
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 621.384.668.8 + 537.534.3]: 663.1 + 579.2

© А. Н. Веренчиков, Н. В. Краснов, Л. Н. Галль

ТАНДЕМНЫЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРЫ В БИОХИМИИ

В обзоре кратко рассмотрена история развития tandemной масс-спектрометрии (МС-МС) и выявлен быстрый прогресс в этой области, особенно в последнее десятилетие. Инструментальные аспекты МС-МС затронуты при описании принципов и аналитических характеристик наиболее популярных тандемов. Показан ряд приложений МС-МС в различных областях "науки о жизни", включая фармацевтику и протеомику. Особое внимание уделено динамике развития области и взаимному влиянию инструментальной базы и приложений. Значительный прогресс в развитии tandemных инструментов, как и революционный взрыв в биоинформатике сделали МС-МС наиболее чувствительным и специфическим и, как следствие, предпочтительным аналитическим методом в биохимии. В свою очередь биотехнология создала значительный рынок для (МС-МС)-приборов и стала существенно влиять на их развитие. В обзоре сделан акцент на то, что биотехнологи работают со сложными смесями (до 10^6 компонент), в большом динамическом диапазоне концентраций (до 10^6). Природа биотехнологических задач требует еще более совершенной (МС-МС)-аппаратуры, способной обеспечить более высокую чувствительность, специфичность и производительность (МС-МС)-анализов, а также их совместимость с различными методами разделения. Это, вероятно, приведет к значительным изменениям (МС-МС)-инструментов в ближайшем будущем.

**ПОЯВЛЕНИЕ ТАНДЕМНОЙ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (60–80 гг.)****Определение МС-МС**

Тандемная масс-спектрометрия (МС-МС) используется для структурного анализа и идентификации веществ в составе смесей. Методика МС-МС состоит из следующих операций.

- Разделение в первой МС-ступени первичных, или "родительских", ионов и селекция ионов с единственным значением отношения массы к заряду (m/z).
- Фрагментация этих ионов с образованием разнообразных структурно значимых ионных фрагментов, называемых вторичными, или "дочерними", ионами.
- Масс-анализ дочерних ионов.

Магнитные приборы ВЕ-ВЕ

С начала 60-х единственно известные танделы состояли из двух магнитных приборов ВЕ-ВЕ, где В означает магнитный, а Е — электростатический каскад масс-спектрометра. Для фрагментации ионов между каскадами использовалась ячейка с разреженным газом. Уже в первых инструментах были обнаружены многие чудесные аналитические свойства МС-МС. Однако первые танделы применялись лишь для изотопных исследований в физике ионных столкновений [1]. Как описал сам Джин Футрелл в юбилейном обзоре [2]: "В начале 60-х наша группа не стала развивать аналитические приложения tandemных магнитных приборов, поскольку ток фрагментных ионов намного

уступал току первичного пучка, а спектры фрагментных ионов при высоких энергиях искажались вторичными ионами. Однако мы не обратили достаточно внимания на тот факт, что химический шум подавлялся на несколько порядков более, чем сигнал. С введением вторичных умножителей tandemные масс-спектрометры успешно стали применяться для анализа структуры соединений и для анализа смесей, как было позднее продемонстрировано в лабораториях Грэхама Кукса, Фрэда МакЛафферти и Джона Бейнона". Обзор первых аналитических приложений тандемов можно найти в книге [3], а примеры первых тандемов в [4, 5].

ВЕ — облегченный тандем

Популярность tandemной масс-спектрометрии (МС-МС) возросла с введением более простых и более чувствительных тандемов ВЕ и тройных квадруполей. В танделах ВЕ [5] количество секторов снизилось с 4 до 2. Родительские ионы выделяются в магнитном секторе и вводятся в бесполевое пространство, в некоторых приборах дополненное фрагментной ячейкой с разреженным газом. Метастабильная фрагментация ионов в бесполевом пространстве приводит к снижению кинетической энергии фрагментных ионов пропорционально массе. Фрагменты анализируются по энергии (а значит, и по массе) в электростатическом секторе ВЕ-прибора.

Тройной квадруполь

Чувствительность (МС-МС)-методов сильно

возросла с введением в середине 70-х тройных квадруполей [6, 7]. Дизайн прибора стал гораздо компактнее и дешевле. Кроме того, была снижена энергия ионных столкновений (с тысяч до десятков эВ), и за счет этого существенно улучшились качество и интерпретируемость фрагментных спектров. Лучше были представлены "мягкие каналы" фрагментации с крупными фрагментами, и по сравнению с ВЕ-приборами состав фрагментных спектров мало зависел от конкретного инструмента. К концу 70-х тройной квадруполь был освоен коммерчески и стал применяться с газовыми источниками ионов API (TAGA). С начала 80-х происходит стремительное развитие тандемной масс-спектрометрии, вызванное сразу многими причинами: введением методов мягкой ионизации, созданием масс-анализаторов нового типа, подключением методов информатики для обработки данных и разработкой новых областей приложения и методов анализа.

МЕТОДЫ МЯГКОЙ ИОНИЗАЦИИ

Предыстория: "электронный удар"

До конца 70-х и мотивация, и возможности (МС-МС)-анализа были ограничены методами ионизации. В основном применялся электронный удар, который сам по себе создавал многочисленные фрагменты. Состав фрагментов давал богатую структурную информацию и позволял идентифицировать вещества, сравнивая спектры с библиотечными. Спектры электронного удара были насыщены пиками, и для анализа смесей было привлекательнее использовать не МС-МС, а тандемы ГХ-МС. Газовая хроматография (ГХ) высокого разрешения позволяла разделять компоненты во времени, а масс-спектры электронного удара позволяли идентифицировать индивидуальные компоненты. Показательно, что исследователи предпочитали (ГХ-МС)-методы даже для расшифровки последовательности белков [8]. Белки подвергались ограниченному кислотному гидролизу, полученные пептиды подвергались химической модификации, переводились в летучее состояние и анализировались ГХ-МС. МС-МС же применялся лишь для подтверждения или расшифровки структуры индивидуальных соединений.

PDMS, FAB

Наблюдаемая сегодня популярность (МС-МС)-методов в значительной степени связана с созданием мягких методов ионизации [9]. Метод плазменной десорбции МакФарлейна (McFarlan) [10, 11] стал одним из первых "мягких" методов ионизации и вызвал большой энтузиазм в среде масс-спектрометристов. В начале 80-х созданы методы

FAB [12–14], "динамический" FAB [15], термоспрей [16] и aerospray [17], сразу же освоенные в ВЕ-приборах и на тройных квадруполях. В результате массовый диапазон нелетучих соединений был расширен до нескольких тысяч дальтон, и новые методы ионизации теперь позволяли анализ сахаров, липидов, аминокислот, коротких пептидов и нуклеотидов [18, 19].

ESI, MALDI

Возможности масс-спектрометрии еще более расширились с появлением мягких методов ионизации следующего поколения: электроспрей — ESI [20–24] и лазерной десорбции / ионизации из матриц — MALDI [25, 26], что было признано при номинации нобелевской премии по химии в 2002 г. (www.nobel.se). К началу 90-х методы MALDI и ESI полностью заменили своих предшественников. Они расширили диапазон анализируемых соединений, привели к существенному улучшению чувствительности — менее единиц фемтомоль — и снизили химический фон [27–29]. Масс-спектры значительно упростились: каждое индивидуальное соединение теперь стало представимым ионами одной массы (учитывая вариации заряда), соответствующей молекулярной массе соединения. Это, наконец, позволило применять (МС-МС)-методы для анализа сложных смесей [19, 30, 31].

Ion Spray, Nanospray

Отметим некоторые важные направления в развитии мягких методов ионизации. Разработка ионного источника Ion Spray [32, 33] при повышенных потоках жидкости позволила надежно стыковать масс-спектрометры с жидкостными хроматографами (LC), что в свою очередь вызвало каскад фармацевтических приложений [34]. Разработка микроэмиттеров [35] и наноэлектроспрея [36, 37] открыла возможность чувствительного анализа на уровне менее 1 фемтомоль (10^{-15} моль, т. е. $6 \cdot 10^8$ молекул). Высокая чувствительность способствовала широкому внедрению электроспрей-масс-спектрометрии в биотехнологии и программе протеомики. Ранее анализ требовал многих пикомолей (т. е. на 3–4 порядка больше вещества) для секвенирования по методу Эдмана (Edman) [38] или для структурного анализа методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) — см. обзор [9]. В 90-х создается ряд тандемных приборов, в значительной степени ориентированных на особенности метода электроспрей. Это — в первую очередь ионная ловушка ITMS, тандемы Q-TOF и LIT-FTMS, рассмотренные ниже. Мощные аналитические комплексы LC-MS-MS, включающие жидкостные хроматографы on-line, успешно применяются для анализа сложных смесей в фармацевтике [33], а с се-

редины 90-х и в биотехнологии, особенно в программе протеомики [39, 40].

Области приложения MALDI

Метод MALDI с самых первых дней был связан с анализом пептидов, белков и коротких молекул ДНК. Надо признать, что, невзирая на большое количество усилий, метод MALDI так и не смог стать конкурентноспособным в анализе ДНК — он уступает секвенаторам и ДНК-чипам и по чувствительности, и по экспрессности анализа, и по размеру анализируемых молекул. Несмотря на исходное воодушевление биологов, и анализ больших белков оказался гораздо менее информативным, чем первоначально ожидалось. Выяснилось, что молекулярный вес не является ни отличительной, ни стабильной характеристикой белков. Так, в организме человека ожидается до 1 000 000 различных белков, покрывающих диапазон от 10 до 100 кДа, т. е. на одну молекулярную массу в среднем приходится около десяти претендентов. Белки испытывают более 200 разных типов вариаций, как например фосфорилирование или гликозилирование. Таким образом, правильнее отличать белки по их "фамилии, имени и отчеству", а не по весу, поэтому прямые измерения массы ДНК и белков оказались непопулярными. Однако настоящий триумф состоялся в приложении метода MALDI к идентификации белков по пептидным картам [41–44], впоследствии ставшей основой методологии протеомики (см. ниже) [9].

Эволюция MALDI: DE MALDI, Orth MALDI

Создание метода задержанной экстракции (delayed extraction, DE) значительно улучшило харак-

теристики метода MALDI [45]. Временная задержка дает матричной струе расширяться, прежде чем ионы экстрагируются импульсным полем. Это устраняет жесткие каналы фрагментации, а также высокую чувствительность к выбору лазерного пятна и лазерной энергии, типичные для статического MALDI. Повысилась чувствительность анализа, улучшились разрешение ($R \sim 20\,000$ [46]) и точность масс до 20–30 ppm. Метод DE значительно способствовал автоматизации и производительности MALDI. Сегодня DE-MALDI — наиболее предпочтительный метод для экспрессной идентификации белков из двумерных гелей по методу пептидных карт [9].

Газовое охлаждение ионов в источнике MALDI [47–49] привело к дальнейшему совершенствованию метода. Газовая стабилизация позволяет перевести ионные импульсы в стационарный пучок для стыковки со всеми известными масс-анализаторами. Внутреннее охлаждение ионов позволяет анализировать сложные смеси. Развязка между источником и анализатором позволяет достичь более высокой массовой точности в единицы ppm.

СОВРЕМЕННЫЕ ТАНДЕМНЫЕ ПРИБОРЫ

Развитие методов мягкой ионизации, успешные приложения MC-MC в биотехнологии и широкое распространение MC-MC стимулировали лавинообразное развитие (MC-MC)-приборов. В результате появились такие скоростные (MC-MC)-инструменты, как ионные ловушки (ITMS) и тандем Q-TOF. Недавно разработан мощный тандем линейной ловушки (LIT) и масс-спектрометра с Фурье-трансформацией (FTMS) и (TOF-TOF)-тандем с источником ионов MALDI.

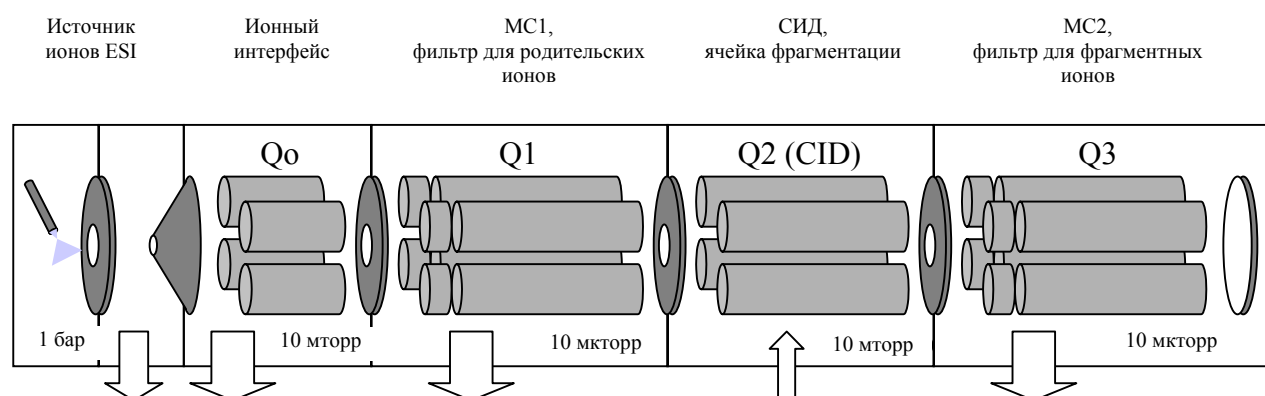


Рис. 1. Тандем тройной квадруполь

Тройной квадруполь (3-Q)

Тройной квадруполь 3-Q [50] является одним из наиболее широко распространенных тандемов. Прибор (рис. 1) включает последовательно соединенные квадрупольные масс-фильтры MC1, MC2, разделенные газовой ячейкой фрагментации CID.

Каждый квадрупольный масс-фильтр состоит из 4 параллельных стержней, к которым прикладываются радиочастотное и постоянное напряжения. Ионный пучок пропускается по оси квадрупольного масс-фильтра и подвергается селекции по массе. Подбор напряжений позволяет пропускать ионы с выбранным отношением массы к заряду m/z (далее для простоты называемым массой), выбрасывая остальные ионы на стержни [51]. В зависимости от типа эксперимента окно пропускания либо фиксируют на выбранном m/z , либо сканируют для записи полного масс-спектра.

В тройном квадруполе источник ионов, например ESI, создает непрерывный ионный пучок. Пучок сужается, а кинетическая энергия ионов демпфируется за счет столкновений с газом в квадрупольном радиочастотном (РЧ) ионном проводнике (ion guide) Q₀ [52]. Далее ионный пучок подают в первый квадрупольный масс-фильтр Q1 для выделения ионов только одной выбранной массы. Остальные компоненты первичного пучка отклоняются и теряются. Выделенные родительские ионы пропускают через так называемую ячейку фрагментации (CID), заполненную газом до давления нескольких мторр и представляющую

собой РЧ квадрупольный проводник ионов Q2. В столкновительной ячейке родительские ионы фрагментируют, а фрагментные ионы тормозятся и охлаждаются за счет газовых столкновений аналогично Q₀. Смесь фрагментных ионов вводят в третий квадруполь Q3 для анализа по массам, где также пропускают ионы только одной массы.

Поскольку сканирование по массам медленное и вызывает потери чувствительности, то тройные квадрупольные приборы чаще всего используются для детектирования и количественного анализа веществ с известными массами родительских и фрагментных ионов. Тройной квадруполь успешно применяется, например, для исследования метаболизма лекарств в крови и тканях [39]. В этом случае заранее известны масса соединения и массы его фрагментов в столкновительной ячейке, поэтому нет необходимости наблюдать весь спектр родительских или весь спектр фрагментных ионов. В таких приложениях применение MC-MC позволяет проводить уверенную идентификацию даже очень незначительных количеств лекарства, селективно не путая его с другими веществами той же массы, составляющими химический фон. При записи выделенных каналов нет потерь на сканирование, а трансмиссия квадруполей на каскад достигает 70 % при разрешении $R = 1$ М. Поэтому тройные квадруполи обладают рекордной чувствительностью, а в сочетании с источником ионов наноспрей позволяют анализ в аттомольном диапазоне [53, 54]. Приборы 3-Q обладают и высоким динамическим диапазоном (от 3 до 4 порядков)

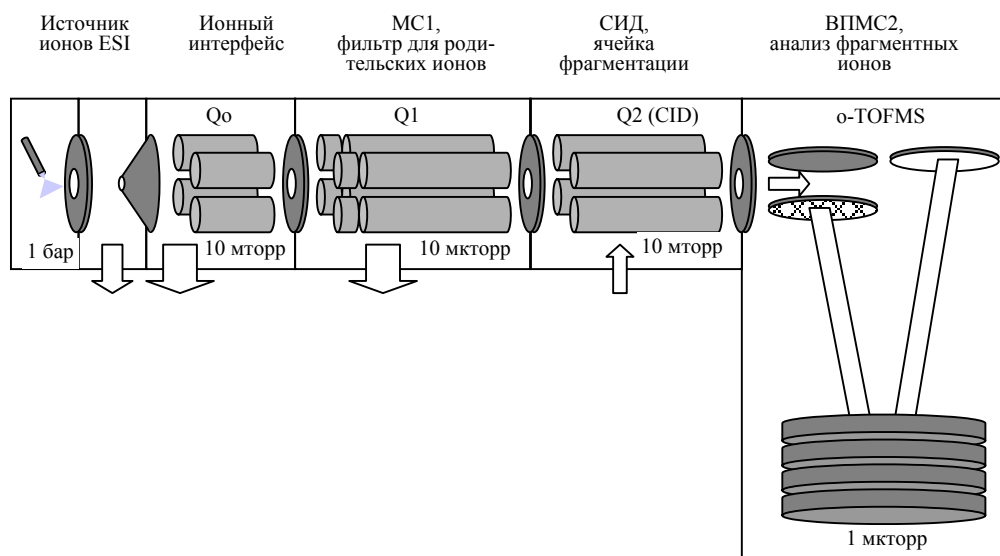


Рис. 2. Тандем квадруполь с ВПМС (Q-TOF)

и незаменимы в количественном анализе. Ахиллесовой пятой приборов является сканирование, особенно если необходимо сканирование в обеих ступенях. Сканирование одной ступени в полном диапазоне масс уже занимает несколько (1–3) секунд и вызывает дополнительные потери с коэффициентом от 1000 до 3000. Сканирование же обеих ступеней, например для полного (МС-МС)-анализа смеси, привело бы к (10^6 – 10^7)-кратным потерям в чувствительности и заняло бы около одного часа (2000 точек в МС1, по 2 с на МС2-скан).

Тандем Q-TOF

Из-за потери на сканирование тройные квадруполи плохо подходят для качественного (МС-МС)-анализа сложных смесей. Это стало особенно очевидным после появления тандемных масс-спектрометров Q-TOF [55–57]. Тройной квадруполь был модифицирован (рис. 2) с заменой последнего квадрупольного масс-фильтра Q3 на ортогональный времяпролетный анализатор (ВПМС, o-TOFMS).

Эта замена позволила резко повысить скорость анализа вторым масс-спектрометром до приблизительно 0.1 с на фрагментный спектр. Несмотря на (10–30)-кратное ухудшение трансмиссии в o-TOF по сравнению с квадруполем в SIC-моде (selected ion current, без сканирования), чувствительность возросла в 30–100 раз в панорамной моде, т. е. при записи "полных" фрагментных спектров. В результате полная (МС-МС)-характеризация всех компонент смеси может быть проведена приблизительно за 2–3 минуты. Кроме того, при этом повысились разрешающая способность (10 000–20 000) и точность определения масс-фрагментов (1–5 ppm), что резко улучшило достоверность идентификации и пороги обнаружения, определяемые химическим шумом.

По сравнению с 3-Q приборы Q-TOF оказались гораздо более пригодны для широкого круга задач, и комплекс Q-TOF с микроколоночной хроматографией (μ LC-QTOF) стал одной из основных "рабочих лошадей" для качественного анализа в биотехнологических и фармацевтических приложениях. С помощью μ LC-QTOF можно определить несколько тысяч компонент в анализируемых смесях на протяжении одночасового анализа. Запись (МС-МС)-спектров хорошо автоматизирована, а типичное время записи единичного МС- или (МС-МС)-спектра составляет около 1 с и диктуется компромиссом между стремлением зарегистрировать максимум компонент, с одной стороны, и чувствительностью прибора и временем интерпретации (МС-МС)-спектров, с другой стороны. Комплексы успешно применяются, например, для идентификации белков в смесях, содержащих несколько сот компонент (представленных десятками

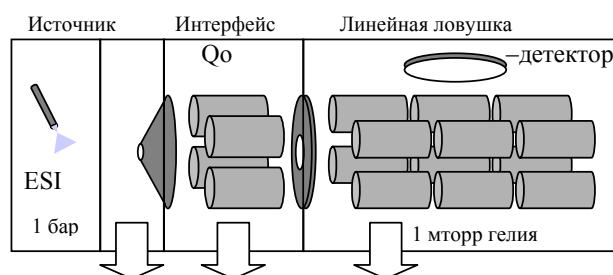


Рис. 3. Линейная ионная ловушка (LIT)

тысяч пептидов), или для характеристики комбинаторных лекарственных библиотек.

Ионная ловушка (ITMS)

Другой распространенный (МС-МС)-прибор использует в своем составе масс-спектрометр типа ионной ловушки Пауля (ITMS), описанной, например, в книге [58]. Прибор ITMS [59] позволяет реализовать многообразие тандемных стратегий на одной ловушке [55]. Все операции с ионным пучком производятся, манипулируя радиочастотным полем и селективно возбуждая секулярные колебания уловленных ионов: производятся масс-анализ, выделение родительского иона, фрагментация и масс-анализ фрагментов. Ловушки выгодно отличаются возможностью многостадийного МСⁿ-анализа, когда исследуются многие последовательные стадии фрагментации и масс-селекции фрагментов, что повышает селективность анализа и точность расшифровки структуры. Ионные ловушки хорошо автоматизированы и позволяют проводить информационно-зависимые эксперименты (Data Dependent Algorithms, DDA) на протяжении хроматографического анализа. Так, на протяжении хроматографического пика (обычно 10–20 с) несколько раз производится переключение между записью масс-спектра родительских и фрагментных ионов. При этом масса родительского иона автоматически выбирается по текущим спектрам.

Именно простота и полнота автоматизации подкупают пользователей ловушки, невзирая на целый ряд ее недостатков, таких как:

- узкий диапазон масс-фрагментов — легкие фрагменты менее 1/3 молекулярной массы не видны, что связано с устойчивостью в РЧ-поле;
- слабая статистика сигнала, поскольку число ионов в ловушке, ограниченное объемом зарядом, менее 300, что порождает ошибки в интерпретации фрагментных спектров;
- большое количество непредставительных фрагментов, связанное с медленным (10 мс) разо-

гревом ионов, что ухудшает долю интерпретируемых спектров в среднем до 10–30 %;

- низкая точность масс, связанная с фрагментацией при выводе ионов и называемая "химическим сдвигом";
- низкое разрешение в панорамной моде (менее 1000), не позволяющее определять зарядовое состояние ESI-ионов при необходимой скорости сканирования в 2000 а.е./с.

Прибор был значительно улучшен с недавним введением линейной ионной ловушки [60] (рис. 3), в которой существенно улучшился захват ионов (с 10 до 90 % от входящего пучка), в 30 раз повысилась емкость ловушки и в 3 раза скорость сканирования. Ловушка остается популярным прибором низкого уровня (с низкими параметрами), удобным, высоко автоматизированным и широко применяемым в рутинных (МС-МС)-измерениях. Именно из-за высокой автоматизации и высокой чувствительности (менее 1 фемтомоль) прибор широко применяется и для задач протеомики [61], несмотря на то что скоростная запись tandemных спектров несовместима с высокой точностью и разрешающей способностью, а качественный состав фрагментных ионов существенно уступает фрагментам в 3-Q и Q-TOF.

LIT-FTMS

До начала 2000-х масс-спектрометр ион-циклотронного резонанса с обратным анализом Фурье (FTMS) лишь ограниченно применялся в биотехнологии [62, 63], несмотря на высокие отдельные параметры приборов. Так, разрешение достигало более 1 000 000 в отдельных измерениях и более 100 000 в рутинной работе. Чувствительность прибора достигла рекордной отметки ниже 1 ат-

томоль в конце 90-х после введения внешнего ионного накопления в газонаполненном квадруполе [64]. Однако применение прибора сдерживалось низкой скоростью (МС-МС)-анализа и малым динамическим диапазоном прибора. Время единичного (МС-МС)-анализа составляло около десятка секунд, в основном требуемых для откачки ячейки до глубокого вакуума ($<10^{-10}$ торр) после охлаждения фрагментных ионов газовым импульсом. Динамический диапазон ограничен емкостью ячейки, с одной стороны (точность измерения падает после наполнения ячейки более чем 10^6 ионами), и чувствительностью детектора, с другой стороны (шум широкополосного детектора сравним с сигналом от 100 ионов). Таким образом, емкость спектра составляет менее 10 000 на все ионные компоненты.

Комбинация прибора с ионной ловушкой (рис. 4) привела к качественному улучшению целого ряда критических параметров tandemного анализа в FTMS [65]. (МС-МС)-анализ значительно ускорился, т. к. ионное накопление, выделение и фрагментация теперь протекают в линейной ионной ловушке (LIT). Панорамный спектр родительских ионов также получают в ловушке, и, кроме того, появляется возможность селективного удаления нескольких интенсивных пиков до введения ионов в FTMS. Сам FTMS-прибор используется для масс-анализа высокого разрешения (от 100 000 до 1 000 000). Благодаря точному контролю количества инжектированных ионов достигается беспрецедентная (для химического анализа) точность по массе в Фурье-масс-спектрометре, на уровне 0.1 ppm. Автоматический выбор числа уловленных ионов (Automatic Gain Control, AGC) резко повышает динамический диапазон Фурье-МС, что ранее было слабой стороной прибора.

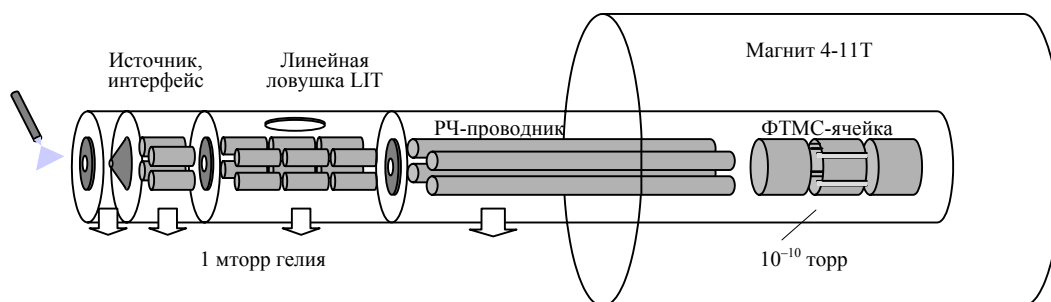


Рис. 4. Тандем линейная ловушка и МС с трансформацией Фурье (LIT-FTMS)

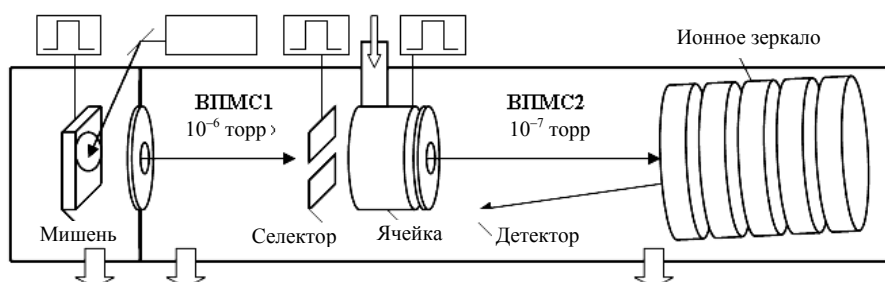


Рис. 5. Тандем из двух ВПМС с задержанной экстракцией (TOF-TOF)

Безусловно, тандем ловушка—Фурье-масс-спектрометр обладает наиболее мощным набором аналитических характеристик. К недостаткам прибора можно отнести большой размер, высокую стоимость и низкую скорость записи спектров — так, требуется около одной секунды на запись Фурье-спектра с разрешением около 100 000. Прибор плохо совместим с жидкостной хроматографией при анализе сложных смесей — просто уже потому, что недостаточно времени для анализа многих компонент за время хроматографического пика. Тандем LIT-TOFMS привлекателен и в новых стратегиях анализа сложных смесей. Недавно появились новые подходы к высокопроизводительной идентификации компонент не по (МС-МС)-спектрам, а по масс-спектрам высокого разрешения в сочетании с меткой по времени хроматографического разделения (Accurate Mass and Time tag — AMT tag) [66]. В работах группы Ричарда Смита лизат *Deinococcus radiodurans* был хорошо охарактеризован LC-MS и LC-MS-MS методами [67], и AMT-метки были определены для многих тысяч пептидов. Показано [68], что последующее измерение пептидных масс с точностью лучше 1 ppm (типичное для FTMS) и времени хроматографического выхода с точностью в несколько процентов позволяет идентифицировать более 3500 пептидов с уникальной AMT-меткой. Для нескольких сот белков в одном эксперименте обнаружено два и более пептидов с уникальной меткой.

TOF-TOF

Появившиеся недавно тандемные времяпролетные масс-спектрометры TOF-TOF [69–71] оказались удачной реализацией (МС-МС)-метода для источников ионов с лазерной десорбцией из матрицы — MALDI. Во всех тандемных (TOF-TOF)-системах импульсный ионный пучок разделяется по времени в первом высокоэнергетическом времяпролетном анализаторе и фильтруется с помо-

щью временного селектора ионов таким образом, что в столкновительную ячейку попадают только ионы выделенного сорта. Столкновительная ячейка наполняется газом при низком давлении (обычно ниже 1 мторр), при котором наиболее вероятны лишь единичные столкновения с молекулами буферного газа. При высоких энергиях происходит эффективная фрагментация ионов, но сохраняется малая длительность ионного пакета. Импульсный пучок фрагментных ионов анализируется во втором высокоэнергетическом времяпролетном анализаторе. Чтобы справиться с большим энергетическим разбросом фрагментных ионов, во втором времяпролетном анализаторе используется либо дополнительное импульсное ускорение [69, 70], либо квадратичное распределение потенциала [71]. Как и в других, ранее описанных тандемах, выделение первичного иона производится с потерей остальных компонент пучка.

Как и LC-Q-TOF, метод MALDI-TOF-TOF успешно применяется для анализа умеренно сложных пептидных смесей, несмотря на умеренную чувствительность (10 фемтомоль), низкую разрешающую способность селекции родительских ионов (100–200), сложный состав фрагментов и трудность настройки. Пользователей привлекает, что тандемный анализ совмещен с ионизацией методом MALDI, что позволяет работать со слабо очищенными образцами и применять роботы для модификации и приготовления пробы на поверхности, например роботы для коллектора фракций или вырезания пятен из двумерных гелей, ферментативного гидролиза в пробирках, быстрого обес-соливания в насадках дозаторов.

Как видно из обзора современных методов, новые возможности МС-МС оказались особенно ценны для решения аналитических задач в биотехнологии и фармакологии. Именно в биотехнологических приложениях приходится анализировать сложные смеси в большом диапазоне концен-

траций компонент и идентифицировать минорные примеси в присутствии сложных биологических матриц (тканей, плазмы крови и т. д.). В результате сложного процесса развития в симбиозе биотехнологические приложения стали основным потребителем (МС-МС), а (МС-МС)-методы — самыми селективными и наиболее достоверными методами анализа в биотехнологии.

НЕКОТОРЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ФАРМАКОЛОГИИ

Масс спектрометрия оказалась чрезвычайно полезной на всех стадиях фармацевтических исследований — см. обзоры [34, 73, 74]. Сегодня масс-спектрометрические методы GC-MS, LC-MS и LC-MS-MS в значительной степени заменили ранее используемые методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР), оптической и ИК-спектроскопии. Масс-спектрометрические методы оказались значительно чувствительнее, специфичнее и более экспрессными. В отличие от спектроскопии они позволяют анализировать смеси и обнаруживать микропримеси. Поскольку размер фармацевтического бизнеса велик — в среднем новое лекарство приносит выпускающей компании несколько миллиардов долларов в год, — то значителен и масштаб фармацевтических исследований [75]. Фарминдустрия чрезвычайно наукоемкая, и более половины этих средств возвращаются обратно на фармацевтические исследования, включая разнообразные стратегии поиска новых лекарственных препаратов и анализа с помощью масс-спектрометрических комплексов. Для обзора применений масс-спектрометрии на разных стадиях разработки лекарств сначала обратимся к особенностям фармацевтических исследований.

Стадии фармацевтических исследований

Целью фармацевтических исследований является создание новых лекарственных препаратов. Фармацевтические исследования можно разбить на следующие 4 стадии:

Drug Discovery. Стадия поиска новых "кандидатов" — потенциальных лекарственных препаратов (Lead Candidate). Эта стадия включает синтез новых соединений и их библиотек, скринирование экстрактов из натуральных источников, а также определение активности, специфичности и токсичности лекарств-кандидатов. Для предпочтительных кандидатов рассматриваются каналы метаболизма для быстрого отсева неблагоприятных соединений. На этой стадии масс-спектрометрия является основным аналитическим инструментом и включена в разнообразные исследовательские стратегии, частично раскрытые в этом обзоре.

Preclinical Development. Стадия характеристики лекарств-кандидатов. На этой стадии проводят предварительные испытания на культурах клеток и на животных. Кроме того, определяют химические свойства соединения, проверяют, насколько технологичным может быть производство лекарства, и определяют деграданты и метаболиты соединения в биосредах. Определение метаболизма лекарств является важным и ресурсоемким анализом. Здесь абсолютно незаменимы (LC-MS-MS)-методы, чаще всего с использованием 3-Q и ITMS приборов.

Clinical Development. Стадия клинических испытаний. На этой стадии проводят количественный анализ метаболизма и накопления лекарств в органах и биосредах нескольких сот пациентов (опять же с помощью LC-MS-MS). Эти исследования совмещают с общими клиническими исследованиями и проводят корреляцию терапевтического эффекта с приемом лекарств, следят за возможными побочными действиями и определяют оптимальную дозу лекарств.

Производство. После утверждения лекарства происходит оптимизация его производства, определение микропримесей и последующий контроль качества промышленно выпускаемого лекарства. Как правило, используются GC-MS, (LC-MS)-методы.

Drug Discovery — поиск новых лекарств

На первой фармацевтической стадии поиска новых кандидатов (lead candidate) разработан ряд производительных методов, включающих масс-спектрометрию не только как инструмент по контролю результата, но и как активный компонент — инструмент поиска. В 19-м и 20-м веках большинство лекарств экстрагировали из натуральных источников (например, пенициллин). С помощью методов выделения и разделения — экстракции растворителями, фильтрации и хроматографии — эти экстракты разделяли на фракции и выбирали наиболее активные и наименее токсичные фракции. По мере развития аналитической техники удалось определить активные начала (соединения) в таких фракциях, и к середине 20-го века сложилась парадигма, что большинство лекарств — это сравнительно небольшие соединения (200–500 а.е. массы), которые можно воспроизвести синтетически. Вплоть до начала 90-х основная стратегия создания новых лекарств сводилась к синтезу новых соединений, их очистке, идентификации химической формулы, определению их активности и токсичности на определенном наборе биологических тестов (bio assay) и тем самым определению пригодности соединения как потенциального лекарства. Дальнейший отбор лекарств происходил в испытаниях на культурах клеток, на мышах

и собаках, а для отобранных и безопасных лекарств — в клинических испытаниях. Поскольку синтез и очистка соединения занимали недели и месяцы, а количество синтезируемого вещества определялось многими миллиграммами, то аналитические методы ТСХ, ЯМР и ИК-спектроскопии были адекватными. Появившиеся в 70-х масс-спектрометрические методы GC-MS оказались дополнительными — более информативными, более удобными и лучше автоматизированными, однако все равно еще медленными и дорогостоящими.

Direct Access — инструменты прямого доступа

С внедрением чувствительных и специфических методов LC-MS и LC-MS-MS стали возможными экспрессная и специфическая идентификация индивидуальных соединений, анализ сложных смесей и количественное определение микропримесей. Изменился подход к поиску новых соединений. В середине 90-х — с использованием автосэмплеров и с ускорением единичного анализа до нескольких секунд. Надежность, производительность и цена анализа стали доступными для массового пользования. Приборы общего пользования получили название "direct access". Химики-синтики могли сами загружать образцы в высокоавтоматизированные приборы, и все что их интересовало — есть или нет соединение с ожидаемой молекулярной массой и является ли оно основной фракцией в спектре. Источники ионов ESI и APCI позволяли получать легко интерпретируемые спектры. Химики стали проводить экспрессный MS-анализ синтетических смесей на каждой промежуточной стадии синтеза, тем самым резко снизив время для синтеза новых соединений [76]. Для синтетиков масс-спектрометрия заменила тонкослойную хроматографию (ТСХ), ЯМР и ИК-спектроскопию. Один химик-синтик стал производить порядка 50 новых соединений в год. Однако со временем и такой производительности стало мало. Наиболее простые соединения были выработаны и выход синтетических лекарств — кандидатов на коммерческое лекарство снизился до 1: 100 000. Поиск новых лекарств стал достаточно дорогим занятием в масштабах человечества. Возникла необходимость в новых стратегиях.

Комбинаторные библиотеки

К середине 90-х стали популярными подходы "комбинаторной химии" [77, 78]. Вместо наработки индивидуальных очищенных соединений синтезируют смесь химических аналогов. Представим, например, что на нескольких стадиях синтеза вместо одного радикала-реагента вносят N подобных $R_1, R_2 \dots R_N$. Разнообразие радикалов может быть внесено в нескольких позициях m . Количество комбинаторных вариаций быстро нарастает, как

N^m , и в некоторых библиотеках достигает 10^6 . С точки зрения целенаправленного синтеза такие вариации позволяют оптимизировать стереометрию молекул и добиваться наиболее точного совпадения молекулы лекарства с "приемным карманом" — эпитопом белка-мишени. Именно оптимальное соединение будет обладать наибольшим сродством к белку-мишени, а значит, и наибольшей активностью и специфичностью. Поскольку белки-мишени могут быть иммобилизованы (внутри ячейки с молекулярными ситами или на поверхности сорбента), то появляется возможность применить аффинные методы и выделить активное соединение — чаще набор соединений с различной степенью обогащения. Как пример, в [79] набор малых молекул-лигандов (от 280 до 580 а.е.) инкубируется с протеином PPAR γ (32537 а.е.) — мишенью для лекарств против диабета. Белок и присоединенные лиганды отделяются хроматографией с разделением по размеру (Size Exclusion Chromatography, SEC), а затем присоединенные лиганды смываются для анализа. Ранее в таких стратегиях для идентификации соединений с помощью ЯМР не хватало чувствительности, а для хроматографии нужно бы было синтезировать и очищать стандарты индивидуальных лигандов, что делало комбинаторный подход бессмысленным.

Выделение активных компонент в библиотеках

С появлением масс-спектрометрии комбинаторный подход стал действительно эффективным (см. обзоры [80, 81]). Методами LC-MS сначала характеризуют смесь и относительные концентрации компонент [82], а после биохимических тестов определяют обогащение активными компонентами [83, 84]. Чаще таких компонент несколько, но не много, и становится рациональным их определение методами LC-MS-MS, особенно с учетом информации о радикалах, использованных в синтезе [85]. Даже если структура соединения остается нерасшифрованной, для дальнейшего уточнения активных компонент теперь экономично применить целенаправленный синтез — ведь вариативность и количество индивидуально синтезируемых компонент снижена на порядки [86]. В результате для характеристики сложных библиотек все более популярны стали методы с частичной идентификацией по точной массе соединений или по так называемой метке, совмещающей точную массу и время хроматографического разделения (AMT tag) [67]. Так, с применением TOFMS масса может быть определена с точностью 1–5 ppm, а в методах FTMS — менее 1 ppm. При такой точности возможно однозначное определение брутто-формулы (атомарного состава) для молекул менее 500 а.е. Для компонент комбинаторной библиотеки это

означает идентификацию с точностью до структурных изомеров [87]. Сегодня созданы разнообразные стандартизованные и хорошо охарактеризованные библиотеки "смесей малых молекул", содержащие многие миллионы соединений и около 200 000 индивидуальных соединений [88–90]. Каждый раз при возникновении новых протеин-мишеней, или новых биохимических тестов, или исследовательских подходов готовые библиотеки скринируются и с помощью масс-спектрометрии выделяются активные компоненты.

Идентификация белков-мишеней

По мере развития методов анализа пептидов и протеинов появилась возможность рационального поиска новых мишеней-белков. Еще недавно на докладах конференции ASMS 2003 звучала цифра — 200 известных мишеней, но в неформальных дискуссиях с биохимиками-разработчиками выяснилось, что сегодня определены и испытываются десятки новых мишеней. Ниже рассмотрены некоторые методы направления протеомики, в том числе методы, направленные на поиск мишеней, понимание их функций и определение механизма терапевтического действия после блокады мишени.

High Throughput — высокопроизводительный анализ

С изменением скоростей анализа масс-спектрометрия стала основным аналитическим инструментом в фармакологии. Высокопроизводительные комплексы LC-MS и LC-MS-MS с автосэмплерами и параллельными LC проникли во все области фармацевтических исследований: для контроля синтеза новых соединений и синтетических библиотек, для контроля очистки и фракционирования, для характеристики и контроля качества комбинаторных библиотек, для скринирования природных экстрактов, для проведения аффинных биохимических тестов и т. д. Для скоростного анализа чаще всего используют TOFMS приборы с 8-канальным источником ионов "электроспрей" в так называемой технологии MUX [91, 92]. Вращающийся затвор по очереди открывает доступ ионов из нескольких ESI-распылителей, соединенных с каналами скоростной доставки образцов. Циклически (раз в секунду) спектры записываются для всех 8 каналов. Для прямой характеристики образцов применяют скоростной 8-канальный инжектор [93] с производительностью более 8 образцов в минуту, т. е. около 5000 образцов в день. Для быстрого (3–5 мин) обессоливания и грубого разделения образцов применяют многоканальный хроматограф с 4–8 параллельными колонками [82], позволяющий характеризовать 1–2 образца в минуту, т. е. 500–1000 образцов в день.

Высокопроизводительные комбайны требуют целого комплекса роботов и программ. Так, образцы хранятся в 96-канальных пластинах, сложенных в кассеты. Образцы аннотированы и их маркировка отслеживается от хроматографа к масс-спектрометру и далее передается вместе со спектрами в пользовательскую базу данных, доступную для группы пользователей через интранет. На основе специализированных программ [94–96] определяется совпадение наблюдаемых ионов с ожидаемыми молекулярными массами, присутствие реагентов, степень протекания реакции, наличие микропримесей и степень очистки.

Скоростные и высокопроизводительные методы анализа произвели очередное смещение в стратегиях фармацевтических исследований [97]. Многостадийные системы фракционирования и очистки позволяют разделить комбинаторные библиотеки на индивидуальные соединения или существенно упростить сложность смесей, опять-таки не требуя синтеза индивидуальных соединений и повышая надежность аффинных методов в биохимических анализах. При этом тяжесть разделения и характеристики падает на автоматизированные комплексы [90, 98, 99], позволяющие автоматически выделять сотни компонент в день.

Метаболизм лекарств

При приеме лекарства происходит его распределение по организму, распределение по тканям с последующим вымыванием или расщеплением лекарства на метаболиты. Доза и частота приема регулируются в зависимости от индивидуальных скоростей этих процессов. При этом необходимо следить за возможностью возникновения токсичных метаболитов или постепенным накоплением лекарства или метаболитов в тканях. Многие из этих процессов могут быть изучены *in vitro*, например проникновение лекарств через мембрану клеток [100]. Принципиально фармакокинетика лекарства изучается на животных моделях *in vivo* [101]. Однако наибольшее количество анализов приходится на клинические испытания, т. к. в соответствии с федеральными требованиями необходимо изучить диапазон кинетики метаболизма, вызванный особенностями пациентов. Это снижает риск возможных негативных последствий при последующем широком использовании лекарств.

Типичные назначаемые дозы составляют от единиц до десятков миллиграмм. Даже растворение лекарства в 5 л крови приводит к концентрации порядка мг/мл. Обычно динамика изменения концентрации прослеживается до уровня нг/мл [101]. В присутствии сложной биологической матрицы такие минорные концентрации могут быть определены только с помощью методов предварительной очистки с последующим применением

LC-MS-MS, чаще всего с использованием тройных квадруполов. Предварительно изучается состав фрагментов лекарства и выбираются несколько наиболее интенсивных фрагментов, минимально перекрывающихся с фоном (МС-МС)-спектров матрицы, т. е. биологических жидкостей — плазмы крови, экстрактов тканей. Зная массу родительского и нескольких фрагментных спектров, проводят так называемый мониторинг выделенной реакции (Selected Reaction Monitoring, SRM) во время хроматографического пика. Для ускорения фармакинетических исследований на животных применяют так называемый кассетный подход [102], когда инжестируются сразу несколько лекарств, а тройной квадруполь ступенчато переключается между каналами выделенных реакций. В таких исследованиях инструмент 3-Q оказывается непревзойденным по чувствительности и селективности. Типичная трансмиссия каждой ступени приближается к 70 % при разрешении $R = M$.

Тандемная масс-спектрометрия применялась для количественного анализа метаболизма лекарств с начала 80-х [103]. К середине 90-х метаболизм лекарств стал первым массовым приложением тандемной масс-спектрометрии в фармацевтике и послужил трамплином для освоения масс-спектрометрии химиками и биохимиками. В течение следующего десятилетия тандемная масс-спектрометрия была не только освоена, но стала основным рабочим инструментом для фармацевтических и биохимических исследований. Создав обширный рынок приборов, биотехнология стала основным потребителем масс-спектрометрии и сегодня в значительной мере диктует направления ее развития.

МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ

Протеомику можно определить как новое направление белковой химии, занимающееся исследованиями функций белков в биологических тканях. Обследуемые объекты — ткани, культуры клеток или плазма крови — содержат колоссально сложные смеси белков (сотни тысяч и более) в большом диапазоне концентраций (6–9 порядков) [104]. Анализ таких сложных смесей стал возможен в результате развития высокоразрешающих методов разделения, высокоспецифической и высокочувствительной масс-спектрометрии [9], набора колоссальной информации в генных [105–107] и белковых базах данных и развития методов биоинформатики, работающих с колоссальными объемами информации.

Двумерный электрофорез (2DE)

Масс-спектрометрическому анализу предшествует разделение смесей. Широко популярен метод

разделения в двумерном электрофорезе (2DE), предложенный для визуализации и анализа белковых смесей в середине 70-х [108]. В методе 2DE белки разделяются по заряду в одном направлении (используя полоски с иммобилизованными буферами, создающими градиент pH) и по подвижности в электрическом поле — в другом направлении [109]. Предприняты попытки стандартизации условий 2DE эксперимента с целью создания баз двумерных карт [110] с последующей идентификацией белков по положению на геле. Однако нет еще полной базы белков и воспроизводимость результатов 2DE между лабораториями низкая. Поэтому часто для идентификации интересующих пятен используются чувствительные и универсальные масс-спектрометрические методы.

В двумерных гелях удается разделить нескольких тысяч белков [36]. Разделенные белки окрашивают, что позволяет наблюдать пятна, содержащие от 1 пмоль (10^{-12} моль) белков при окрашивании Кумасси и от 100 фмоль (10^{-13} моль) при окрашивании серебром [37, 54]. Как правило, интересуются различиями двумерных карт, отвечающих либо состояниям нормы и патологии, либо соответствующих отклику на воздействие лекарством или стимулятором, либо вызванных блокадой выработанного гена [111, 112].

Для идентификации качественных или количественных различий используют масс-спектрометрию как наиболее чувствительный и информативный метод анализа. Интересующее пятно вырезают и обрабатывают химически: с белка снимают окраску, его денатурируют, восстанавливают (разрывая дисульфидные мостики) и подвергают ферментативному гидролизу. Наиболее популярен гидролиз трипсином, разрывающий пептидные связи после аминокислот лизин (K) или аргинин (R) и переводящий белки в хорошо предсказуемые фрагменты — триптические пептиды. Пептиды экстрагируют из геля с помощью растворителей, и смесь пептидов вводят в масс-спектрометр.

2DE-MALDI MS

Яркие, сильно концентрированные пятна 2DE чаще анализируют с помощью (MALDI-TOF)-приборов, поскольку метод MALDI мало чувствителен к примесям буферов, солей и полимеров из гелей и требует минимальной очистки образцов. С другой стороны, лишь измерение масс пептидов оказывается достаточным для идентификации белка по методу "пептидных карт". Измеренные массы пептидов сопоставляются с предсказаниями по белковому EST (Expressed Sequence Tag) или геномным базам данных. Частичное перекрытие измеренных и предсказанных масс, от 4 до 7 пептидов в зависимости от белка и массовой точности измерений, оказывается достаточным для уверенной идентификации белка [36, 44, 113, 114].

Гораздо чаще единичное пятно в геле представлено многими единицами и даже десятками белков, и метод пептидных карт сбивается. Некоторое улучшение достигается с введением специализированных программ [115], а также за счет увеличения массовой точности МС. При точности лучше 0.01 Да, достижимой в TOFMS, число совпадений для одного пептида снижается до сотен, а при точности 0.001 Да в FTMS — до десятков совпадений.

2DE-MS-MS

С применением тандемного МС стала возможной идентификация белков по одиночным пептидам. Долгое время качественный тандемный МС-анализ был доступен только для стационарных (не импульсных) методов ионизации, таких как электроспрей (ESI) с применением широкого набора инструментов — 3-Q, Q-TOF, ITMS, FTMS. В последние несколько лет высокоразрешающий МС-МС был реализован с источниками ионов MALDI в приборах Q-TOF [47, 51, 116, 117] и TOF-TOF [70], однако пока еще обладающих умеренной чувствительностью.

Успех тандемных методов в значительной степени обусловлен накоплением баз данных и разработкой программных методов идентификации белков. В методе "фрагментных карт" единичный пептид выбирают в первом МС, фрагментируют в столкновительной ячейке, а массы фрагментов сопоставляют с предсказаниями по базам данных (для всех пептидов с данной массой). Несмотря на отсутствие интерпретации фрагментных спектров, перекрытие более 5 масс фрагментов оказывается достаточным для идентификации пептида, а следовательно, и содержавшего его белка. Зачастую идентификация подтверждается последующим более подробным анализом спектра фрагментов, а также анализом других пептидов, ожидаемых в данном белке и обнаруженных в родительском спектре.

В методе "sequence tag" фрагментные спектры используются для частичной интерпретации и определения короткой последовательности из трех-четырех аминокислот. "Проезжая" такой последовательностью по известным пептидам с данной массой, быстро добиваются одиночного совпадения. Производные от метода позволяют поиск с допуском к ошибкам измерений [118], ошибкам в базах данных, а также идентификацию белков для гомологичных организмов, для которых отсутствуют белковые или EST базы или геном не расшифрован [119].

LC-MS-MS

По сравнению с двумерным электрофорезом применение ЖХ позволяет улучшить ряд парамет-

ров. В то время как в двумерном электрофорезе (2DE) разделение на тысячи пятен может протекать до 2 суток, типичная длительность LC-разделения составляет 1–2 часа. Хроматографы обладают существенно большей массовой емкостью образцов, что позволяет выделять минорные белки [104]. С другой стороны, разделительная способность LC существенно ниже, и в случае сложной смеси приходится проводить многостадийное разделение. На первой стадии смесь белков разделяется на фракции, например, методами афинной сепарации или ионообменной хроматографии [120–122]. Интересующие фракции белков подвергаются трипсическому гидролизу до пептидов. Пептиды в свою очередь разделяются в ЖХ с обращенной фазой чаще с применением микроколонок [35, 123, 124] при потоке 0.1–1 мкл/мин, что позволяет достичь высокой чувствительности метода, ниже 1 фмоль [18, 83, 125]. Разделенная смесь пептидов напрямую (on-line) анализируется в тандемном МС-МС с источником ионов "электроспрей" (ESI).

Большинство тандемов высоко автоматизировано, что позволяет проводить предметно-зависимый (МС-МС)-анализ (Data Dependent Analysis, DDA) без участия оператора. Так, в ионных ловушках ITMS или приборах Q-TOF на протяжении хроматографического пика (20 с) прибор переключается между записью спектра родительских ионов, автоматическим определением масс пептидов для (МС-МС)-анализа и записью фрагментных спектров, позволяя записывать несколько тысяч фрагментных спектров за 1 час. Высокая чувствительность и полная автоматизация сделали метод ЖХ-МС-МС наиболее популярным для работ по проектам протеомики.

Количественная дифференциация

Часто протеом формулируют как выявление функций белков за счет количественной дифференциации. Так, устранение белка-ингибитора повысило бы концентрацию его рецептора, а устранение гена вызвало бы потерю кодируемого белка. Для достоверной дифференциации таких связей абсолютно необходимо применять внутренние стандарты или изотопные метки. Поскольку при анализе сложных смесей происходит значительная интерференция (взаимное подавление) компонент, то низкая интенсивность сигнала совсем не означает отсутствие или подавление пептида в исходной смеси [9].

Введение изотопных меток ICAT [126] вызвало прорыв в количественном анализе. Метка содержит тиол-реагирующую группу для ковалентного присоединения только к аминокислоте цистеину, изотопно-меченную связку (linker) и биотиновый "хвост" для аффинного выделения. Для диффе-

ренциации двух линий клеток (например, между нормой и патологией) в лизаты обеих линий вводят метки с различным весом, отличающиеся числом дейтериевых замен протона в связке. Принято отличать легкую и тяжелую метку на 8 дейтериевых замен. Раз метка введена, оба лизата смешивают, чтобы избежать различий в последующей подготовке пробы. Смесь гидролизуют до пептидов и значительно упрощают за счет аффинного выделения на авидиновых колонках. Теперь остаются только цистеин-содержащие пептиды, которые подвергают ЖХ-МС-МС анализу. Сходные пептиды из обоих лизатов появляются рядом и в хроматографическом разделении и в масс-спектрах, лишь различаясь на 8 единиц массы. Из всего набора пептидных пар выбирают лишь пары со значительным различием интенсивности — отвечающие количественной дифференциации между нормой и патологией. Именно их и идентифицируют в тандемном (МС-МС)-анализе, применяя методы фрагментных карт или sequence tag [127].

Ограничения методов протеомики

Существующие методы изучения протеома еще не позволяют проводить быстрый и полный анализ всех его полипептидов. Прежде всего не хватает динамического диапазона и мощности разделения. Кроме того, скорость (МС-МС)-анализа сегодня ограничена на уровне менее 1 (МС-МС)-спектра за секунду, т. е. идентификация менее одного пептида в секунду. Даже для простейшего организма, как дрожжи, с 6000 генами и около 20 000 белками [128] полный анализ составил бы более 200 000 с (7 рабочих дней) на образец, учитывая приблизительно десятикратную редантность анализа пептидов. Такой объем протеома заставляет искать более рациональные подходы, прежде всего связанные с постановкой конкретной биохимической проблемы. В таких подходах для анализа выделяется лишь часть протеома. Например, белки-наживки используются для выделения нековалентно связанных лигандов. Для исследования передачи сигналов выделяются только фосфопептиды. В анализе с количественной дифференциацией выделяются только пептиды, содержащие аминокислоту цистеин.

ЗАДАЧИ ПРОТЕОМИКИ

Программа исследования протеома нацелена на изучение белков и их взаимодействий — центральных исполнителей биохимических процессов жизни. Если гены программируют набор возможных белков, то белки выполняют программу и ответственны за все биохимические процессы на уровне клетки: химический синтез, накопление и расходование энергии, дыхание, деление и умира-

ние клетки. Большое число белков отвечает за регуляцию на уровне всего организма. Так, гемоглобины переносят кислород, ХХХ — энергосодержащие молекулы АТФ, иммуноглобулины участвуют в иммунной защите. Для диагностики болезни используются белки-маркеры, а для лечения подбираются синтетические соединения — лекарства, селективно блокирующие белки-мишени. Данный обзор не претендует на полноту. Скорее мы хотели бы дать ощущение широты области, называемой протеомикой.

Характеризация белков

Программа по изучению протеома и сейчас находится в стадии накопления информации. Первоначальной стадией этой программы являются "характеризация белков" и аннотация генома. Одного кода ДНК недостаточно, поскольку связь между генами и кодируемыми протеинами опосредована сплайсингом М-РНК [129, 130] и посттрансляционными модификациями (РТМ) [131]. Сегодня известно более 200 типов РТМ [132], и их характеристика для конкретных белков может занять еще как минимум десятилетие. Задача обнаружения и характеристики самих белков осложнена и сильным различием в уровне экспрессии.

Функциональный протеом

"Функциональный протеом" (functional proteomics) нацелен на связь между генами и протеинами и на понимание функций белков. В понятие функции включается (но не ограничивается) назначение белка, его соотношение с геном и знание участников сети (functional network) белковых взаимодействий [133]. Функции не известны как минимум для трети аннотированных белков [134]. Функции белков можно, например, распознать по изменению их экспрессии при блокаде какого-либо гена. Такие эксперименты удобно ставить на бактерии кишечной палочки (*E.coli*) — полигоне геномной инженерии. Для понимания функций белков у эукариотов (высших организмов) используют нокаут генов (gene knock out) в мышах. Целый ряд белков работает в виде комплексов (например, сплайсозомы). Выделение и анализ каждого компонента из комплексов дают прямой ответ о назначении и "соучастниках" данного белка. Для распознавания сети взаимодействий протеинов (protein network) используют реакцию иммунной преципитации белков или осаждение на белок-наживку (protein bait), выделенный или экспрессированный. Исследование парных взаимодействий и цепочек взаимодействий, вероятно, позволит восстановить картину всей сети взаимодействий и построить динамическую модель взаимодействий. В последнее время для определения

функций белков все более эффективными становятся протеиновые чипы, когда протеины из анализируемой смеси селективно осаждаются на элементах чипа с иммобилизованными протеинами-лигандами [135].

Структурный протеом

"Структурный протеом" (structural proteomics) включает определение места расположения белков в клетке и отдельных тканях, определение структурных комплексов белков, характерных для отдельных органелл, и трехмерное картирование клетки [136]. Для белкового картирования клетки выделяют отдельные органеллы клеток и белковые комплексы [137].

Посттрансляционные модификации (ПТМ)

Исследование "посттрансляционных модификаций", таких как гликозилирование и фосфорилирование, позволяет проследить передачу сигналов в живой клетке или организме (*in vivo*). Выработан ряд методов выделения субпротеома, содержащего только фосфорилированные пептиды. Например, разработана методика химической замены фосфорной группы на биотин — стандартный лиганд для биотехнологической иммунной очистки на авидиновом сорбенте [138]. Это позволяет проводить ферментативный гидролиз всего лизата клетки с последующим вылавливанием только фосфо-пептидов, одновременно достигающий существенного обогащения из большого объема пробы. Для такой концентрированной и упрощенной под-выборки протеома применим прямой (ЖХ-МС-МС)-анализ с однократным хроматографическим разделением. (МС-МС)-анализ зачастую позволяет выявить место (аминокислоту в последовательности пептида) присоединения фосфатного остатка. Для экспрессного определения фосфорилированных пептидов применяются (МС-МС)-методы сканирования по массе родительских ионов при фиксированной массе фрагментов $m/z = 79$ для PO_3 -группы, $m/z = 69$ для фрагментов фосфосерина и $m/z = 83$ для фрагментов фосфотреонина [139, 140].

Поиск белков-мишеней

Направление "поиск белков-мишеней" (proteome mining) ориентировано на задачи фармацевтики. Сегодня известно более 200 белков-мишеней, дезактивируя которые можно лечить определенные болезни. Для дезактивации каждой "мишени" подбирают лекарственные препараты, заменяющие недостающий клеточный лиганд и связывающие "мишень" селективно и с минимальной токсичностью, т. е. прежде всего не связывающие

другие белки в организме. Для многих болезней такие белки только ищут. Стратегии поиска включают выявление критических узлов и цепочек в сети белковых взаимодействий. Проводится дифференциальное изучение (differential display) белковой экспрессии (т. е. количественных различий в концентрации отдельных белков) между нормой и патологией или же ищутся отличия, вызванные введением стимуляторов, гормонов или лекарств.

В фармацевтике применяются и более массовые, конвейерные способы выявления белков-мишеней. В случае если лиганд известен, то его иммобилизуют (например, на сорбенте) и используют как наживку для вылавливания белков-мишеней из экстрактов тканей и клеток [141]. Селективно связанный материал смывают в жестких средах и анализируют с помощью масс-спектрометрии, чаще используя гидролиз и ЖХ-МС-МС пептидов. В качестве лигандов применяются и фармацевтические препараты (т. е. маленькие молекулы), заведомо обладающие активностью или терапевтическим эффектом. Селективно связанные белки представляют как потенциальные мишени (требующие дальнейших исследований и подтверждений), так и данные о токсичности, т. е. о нежелательных взаимодействиях.

Профили белковой экспрессии

Определение профилей белковой экспрессии (protein expression profiling) основано на анализе матричной РНК (м-РНК) для изучения первичной последовательности белков, места положения и времени экспрессии белков. Анализ м-РНК значительно более скоростной и чувствительный (по сравнению с анализом белков), поскольку проводится с умножением материала методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) и с использованием многоканальных секвенаторов или чипов [142]. Расшифрованные последовательности м-РНК составляют EST-базы (Expression Sequence Tag) данных. Поскольку белок транслируется на м-РНК (синтезируется из аминокислот с кодированием одной аминокислоты каждой тройкой нуклеотидов), то данные об м-РНК чрезвычайно полезны. Однако практически мгновенно протеины подвергаются посттрансляционным модификациям (ПТМ). Кроме того, наблюдается значительное различие в уровне трансляции разных белков [143].

Маркеры болезни

В программу протеомики включены и поиски "маркеров болезни". Проводятся статистические корреляции между сдвигами в концентрации белков, сравнивая большое количество образцов здоровых людей и больных определенной болезнью.

Сходные исследования проводятся и при исследовании биохимических механизмов болезней. Однако, даже не выявив механизмы, одной корреляции было бы достаточно для клинической диагностики вероятного заболевания. Особенно благоприятно проводить такие исследования на легко отделяемых раковых клетках [144]. Значительное внимание уделяется поиску маркеров в плазме крови для ранней диагностики рака или заболеваний сердца [111, 145].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых лекарств, разработка новых методов лечения и диагностики болезней объединены в рамках биотехнологии или так называемой науки о жизни — life science. В большинстве биотехнологических приложений исходные смеси содержат чрезвычайно большое число компонент (до 10^6) в большом динамическом диапазоне концентраций. Благодаря многостадийному обогащению и разделению удастся уменьшить сложность смесей для успешного анализа методами tandem mass spectrometry, ставшей незаменимым инструментом. С расширением областей применения сегодняшние возможности MS-MS — фемтомольная чувствительность, способность идентифицировать тысячи компонент при скорости анализа 1 (MS-MS)-спектр в секунду — оказываются недостаточными. Ожидается, что запросы биотехнологии приведут к значительному изменению приборов в ближайшее десятилетие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Futrell J.H., Miller C.D.* // Rev. Sci. Instrum. 1966. V. 37. P. 1521.
2. *Futrell J.H.* Development of tandem mass spectrometry: one perspective // Int. J. of Mass Spectrom. 2000. V. 200. P. 495–508.
3. *Tandem Mass Spectrometry* / Ed. McLafferty F.W. NY, John Wiley & Sons, 1983.
4. *McLafferty F.W., Todd P.J., McGilvery D.C., Baldwin M.A.* High resolution tandem mass spectrometer (MS-MS) of increased sensitivity and mass range // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 3360–3363.
5. *Beynon J.H., Cooks R.G., Amy J.W. et al.* Design and Performance of a mass analyzed ion kinetic energy spectrometer // Anal. Chem. 1973. V. 45. P. 1023A–1027A.
6. *Futrell J.H.* Interactions Between Ions and Molecules / Ed. Ausloos P. Plenum: New York, 1975.
7. *Yost R.A., Enke C.G.* Selected Ion fragmentation with a quadrupole mass spectrometer // J. Am. Chem. Soc. 1978. V. 100. P. 2274–2275.
8. *Werlihy W.C., Royal N.J., Bieamann K. et al.* Mass Spectra of partial protein hydrolysates as a multiple check for long polypeptides deduced from DNA sequences: NH₂ –terminal segment of alanine tRNA synthetase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 6531–6535.
9. *Aebersold R. and Mann M.* Mass spectrometry-based proteomics // Nature. 2003. V. 422. P. 198–207.
10. *Macfarlane R.D., Torgerson D.F., Chung K. et al.* // Cyclotron Institute Progress Report. Texas A&M University, 1973–1974. P. 78–80.
11. *Macfarlane R.D., Torgerson D.F.* // Science. 1976. V. 191. P. 920.
12. *Танцырев Г.Д., Разников В.В.* // ДАН. 1964. Т. 159. С. 182.
13. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Techniques and Applications* / Eds.: Vestal M.L., Yergey A.L., Edmonds C.G., Lewis I.A.S. NY.: Plenum Press, 1990. 316 p.
14. *Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N.* Fast Atom Bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry // Nature. 1981. V. 293. P. 270–275.
15. *Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N.* Fast Atom Bombardment (F.A.B.): A new ion source in mass spectrometry // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1981. N 7. P. 325–327.
16. *Caprioli R.M., Fan T., Cottrell J.S.* Continuous-flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrometry // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 2949–2954.
17. *Iribarne J.V., Dziedzic P.J. and Thomson B.A.* Atmospheric Pressure Ion Evaporation Mass Spectrometry // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1983. V. 50. P. 331–347.
18. *Johnson O.N., Yost R.A.* Tandem mass spectrometry for trace analysis // Anal. Chem. 1985. V. 57. P. 758A–768A.
19. *Hunt D.F., Yates J.R., Shabanowitz J., Winston S. and Hauer C.R.* Protein sequencing by tandem mass spectrometry // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 6233–6237.
20. *Александров М.Л., Галь Л.Н., Краснов Н.В. и др.* Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении — новый способ масс-спектрометрического анализа биоорганических веществ // ДАН. 1984. Т. 277, № 2. С. 379–383.
21. *Александров М.Л., Галь Л.Н., Краснов Н.В. и др.* Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10, № 5. С. 710–712.
22. *Александров М.Л., Галь Л.Н., Краснов Н.В. и др.* Метод масс-спектрометрического анализа труднолетучих термически нестабильных веществ, основанный на экстракции ионов из

- раствора при атмосферном давлении // ЖАХ. 1985. Т. 40, № 6. С. 160–172.
23. *Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M. and Fenn J.B.* Electrospray Interface for liquid chromatographs and mass spectrometers // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. P. 675–679.
 24. *Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. and Whitehouse C.M.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // *Science.* 1989. V. 246. P. 64–71.
 25. *Tanaka K., Waki H., Ido Y. et al.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988. N 2. P. 151.
 26. *Karas M. and Hillenkamp F.* Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 2299–2301.
 27. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications* / Ed. Cole R.B. NY.: Wiley, 1997.
 28. *Mass spectrometry in the Biological Sciences* / Eds. Burlingame A.L., Carr S.A. NY.: Human Press.
 29. *Burlingame A. L., Boyd R.K. and Gaskell S.J.* Mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 647R–716R.
 30. *Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R. and Jaeger E.* Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992. N 6. P. 105–108.
 31. *Kaufmann R., Chaurand P., Kirsch D. and Spengler B.* Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs? // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. N 10. P. 1199–1208.
 32. *Covey T.R., Lee E.D., Henion J.D.* High Speed Liquid chromatography/tandem/mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. P. 2453–2460.
 33. *Bruins A.P., Covey T.R., Henion J.D.* Ion Spray Interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 2642–2646.
 34. *Lee M.S.* LC/MS applications in Drug Development // J. Wiley Interscience. NY., 2002.
 35. *Emmett M.R., Caprioli R.M.* Microelectrospray mass spectrometry: ultra high sensitivity analysis of peptides and proteins // *JASMS.* 1994. N 5. P. 605–613.
 36. *Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V. et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1996. V. 93. P. 14440–14445.
 37. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. and Mann M.* Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 850–858.
 38. *Edman P.* A method for the determination of the amino acid sequence of peptides // *Arch. Biochem. Biophys.* 1949. V. 22. P. 475–483.
 39. *Hunt D.F., Zhu N.Z., Shbanovich J.* Oligopeptide sequence analysis by collision activated disassociation of multiply charged ions // *Rapid Comm Mass Spectrom.* 1989. V. 3, N 4. P. 122–124.
 40. *Covey T.R., Huang E.C., Henion J.D.* Structural Characterization of protein tryptic peptides via liquid chromatography/mass spectrometry and collision induced dissociation of their doubly charged molecular ions // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1193–1200.
 41. *Yates J.R., Yates III., Speicher S., Griffin P.R., Hunkapiller T.* Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification // *Anal. Biochem.* 1993. V. 214. P. 397–408.
 42. *Yates J.R., Yates III.* Mass spectrometry and the age of the proteome // *J. Mass Spectrom.* 1998. V. 33. P. 1–19.
 43. *Pappin D.D., Hojrup P. and Bleasby A.J.* Rapid identification of proteins by peptide-mass finger printing // *Curr. Biol.* 1993. N 3. P. 327–332.
 44. *Mann M., Hojrup P. and Roepstorff P.* Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases // *Biol. Mass Spectrom.* 1993. V. 22. P. 338–345.
 45. *Vestal M.L., Juhasz P., Martin S.A.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995. N 9. P. 1044.
 46. *Juhasz P., Vestal M.L., Martin S.* Optimization Strategies in Delayed Extraction MALDI TOF // Extended abstract of ASMS conference 1997 (www.asms.org).
 47. *Loboda A.V., Krutchinsky A.N., Bromirski M. et al.* A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. N 14. P. 1047–1057.
 48. *Verentchikov A., Smirnov I. and Vestal M.L.* Collisional Cooling and Ion Formation Processes in orthogonal MALDI at Intermediate Gas Pressure // Extended abstract of ASMS conference 1999 (www.asms.org).
 49. *Smirnov I., Haff L., Vetsal M.L. and Verentchikov A.N.* Orthogonal MALDI in the Analysis of proteins and DNA // Extended abstract of ASMS conference 1999 (www.asms.org).
 50. www.appliedbiosystems.com
 51. *Miller P.E., Denton M.B.* The quadrupole mass filter: basic operating concepts // *J. Chem.* 1986. V. 63. P. 617–622.
 52. *Douglas D.J., French J.B.* // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992. N 3. P. 398.
 53. *Carr S.A., Huddleston M.J. and Annan R.S.* Se-

- lective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239. P. 180–192.
54. *Wilm M. and Mann M.* Analytical properties of the nanoelectrospray ion source // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 1–8.
55. *Morris H.R., Paxton T., Dell A. et al.* High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal- acceleration time-of-flight mass spectrometer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. N 10. P. 889–896.
56. *Morris H.R., Paxton T., Panico M. et al.* A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF for low-femtomole/attomole- range biopolymer sequencing // *J. Protein Chem.* 1997. N 16. P. 469–479.
57. *Shevchenko A., Chernushevich I., Ens W. et al.* Rapid "de novo" peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997. N 11. P. 1015–1024.
58. *March R.E., Hughes R.J.* Quadrupole storage mass spectrometry. NY.: Wiley-Interscience, 1989.
59. www.thermofinnigan.com
60. *Cooks R.G., Glish G.L., McLuckey S.A. and Kaiser E.R.* Ion trap mass spectrometry // *Chem. Eng. Newsl.* 1991. N 25. P. 26–41.
61. *Yates J.R., Yates III., McCormack A.L. et al.* Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry // *J. Protein Chem.* 1997. N 16. P. 495–497.
62. *Marshall A.G., Hendrickson C.L. and Jackson G.S.* Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer // *Mass Spectrom. Rev.* 1998. N 17. P. 1–35.
63. *Smith R.D., Pasa-Tolic L., Lipton M.S. et al.* Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Electrophoresis.* 2001. N 22. P. 1652–1668.
64. *Senko M.W., Hendrickson C.L., Pasa-Tolic L. et al.* // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1996. V. 10. P. 1824–1828.
65. *Horning S., Malek R., Wieghaus A., et al.* A Hybrid two-Dimensional Quadrupole Ion Trap—Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometer: Accurate Mass and High Resolution at a Chromatography Timescale // Extended abstract on ASMS conference 2003 (www.asms.org)
66. *Conrads T.P., Anderson G.A., Veenstra T.D. et al.* // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 3349.
67. *Smith R.D., Anderson G.A., Lipton M.S. et al.* // *Proteomics.* 2002. N 2. P. 513.
68. *Strittmatter E.F., Ferguson P.L., Tang K. and Smith R.D.* Proteome Analyses Using Accurate Mass and Elution Time Peptide Tags with Capillary LC Time-of-Flight Mass Spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003. N 14. P. 980–991.
69. *Vestal M.L.* Time-of-flight mass spectrometry analysis of biomolecules. US Patent 6541765, Filed 1998.
70. *Vestal M.L.* The future of time of-flight mass spectrometry // Extended abstract on ASMS 2002, ThOF 3:40 (www.asms.org).
71. www.bruker.com
72. *Cornish T.J., Cotter R.J.* High-order kinetic energy focusing in the end cup reflectron time-of-flight mass spectrometer // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 4615–4618.
73. *Pramanik B.N., Bartner P.L., Chen G.* The role of mass spectrometry in drug discovery process // *Current Opinion in Drug Discovery.* 1999. N 2. P. 401–417.
74. *Applied Electrospray Mass Spectrometry* / Eds. Pramanik B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. NY.: Marcel Dekker, 2001.
75. *Banerjee P.K., Rosofsky M.* Drug discovery: the quest for innovation and productivity // *Scrip Magazine.* November 1997. P. 35–38.
76. *Taylor L.C.E., Johnson R.L., Raso R.* Open-access atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for routine sample analysis // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995. N 6. P. 387–393.
77. *Gallop M.A., Barrett R.W., Dower W.J., Fodor S.P., Gordon E.M.* Application of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 1233–1251.
78. *Gordon E.M., Barrett R.W., Dower W.J. et al.* Application of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screenings strategies, and future directions // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 1385–1401.
79. *Davis R.G., Anderegg R.G., Blanchard S.J.* Iterative size-exclusion chromatography coupled with liquid chromatographic mass spectrometry to enrich and identify tight binding ligands from complex mixtures // *Tetrahedron.* 1999. V. 55. P. 1653–1667.
80. *Enjabal C., Martinez J., Aubagnac J.L.* Mass Spectrometry in Combinatorial Chemistry // *Mass Spectrom. Rev.* 2000. N 19. P. 139–161.
81. *Susmith R.D., Yang G.* Impact of mass spectrometry on combinatorial chemistry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 725. P. 49–65.
82. *Zeng L., Kussel D.B.* Developments of fully automated parallel HPLC mass spectrometry system for the analytical characterization and preparative purification of combinatorial libraries // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 4380–4388.
83. *Davis M.T. and Lee T.D.* Rapid protein identification using a microscale electrospray LC/MS

- system on an ion trap mass spectrometer // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998. N 9. P. 194–201.
84. *Van Breeman R.B., Huang C.R., Nikolic D. et al.* Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2159–2164.
 85. *Blom K.F., Combs A.P., Rockwell A.L. et al.* Direct mass spectrometry determination of bead bound compounds in a combinatorial lead discovery application // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998. N 12. P. 1192–1198.
 86. *Pullen F.S., Kerkins G.L., Barton K.I. et al.* Putting mass spectrometry in the hands of the end user // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995. N 6. P. 394–399.
 87. *Lane S.J., Pipe A.* A single generic microbore liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry solution for the simultaneous accurate mass determination of compounds on single beads, the decoding of dansylated orthogonal tags pertaining to compounds and accurate isotopic difference target analysis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999. N 13. P. 798–814.
 88. *Fang A.S., Vouros P., Stacey C.C. et al.* Rapid characterization of combinatorial libraries using electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 1998. N 1. P. 23–33.
 89. *Fitch W.L.* Analytical Methods for quality control of combinatorial libraries // *Mol. Divers.* 1998/1999. N 4. P. 39–45.
 90. *Zeng L., Burton L., Young K., Shushan B., Kussel D.B.* Automated analytical-preparative HPLC mass spectrometry system for rapid characterization and purification of combinatorial libraries // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 794. P. 3–13.
 91. www.waters.com
 92. *De Biasi V., Haskins N., Organ A. et al.* High throughput liquid chromatography – mass spectrometric analyses using a novel multiplexed electrospray interface // *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* 1999. N 12. P. 1165–1168.
 93. *Wang T., Zheng L., Strader T. et al.* A new ultra-high throughput method for characterizing combinatorial libraries incorporating a multiple probe autosampler coupled with flow injection mass spectrometry analysis // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1998. N 12. P. 1123–1129.
 94. *Tong H., Bell D., Keiko T., Siegal M.M.* Automated data massaging and e-mailing for high throughput open access mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1990. N 10. P. 1174–1187.
 95. *Huang N., Siegel M.M., Kruppa G.H., Laukien F.H.* Automation of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for acquisition, analysis, and e-mailing of high resolution exact mass electrospray ionization mass spectral data // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999. N 10. P. 1166–1173.
 96. *Richmond R., Gorlach E., Seifert J.M.* High throughput flow injection analysis mass spectrometry with networked delivery of colour rendered results: the characterization of liquid chromatography fractions // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 835. P. 29–39.
 97. *Kyranos J.N., Hogan J.C.* High Throughput characterization of combinatorial libraries generated by parallel synthesis // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 389A–395A.
 98. *Weller H.N., Young M.G., Michalczyk S.J. et al.* High throughput analysis and purification in support of automated parallel synthesis // *Mol. Divers.* 1997. N 3. P. 61–70.
 99. *Weller H.N.* Purification of combinatorial libraries // *Mol. Divers.* 1998/1999. N 4. P. 47–52.
 100. *Korfmacher W.A., Palmer C.A., Nardo C. et al.* Development of an automated mass spectrometry system for the quantitative analysis of liver microsomal incubation samples: a tool for rapid screening of new compounds for metabolic stability // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1999. N 13. P. 901–907.
 101. *Olah T.V., McLoughlin D.A., Gilbert J.D.* The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1997. N 11. P. 17–23.
 102. *Beaudry F., Yves J.C., Le Blanc, Coutu M., Brown N.K.* In vivo pharmacokinetic screening in cassette dosing experiments: the use of on-line prospect (R) liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry technology in drug discovery // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1998. N 12. P. 1216–1222.
 103. *Perchalski R.J., Yost R.A., Wilder B.J.* Structural Elucidation of drug metabolism by triple quadrupole mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1982. V. 54. P. 1466–1471.
 104. *Corthals G.L., Wasinger V.C., Hochstrasser D.F. and Sanchez J.C.* The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research // *Electrophoresis.* 2000. N 21. P. 1104–1115.
 105. *Dunham I., Shimizu N., Roe B.A. et al.* The DNA sequence of human chromosome 22 // *Nature.* 1999. V. 402. P. 489–495.
 106. *Broder S. and Venter J.C.* Sequencing the entire genomes of free-living organisms: the foundation of pharmacology in the new millennium // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000. V. 40. P. 97–132.
 107. *Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al.* The sequence of the human genome // *Science.* 2001. V. 291. P. 1304–1351.

108. *O'Farrell P.H.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. P. 4007–4021.
109. *Anderson N.G. and Anderson N.L.* Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future // *Electrophoresis*. 1996. N 17. P. 443–453.
110. *Appel R.D., Bairoch A. and Hochstrasser D.F.* 2-D databases on the World Wide Web // *Methods Mol. Biol.* 1999. V. 112. P. 383–391.
111. *Dunn M.J.* Studying heart disease using the proteomic approach // *Drug Discov. Today*. 2000. N 5. P. 76–84.
112. *Scheler C., Li X.P., Salnikow J. et al.* Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts // *Electrophoresis*. 1999. N 20. P. 3623–3628.
113. *Zhang W., Czernik A.J., Yungwirth T. et al.* Matrix-assisted laser desorption mass spectrometric peptide mapping of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis: determination of phosphorylation in synapsin // *J. Protein Sci.* N 3. P. 677–686.
114. *Jensen O.N., Podtelejnikov A.V. and Mann M.* Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 4741–4750.
115. *Zhang W., Chait B.T.* ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 2482–2489.
116. *Krutchinski A.N., Zhang W. and Chait B.T.* Rapidly switchable matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry for protein identification // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000. N 11. P. 493–504.
117. *Griffin T.J., Gygi S.P., Rist B. et al.* Quantitative proteomic analysis using a MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometer // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 978–986.
118. *Mann M. and Wilm M.* Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 4390–4399.
119. *Sunyaev S., Liska A.J., Golod A. et al.* MultiTag: Multiple Error tolerant sequence tag search for the sequence similarity identification of proteins by mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 1307–1315.
120. *Opiteck G.J., Lewis K.C., Jorgenson J.W. and Anderegg R.J.* Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 1518–1524.
121. *Gygi S.P., Gorthals G.L., Zhang Y. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 9390.
122. *Peng J., Gygi S.P.* Proteomics: the move to mixtures // *J. Mass Spectrom.* 2001. N 36. P. 1083–1091.
123. *Deterding L.J., Moseley M.A., Tomer K.B. and Jorgenson J.W.* Nanoscale separations combined with tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr.* 1991. V. 554. P. 73–82.
124. *Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T. et al.* Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry // *Nature*. 1996. V. 379. P. 466–469.
125. *Hunt D.F., Henderson R.A., Shabanowitz J. et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry // *Science*. 1992. V. 255. P. 1261–1263.
126. *Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A. et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope coded affinity tags // *Nat. Biotechnol.* 1999. N 17. P. 994–999.
127. *Smolka M.B., Zhou H., Purkayastha S. and Aebersold R.* Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis // *Anal. Biochem.* 2001. V. 297. P. 25–31.
128. *Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. et al.* Life with 6000 genes // *Science*. 1996. V. 274. P. 546, 563–567.
129. *Newman A.* RNA splicing // *Curr. Biol.* 1998. N 8. P. R903–R905.
130. *Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R. and Aebersold R.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast // *Mol. Cell. Biol.* 1999. N 19. P. 1720–1730.
131. *Eisenberg D., Marcotte E.M., Xenarios I. and Yeates T.O.* Protein function in the post-genomic era // *Nature*. 2000. V. 405. P. 823–826.
132. *Krishna R.G. and Wold F.* Post-translational modification of proteins // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1993. V. 67. P. 265–298.
133. *Pandey A. and Mann M.* Proteomics to study genes and genomes // *Nature*. 2000. V. 405. P. 837–846.
134. *Eisenstein E., Gilliland G.L., Herzberg O. et al.* Biological function made crystal clear — annotation of hypothetical proteins via structural genomics // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000. N 11. P. 25–30.
135. *MacBeath G. and Schreiber S.L.* Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination // *Science*. 2000. V. 289. P. 1760–1763.
136. *Blackstock W.P. and Weir M.P.* Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins // *Trends Biotechnol.* 1999. N 17. P. 121–127.
137. *Jung E., Heller M., Sanchez J.C. and Hochstrasser D.F.* Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes // *Electro-*

- phoresis. 2000. N 21. P. 3369–3377.
138. Oda Y., Nagasu T., Chait B.T. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome // *Nat. Biotechnol.* 2001. N 19. P. 379–382.
 139. Neubauer G. and Mann M. Mapping of phosphorylation sites of gel-isolated proteins by nano electrospray tandem mass spectrometry: potentials and limitations // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 235–242.
 140. Goshe M.B., Conrads T.P., Panisko E.A. et al. Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 2578–2586.
 141. Graves P.R. and Haystead T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics // *Microbiology Mol. Biology Rev.* March 2002. P. 39–63.
 142. Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Science*. 1995. V. 270. P. 467–470.
 143. Haynes P.A. and Yates III. Proteome profiling—pitfalls and progress // *Yeast*. 2000. N 17. P. 81–87.
 144. Celis J.E., Ostergaard M., Rasmussen H.H. et al. A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer // *Electrophoresis*. 1999. N 20. P. 300–309; <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>
 145. Heinke M.Y., Wheeler C.H., Yan J.X. et al. Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure // *Electrophoresis*. 1999. N 20. P. 2086–2093.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 7.04.2004.

TANDEM MASS SPECTROMETRY IN BIOCHEMISTRY

A. N. Verenchikov, N. V. Krasnov, L. N. Gall

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The work presents a brief historical review of tandem mass spectrometry (MS-MS), indicating a vast progress in the field during the last decade. Instrumentation aspects are touched while describing basic principles of operation as well as analytical characteristics of the most popular tandems. Various applications of MS-MS in the field of life science are overviewed, including drug discovery and proteomics. The review is mostly concerned with the logics of the field evolution and a mutual relation between instrumentation and applications. Recent advances in tandem mass spectrometry as well as revolutionary leap in bioinformatics has made MS-MS the most specific and the most sensitive tool and a tool of choice for biochemical analysis. In return, life science became the major customer and a very noticeable driving force in the instrumentation development. The review highlights the fact that life science deals with very complex mixtures containing up to 10^6 components in a wide dynamic range of concentrations, up to 10^6 . The nature of biochemical problems requires even higher sensitivity, specificity and throughput of MS-MS, and its compatibility with a wide range of separation tools, which is likely to cause further dramatic changes in MS-MS instrumentation.