

**Копылов Артур Тигранович**

**РАЗРАБОТКА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ  
СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК**

**03.00.04 – биохимия**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**МОСКВА - 2009**

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН.

**Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук

Згода Виктор Гаврилович

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук

Шевченко Валерий Евгеньевич

Доктор биологических наук

Прозоровский Владимир Николаевич

**Ведущая организация:**

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт питания РАМН.

Защита состоится 18 июня 2009 года в 12 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН по адресу: 119121 Москва, улица Погодинская, дом 10, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Любой биологический процесс неразрывно сопровождается изменениями химического состава клетки и биологических жидкостей. Определение динамических изменений в белковом составе биологических образцов является основной задачей протеомных исследований, направленных на фундаментальное понимание биологических процессов и на применение новых методов в диагностике и лечении заболеваний. Решение этих вопросов достигается путем сравнительного анализа белков в протеоме, содержание которых может меняться в ответ на воздействия химического или физиологического характера. Именно такие изменения представляют собой наибольший интерес для дальнейших исследований.

В последнее время к протеомике предъявляются требования количественной оценки наблюдаемых изменений. Однако из-за значительных технических и методических ограничений масс-спектрометрия, которая является основным инструментом современной протеомики, не всегда способна осуществлять количественную оценку содержания белка в отсутствие внутренних стандартов. Для решения проблемы количественного анализа были разработаны методы относительной количественной протеомики с использованием стабильных тяжелых изотопов кислорода, углерода, азота и дейтерия. Тяжелые атомы включались в состав пептидов или белков, либо замещали их легкие изотопы, тем самым смещая молекулярную массу пептида. Сравнивая площади под пиками пептидов одинакового химического состава, но с различным содержанием тяжелых изотопов, проводят относительную количественную оценку белков в организмах при различных состояниях. С течением времени исследователи обнаруживали все больше недостатков в методах количественной оценки с использованием различных изотопов. Прежде всего, к ним относится ограниченная специфичность меток: многие из них были направлены на связывание с тиольной группой аминокислотного остатка цистеина. Это вызывало трудности, связанные с необходимостью максимально полного восстановления цистеинов в процессе пробоподготовки и увеличивало время постановки эксперимента. Невозможно было проводить количественную оценку для белков с малым содержанием или отсутствием цистеинов в первичной цепи, или недоступными для протеолиза цистеинами. Метод метаболического изотопного мечения доступен только для использования в культуре клеток *in vitro* или для простейших организмов. Изотопное мечение тяжелыми атомами кислорода [ $^{18}\text{O}$ ] в ходе реакции гидролитического расщепления трипсином требовало использование масс-спектрометров с высоким разрешением, чтобы не допустить перекрытия изотопных распределений масс измеряемых пептидов

Однако, в последнее десятилетие все больше внимания стали обращать на подход в количественной протеомике, не требующий использования изотопных меток. Выявление и изучение закономерностей зависимости между сигналом масс-спектрометра и количеством измеряемого белка привело к развитию двух основных направлений количественной протеомики без использования меток. Более раннее из них основано на корреляции суммарного индекса достоверности идентификации белка по всем зафиксированным в ходе эксперимента его пептидам с количеством анализируемого белка. Второе направление основано на существовании зависимости

между усредненной суммы масс-спектрометрических сигналов пептидов, принадлежащих одному белку, и его содержанием в биологической пробе. Оба направления постоянно совершенствуются и имеют все перспективы в недалеком будущем успешно конкурировать с количественными методами с использованием тяжелых изотопных атомов.

В настоящей работе была выявлена зависимость уровня масс-спектрометрического сигнала от содержания белка в пробе, детально исследован характер зависимости для индивидуальных белков и для белковых смесей; показаны особенности зависимости, связанные с числом индивидуальных пептидов одного белка и их сочетанием. Кроме того, определено влияние скорости потока наноэлектроспрея на линейность кривой зависимости и на уровень интенсивности на отдельных участках зависимости. На основе полученных результатов разработан и охарактеризован новый метод количественного протеомного анализа без использования меток, а также проведено его сравнение с изотопными технологиями количественной масс-спектрометрии.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в разработке метода количественной оценки содержания белков в модельных растворах и биоматериале без использования меток.

Для достижения этой цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Выявить наличие и характер зависимости между уровнем масс-спектрометрического сигнала и концентрацией растворов 8 индивидуальных белков и их смесей. Определить концентрационные интервалы, в рамках которых проявляется линейная зависимость масс-спектральной интенсивности от концентрации.
2. Определить условия линейности зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации триптических пептидов анализируемого белка в пробе.
3. Выявить влияние скорости потока наноэлектроспрея на зависимость интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации для указанных белков виде чистого препарата и в смеси.
4. Оценить эффективность разработанного метода путем его использования для количественной оценки белка MUP3 в пробе микросом ткани печени мыши.

**Научная новизна работы.** В диссертации разработан и охарактеризован метод количественного протеомного анализа без использования изотопных меток. Для этого установлено существование линейной корреляции уровня масс-спектральной интенсивности от концентрации анализируемого белка. Показано, что границы корреляции для количественного анализа с использованием масс-спектрометра типа ионной ловушки составляют от 1 нМ до 1 мкМ. Зависимость в данном интервале концентраций сохраняет линейность в условиях анализа чистого препарата и в смеси белков и не зависит от физико-химических свойств белка или его структурно-функциональных особенностей. Кроме того, показано, что для соблюдения линейности в

анализе необходимо наличие минимум четырех различных достоверно идентифицированных пептидов, принадлежащих одному белку, причем присутствие данных пептидов должно прослеживаться на протяжении всего исследуемого концентрационного диапазона. Нами также были подобраны оптимальные условия скорости потока наноэлектроспрея, применимые для проведения количественной оценки белков на масс-спектрометрах типа ионных ловушек.

**Практическая значимость работы.** В работе показано, что разработанный метод позволяет осуществлять оценку содержания белковых компонентов в биологических пробах и в чистых препаратах без использования химических или метаболических меток. Разработан общий подход к оптимизации условий количественной оценки белков с использованием масс-спектрометров типа ионной ловушки. Предложены метод нормирования масс-спектрометрических данных для эффективного выявления линейных участков зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации анализируемого белка в чистом препарате и в смеси белков.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования были представлены на Международной конференции «Биология – наука XXI века», Пушино, Россия, 2007; международной конференции HUPO-2008, Amsterdam, the Netherlands; VII Всероссийская конференция в рамках Федерального конкурса инновационных проектов «Живые системы», Москва, Россия, 2007.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ: 4 статьи в российских и иностранных научных изданиях и 3 публикации в докладах научных конференций.

**Объём и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (8 глав), описания материалов и методов исследования (2 главы), результатов (6 глав), обсуждения (6 глав), выводов, заключения, списка литературных источников, цитируемых в диссертационной работе и приложения. Работа изложена на 161 странице печатного текста, содержит 15 таблиц, 24 рисунков и 1 приложение. Список цитируемой литературы включает 158 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### *Препараты белков для количественного анализа*

В качестве модельных объектов были отобраны 8 белков в виде чистого коммерческого препарата: бычий сывороточный альбумин (ICN Biomedical, США), 69,293 кДа; миоглобин из спермы кита (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 ткани 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, США), 11,832 кДа.

Белки растворяли в 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, до конечной концентрации 100 мкМ. Затем из маточного раствора отбирали по 20 мкл (2 нМ белка) и переносили в чистую

пробирку объемом 200 мкл. Раствор упаривали в вакуумном испарителе при температуре 30°C и 4200 об./мин в течение 45-60 минут и хранили при -80°C до использования.

#### *Проведение гидролиза белков трипсином в растворе*

Сухой остаток белка ресуспендировали в 20 мкл буферного раствора для проведения трипсинолиза. Раствор содержал 100 мМ гидрокарбоната аммония, 15 % ацетонитрила и 0,02 % додецилсульфата натрия и 0,5 мМ хлорида кальция при pH 8,0. Добавляли по 1 мкл раствора свиного модифицированного трипсина (Promega) с концентрацией 0,05 мкг/мкл (1 : 400 по массе). Реакционную смесь инкубировали при температуре 42°C. Через 2 часа после начала реакции к смеси добавили еще 0,05 мкг раствора фермента и инкубировали при 37°C; через последующие 2 часа вносили еще 1 мкл раствора трипсина с концентрацией 0,10 мкг/мкл. Затем реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение ночи.

Полученную смесь пептидов высушивали в вакуумном испарителе при 45°C при 4200 об./мин в течение 1,5 часов. После процедур предварительной пробоподготовки получали 1 нмоль смеси пептидов интересующих белков, которую растворяли в 10 мкл 5% раствора муравьиной кислоты.

#### *Масс-спектрометрический анализ*

Пробы разбавляли с получением последовательных разведений по 20 мкл с конечной концентрацией пептидов от 100 пмоль/мкл до 1 фмоль/мкл в 5% муравьиной кислоте.

Для анализа проб пептидов и построения калибровочного графика зависимости использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометром типа ионной ловушки (Agilent 6330 Series XCT Ultra Chip Cube IT, США). Источник ионов и колонка Zorbax с обращенной фазой (40 нл Trap 75 мкм X 43 мм, 5 мкм, C – 18SB – ZX) интегрированы в чип Chip Cube (Agilent). Каждую пробу анализировали в пяти повторах при следующих условиях: загрузка 1 мкл пробы в течение 6 минут при скорости потока 3,000 мкл/мин в изократическом растворе С (5 % ацетонитрила и 0,1 % муравьиной кислоты) на предварительно уравновешенную раствором С колонку. Элюция с колонки в линейном градиенте растворов А (водный раствор 0,1 % муравьиной кислоты) и В (80 % ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой) при скорости потока градиента 0,3 мкл/мин в течение 80 минут. По окончании цикла колонку уравнивали раствором С в течение 5 минут.

Сканирование 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, нижний порог интенсивности от  $1,5 \cdot 10^5$ , режим ICC (ion current control, контроль тока ионов) аккумуляции и контроля зарядов пептидных ионов не менее 100000 ионов за не более, чем 50 мс. PBC-хроматографический (peak-based chromatography) мониторинг элюции пептидов. Сканирование проводили в режиме положительной полярности на электроде при максимальном напряжении на капилляре – 2050 В.

### *Смеси модельных белков для масс-спектрометрического анализа*

Смеси получали так, чтобы в каждой модельной смеси содержался один из белков, присутствующих в другой смеси. Общее количество молярных частей белков, входящих в состав модельной смеси, варьировали от 12 до 71. Для постановки эксперимента были приготовлены следующие модельные смеси белков в следующих молярных количествах и соотношения:

Цитохром С / цитохром 2b4 / БСА – 1 : 1,7 : 10, 1 : 10 : 20

NADPH-цитохром Р450 редуктаза / цитохром 2b4 / БСА – 1 : 5 : 10, 1 : 1,7 : 20

NADPH-цитохром Р450 редуктаза / миоглобин / БСА – 1 : 10 : 30, 1 : 10 : 60

Концентрация белков в смесях в количественном молярном выражении изменялась от 0,001 до 0,6 мкМ. Смеси готовили в объёмах по 10 мкл для проведения эксперимента не менее чем в 4 повторениях. Масс-спектрометрический анализ проводили на ионной ловушке в условиях, указанных выше.

### *Препарат синтетических пептидов*

Для анализа были отобраны три модельных пептида белка MUP3 (Major Urinary Protein 3) с молекулярной массой 1410,555 Да, 1368,475 Да и 1054,639 Да. Пептиды были химически синтезированы Fmoc-методом и лиофилизированы в лаборатории белковой инженерии ИБМХ РАМН (зав. – проф. Е.Ф. Колесанова). На С-конце пептиды массой 1368,475 Да и 1410,555 Да содержали аминокислотный остаток треонинамида, защищающий предшествующий ему  ${}_3[\text{N}^{15}]_6[\text{C}^{13}]$ -аргинин. Пептид 1054,639 Да на С-конце содержал открытый аминокислотный остаток  ${}_3[\text{N}^{15}]_6[\text{C}^{13}]$ -аргинина со свободной карбоксильной группой.

Пептиды растворяли в 10 % муравьиной кислоте до 10 мг/мл (7.3 мМ для 1368,475 Да, 7.01 мМ для 1410,555 Да и 8.6 мМ для 1054,639 Да) и анализировали на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) для определения примесей. Пробы получали методом сухой капли: по 10 нМ каждого пептида были смешаны в равных объёмах с раствором матрицы (8 мг/мл 2,5-дигидроксибензоат в 50 % ацетонитриле, 0,75 % трифторацетате и 15 % 2-пропаноле) и нанесены на мишень типа Ground Steel (Bruker, Германия) по 1,5 мкл. Высушивали при комнатной температуре 35 – 50 минут. Снятие спектров проводили в диапазоне m/z от 760 до 1600 Да.

Для отщепления треонинамидной группы по 100 нмоль пептидов массой 1368,475 Да и 1410,555 Да были подвергнуты гидролитическому расщеплению трипсином (1 : 200 по массовым частям) в объёме 20 мкл в буфере 100 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,0, при температуре инкубации 37°C в течение ночи. Реакцию ингибировали добавлением 2 мкл 1% трифторуксусной кислоты. Пептиды обессоливали с помощью ZipTip C-18 (Agilent, USA), и высушивали при температуре 30°C в вакуумном испарителе в течение 1 часа.

### *Очистка пептидов после протеолиза на колонке с обращенной фазой и анализ чистоты препарата посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии.*

Сухой остаток пептидов растворяли в 50 мкл 5% муравьиной кислоты. Загружали по 100 нмоль пептидов на колонку с обращенной фазой (mRP-C18, 5 мкм, 4,6 мкм x 50 мм) в течение 5 минут в изократическом растворе С при скорости потока 0,75 мл/мин; рабочая температура колонки 80°C. Элюцию пептидов с колонки осуществляли в градиенте растворов В и А при скорости потока 0,75 мл/мин в течение 25 минут. После каждого

цикла колонку уравнивали в течение 7 минут 5 % ацетонитрилом с 0,1 % муравьиной кислотой и 95 % водным раствором 0,1 % муравьиной кислоты, при скорости потока 0,9 мл/мин. Фракции собирались в интервале времени с 0 по 20 минуты по 1,5 мл.

Фракции высушивали при 30°C в течение 50-60 минут, ресуспендировали в 15 мкл 5% муравьиной кислоты и анализировали посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии для выявления целевого пептида.

#### *Масс-спектрометрический количественный анализ препарата ${}_3[N^{15}],{}_6[C^{13}]-Arg$ пептидов*

Пептиды анализировали в MS режиме в диапазонах m/z от  $([M+3H]^{3+} - 100)$  до номинальной моноизотопной величины m/z; для MS/MS режима задавали диапазон от 420 до 1450 m/z. Отбирали по 1 мкл из маточных растворов каждого пептида, смешивали их в чистой пробирке на 200 мкл и доводили объем до 30 мкл 5% муравьиной кислотой, получая смесь из трех пептидов, каждого в конечной концентрации 1 мкМ.

По 1 мкл полученной смеси пептидов анализировали в 5 повторениях на масс-спектрометре типа ионной ловушки в условиях хроматографического разделения, полностью повторяющих таковые для проб с белками в чистом препарате и в смеси, как описано выше. С 10 по 70 минуты пептидные пики сканировали в режиме MS/MS. После проведения верификации пептидов каждую пробу разбавляли от 100 мкМ до 1 нМ в 5% муравьиной кислоте по 20 мкл в соответствии с концентрациями, выбранными для модельных белков. Полученные пробы анализировали в 5 повторениях в условиях, идентичных условиям анализа пептидов модельных белков.

#### *Мечение пептидов тяжелыми атомами кислорода [ $^{18}O$ ]*

Модельные белки смешивали в различных молярных пропорциях. Смесь высушивали при температуре 45°C в течение одного часа. Сухой остаток ресуспендировали в рабочем буфере для проведения трипсинолиза, приготовленного на основе  $H_2^{18}O$  (90,5 %, Sigma, Germany): 100 мМ  $NH_4HCO_3$ , 10 % ацетонитрила, 0,05% додецилсульфата натрия, pH 7,8. Добавляли 2 мкл раствора трипсина с концентрацией 200 нг/мкл, в воде  $H_2^{18}O$ , содержащей 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, добавляли еще 1 мкл раствора трипсина, инкубировали при 37°C 2 часа, и затем добавляли последние 2 мкл раствора 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 при 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. Таким образом, общее время проведения второго этапа составляло 18 часов, а количество трипсина, участвующего в реакции, - 900 нг.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Анализ зависимости между уровнем интенсивности масс-спектрометрического сигнала и количеством белка в пробе

Для построения калибровочной кривой зависимости интенсивности сигнала от концентрации анализируемого белка в качестве модельных объектов были отобраны 8 белков. Молекулярные массы модельных белков находились в диапазоне от 10 до 100 кДа. Среди исследуемых белков представлены молекулы с различной степенью гидрофобности (мембранные и цитозольные белки) и с хорошо изученными физико-химическими и структурными свойствами. Отобранные белки подвергали ферментативному гидролизу с высоким выходом детектируемых пептидов.

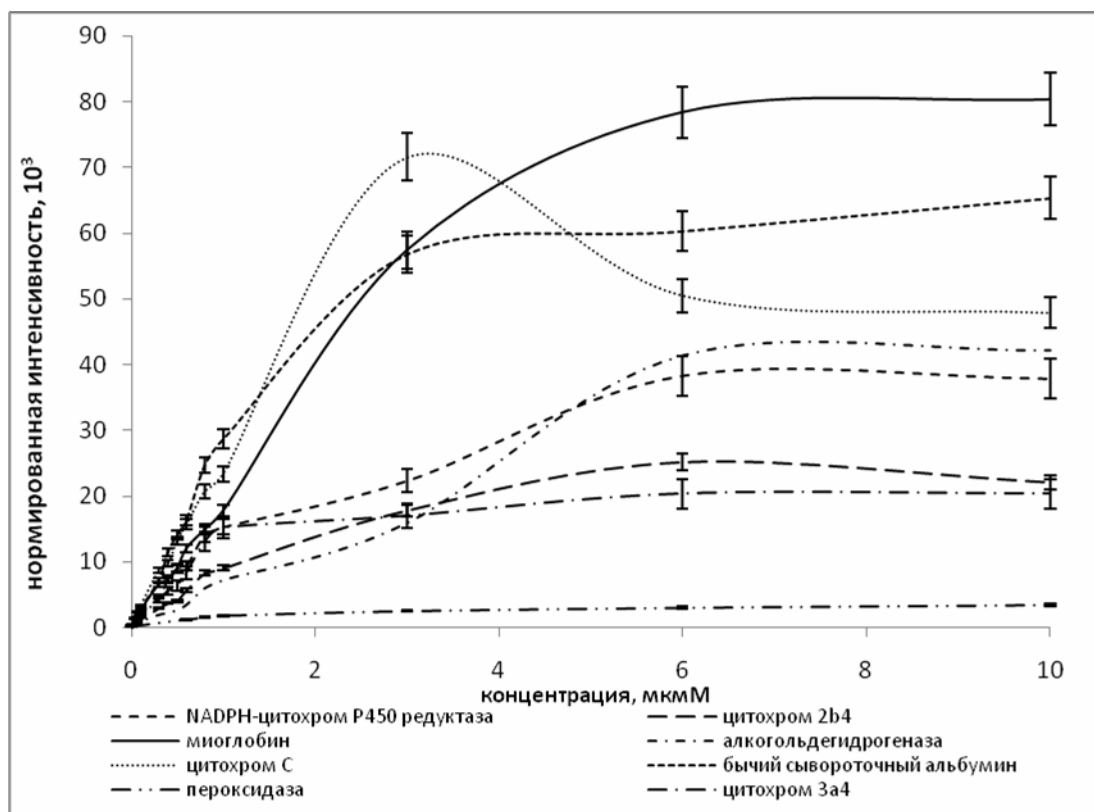
Таблица 1. Модельные белки, использовавшиеся для построения зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации.

Название белка	Идентификатор в базе Swiss Prot	Молекулярная масса, кДа	Число уникальных идентифицированных пептидов	Покрытие аминокислотной последовательности, %
NADPH-цитохром-P450-редуктаза	P00389	76,5884	19	35
Цитохром 2b4	P00178	55,7137	21	55
Миоглобин	P02185	17,3312	8	49
Алкогольдегидрогеназа	P00330	36,8233	14	52
Цитохром С	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

Выбор концентрационного диапазона для построения калибровочной кривой количественного анализа проводили, исходя из литературных данных об ограничениях чувствительности масс-спектрометрии. При этом учитывали реальные концентрации известных белков в живых организмах и необходимость охвата динамического диапазона концентраций, составляющего, как минимум, 3 порядка. Минимальное количество, с которого исследователи начинают количественный анализ белков, в том числе и с пост-трансляционными модификациями, исчисляется от 1 нМ с относительной погрешностью  $\pm 10\%$  на nanoLC-MS/MS, на QQQ (тройной квадруполь) с применением MRM (Kuhn E. Et al, 2004, *Proteomics*, 4, 1175–86) до 6 нМ на nanoLC-MS/MS, Q-TOF и QQQ (Yu.L.-R. et al, 2004, *J. Proteome Res*, 3, 469-77; Parker.K.C. et al, 2004, *J. Mol. Cell. Proteomics*, 3, 625-59). Ионные ловушки и гибридные масс-спектрометры являются приблизительно равными в условиях динамического диапазона определяемых концентраций. Таким образом, для анализа на масс-спектрометре типа ионной ловушки нами был определен диапазон концентраций от  $10^{-9}$  М до  $10^{-4}$  М.

На рисунке 1 показаны зависимости интенсивности масс-спектрального сигнала от концентрации для каждого анализируемого белка в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ. Видно, что корреляция, при которой наблюдается равномерный линейный рост интенсивности сигнала, проявляется только на участке от 1 нМ до 1 мкМ. Это составляет три порядка концентраций, после чего рост интенсивности замедляется и после 1-3 мкМ

приобретает вид логарифмической кривой. Диапазон линейной зависимости концентраций являлся общим для всех анализируемых белков. Мы предполагаем, что причиной ограничения сигнала рамками рассматриваемых концентраций может служить верхний и нижний пределы чувствительности ионной ловушки, на которой проводились экспериментальные измерения. Верхняя граница чувствительности, скорее всего, обусловлена насыщением сигнала пептидных ионов в высокой концентрации, в результате чего показатели сигнала перестают соотноситься с концентрацией измеряемого вещества. Так, экспериментально показано, что величина интенсивности масс-спектрометрического сигнала в точках концентрации 10 мкМ и 100 мкМ отличается на 5-7%. Таким образом, показатели интенсивности сигнала после 6-10 мкМ не позволяют достоверно определять концентрации белков в растворах.



**Рисунок 1.** Зависимости интенсивности масс-спектрометрического сигнала от концентрации в интервале от 0,001 до 10 мкМ. Зависимости для каждого белка получены путем усреднения показателей интенсивности ответного сигнала в четырех повторениях. Смесь пептидов анализировали на масс-спектрометре типа ионная ловушка (Agilent 6330 Series XCT Ultra Chip Cube IT, Agilent, США). Подробности условий проведения масс-спектрометрического анализа обозначены в разделе «материалы и методы»

Сигналы пептидов модельных растворов белков в диапазоне концентраций от 3 мкМ до 100 мкМ практически не отличаются друг от друга; отличие нормированных на общий ионный ток значений сигнала составляет 15 %, что сравнимо с уровнем относительной ошибки измерений прибора ( $\pm 12\%$ ).

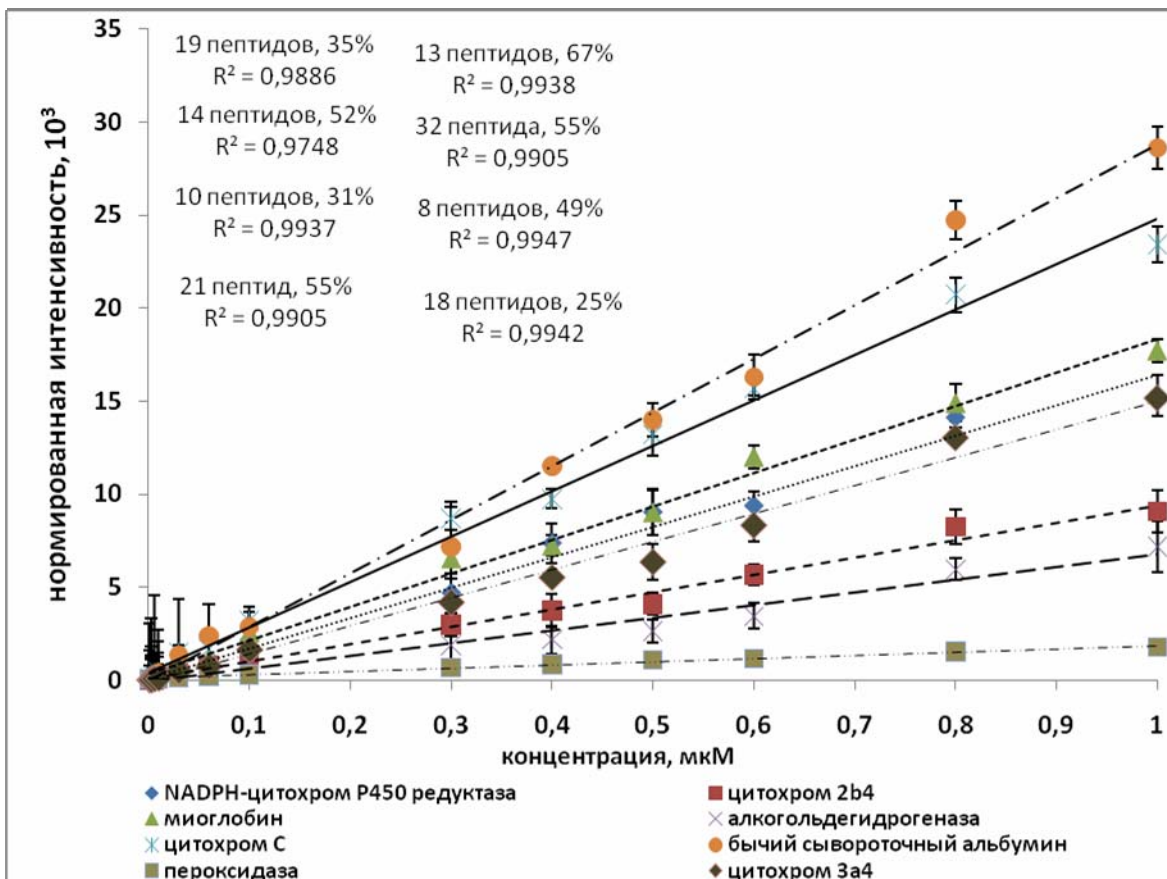


Рисунок 2. Линейная аппроксимация зависимости масс-спектрального сигнала для модельных белков в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ. Каждая концентрационная точка представляет собой результат усреднения значений интенсивности всех идентифицированных в ней пептидов по пяти повторениям.

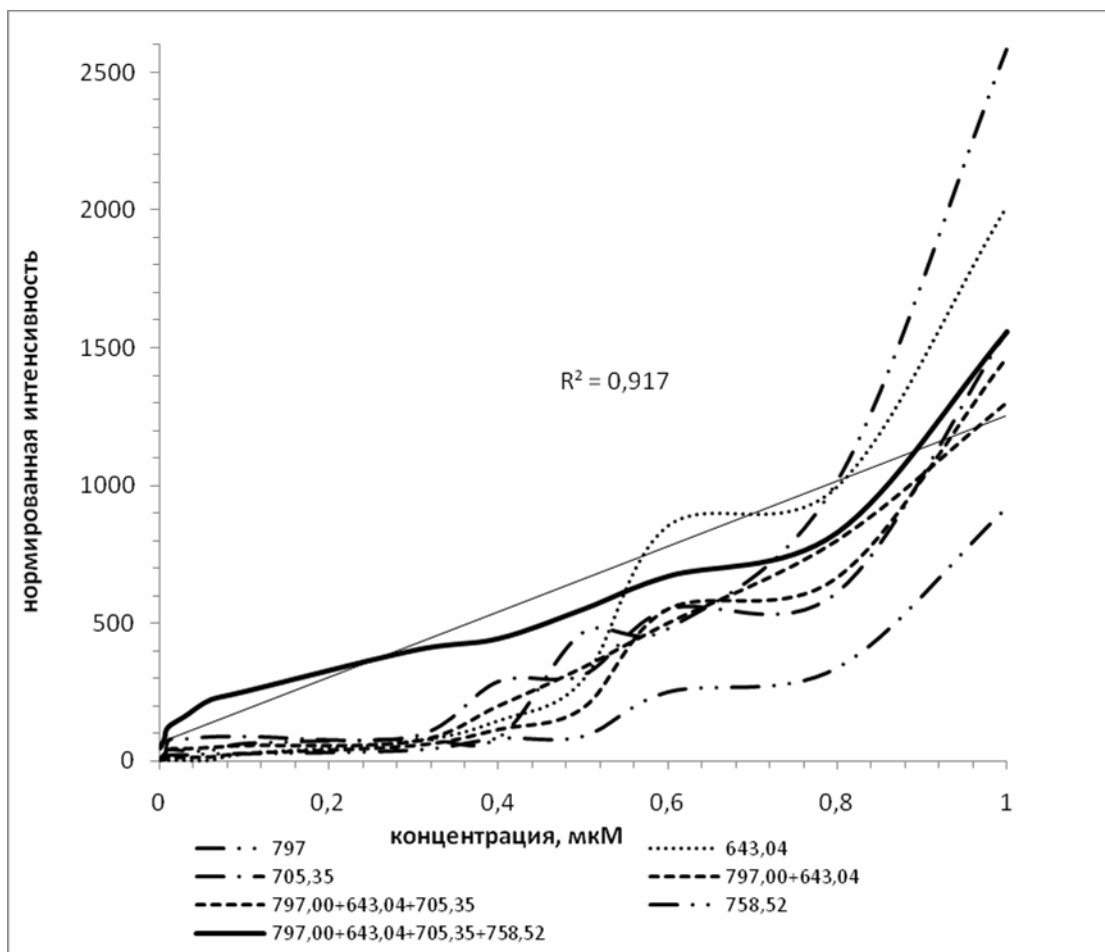
На рисунке 2 показаны результаты линейной аппроксимации зависимости сигнала от концентрации для каждого модельного белка в диапазоне от 1 нМ до 1 мкМ. Значительных различий между белками в свойствах зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации не было найдено. Об этом свидетельствует тест Фишера ( $3,257 \leq F \leq 1,004$ ,  $F_t = 9,28$ ), значение которого рассчитывали при сравнении массивов данных зависимости различных белков. Как видно из рисунка 2, коэффициент Пирсона для рассматриваемых модельных белков находится в пределах 0,97 – 0,99, что свидетельствует в пользу линейной корреляции между масс-спектральной интенсивностью и концентрацией. Из таблицы 1 и рисунка 2 видно, что покрытие аминокислотной последовательности по уникальным идентифицированным пептидам колеблется от 25% (бычий сывороточный альбумин) до 67% (цитохром c).

## 2. Условие линейной зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации белка

Мы определили минимальное количество различных идентифицированных пептидов для одного белка, необходимое для линейной корреляции между уровнем масс-спектрометрического сигнала и анализируемой концентрацией. Для того, чтобы условие выполнялось, необходимо учитывать интенсивность масс-спектрального сигнала от **четырёх различных пептидов** с показателем индекса достоверности

идентификации для каждого не менее 6,0 (Spectrum Mill, Agilent). Пептиды при этом должны принадлежать только одному белку (генному продукту) и их присутствие должно прослеживается на протяжении всего концентрационного диапазона. Чем больше идентифицированных пептидов относится к одному белку, тем более сглаженной является суммарная зависимость.

На рисунке 3 показаны зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации для четырех пептидов миоглобина кашалота. Как видно, кривые зависимости для каждого пептида в отдельности характеризуются коэффициентом Пирсона от 0,76 (для двухзарядных ионов  $r^2=0,76$  для 797,00;  $r^2=0,83$  для 643,04;  $r^2=0,79$  для 705,35;  $r^2=0,86$  для 758,52). Однако усреднение значений интенсивности по четырем пептидам в совокупности дает новую зависимость с коэффициентом корреляции 0,927. Такую аппроксимирующую зависимость мы в дальнейшем будем называть базовой. Аппроксимация базовой зависимости по четырем различным пептидам практически совпадает с зависимостью, полученной для всех уникальных идентифицированных пептидов белка. Коэффициент Пирсона находится в пределах  $r^2 \geq 0,91-0,95$ , а относительное стандартное отклонение значений интенсивности в различных точках концентраций не превышает 23-25 %. Такое отклонение сравнимо с показателями суммарной зависимости сигнала от концентрации пептидов (рисунок 2).



**Рисунок 3. Изменение коэффициента линейной корреляции с ростом числа идентифицированных пептидов при интеграции кривых зависимости сигнала от концентрации для миоглобина. Кривые зависимости сигнала от концентрации построены в диапазоне от 0,001 до 1 пМ. Для интегрированной кривой зависимости по двум пептидам (797+643)  $r^2=0,89$ , для зависимости по трем пептидам (797+643+705) коэффициент корреляции  $r^2=0,902$ . Базовая кривая зависимости, сформированная по четырем пептидам обнаруживает  $r^2=0,917$ . Отклонение величины коэффициента Пирсона базовой кривой зависимости в четырех повторениях составляет  $\pm 0,06$ . Измерение масс-спектральной интенсивности пептидов миоглобина в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ проводили на ионной ловушке типа ионной ловушки (Agilent 6330 XST Ultra Chip Cube IT, Agilent, США). Подробности условий проведения масс-спектрометрического анализа описаны в разделе «материалы и методы»**

В ряде случаев, например, для бычьего сывороточного альбумина, цитохрома P450 2b4, цитохрома c, для появления линейных свойств зависимости с коэффициентом Пирсона в пределах 0,94 – 0,96 достаточно трех регистрируемых пептидов. Соблюдение «правила четырех пептидов» становится тем сложнее, чем меньше молекулярная масса белка, а, следовательно, и меньше количество получаемых после трипсинализа протеотипических пептидов. Так, для миоглобина, пероксидазы, алкогольдегидрогеназы, цитохрома P450 3A4 необходимо четыре пептида, а для цитохрома 2b4, бычьего сывороточного альбумина и цитохрома c – трех пептидов уже достаточно для формирования уверенной линейной зависимости.

### **3. Зависимости масс-спектрометрической интенсивности от концентрации, полученные для различных белков и их смесей.**

Для того, чтобы установить, будут ли отличаться зависимости для изолированных белков и белковых смесей, были поставлены эксперименты на приготовленных препаратах смесей модельных белков с различными концентрационными соотношениями. Растворы модельных смесей были составлены таким образом, чтобы в одной смеси присутствовали белки, отличные по таким свойствам, как молекулярная масса, степень гидрофобности, принадлежность к различным функциональным и структурным классам (таблица 2). Анализ проводили на примере трех модельных смесей белков, отличающихся по композиции белков и их молярному соотношению: cab1/2 – cytochrome 2b4, bovine serum albumin, myoglobin; nab1/2 – NADPH-cytochrome P450 reductase, cytochrome 2b4, bovine serum albumin; nmb1/2 - NADPH-cytochrome P450 reductase, myoglobin, cytochrome 2b4.

Полученные данные позволили нам выяснить отличия интенсивности пептидов в одной и той же концентрационной точке для белков в составе смеси и в виде чистых препаратов. В смеси белков с различными молярными отношениями (таблица 2) закономерность линейной зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации пептидов на участке 0,001-1 мкМ сохраняется (рисунок 4). Коэффициент линейной корреляции для белков в смеси близок к таковому, рассчитанному для отдельных белков и находится в пределах 0,93-0,98 при аппроксимации по всей совокупности идентифицированных уникальных пептидов на протяжении всего анализируемого концентрационного диапазона.

**Таблица 2. Распределение белков по концентрации и группам аналитических модельных смесей.**

модельная смесь	название белка	количество белка, мкМ	мольные доли
<b>cab1</b>	бычий сывороточный альбумин	0,03	1
	цитохром 2b4	0,05	1,7
	миоглобин	0,3	10
<b>cab2</b>	бычий сывороточный альбумин	0,1	20
	цитохром 2b4	0,5	10
	миоглобин	0,05	1
<b>nab1</b>	бычий сывороточный альбумин	0,01	1
	цитохром 2b4	0,1	10
	NADPH-цитохром P450 редуктаза	0,05	5
<b>nab2</b>	бычий сывороточный альбумин	0,05	1,7
	миоглобин	0,6	20
	NADPH-цитохром P450 редуктаза	0,03	1
<b>nmb1</b>	бычий сывороточный альбумин	0,3	30
	NADPH-цитохром P450 редуктаза	0,01	1
	миоглобин	0,1	10
<b>nmb2</b>	цитохром 2b4	0,6	60
	NADPH-цитохром P450 редуктаза	0,1	10
	миоглобин	0,01	1

В таблице 3 представлены данные, свидетельствующие о том, что зависимость масс-спектральной интенсивности от концентрации сохраняет линейность в смесях и не отличается по основным свойствам от таковой для изолированных белков даже если концентрация белков в смеси отличалась на порядки. В пользу этого свидетельствуют близкие по значению коэффициенты Пирсона (рисунок 4), вариация значений нормированной интенсивности и значения относительного стандартного отклонения (таблица 3).

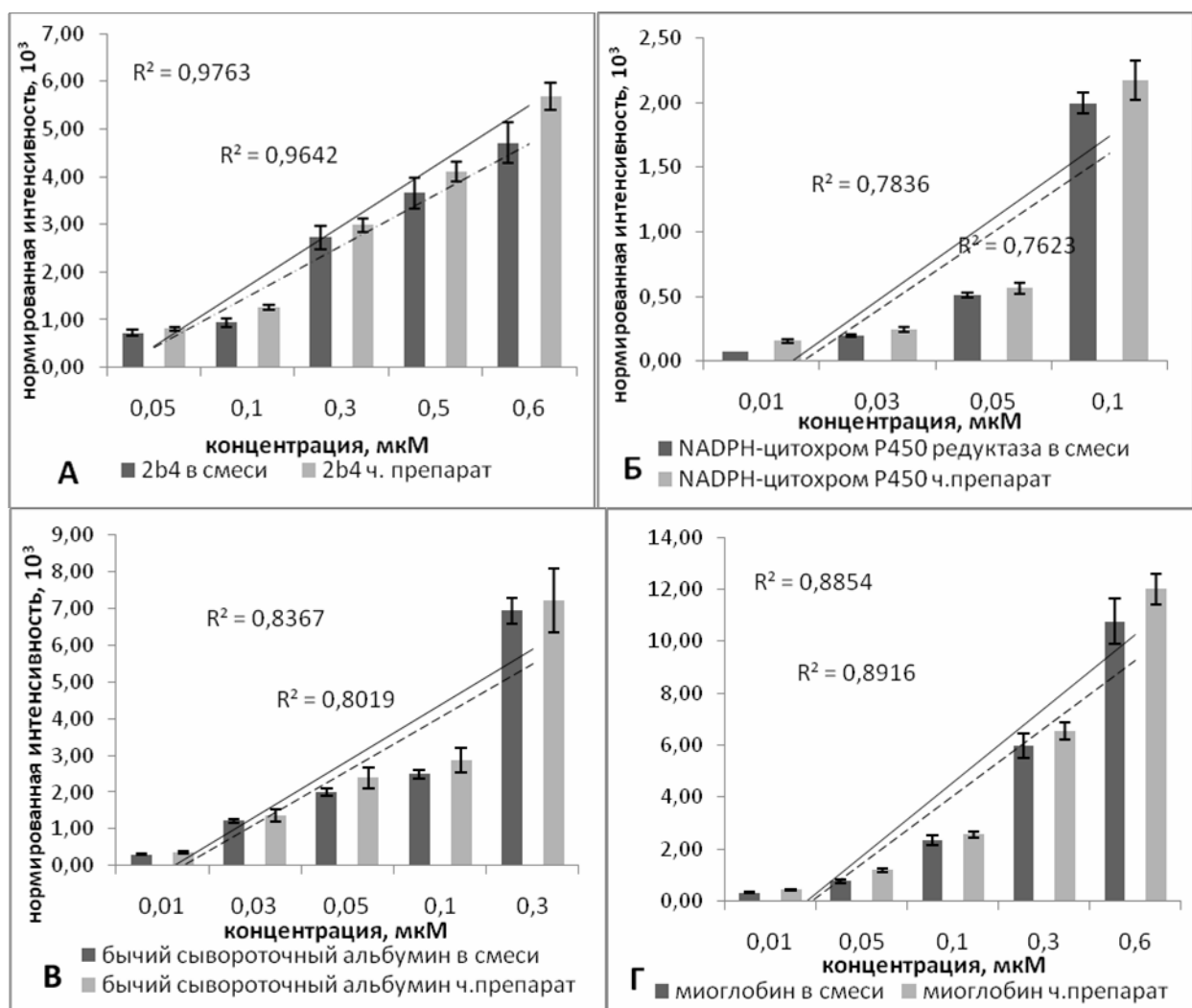
В растворах изолированных модельных белков разброс значений интенсивности в интервале концентраций от 1 нМ до 1 мкМ составлял около трех порядков. Такой разброс значений оставался характерным и для модельных белков в смесях. Количество уникальных пептидов в определенных концентрационных точках для белка в смеси и в чистом препарате оставалось приблизительно одинаковым (таблица 3).

**Таблица 3. Значения нормированной интенсивности для белков в смеси и в чистом препарате.**

количество, мкМ	нормированная интенсивность в смеси	нормированная интенсивность в чистом препарате	число уникальных пептидов в смеси
<b>цитохром 2b4</b>			
0,05	723±62,53	809±73,01	8
0,1	937±90,51	1260±134,17	11
0,3	2722±419,2	2980±187,67	13
0,5	3651±263,2	4100±433,15	18
0,6	4709±369,2	5680±601,3	20
<b>NADPH-цитохром P450 редуктаза</b>			
0,01	72±6,61	154±9,78	5
0,03	198±23,7	241±30,61	8
0,05	510±96,39	563±54,11	9
0,1	1996±180,04	2170±241,3	12
<b>бычий сывороточный альбумин</b>			
0,01	300±21,93	367±35,95	4
0,03	1221±166,9	1370±149,6	4
0,05	1987±260,1	2390±276,83	5
0,1	2491±209,74	2870±300,72	9
0,3	6930±632	7200±693,74	13
<b>миоглобин</b>			
0,01	325±24,7	427±34,92	3
0,05	765±108	1190±122,36	3
0,1	2340±490,7	2560±280,75	4
0,3	5990±620,56	6540±677,15	6
0,6	10760±109,43	12000±111,6	7

На рисунке 4 продемонстрировано, что нормированные масс-спектральные интенсивности возрастают в обоих случаях, но для белков в модельных смесях изменение происходит с небольшим отставанием в 10 – 14%. Снижение интенсивности обусловлено более высоким уровнем общего ионного тока в смеси и ионной супрессии, как следствие возросшего разнообразия пептидных ионов в смеси. Так, для смесей группы *cab1* и *cab2* общее число протеотипических пептидов всех белков составляет 36 и 32 соответственно, для *cab1* и *cab2* – 34 и 31, а для *mnb1* и *mnb2* – 21 и 28. Причем, 70 % всех пептидных ионов в различных зарядных состояниях регистрировали в интервале от 570 до 920 единиц *m/z*.

В некоторых случаях, например, для NADPH-цитохром P450 редуктазы значения нормированной масс-спектральной интенсивности отличались на 53,24% (в 2,138 раза в точке 0,01 мкМ (таблица 3)). В целом, линейность зависимости сохранялась как для белков в смеси, так и для чистого препарата. Разброс линейного коэффициента корреляции больше для белков в смеси и составлял  $\Delta r^2=0,208$ , тогда как для индивидуальных белков он не превышал  $\Delta r^2=0,191$ . О незначительном снижении линейности зависимости в смесях свидетельствовало увеличение относительного стандартного отклонения масс-спектральной интенсивности до 7–21 %. При этом значительно возрос нижний предел отклонения, так как в случае с индивидуальными белками он составлял 2,38%.



**Рисунок 4.** Корреляции между масс-спектральной интенсивностью и концентрацией белка в чистом препарате и в смеси: А – цитохром 2b4, Б – NADPH-цитохром P450 редуктаза, В – бычий сывороточный альбумин, Г – миоглобин.

Исследование влияния количества регистрируемых уникальных пептидов белка на линейность зависимости показало, что в смеси также необходимо соблюдение «правила четырех пептидов», принадлежащих одному белку и формирующих базовую зависимость интенсивности от концентрации. При этом качественное сочетание пептидов в смеси может отличаться от такового для индивидуальных белков. К примеру, в начальной точке концентрационного диапазона (1 нМ) у трех (цитохрома *c*, цитохрома 2b4 и бычьего сывороточного альбумина) из пяти белков в смесях были найдены замены до двух из четырех пептидов в сравнении с набором пептидов, идентифицированных в чистом препарате белка. Тем не менее, коэффициент корреляции для цитохрома 2b4 в смеси по четырем пептидам составлял 0,91 (2b4 изолированный белок – 0,93), цитохром *c* 0,89 (против 0,9 в чистом препарате), БСА – 0,92 (против 0,907 в чистом препарате). Эти данные указывают на то, что линейность зависимости нормированной интенсивности от концентрации на начальных этапах формирования определяется не

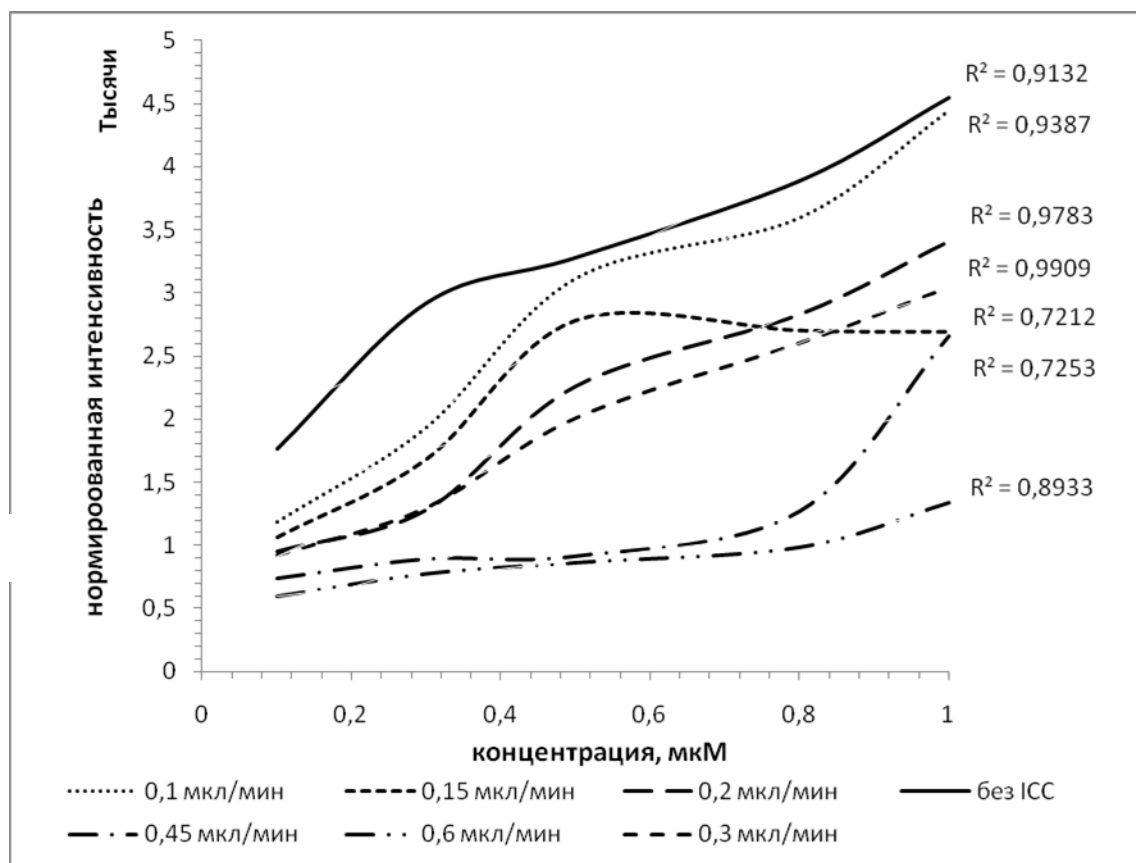
качественным составом пептидной смеси, а количеством уникальных идентифицированных пептидов.

#### **4. Влияние скорости потока наноэлектроспрея на линейность зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации анализируемого белка.**

В нашей работе были проведены эксперименты для определения влияния скорости потока наноэлектроспрея на линейность зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации пептидов модельных белков. В данных экспериментах мы варьировали показатель скорости потока наноэлектроспрея, используя пять режимов: 0,10 мкл/мин, 0,15 мкл/мин, 0,20 мкл/мин, 0,45 мкл/мин и 0,60 мкл/мин. Полученные данные показателей нормированной интенсивности сравнивали с теми, что были получены при скорости 0,30 мкл/мин, которую использовали как контрольную. Как показано на рисунке 5, снижение скорости потока наноэлектроспрея приводило к росту масс-спектральной интенсивности пептидов. Однако, рост в различных точках концентрационного диапазона неодинаков. В среднем, интенсивность увеличивается в 6,8 раза в интервале от 1 нМ до 200 нМ и в 7,4 раза на участке 0,200-1 мкМ. Такая тенденция проявляется для всех модельных белков без исключения (рисунок 5).

Обратную ситуацию наблюдали при повышении скорости потока наноэлектроспрея. При потоках 0,45-0,60 мкл/мин значения масс-спектральной интенсивности снижались равномерно на протяжении всего концентрационного диапазона. При этом линейность зависимости, как правило, остается характерной для потоков 0,10-0,20 мкл/мин. Таким образом, оптимальной скоростью потока наноэлектроспрея, при котором коэффициент линейной корреляции достигает уровня 0,96–0,99 является 0,3 мкл/мин.

Таким образом, скорость потока наноэлектроспрея определяет границы масс-спектральной интенсивности, в которых зависимость становится линейной. При этом, зная особенности зависимости интенсивности от концентрации при известной скорости потока, экстраполяция концентрации пептидов белка становится более точной. Однако чем больше скорость потока отклоняется от оптимальной (0,3 мкл/мин), тем меньше достоверность регистрируемых значений интенсивности, особенно при концентрациях выше 200-400 нМ, и тем больше стандартное отклонение нормированной интенсивности. С изменением скорости потока наноэлектроспрея участок нелинейности может достигать 0,6 – 0,8 мкМ. При скорости потока 0,10 -0,15 мкл/мин зависимость масс-спектральной интенсивности от концентрации выходила на плато уже после 500-600 нМ, а при скоростях 0,45-0,60 мкл/мин заметного изменения значений интенсивности масс-спектрального сигнала с ростом концентрации не наблюдали уже после 300 нМ.



Рисунки 5. Изменение значений масс-спектральной интенсивности и линейности корреляции интенсивности от концентрации в зависимости от скорости потока наноэлектроспрея на примере цитохрома с. Кривые построены по сумме всех идентифицированных пептидов цитохрома С при определенной скорости потока наноэлектроспрея: для скорости 0,1 мкл/мин – 11 пептидов; 0,15 мкл/мин – 11 пептидов; 0,2 мкл/мин – 10 пептидов; 0,3 мкл/мин – 13 пептидов; 0,45 мкл/мин – 13 пептидов; 0,6 мкл/мин – 12 пептидов. Во всех случаях сканирование и идентификацию пептидов в MS/MS режиме проводили при усреднении по не менее двум пикам интенсивностью не менее  $1,5 \cdot 10^5$  при условии накопления не менее 25000 пептидных ионов за 50 мсек.

Для объяснения зависимости линейности от скорости потока наноэлектроспрея, мы выдвинули следующее предположение: если сделать допущение, что растворимость пептидов, элюируемых с колонки бесконечно велика  $\lim_{s \rightarrow \infty} n$  и, при прочих равных условиях, число пептидов, способных раствориться в 0,1 мкл и в объеме большем в  $n$  раз одинаково, то, тем не менее, концентрация пептидов в капле остается бесконечно малой. Тогда, концентрация пептидов в 0,1 мкл составляет  $C_i = n \times c_0$ . При разной скорости потока наноэлектроспрея за единицу времени с колонки элюируют приблизительно одинаковое число пептидов в различном объеме,  $n(v_i) \cong n(v_{i+1})$ . При этом, скорость испарения капли элюента при разных скоростях потока неодинакова и будет тем меньше, чем выше скорость потока наноэлектроспрея. Значит число пептидов, попавших для анализа в масс-спектрометр, за одинаковый интервал времени будет больше,

$$V(v_i) > V(v_{i+1}) \sim \frac{c(n_i)}{v}, t = const$$

Количество ионов, которое должно аккумулироваться за определенный интервал времени перед фрагментацией является еще одним фактором, определяющим

линейность зависимости интенсивности от концентрации. Этот параметр регулируется приборно в режиме ICC (ion current control) при проведении масс-спектрометрических измерений. Изменение времени накопления ионов с 50 до 5 миллисекунд и снятие ограничения по количеству ионов со 100000 при контрольной скорости потока 0,3 мкл/мин приводит к значительному росту масс-спектральной интенсивности на всем интервале концентраций. В сравнении с активным режимом ICC при той же скорости потока, рост интенсивности превосходил наблюдаемый даже при малых скоростях (0,10 – 0,20 мкл/мин) приблизительно в 1,6 раза.

#### **5. Сравнение безметкового метода количественной оценки содержания белков в биологических пробах с общепринятыми методами количественной протеомики.**

Проверку разработанного безметкового метода количественной оценки содержания белков в биологических пробах осуществляли с помощью сравнительного анализа с методом AQUA и методом изотопного замещения двух атомов кислорода [ $^{16}\text{O}$ ] на [ $^{18}\text{O}$ ] на С-конце пептидов в ходе реакции расщепления, катализируемой трипсином. Результаты измерений параллельно сравнивали с содержанием белка в пробе, оценку которого проводили безметковым методом.

Метод абсолютной количественной оценки белка AQUA (Absolute QUantification) основан на сравнении площади пиков выбранных пептидов белка с идентичными пептидами с аминокислотными остатками с тяжелыми изотопами [ $^2\text{H}$ ], [ $^{13}\text{C}$ ] или [ $^{15}\text{N}$ ] – внутренними стандартами. Нативные и синтетические пептиды с одинаковой аминокислотной последовательностью характеризуются синхронностью во времени удержания на колонке.

В смесь пептидов исходного препарата белка добавляли 10 и 50 нмоль синтезированных пептидов с изотопной меткой, и далее по масс-спектрам проводили оценку количества белка по внутренним стандартам. Для данной работы в качестве модельного белка выбрали 3-ю изоформу MUP (Major Urinary Protein) мыши, который встречается при протеомном профилировании белкового состава фракции микросом печени. Из числа идентифицированных пептидов для данного белка отбирали уникальные пептиды, индекс достоверности идентификации которых составлял не ниже 8,0 и покрытие не менее 85%. Из полученного пула пептидов отбирали те, длина которых не превышала 15 аминокислотных остатков, так как большая длина в значительной степени усложняет химический синтез пептидов. При этом пептиды не содержали в своем составе модифицированных аминокислотных остатков и при анализе формировали пептидные ионы с зарядом не выше +3. Всего в составе MUP3 белка было проанализировано 18 пептидов с молекулярными массами от 563 до 2238 Да.

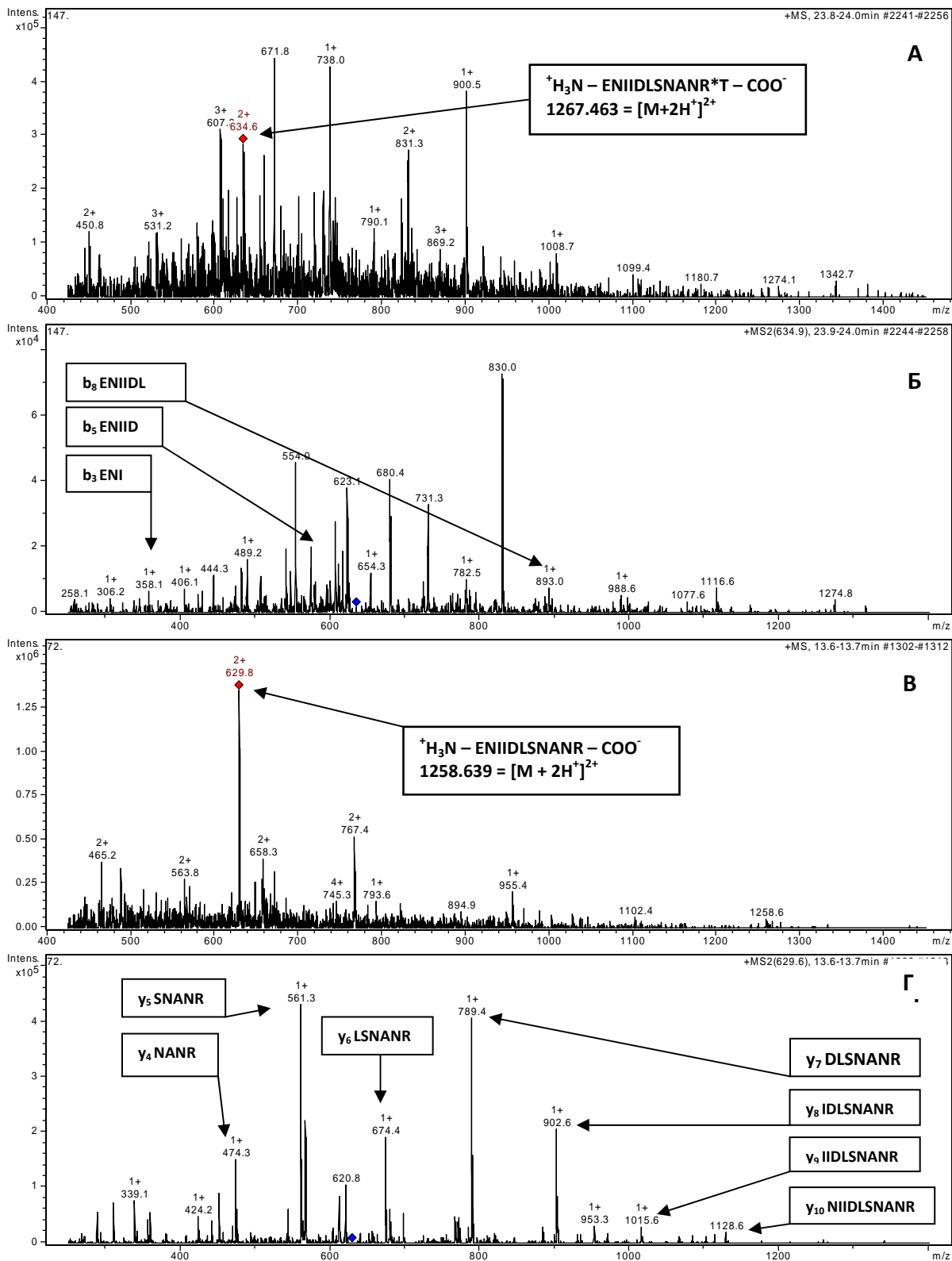
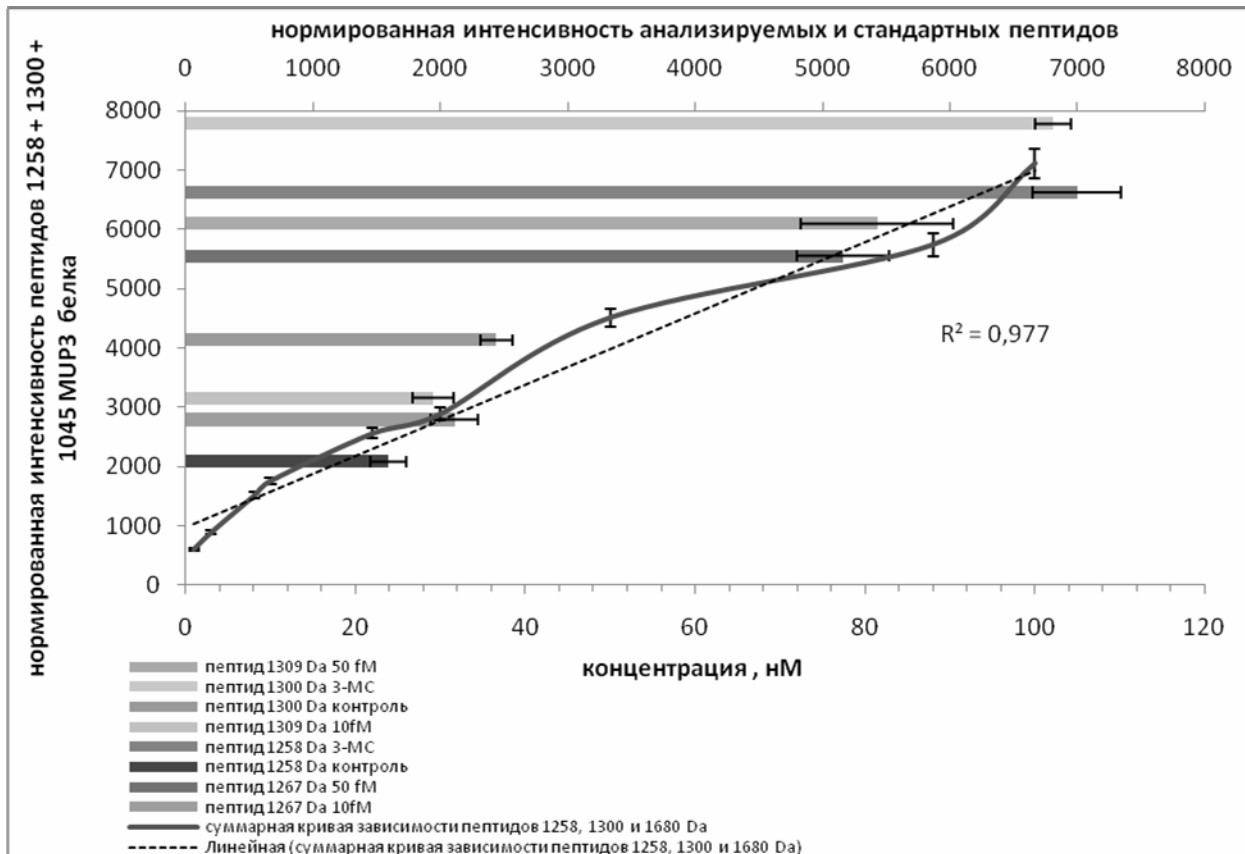


Рисунок 6. Масс-спектры пептидных двухзарядных ионов 1267 (А – MS-спектр, Б – MS/MS-спектр распада иона 1267) и 1258 (В – MS-спектр, Г – MS/MS спектр распада иона 1258).

Калибровочную кривую в интервале концентраций от 1 нМ до 1 мкМ для MUP3 белка строили по трем синтетическим пептидам (1258 Да, 1300 Да и 1045 Да) полностью

соответствующие по молекулярной массе и аминокислотному составу нативным триптическим пептидам. Методом AQUA проводили количественный анализ белка MUP3 в контрольной и опытной (мышей, инъецированных 3-метилхлорантреном) пробах микросом печени мыши. 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 содержание белка оставило 85нМ, что в 8,31 раз превышало содержание в контрольной пробе – 10,22 нМ. По калибровочной кривой безметкового метода определили, что содержание MUP3 в контрольной пробе составило 10,5 нМ, а в опытной пробе - в 94 нМ, то есть отличие в 9 раз. Сравнение эффективности двух методов продемонстрировало хорошее совпадение результатов в 84-88%, что укладывалось в рамки относительного стандартного отклонения  $\sigma = 15\%$  для нашего метода. Данные об уровне экспрессии MUP3, полученные сравнительным анализом AQUA и безметкового метода, согласуются с цифрами, обозначенными ранее (Zgoda V. et al, 2006, *Proteomics*, 6, 4662-70), где авторы проводили количественную оценку MUP3 с использованием дифференциальных двумерных электрофорезов.



**Рисунок 7.** Диаграмма для сравнения интенсивностей пептидов 1300 и 1258 Да в смеси белков контрольной и анализируемой проб микросом печени мыши со значениями изотоп-содержащих пептидов 1309 и 1268 Да по калибровочной кривой MUP3 белка в точках 10 нМ и 50 нМ.

Количественный анализ трех модельных белков в смеси (цитохром *c*, алкогольдегидрогеназа и пероксидаза) проводили методом включения атомов кислорода [ $^{18}\text{O}$ ] на С-конец пептидов в ходе реакции гидролитического расщепления. Оценивали

содержанием меченых белков и белков контрольной группы (с изотопами кислорода [ $^{16}\text{O}$ ]) в соотношениях 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 5 по мольным долям в прямом и обратном экспериментах, где одна мольная доля составила 10 нМ.

В таблице 5 представлены результаты измерения масс-спектральной интенсивности пептидов в смеси [ $^{18}\text{O}$ ]- и [ $^{16}\text{O}$ ]-пептидов цитохрома *c*, алкогольдегидрогеназы и пероксидазы после трипсинолиза. Количественный анализ проводили, оценивая соотношение площадей масс-спектрометрических пиков пептидов в паре [ $^{16}\text{O}$ ]/[ $^{18}\text{O}$ ] с учетом вклада доли немеченых пептидов в  $^{18}\text{O}$ -препарате.

Таблица 5. Количественная оценка содержания пептидов цитохрома *c*, пероксидазы и алкогольдегидрогеназы в смеси безметковым методом.

Пептид	№	Белок	Мольная доля в прямом эксперименте, нМ	Мольная доля в обратном эксперименте, нМ
(R)TPTIFDNK(Y)	1	цитохром С	8,2±0,12	7,9±0,03
(R)MGNITPLTGTQGQIR(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
(R)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)GFTEENIYEHD(K)	6	алкогольдегидрогеназа	8,5±0,11	8,1±0,15
(R)THERDRHADSAVD(N)	7	пероксидаза	8,3±0,04	8,3±0,12
средняя величина отношения			8,28±0,09	
стандартное отклонение			0,286 (17%)	

Для отношения 1 : 1 среднее значение [ $^{18}\text{O}$ ]/[ $^{16}\text{O}$ ] составило 1,161, стандартное отклонение 0,049. На основании полученных результатов для отношений 1 : 3 и 1 : 5 в прямом и реципрокном экспериментах и формальных статистических критериев (z-, G-критерий, F-тест), мы объединяли выборки по соответствующим отношениям в одну генеральную совокупность. В результате получили, что 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 по значениям нормированной интенсивности калибровочной кривой для цитохрома *c*, было показано, что одна мольная доля соответствую 8,2 нМ в прямом и 7,9 нМ в реципрокном экспериментах; для алкогольдегидрогеназы – 8,7 нМ и 8,3 нМ соответственно. Для пероксидазы количественное содержание определили как 8,4 нМ и 8,3 нМ. В общем случае, средняя концентрация одной мольной доли, рассчитанной по безметковому методу, составила 8,28 нМ со стандартным отклонением в 0,286; в процентном выражении отклонение расчетной величины от известной концентрации составило в 17%. Это значение укладывается в рамки погрешностей, которые были определены для белков в виде чистого препарата и в смеси.

Таким образом, результаты сравнительного анализа безметкового метода с данными традиционных методов относительной и абсолютной количественной протеомики указывают на высокую точность измерений, подтверждая существование зависимости масс-спектрометрического сигнала от концентрации.

## ВЫВОДЫ

1. С использованием 8 модельных белков выявлено наличие зависимости масс-спектральной интенсивности их трипсиновых пептидов от концентрации белков в исходном образце. Данная зависимость определяется линейным характером с коэффициентом корреляции Пирсона от 0,96 до 0,99. Границы линейной зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации белка находятся в пределах от 1 нМ до 1 мкМ при использовании электроспрейной ионизации и ионной ловушки в качестве детектора. Линейность зависимости справедлива для изолированных белков и для белков в смесях.
2. Для соблюдения линейной зависимости между концентрацией белков и масс-спектральной интенсивностью их трипсиновых пептидов необходимо выполнения условия регистрации спектров четырех уникальных пептидов, принадлежащих одному белку. Присутствие таких пептидов должно прослеживаться на протяжении всего исследуемого концентрационного диапазона.
3. Скорость потока наноэлектроспрея и ИСС (контроль потока ионов) воздействуют на свойства зависимости масс-спектральной интенсивности от концентрации. Оптимальной скоростью потока для поддержания линейной зависимости в диапазоне 0,001-1 мкМ является 0,3 мкл/мин.
4. Эффективность безметкового метода количественной оценки содержания белков была подтверждена альтернативными методами количественной протеомики. При сравнении с методом AQUA (абсолютная количественная оценка) совпадение результатов количественной оценки белка MUP3 в микросомах печени мыши составляет 87-92 %. При сравнении результатов безметкового количественного анализа с результатами, полученными методом количественной оценки с использованием изотопов атомов [ $^{18}\text{O}$ ], совпадение результатов составляет 84-88 %.

## ПУБЛИКАЦИИ

1. Н.А.Петушкова, А.В.Лисица, И.И.Карузина, В.Г.Згода, Г.Ф.Шереметьева, Н.Ф.Саменкова, И.П.Никитин, Т.А.Сахарова, А.Т.Копылов, А.И.Арчаков. Идентификация цитохромов P450 микросом клеток печени человека с помощью масс-спектрометрии // Биомедицинская химия. – 2007. - Т.53, №4. - С. 400-411.
2. Копылов А.Т., Мельник С.А. Комплексная клиническая и лабораторная диагностика заболеваний // Сборник докладов VII Всероссийской конференции в рамках конкурсного отбора инновационных проектов по приоритетному направлению «Живые системы». – 2007. - Москва-Звенигород, Россия. - С. 38
3. Копылов А.Т., Згода В.Г. Количественная оценка влияния 3-метилхлорантрена и фенobarбитала на уровень экспрессии цитохромов P450 методом масс-спектрометрии в фармакопротеомике // Сборник докладов XI Международной Пушинской конференции «Биология-наука XXI века». – 2007. - Пушкино, Россия. - С. 255
4. Копылов А.Т., Згода В.Г. Методы количественной протеомики // Биомедицинская химия. – 2008. – Т.53, №6. - С. 613-43
5. Kopylov A.T., Zgoda V.G. Label-free quantitative analysis in mass-spectrometry // The 7<sup>th</sup> HUPO Annual Congress. – 2008. - Seoul, Korea. - P. 91
6. Michele Crumeyrolle-Arias, Olga Buneeva, Victor Zgoda, Arthur Kopylov, Ana Cardona, Marie-Claude Tournaire, Vladimir Pozdnev, Vivette Glover, Alexei Medvedev., Isatin binding proteins in rat brain: in situ imaging, quantitative characterization of specific <sup>3</sup>[H]Isatin binding, and proteomic profiling // Journal of Neuroscience research. – 2009, Apr. 24. - Epub ahead of print
7. Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. Количественный масс-спектрометрический анализ содержания белков в биологических пробах без использования изотопных меток // Биомедицинская химия. – 2009. - Т.55, №2. – С.125-139