мкл), растворенного в H_2^{18}O через каждые два часа в течение 6 часов и инкубировали при температуре 42°C. После добавления последней аликвоты трипсина реакционную смесь инкубировали при температуре 37°C в течении 12 часов [16].

Статистическая обработка результатов. Значения масс-спектрометрической интенсивности нормировали на суммарную интенсивность общего ионного тока. Линейность зависимости масс-спектрометрического сигнала оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Сравнение зависимостей между белками осуществляли с помощью теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Анализ линейной зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации для белков в чистом препарате и в смеси. Для построения калибровочной кривой нами был проведен масс-спектрометрический анализ покрытия аминокислотной последовательности модельных белков и идентификация числа уникальных пептидов. Как показано в таблице 1, покрытие аминокислотной последовательности по идентифицированным уникальным пептидам варьирует от 25% (бычий сывороточный альбумин) до 67% (цитохром c). В среднем число идентифицированных пептидов в каждом белке равно 18, что соответствует 35-50% его аминокислотной последовательности. В литературных источниках есть данные о зависимости интенсивности или площади масс-спектрометрического пика от концентрации измеряемого вещества [17-20]. При этом различные авторы говорят о возможности корреляции этих величин для разных методов относительной или абсолютной количественной масс-спектрометрии.

Таблица 1. Белки, использовавшиеся для построения кривой зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации.

Название белка	Идентификатор в базе Swiss Prot	Молекулярная масса, кДа	Число различных идентифицированных пептидов	Покрытие аминокислотной последовательности, %
NADPH-цитохром P450 редуктаза	P00389	76,5824	19	35
Цитохром 2b4	P00178	55,7137	21	55
Многлобин	P02185	17,3312	8	49
Алкоголь-дегидрогеназа	P00330	36,8233	14	52
Цитохром c	P00004	11,8328	13	67
Бычий сывороточный альбумин	P02769	69,2939	18	25
Пероксидаза	P00433	38,8253	10	31
Цитохром 3a4	P08684	57,3435	32	55

Серией экспериментов на модельных белках мы также продемонстрировали существование зависимости между интенсивностью масс-спектрометрического сигнала и концентрацией пептидов анализируемого белка в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ (рис. 1).

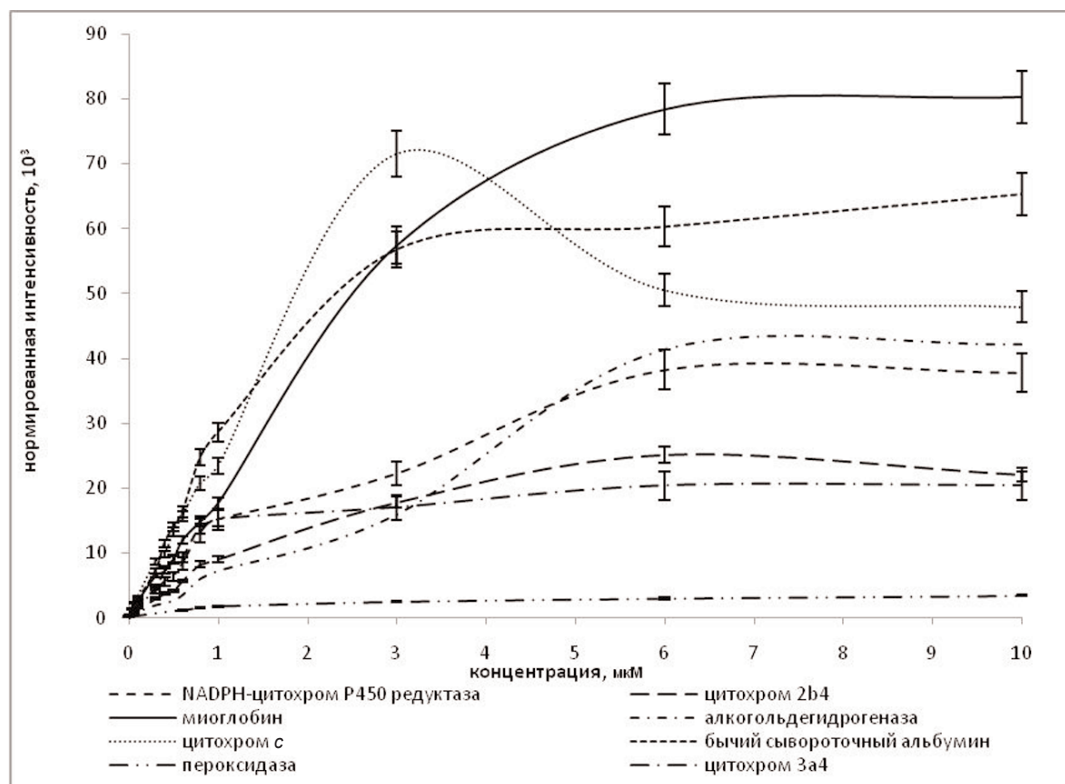


Рисунок 1.

Зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации белка в интервале от 1 нМ до 10 мкМ. Условия разделения и анализа триптических гидролизатов белков указаны в разделе "Методика".

На рисунке 1 показаны кривые зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации для каждого анализируемого белка в первичном диапазоне рассматриваемых концентраций от 1 нМ до 10 мкМ. Из полученных нами данных видно, что корреляция, при которой наблюдается закономерный линейный рост масс-спектрометрической интенсивности, наиболее выражено проявляется на участке до 1 мкМ. Это составляет три порядка концентраций, после которого рост интенсивности замедляется и приобретает логарифмический характер, а в случае с цитохромом *c* интенсивность уменьшается с ростом концентрации после 5 мкМ. В литературных источниках можно найти информацию о том, что пределы детекции динамического диапазона концентраций будут в большей степени зависеть не столько от способа подготовки биологической пробы или алгоритма обработки результатов, сколько от приборно-измерительной базы, используемой в экспериментальной работе. Это очевидно, так как различные типы масс-спектрометров обладают различной чувствительностью, точностью измерения, типом ионизации и т.д. [4, 23–26]. Тем не менее, большинство исследователей, работающих в количественной протеомике с использованием масс-спектрометрии, ссылаются на динамический диапазон достоверно измеряемых концентраций до трёх порядков [19–21, 27, 28]. Данное утверждение верно как для методов относительной, так и для абсолютной количественной протеомики; для методов с применением изотопных меток [19, 21, 27] и без их использования [29, 30]. Минимальная концентрация, с которой исследователи начинают измерения белков, исчисляется от 1 нМ при использовании nanoLC и

МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПРОБАХ БЕЗ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК

QQQ масс-спектрометра с применением MRM [19], до 6 нМ при работе в nanoLC хроматографическом режиме и использованием Q-TOF и QQQ в качестве детекторов масс-спектрометрического сигнала [27, 28]. В нашей работе общим для всех анализируемых белков диапазоном линейной зависимости масс-спектрометрической интенсивности от концентрации, который характеризовался коэффициентом корреляции r^2 на уровне от 0,97 до 0,98, являлся от 1 нМ до 1 мкМ. Причиной ограничения сигнала рамками рассматриваемых концентраций может служить верхний и нижний пределы чувствительности ионной ловушки. При этом, если нижняя граница концентрации действительно обусловлена пределом чувствительности прибора, то верхняя граница чувствительности, скорее всего, обусловлена насыщением сигнала пептидных ионов в высокой концентрации, в результате чего показатели сигнала перестают соотноситься с концентрацией измеряемого вещества. Отличие нормированного на общий ионный ток сигнала пептидов белков в диапазоне от 3 мкМ до 100 мкМ составляет 10–15%, что сравнимо с уровнем относительной ошибки измерений прибора ($\pm 12\%$). Среднее отличие интенсивности по всей выборке белков при концентрациях от 3 мкМ до 6 мкМ составляет 1,2 раза, от 6 до 10 мкМ отличия в значениях интенсивности сигнала отсутствуют, а в диапазоне от 10 мкМ до 100 мкМ – в 1,15 раза.

На рисунке 2 показаны кривые линейной аппроксимации зависимости сигнала от концентрации для каждого белка в диапазоне от 0,1 до 1 мкМ. Видно, что для всех белков характерна линейная зависимость интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации, что также подтверждается тестом Фишера ($3,257 \leq F \leq 1,004$, $F_t = 9,28$). Как видно из рисунка 2, коэффициент линейной корреляции Пирсона в рассматриваемом диапазоне концентраций для модельных белков находится в пределах 0,97–0,99. Следует отметить, что при более низких концентрациях белков (от 1 нМ до 0,1 мкМ) сохраняется линейная зависимость сигнала от концентрации каждого белка.

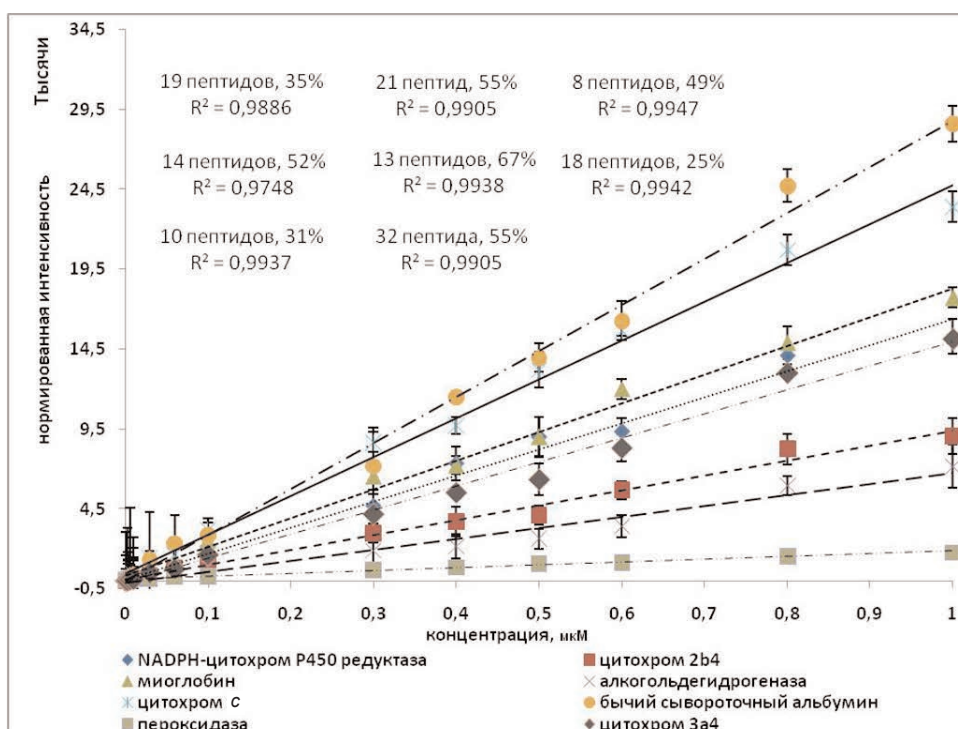


Рисунок 2.

Линейная корреляция интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации для каждого модельного белка в диапазоне от 1 нМ до 1 мкМ. Для каждого модельного белка показаны аппроксимирующие кривые линейной зависимости интенсивности ответного сигнала от концентрации, построенные по совокупности всех идентифицированных пептидов в конкретной концентрационной точке.

Для исследования возможности использования предлагаемого метода количественной оценки в сложных белковых смесях, был поставлен эксперимент по анализу зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации белков в смеси. В работе были использованы различные концентрационные соотношения белков, присутствующих в одном препарате белковой смеси. Анализ проводили на примере трех смесей белков, отличающихся по композиции белков и их молярному соотношению (см. раздел “Методика”).

На рисунке 3 показано сравнение интенсивностей масс-спектрометрического сигнала для белков в смеси и в чистом препарате. Видно, что в смеси белков с различными молярными отношениями закономерность линейного распределения зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации пептидов сохраняется. Рост интенсивности наблюдается в обоих случаях, но у белков, находящихся в модельных смесях, изменение происходит с отставанием. Снижение интенсивности может быть обусловлено эффектом более высокого уровня общего ионного тока, на который нормируется интенсивность сигнала отдельного пептида. С другой стороны, эффект снижения интенсивности может быть обусловлен ионной супрессией, как следствие большего качественного разнообразия пептидных ионов в смеси.

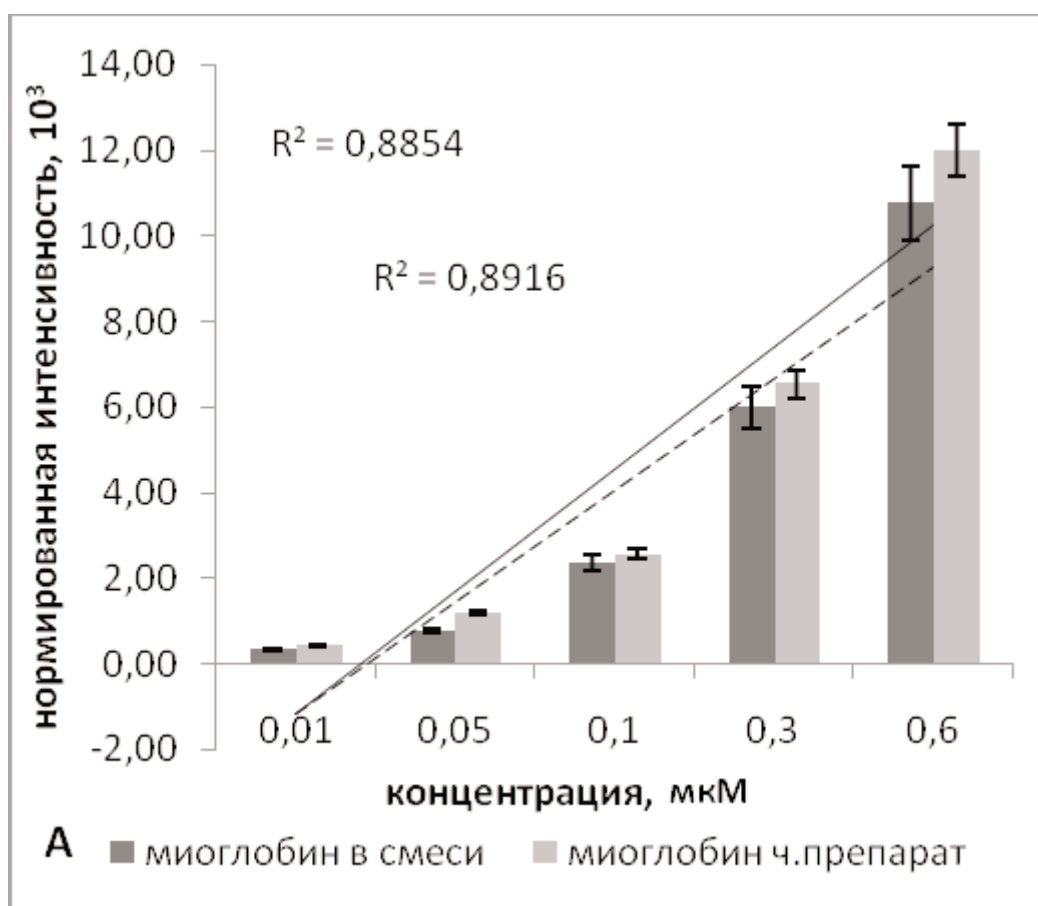


Рисунок 3А.

Линейность зависимости нормированной масс-спектрометрической интенсивности от концентрации для изолированных белков и в смеси на примере миоглобина (А).

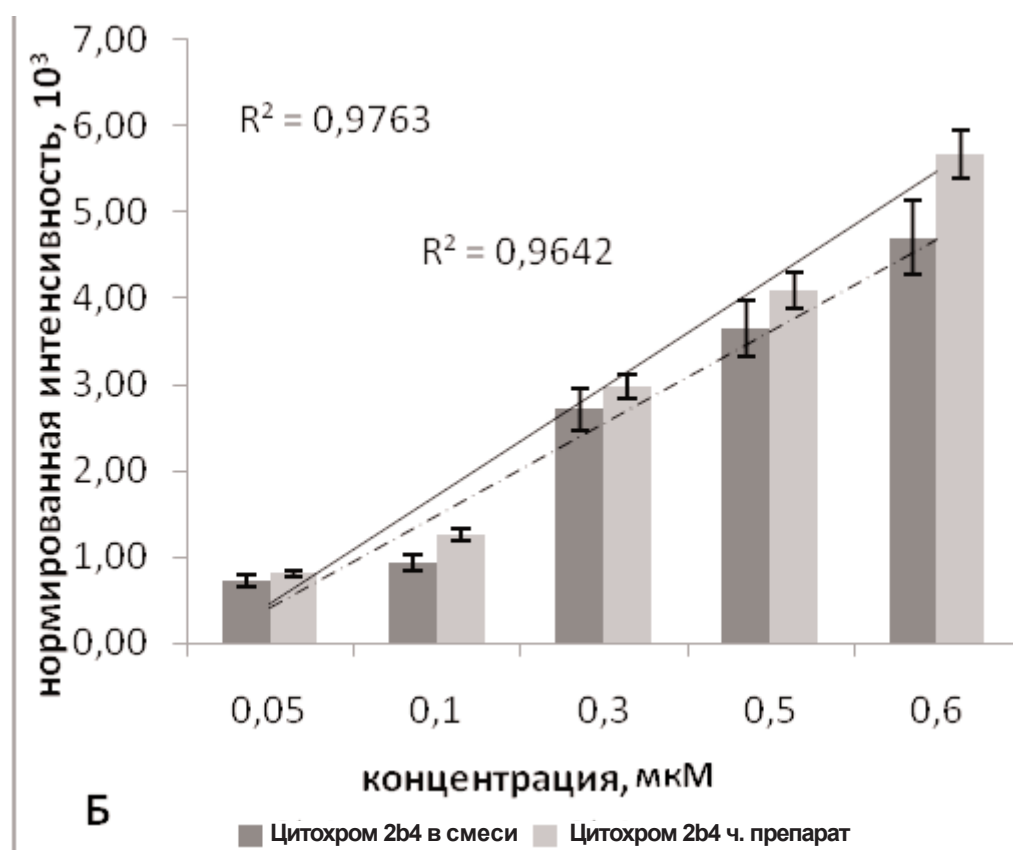


Рисунок 3Б.

Линейность зависимости нормированной масс-спектрометрической интенсивности от концентрации для изолированных белков и в смеси на примере цитохрома 2b4 (Б).

Коэффициент линейной корреляции зависимости сигнала от концентрации для белков в смеси близок к рассчитанному для отдельных белков и лежит в пределах 0,93–0,98 для аппроксимирующей кривой зависимости по всей совокупности идентифицированных пептидов на протяжении анализируемого концентрационного диапазона.

Исходя из полученных данных нормированной интенсивности сигнала для белков в чистом препарате и в смеси при различном концентрационном соотношении, можно сделать вывод, что присутствующие в смеси белки не нарушают линейный характер зависимости какого-либо белка в отдельности, даже если их концентрация в смеси отличается на порядок.

Подобные данные со значениями стандартного отклонения на уровне 15–30% представили в своих работах и другие исследователи, работающие на ионных ловушках и Q-TOF масс-спектрометрах [31–33]. Несмотря на общность зависимости сигнала от концентрации, для каждого белка характерны свои свойства кривой корреляции, которые проявляются в таких параметрах, как верхняя и нижняя граница интенсивностей, в рамках которых проявляется линейность, амплитуда ускорения роста интенсивности с изменением концентрации. Поэтому отношение интенсивностей невозможно использовать как прямой показатель истинного относительного содержания белка в смеси. Об этом также говорят в своих обзорах Fiehn [32], Anderson [33] и Lill [34]. Таким образом, для определения количественного содержания белка в пробе, для каждого из них необходимо строить калибровочную кривую зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации в интересующих концентрационных границах.

Условие, необходимое для выполнения линейной зависимости между уровнем интенсивности масс-спектрометрического сигнала и концентрацией белка. В нашей работе было продемонстрировано, что линейная зависимость интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации формируется при определенном численном сочетании уникальных пептидов. Для миоглобина и алкогольдегидрогеназы и кривая зависимости становится линейной с коэффициентом $r^2=0,93$ при интегрировании данных не менее, чем по четырем пептидам. В случае, если кривая сформирована по трем пептидам, коэффициент Пирсона не превышает значения 0,85 для алкогольдегидрогеназы и 0,87 для миоглобина. Такую аппроксимирующую кривую мы будем называть базовой. Базовая кривая зависимости, сформированная по четырем различным пептидам, максимально приближена по своим свойствам и коэффициенту линейной корреляции к общей интегрированной кривой зависимости для белков, как совокупности всех идентифицированных в ходе эксперимента уникальных пептидов. Для такой кривой коэффициент Пирсона лежит на уровне $r^2 = 0,91-0,95$, а относительное стандартное отклонение значений интенсивности в различных точках концентраций не превышает 23-25%, что сравнимо с показателями суммарной кривой зависимости сигнала от концентрации пептидов.

Однако в некоторых случаях для белков достаточно трех пептидов для формирования базовой кривой зависимости с коэффициентом корреляции более 0,9. Таким примером является БСА (рис. 4), пероксидаза, цитохром с и цитохром 2b4. На рисунке 4 показаны кривые зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации для трех пептидов БСА. Как видно, кривые зависимости для каждого пептида в отдельности характеризуется низкими значениями коэффициента корреляции Пирсона ($r^2=0,82$ для 625,26; $r^2=0,85$ для 417,22; $r^2=0,78$ для 547,37). Однако усреднение и интегрирование кривых зависимости трех пептидов в совокупности дает новую кривую с коэффициентом корреляции 0,94.

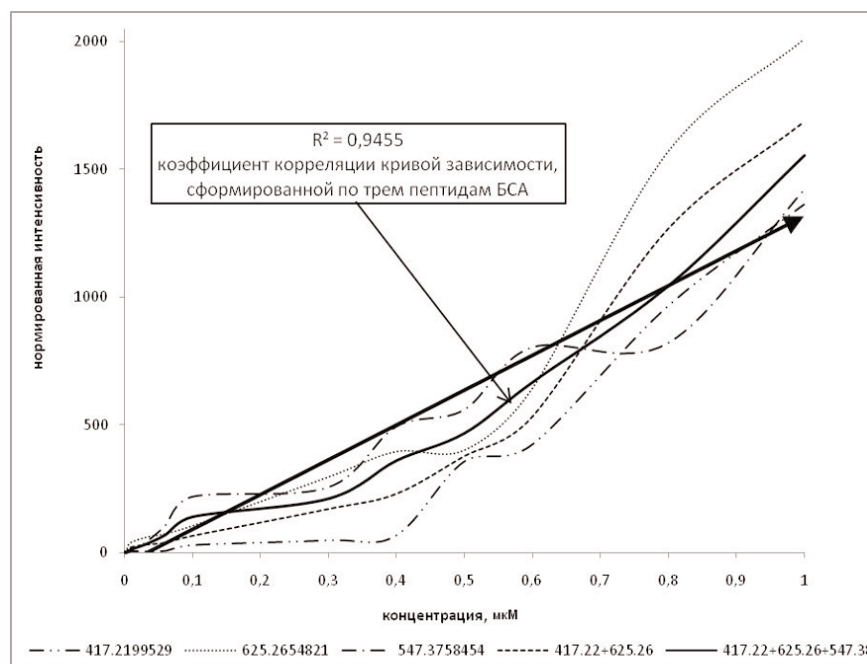


Рисунок 4.

Изменение коэффициента линейной корреляции с ростом числа идентифицированных пептидов при интеграции кривых зависимости сигнала от концентрации для бычьего сывороточного альбумина. Кривые зависимости сигнала от концентрации построены в диапазоне от 0,1 до 1 мкМ. Для пептидов в отдельности были показаны следующие коэффициенты Пирсона: $r^2=0,82$ для 625,26; $r^2=0,85$ для 417,22; $r^2=0,78$ для 547,37. Для интегрированной кривой зависимости по двум пептидам (417,22+625,26) $r^2=0,89$. Базовая кривая зависимости, сформированная по трем пептидам обнаруживает $r^2=0,94$. Отклонение величины коэффициента Пирсона базовой кривой зависимости в четырех повторениях составляет $\pm 0,02$.

Таким образом, мы определили, что для соблюдения линейной корреляции между уровнем масс-спектрометрического сигнала и анализируемой концентрацией существует минимальное необходимое количество различных идентифицированных пептидов для одного белка. Для того, чтобы условие выполнялось корректно, необходимо четыре различных пептида с показателем индекса достоверности идентификации для каждого не менее 6,0 (Spectrum Mill). Пептиды при этом должны принадлежать одному белку и их присутствие должно прослеживаться на протяжении всего концентрационного диапазона. Чем больше идентифицированных пептидов относится к одному белку, тем более сглаженной является суммарная кривая зависимости, тем ниже амплитуда колебаний интенсивности сигнала вдоль концентрационного диапазона.

Соблюдение “правила четырёх пептидов” становится тем сложнее, чем меньше молекулярная масса белка, а, следовательно, и меньше теоретическое и реальное количество формируемых пептидов.

Проверка эффективности безметкового метода количественной оценки содержания белков в биологических пробах в сравнении с AQUA методом абсолютной количественной протеомики и ^{18}O мечением. Для определения точности измерений предлагаемым методом мы провели сравнительную оценку содержания белков методами AQUA и методом изотопного замещения двух атомов кислорода ^{16}O на изотопы ^{18}O на С-конце пептидов в ходе реакции кислородного обмена, катализируемой трипсином. Результаты измерений параллельно сравнивали с содержанием белка в пробе (см. раздел “Методика”).

Метод AQUA основан на количественной оценке белка по выбранным пептидам в сравнении с идентичными пептидами, но имеющими в своем составе аминокислотный остаток с включением тяжелых изотопов атомов, ^{13}C или ^{15}N . В смесь пептидов исходного препарата белка добавляли известное количество синтезированных пептидов с изотопной меткой, и далее по масс-спектрам проводили оценку количества белка по пептидам сравнения. Обязательным условием метода является синхронность во времени удержания на колонке пептидов белка и синтетических пептидов с изотопами. Для данной работы были выбраны 3-я и 5-я изоформы MUP (Major Urinary Protein) мыши, которые в большом количестве встречаются при протеомном профилировании белкового состава фракции микросом. Из числа идентифицированных пептидов для данных белков были отобраны пептиды, индекс достоверности идентификации для которых был не ниже 20,0 и покрытие не менее 85%. Из отобранного пула пептидов мы отбирали те, длина которых не превышала 15 аминокислотных остатков, так как большая длина в значительной степени усложняет химический синтез пептидов. При этом, пептиды не должны иметь в своем составе модифицированных аминокислотных остатков и при анализе формировать пептидные ионы с зарядом не выше +3.

На рисунке 5 представлены масс-спектры пептида 1258 Да белка MUP3 (А) и спектр распада пептидного иона на ряд b- и y-ионных фрагментов (Б).

Для белков MUP3 и MUP5 калибровочную кривую в границах от 1 нМ до 1 мкМ строили по трем синтетическим пептидам (1258 Да, 1300 Да и 1045 Да), полностью соответствующих молекулярной массе и аминокислотному составу нативным триптическим пептидам. Сравнительный анализ с методом AQUA по белку MUP при добавлении 10 и 50 фмоль/мкл пептидов 1267 Да, 1309 Да и 1054 Да с включением изотопов 6 атомов ^{13}C и 3 атомов ^{15}N показал отличие значений интенсивности по отдельным пептидам на 12-14% по сравнению с показателями калибровочной кривой. Методом AQUA проведен сравнительный анализ контрольной и опытной (мышей, инъецированных 3-метилхлорантреном) проб микросом печени мыши, в которых оценку содержания белка рассчитывали по отношению площадей пиков пептидов с включением изотопов атомов углерода и азота и нативных пептидов, полученных после трипсинолиза. Было показано, что в опытной пробе концентрация белка оставляет 85 нМ, что в 8,31 раз

превышает содержание в контрольной пробе – 10,22 нМ. По калибровочной кривой содержание белка в контрольной пробе составляло 10,5 нМ, а содержание MUP3 в опытной пробе составляет 94 нМ, то есть отличие в 9 раз. Отличие в измерении двумя методами составляет 11,7%, что укладывается в относительное стандартное отклонение значений $\sigma = 15\%$ в нашем методе. Данные о содержании MUP белка, полученные сравнительным анализом с методом AQUA, согласуются с величинами, полученными ранее [35], где авторы проводили количественную оценку MUP в пробе с использованием двумерного электрофореза.

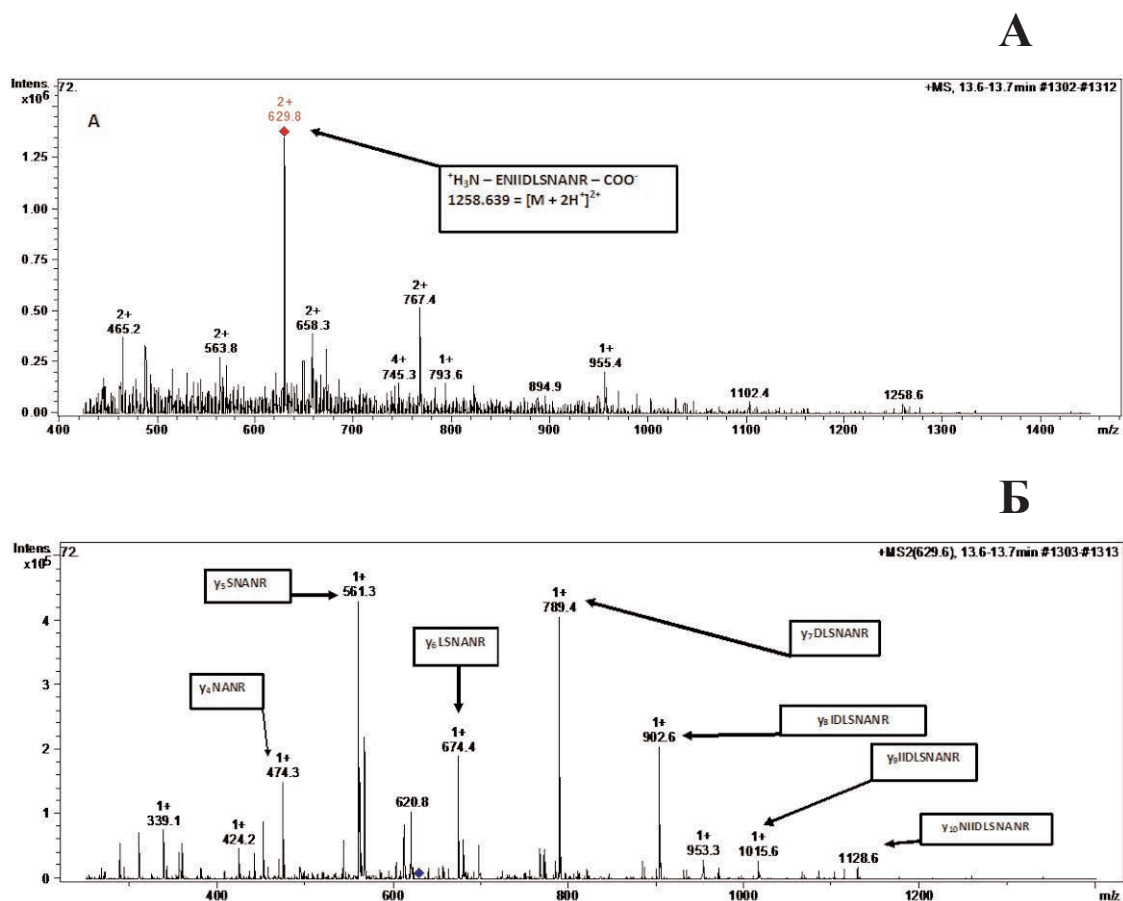


Рисунок 5.

Масс-спектры пептида 1258 Да (А - MS-спектр, Б - MS/MS спектр распада иона 1258). Стрелками указаны b- и y-фрагменты пептида 1258 Да.

Другим методом с включением атомов кислорода ^{18}O в ходе реакции гидролитического расщепления был проведен количественный анализ трех белков в смеси: цитохрома с, алкогольдегидрогеназы и пероксидазы. Содержанием белков оценивали при соотношении с контрольной группой (с изотопами кислорода ^{16}O) 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 5 в прямом и обратном экспериментах, где одна мольная доля составляла 10 нМ.

В таблице 2 представлены результаты измерения масс-спектрометрической интенсивности пептидов в смеси ^{18}O - и ^{16}O -пептидов цитохрома с, алкогольдегидрогеназы и пероксидазы после трипсинолиза. Количественный анализ проводили с учетом вклада доли немеченых пептидов в препарате ^{18}O -пептидов.

МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПРОБАХ БЕЗ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК

Таблица 2. Данные количественной оценки содержания белков в смесях без использования метки ^{18}O . При расчётах принимали, что в смеси одна мольная доля составляла 10 нМ.

Пептид	№	Белок	Средняя величина мольной доли в прямом эксперименте, нМ	Средняя величина мольной доли в обратном эксперименте, нМ
(K)ITTFDNK(V)	1	цитохром с	8,2±0,12	7,9±0,03
(K)MGNIPLTGTQGQIR(L)	2	цитохром с	8,5±0,10	8,1±0,07
(K)EKDIVGAVLK(A)	3	алкогольдегидрогеназа	8,7±0,06	8,7±0,02
(K)VLGIDGGEGKEELFR(S)	4	цитохром с	8,2±0,17	7,9±0,10
(K)TGQAPGFSYTDANK(N)	5	пероксидаза	8,5±0,06	8,1±0,09
(K)GFTENIYEENID(K)	6	алкогольдегидрогеназа	8,5±0,11	8,1±0,15
(K)IHERDKHADSAVD(N)	7	пероксидаза	8,3±0,04	8,3±0,12
средняя величина отклонения, нМ			8,28±0,09	
стандартное отклонение, %			0,286 (17%)	

Был проведён анализ эффективности мечения атомами кислорода ^{18}O в соотношениях $[^{16}\text{O}]/[^{18}\text{O}]$ как 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 5 в прямом и обратном экспериментах. Данные эксперимента показали, что среднее значение для отношения 1 : 1 составляет 1,161, стандартное отклонение - 0,049. Значения для отношений 1 : 3 и 1 : 5 в прямом и обратном экспериментах близки, поэтому для расчета среднего значения и стандартного отклонения мы объединяли выборки по соответствующим отношениям в одну генеральную совокупность. Таким образом, для 1 : 3 среднее отношение площадей пиков составляет 3,295 со стандартным отклонением 0,272, а для 1 : 5 среднее равно 5,332 со стандартным отклонением 0,261. При сравнительном анализе с безметковым методом по калибровочным кривым для данных белков показано (табл. 3), что для первого и четвертого пептида одна мольная доля по уровню нормированной масс-спектрометрической интенсивности соответствуют приблизительно 8,2 нМ в прямом и 7,9 нМ в обратном экспериментах, для второго, пятого и шестого – 8,5 нМ и 8,1 нМ соответственно, а для третьего, седьмого 8,7 нМ и 8,3 нМ. В общем случае, среднее значение в одной мольной доле составляет 8,28 нМ со стандартным отклонением в 0,286; в процентном выражении отклонение расчетной величины от известной концентрации составляет в среднем 17%. Это укладывается в рамки погрешностей, которые были показаны для препаратов коммерчески доступных индивидуальных белков и в смеси пептидов. При усреднении показателей концентрации по пептидам для каждого белка в смеси одна мольная доля цитохрома с составляет 8,04 нМ, а для пероксидазы и алкогольдегидрогеназы – 8,40 нМ.

Таким образом, результаты сравнительного анализа с данными относительной количественной оценки указывают на высокую точность измерений, подтверждая нашу гипотезу о высокой степени корреляции между нормированной интенсивностью масс-спектрометрического сигнала совокупности пептидов белка и их концентрацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Подводя итоги результатам проведенной работы, можно сказать, что в работе подтверждена и проверена на практике возможность осуществления количественного анализа содержания белков в биологических пробах без использования меток с применением масс-спектрометрии. В работе детально изучены закономерность зависимости интенсивности

масс-спектрометрического сигнала от концентрации белка в пробе, приведена доказательная база линейности корреляции. В работе выяснены некоторые особенности линейной зависимости на различных участках концентраций, определены пределы чувствительности, в рамках которых сохраняется линейность корреляции. Проведено сравнение результативности и эффективности метода для исследования чистых препаратов белков и белковых смесей.

Показано, что линейность зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации проявляется в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ. Такие же границы корреляции справедливы для белков в смеси, где было продемонстрировано, что присутствие в смеси одного и более белков не влияет на линейность зависимости сигнала от концентрации другого белка, но при этом наблюдается снижение абсолютных величин интенсивности на протяжении всего диапазона на 12–15%.

Выявлено, что для соблюдения линейности корреляции интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации белка в пробе необходимо наличие как минимум четырех различных идентифицированных пептидов, принадлежащих одному белку, которые формируют базовую кривую зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации, характерную для общей совокупности всех пептидов данного белка, идентифицированных в ходе количественного анализа. Данные пептиды должны прослеживаться на протяжении всего интересующего анализируемого диапазона предполагаемых концентраций и имеют ограничения по индексу достоверности идентификации – не менее 6,0 для каждого; это правило сохраняется как для очищенных белков в виде чистого препарата, так и в виде белковых смесей. В отдельных случаях, для формирования базовой кривой зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации достаточно трёх пептидов.

Каждый белок обладает характеристическим для него значением тангенса угла наклона кривой зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации. Данная величина не зависит от присутствия других белков в пробе и характеризует природу самого белка.

Результаты, полученные в условиях анализа изолированных белков и белковых смесей, были проверены на реальных протеомных объектах. Количественный анализ фракции микросом из клеток печени мыши с использованием масс-спектрометрического безметкового количественного анализа, подтвердил данные, полученные методом AQUA и относительной количественной оценкой в условиях изотопного мечения атомами ^{18}O .

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 07-04-00803а

Авторы выражают благодарность проф. Е.Ф. Колесановой за синтез пептидов MUP3 и MUP5 белков с включением С-концевого ${}^3[\text{N}^{15}]_6[\text{C}^{13}]$ -аргинина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ottens A.K., Kobeissy F.H., Wolper R.A., Haskins W.E., Hayes R.L., Denslow N.D., Wang K.K.W. (2005) *Anal. Chem.*, **5**, 4836-4845.
2. Alban A., David S.O., Bjorkesten L., Andersson C., Sloge E., Lewis S., Currie I. (2003) *Proteomics*, **3**, 36-44.
3. Unlu M., Morgan E., Minden J.S. (1997) *Electrophoresis*, **18**, 2071-2077.
4. Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M. (2001) *Proteomics*, **1**, 377-396.
5. Копылов А.Т., Згода В.Г. (2007) *Биомед. хим.*, **53**(6), 613-643.
6. Stewart I.I., Thomson T., Figeys D. (2001) *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **15**, 2456-2465.

7. Yao X., Freas A., Ramirez J., Dmitriev P.A., Fenselau C. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 2836-2842.
8. Yao X., Afonso C., Fenselau C. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**, 147-152.
9. Rabilloud T. (2002) *Proteomics*, **2**(1), 3-10.
10. Hoffmann P., Ji H., Mortiz R.L., Connolly L.M., Frecklington D.F., Layton M.J., Eddes J.S., Simpson R.J. (2001) *Proteomics*, **1**, 807-818.
11. Hamler R.L., Zhu K., Buchanani N.S., Kreunin P., Kachman M.T., Miller F.R., Lubman D.M. (2004) *Proteomics*, **4**, 562-577.
12. Wang H.X., Kachman M.T., Schwatz D.R., Cho K.R., Lubman D.M. (2004) *Proteomics*, **4**, 2476-2495.
13. Opitek G.J., Ramirez S.M., Jorgenson J.W., Moseley M.A. (1998) *Anal. Biochem.*, **258**, 349-361.
14. Chong B.E., Yan F., Lubman D.M., Miller F.R. (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 291-296.
15. Hansen K.C., Schmitt-Ulms G., Chakley F., Hirsch J. (2003) *J. Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 299-314.
16. Bantscheff M., Dimpfelfeld B., Kuster B. (2004) *Proteomics*, **18**, 869-876.
17. Jiang X.-S., Dai J., Sheng Q.-H., Zhang L. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 12-34.
18. Ranish J.A., Yi E.C., Leslie D.M., Purvine S.O., Goodlet D.R., Eng J., Aebersold R. (2003) *Nature Genetics*, **33**(3), 349-355.
19. Shen M., Guo L., Wallace A., Fitzner J., Eisenman J., Jacobson E., Jhonson R.S. (2003) *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 315-324.
20. Wang S., Regnier F.E. (2001) *J. Chromatogr. A*, **924**, 345-357.
21. Patton W.F. (2002) *J. Chromatogr. B*, **771**, 3-31.
22. Alban A., David S.O., Bjorkesten L., Andersson C., Sloge E., Lewis S., Currie I. (2003) *Proteomics*, **3**, 36-44.
23. Oda Y., Owa T., Sato T., Boucher B. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 2159-2165.
24. Yu L.-R., Conrads T.P., Uo T., Isaaq H.J. (2004) *J. Proteome Res.*, **3**, 469-477.
25. Kopylov A.T., Zgoda V.G. (2008) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry*, **2**, 28-46.
26. Зиганишин Р.Х., Алексеев Д.Г., Арапиди Г.П., Иванов В.Т., Мошковский С.А., Говорун В.М. (2008) *Биомед. хим.*, **54**(4), 408-419.
27. Parker K.C., Pattern D., Williamson B., Marches J. (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 625-659.
28. Molloy M.P., Donohoe S., Brzezinski E.E., Kilby G.W. (2005) *Proteomics*, **5**, 1204-1208.
29. Kuhn E., Wu J., Karl J., Liao H. (2004) *Proteomics*, **4**, 1175-1186.
30. Kirkpatrick D., Gerbes S., Gygi S. (2005) *Methods*, **35**, 265-273.
31. Cutillas P., Vanhaesebroeck B. (2007) *Molecular and Cellular Proteomics*, **6**, 1560-1573.
32. Fiehn O., Weckwerth W. (2007) *Quantitation Mass spectrometry*, **12**, 1030-1034.
33. Anderson N.L., Anderson N.G. (1998) *Electrophoresis*, **19**, 1853-1861.
34. Jennie Lill (2003) *Mass spectrometry Reviews*, **22**, 182-194.
35. Zgoda V.G., Tikhonova O., Viginskaya A., Serebriakova M., Lissitsa A., Archakov A. (2006) *Proteomics*, **6**(16), 4662-4670.

Поступила: 08. 04. 2009.

LABEL-FREE QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTEINS USING MASS-SPECTROMETRY

A.T. Kopylov, V.G. Zgoda, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, 119121 Moscow, Pogodinskaya ul., 10;
e-mail: a.t.kopylov@gmail.com

In the present paper we highlight the dependence of normalized mass spectrometry intensity on protein concentration. We have defined dynamic range of concentrations from 1 nM to 1 mM. It has been shown that the dependence holds linearity along the whole concentration range as for pure proteins as for proteins mixtures. Our observation revealed that the correlation curve possess protein-specific tangent between 1 nM and 1 mM. The efficacy of the method evaluated by AQUA and ^{18}O -labelling techniques of quantitative proteomics.

Key words: quantitative proteomics, mass-spectrometry, linear correlation, label-free method.