ДЕВЯТЫЙ СЪЕЗД ВМСО
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В НАУКАХ О ЖИЗНИ

УДК 621.384.8
ВАК 02.00.02

Борисов Р.С., к.х.н., **Заикин В.Г.**, д.х.н., ИНХС РАН, **Клычников О.И.**, к.б.н., **Лебедев А.Т.**, д.х.н., МГУ им. М.В.Ломоносова, **Пронин В.Б.**, ООО "Компания Хеликон", **Сысоев А.А.**, д.ф.-м.н., НИЯУ МИФИ

С 14 по 18 октября 2019 г. в Москве проходил IX съезд Всероссийского масс-спектрометрического общества (ВМСО), в рамках которого была проведена VIII Всероссийская конференция с международным участием "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы". Это мероприятие осуществлено под эгидой ВМСО, а также Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН) и Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН (ИНХС РАН). Были зарегистрированы 190 делегатов и участников, представляющих около 450 членов Всероссийского масс-спектрометрического общества, а также ученые из США, Словении, Чешской республики, Швейцарии, Колумбии, Китая, Казахстана и Украины.

Генеральными спонсорами проведения съезда и конференции выступили "МС-Аналитика", "Брукер", "Компания Хеликон", а также Министерство науки и высшего образования РФ. Новейшие инструментальные решения и разработки в области масс-спектрометрии представили компании "Неолаб", НКЦ "Лабтест", "Мерк", "ЛЕКО ЦЕНТР-М".

Работа конференции проходила в шести секциях: органическая масс-спектрометрия, масс-спектрометрия в метаболомике и протеомике, изотопная, неорганическая и элементная масс-спектрометрия, аналитическая масс-спектрометрия, приборостроение, масс-спектрометрия в медицине и биологии. Однако, независимо от названия секции, значительная часть докладов касалась применения масс-спектрометрии в науках о жизни: биологии, экологии и медицине. Это неудивительно: наукам о жизни уделяется все большее внимание во всем мире. В России Указом Президента № 899 от 7.07.2001 они были внесены в список приоритетных направлений развития науки, технологий и техники, а биосинтетические, биомедицинские, геномные, протеомные и постгеномные технологии – в перечень критических технологий РФ.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ПРОТЕОМИКЕ

Термин "протеом" был введен в середине 1990-х годов для описания полного комплекса белков, который экспрессируется или может быть экспрессирован клеткой, тканью или организмом. Несколько лет спустя появилось понятие "протеомика" – область науки, занимающейся идентификацией белков протеома и их количественным анализом. Первые работы в этой области включали секвенирование и 2D гель-электрофорез. Развитие новых технологий в масс-спектрометрии – матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) и ионизации электрораспылением (ИЭР) – позволили исследованиям выйти на новый, высокопроизводительный уровень. Появившиеся затем методы маркировки стабильных изотопов, такие как SILAC (маркировка стабильных изотопов аминокислотами в клеточной культуре) и введение изобарических меток iTRAQ и TMT, сделали процесс комплексным и улучшили количественную оценку.

В подавляющем большинстве исследований для установления протеома используют информационно-зависимый вариант сбора данных (DDA) методом "снизу-вверх". Образец протеома расщепляется трипсином или другими ферментами на более мелкие пептиды, затем ионизируется и анализируется с помощью тандемной масс-спектрометрии, при этом для фрагментации берутся только сигналы тех пептидов, которые превышают уровень шума в масс-спектре полного сканирования. Полученные МС-МС-спектры сопоставляют со спектрами в базе данных. Несмотря на успехи, достигнутые применением этого метода, существует элемент случайности при отборе пептидов для дальнейшей фрагментации, а также риск пропустить пептиды с низким уровнем сигнала, но важной биологической функцией.

Для определения конкретных интересующих белков используют метод целевой протеомики, в частности, метод мониторинга выбранных реакций (SRM), обладающий очень высокой чувствительностью.

Сьюзан Вейнтрауб (Susan Weintraub), директор лаборатории масс-спектрометрии университета Сан-Антонио, США, на протяжении нескольких лет возглав-

DOI: 10.32757/2619-0923.2020.1.11.70.78

Табл.1. *Сравнительная характеристика информационно-зависимого, информационно-независимого и целевого анализа [1]*

	Информационно-независимый анализ	Информационно-зависимый анализ	Целевой анализ (SRM или PRM)
Простота сбора данных	** Просто. Требуется определить диапазон масс, ширину окна прекурсоров и число MC2 сканов в цикле	*** Очень просто, в настройках большинства масс-спектрометров	* Очень сложно, требуется сгенерировать и оптимизировать метод для каждого пептида
Простота анализа	* В настоящий момент очень сложно, требуются сложные программы и большое число информационных ресурсов	*** В настоящий момент наиболее просто, существует множество методов	** Несложно, разработан ряд программных продуктов для ручного и автоматического анализа
Полнота охвата пептидов и белков/ мультиплексность	*** Количественно определяется 10 000 пептидов за один вкол	*** Количественно определяется 10 000 пептидов за один вкол	* Количественно определяется 10–100 пептидов за один вкол
Селективность/ чувствительность	** 4 порядка	** 4 порядка	*** 4–5 порядков
Воспроизводимость	*** Высокая благодаря пептид-сфокусированному скоринговому анализу	* Низкая из-за стохастического выбора образцов	*** Высокая благодаря целевому выбору данных
Ретроспективная обработка	*** Возможна на уровнях MC1 и MC2	** Возможна только на уровне MC1	* Невозможна

*, **, *** – степень выраженности

лявшая Американское общество масс-спектрометристов (ASMS), рассказала о новом подходе в протеомике – информационно-независимом анализе протеома (DIA), сочетающем преимущества DDA и SRM (табл.1) [1]. В этом методе фрагментируют все пептиды в диапазоне 500–900 m/z. Для этого интервал 500–900 m/z разбивают на небольшие пересекающиеся участки около 20 m/z, и все пептиды, попавшие в него, подвергают фрагментации. Получающиеся спектры сложны для анализа, поскольку нет прямой связи между ионом-предшественником и ионами-фрагментами, однако новое программное обеспечение, например, OpenSWATH, Spectronaut Pulsar, SWATH 2.0, DIA-Umpire, DISCO, а также увеличенная скорость сканирования современных масс-спектрометров, таких как Q Exactive HF-X, делают возможным решение этой задачи. Благодаря новому подходу качественный и количественный анализ 5–6 тысяч белков в образце можно проводить даже без предварительного гель-электрофореза. На примере собственных исследований С.Вейнтрауб продемонстрировала основные принципы и преимущества информационно-независимого варианта проведения протеомных анализов.

М.В.Горшков из ИЭПХФ РАН предложил принципиально иной подход – отказ от тандемного масс-анализа, что позволяет использовать ультракороткие градиенты разделения и тем самым существенно сократить время анализа [2]. В руководимой им группе разработан новый метод анализа протеомов, названный DirectMS1, который не требует использования фрагментации, но обладает при этом высокой эффективностью. В его основе лежит реализация работы масс-спектрометра в режиме измерения только масс-спектров ионов пептидов первого уровня и использование комплементарной информации о пептидах, такой как времена хроматографического удерживания. Уникальная особенность ВЭЖХ заключается в ее специфичности к аминокислотной последовательности пептидов, которая может предоставить информацию, дополняющую данные масс-спектрометрии. Признание

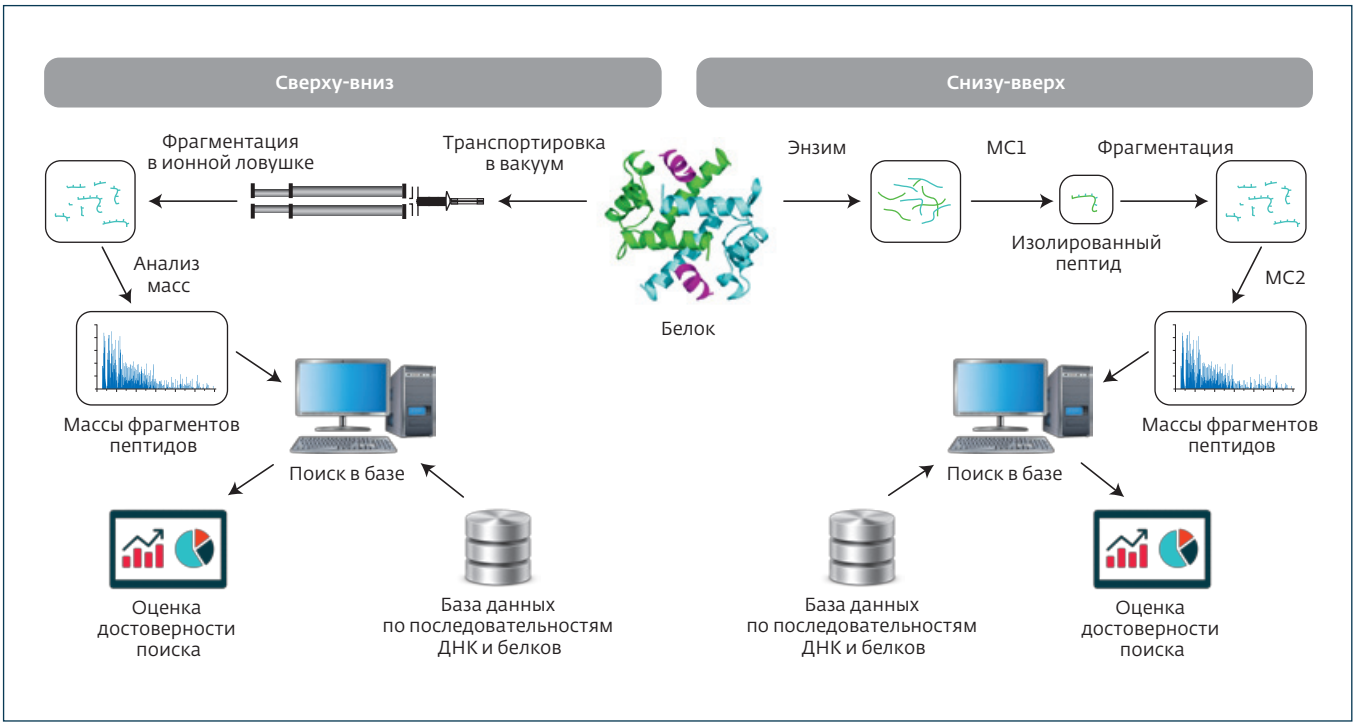

Рис.1. *Анализ протеома методами "снизу-вверх" и "сверху-вниз"*

важности этой информации для протеомики стимулировало разработку и реализацию вычислительных и теоретических моделей для прогнозирования времени удержания пептида.

Результаты, полученные М.В.Горшковым с использованием алгоритма DirectMS1, превосходят эффективность стандартного протеомного анализа на основе МС-МС по всем параметрам, включая количество идентифицированных белков, чувствительность и точность количественных измерений. Так, при работе масс-анализатора Orbitrap в режиме измерения только масс-спектров первого уровня и 5-минутных градиентов ВЭЖХ было идентифицировано более 1000 белков клеточной линии HeLa. Количество загружаемой для анализа смеси варьировалось от 1 до 500 нг, при этом чувствительность метода на порядок превосходила таковую для стандартного тандемного анализа. Сравнение точности количественных измерений относительных концентраций белков также показало существенное превосходство метода DirectMS1 благодаря более высокому покрытию последовательностей идентифицируемых белков протеома.

Кроме распространенного в протеомике метода "снизу-вверх" существует стратегия "сверху-вниз", в которой с помощью мощных детекторов сверхвысокого разрешения исследуются целые белки без предварительного ферментативного расщепления (рис.1).

Для формирования фрагментных ионов используются различные методы активации на основе соударения молекул аналитов с молекулами или атомами газов, передачи или захвата электронов, которые однако в большинстве случаев обеспечивают лишь частичное покрытие аминокислотной последовательности. В докладе К.В.Вяткиной, представляющей работу коллективов трех институтов, приведен граф-аналитический алгоритм для de novo вычисления обобщенного спектра, полученного с использованием метода ультрафиолетовой фотодиссоциации (УФФД). Его мощность заключается в более полной фрагментации белкового остова по сравнению с методами инициирования диссоциации соударением (ДАС) или захватом/переносом электрона (ДЭЗ/ДПЭ). До недавнего времени интерпретация соответствующих спектров была затруднена, поскольку при фрагментации может возникать до девяти серий ионных фрагментов. Разработанный авторами алгоритм включает de novo секвенирование белков по наборам масс-спектров "сверху-вниз", полученных при помощи метода УФФД с длинами волны 193 нм и 157 нм (доминируют a- и x-ионы) и ДЭЗ (доминируют c- и z- ионы) (рис.2). Затем выделяются группы пиков, потенциально соответствующих ионам различных типов для одного и того же фрагмента белковой молекулы, и строится обобщенный спектральный граф, на основании которого восстанавливаются

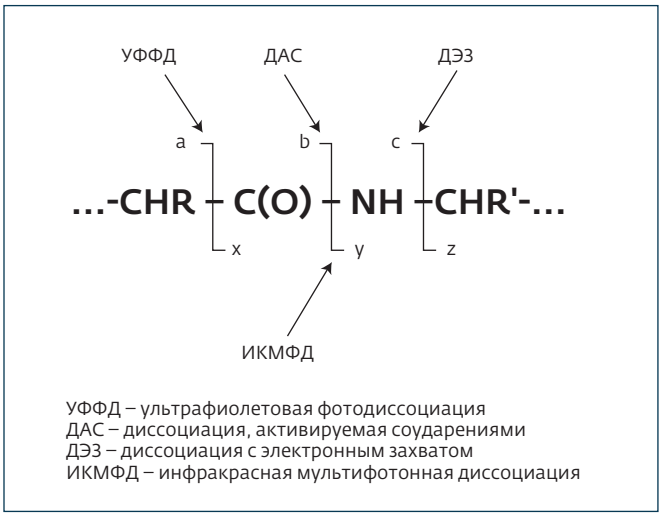

Рис.2. *Фрагментация пептида под действием различных методов ионизации*

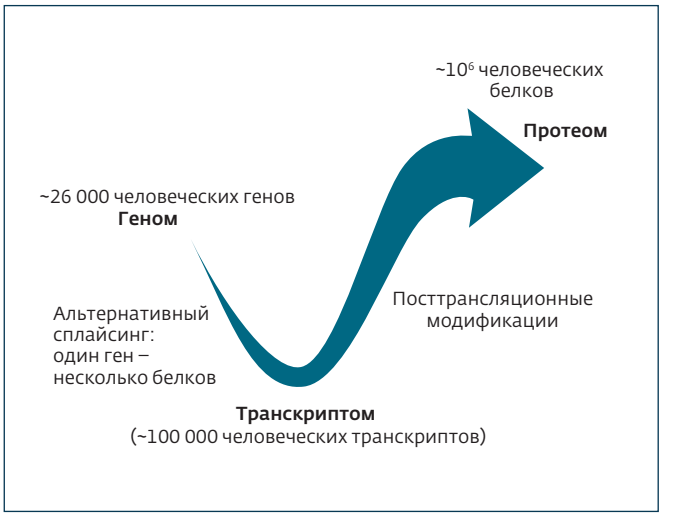

Рис.3. *Соотношение между геномом, транскриптомом и протеомом*

точные фрагменты аминокислотной последовательности исследуемого белка. На заключительном этапе заполняются "пробелы" между сгенерированными таким образом ее участками. В модельном эксперименте с использованием модифицированных приборов Thermo: Q Exactive HF и Fusion Lumos предложенный алгоритм позволил полностью восстановить последовательность убихитина и на 78% последовательность миоглобина [3]. Авторы планируют усовершенствование алгоритма для анализа модифицированных форм белков.

Благодаря развитию омиксных технологий, накоплен огромный массив масс-спектрометрических данных, обработка и анализ которых в ручном режиме становятся практически невыполнимыми. Поэтому особую актуальность в масс-спектрометрии приобретает разработка IT-технологий, помогающих накапливать, обрабатывать и обмениваться информацией.

А.А.Аксенов из Калифорнийского университета в Сан-Диего рассказал о создании открытой сети данных метаболомных исследований. По его словам, сегодня большая часть результатов, получаемых с использованием современных масс-спектрометров, остается неизвестной научному сообществу, поскольку в публикуемые статьи входит лишь малая толика результатов метаболомного, протеомного, петролеомного, экологического анализа. Алгоритмы работы с гигантскими массивами данных, которые создает современная масс-спектрометрия, пока плохо проработаны. Созданные недавно масс-спектрометрические платформы "социальных сетей" GNPS и MassBank позволяют пользователю депонировать и анализировать полученные в экспериментах сырые результаты с помощью новейших алгоритмов работы с big data. GNPS открывает доступ к постоянно обновляемым данным результатам анализов из разных лабораторий. Сеть работает с результатами ГХ/МС и ЖХ/МС-МС анализов [4]. Этой платформой в настоящее время уже пользуются более 25 000 ученых из 165 стран. Актуальность разработки такой сети подтверждается публикацией ряда статей по этому направлению в престижных мультидисциплинарных журналах группы Nature [5].

ПОСТГЕНОМНЫЕ МОДИФИКАЦИИ

Современный протеомный анализ человеческих клеток обеспечивает идентификацию более десяти тысяч белковых генных продуктов, что покрывает практически половину теоретически возможного протеома, кодируемого геномом человека. Однако синтез белка с одного гена приводит в большинстве случаев к образованию нескольких протеоформ. Их разнообразие обеспечено различной обработкой матричных РНК, например, альтернативным сплайсингом, а также изменениями, происходящими уже на белковом уровне, например, протеолитическим расщеплением и посттрансляционными модификациями (рис.3). На сегодняшний день известно более 200 вариантов посттрансляционной модификации белков, и, по всей видимости, модификациям подвергается подавляющее большинство белков, более того, один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям. В ряде случаев посттрансляционные модификации являются обязательным этапом созревания белка, в противном случае он оказывается функционально неактивным.

С.А.Мошковский (ИБМХ им. В.Н.Ореховича) рассказал о новом применении скорострельной протеомики, основанной на ВЭЖХ/МС-МС высокого разрешения, для идентификации протеоформ в головном мозге мушки-дрозофилы. Одним из интересных и слабо изученных источников образования протеоформ является редактирование РНК аденозиндезаминазами ADAR. Эти эволюционно древние ферменты существуют у большинства многоклеточных организмов и дезаминируют в РНК остатки аминозина с образованием инозина. При попадании в кодирующий участок РНК последний, как правило, играет роль гуанозина, вследствие чего РНК перекодируется, а в аминокислотную последовательность вносятся точечные замены. Эти замены, в свою очередь, могут приводить к существенным изменениям в жизнедеятельности клетки из-за функциональных изменений соответствующих белков, вовлеченных в критически важные белок-белковые и метаболические процессы. Поэтому обнаружение событий РНК редактирования на протеомном уровне – крайне интригующая и актуальная задача современной биологии и биомедицины.

Используя литературные данные о потенциально кодирующих участках редактирования РНК, авторы составили расширенную базу данных для протеомного поиска с учетом возможных протеоформ. К имеющимся в открытом доступе данным по протеомике целого организма и головы Drosophila melanogaster, а также транскриптомике был добавлен полученный ими с использованием хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения протеом головного мозга насекомого. Созданная база данных последовательностей белков использовалась авторами для идентификации отредактированных белков. Было обнаружено 68 отредактированных пептидов, принадлежащих 59 белкам, из которых восемь были общими для протеомов всего насекомого, его головы и мозга. Разработанный мультиомиксный подход позволил проанализировать также головной мозг модельных организмов, в том числе плодовой мушки, мыши и человека, и идентифицировать участки белков, отредактированные на уровне матричных РНК. Подтверждение редактирования нескольких участков РНК на белковом уровне осуществлялось при помощи мониторинга множественных выбранных реакций (МВР) на масс-спектрометрах с тройным квадруполем и с использованием изотопно-меченных стандартов. Таким образом, авторы продемонстрировали возможность определения события редактирования РНК на уровне протеома с помощью скорострельной протеомики и настраиваемой базы данных отредактированных белков [6].

Одна из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций белка в живых клетках – фосфорилирование, выполняемое киназами. Считается, что фосфорилированию подвергаются около трети белковых молекул эукариот. Учитывая распространенность и важность этого процесса, исследование белков, содержащих фосфатную группу, выделилось в отдельный раздел протеомики, называемый фосфопротеомикой. Анализу фосфопротеома мутанта по серин-треониновой протеинкиназе SpkH цианобактерии Synechocystis sp. PCC6803 был посвящен доклад О.И.Клычникова. Ученым и его коллегами была подтверждена субстратная специфичность этого фермента и ее вероятное участие в транспорте белков из клетки в периплазму и во внеклеточную среду.

ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Применению полуколичественного протеомного анализа методом ВЭЖХ/МС-МС состава цервикальной жидкости 40 женщин репродуктивного возраста с разной степенью неопластической трансформации шейки матки был посвящен доклад А.Г.Бржозовского из Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии. Филогенетическая иерархическая кластеризация и анализ методом главных компонентов полученных протеомных данных выявили распределение образцов на четыре основных кластера в зависимости от степени поражения шейки матки. Статистический анализ выявил изменение уровня 117 белков при ассоциированной трансформации эпителия шейки матки и 27 белков – при раке шейки матки. Таким образом, было продемонстрировано, что протеом цервикальной жидкости отражает стадии злокачественного процесса в эпителии шейки матки, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.

Часто применение протеомики в биологии и медицине не подразумевает расшифровку полного протеома биологической ткани, которая требует применения дорогого оборудования и достаточно длительно. Сфокусированный подход позволяет сократить время анализа и использовать более доступные инструменты. О.И.Клычников (МГУ) провел сравнительный анализ результатов исследования ограниченных протеомов с использованием масс-спектрометров высокого разрешения и машин среднего уровня разрешения, подчеркнув возможность применения данных инструментов при сфокусированном подходе. Этот подход включает предварительное фракционирование биологического материала классическими биохимическими методами с последующим разделением полученной фракции методами аналитической химии. В частности, авторы сконцентрировались на субпопуляции белков, участвующих в межклеточной сигнализации и обмене сигналами с окружающей средой. Используя среднеформатную протеомику в геле, они проанализиро-

вали секретом патогенных бактерий человека Clostridium difficile и детально охарактеризованы несколько белков: продукты генов cd2718, cd2830, cd2831. Комплексный подход, включающий как биоинформатические, так и молекулярно-биологические и биохимические исследования, позволил установить существенное значение продуктов данных генов в механизме клеточной диссеминации и возможную роль в развитии патогенеза. По мнению авторов, полученные результаты могут быть использованы при поиске новых терапевтических мишеней, а также для детального описания состояния клеток методами масс-спектрометрии [7].

ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКОЛОГИИ

Важный раздел наук о жизни – экология: изучение взаимодействия живых организмов с окружающей средой. Человеческая активность кардинальным образом меняет характер окружающей среды: исчезают леса и луга, нарушаются естественные углеродный и азотный циклы, загрязняются водные и воздушные пространства и т.д. С реализацией принятой ООН концепции устойчивого развития все более пристальное внимание уделяется экологическому мониторингу за промышленной деятельностью человека.

А.Т.Лебедев (МГУ им. М.В.Ломоносова) рассказал о современных возможностях масс-спектрометрии при проведении нецелевого анализа образцов объектов окружающей среды. Несмотря на важность задачи, это направление существенно отстает от целевого анализа. Основная сложность заключается в том, что проба может содержать до тысячи самых разнообразных соединений с диапазоном концентраций в несколько порядков. Часто имеют место суперпозиция масс-спектров, их искажение, отсутствие пиков молекулярных ионов и т.д. Эффективным подходом служит комплексное использование масс-спектрометрии высокого разрешения, тандемной газовой хроматографии и нескольких методов ионизации в дополнение к электронной.

Тандемная газовая хроматография разделяет компоненты с очень близкими хроматографическими характеристиками, что увеличивает число читаемых пиков в 3–4 раза по сравнению с одномерным спектром. Масс-спектрометрия высокого разрешения дает возможность установить правильное соединение, даже если оно находится далеко от начала библиотечного списка кандидатов, и полезна и при ручной интерпретации спектра, и для целевого поиска. В частности, отличные результаты можно получить при комплементарном использовании электронной и химической ионизации, а также ионизации при электронном захвате с регистрацией отрицательных ионов. Такой комплекс методов дает возможность регистрировать молекулярные ионы, устанавливать структуры соединений по их комплементарным масс-спектрам, повышать на два порядка чувствительность по отношению к экологически значимым полигалогенированным и нитросоединениям.

Теоретические выкладки были подкреплены большим количеством примеров анализов проб снега и дождя, собранных в Москве, Арктике, Франции и Чили на приборе GC-HRT+4D (LECO, USA) с разрешающей способностью более 25 000, оснащенном длинной неполярной и короткой среднеполярной колонками. Для идентификации использовали библиотеку масс-спектров NIST17, а также методы ручной интерпретации.

Вопросы взаимодействия экотоксикантов с живыми организмами затронул в своем докладе "Масс-спектрометрия в токсикологии окружающей среды" Марк Сьютер (Marc Suter) из Швейцарского федерального института наук и технологий о воде Eawag. Разнообразные бытовые отходы, сливы с промышленных производств, а также стоки с городских и сельскохозяйственных земель в конечном итоге попадают в природные водоемы (рис.4). Количество химических веществ, потенциально попадающих в водную среду, огромно, и их воздействие на организмы может быть очень разнообразным. Недостаток целевого анализа заключается в том, что он слеп, когда речь идет о неизвестных химических веществах и продуктах трансформации. Что еще хуже, некоторые из этих химических веществ могут быть полностью пропущены, потому что они очень полярные или ионные. Из-за уникальных свойств отдельных экотоксикантов их невозможно уловить классическими методами анализа для приоритетных загрязняющих веществ, поскольку они требуют специфической пробоподготовки. В частности, это относится к глифосату или параквату, которые заряжены в нейтральной среде. По этой причине для обогащения проб в нецелевом анализе применяют смешанные фазы, сочетающие неполярное удержание с ионным обменом. Изучение действия пробы воды на биологические объекты дает важную информацию, связывающую химические данные с биологическими эффектами в моделях in vitro или in vivo. Это позволяет ученым-экологам сосредоточиться на образцах, которые вызывают эффект, и определить в них активные компоненты. В идеале определенную активность можно затем связать с концентрациями идентифицированных активных компонентов, а также обнаружить антагонистические, аддитивные и синергические эффекты в смесях. Масс-спектрометрия успешно применяется как для идентификации экотоксикантов, так и для оценки их воздействия на живые организмы, поскольку она может не только количественно определять загрязнители в раз-

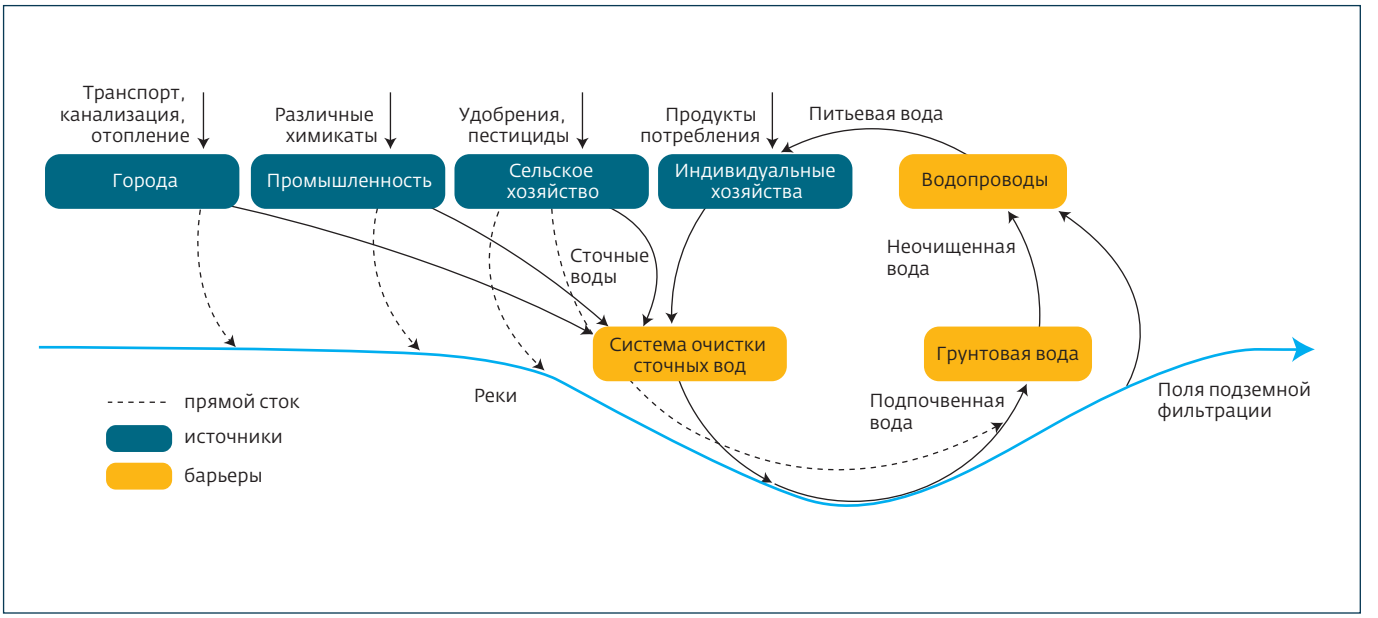

Рис.4. *Схема частично замкнутого водного цикла с источниками химических выбросов и некоторыми барьерами*

личных объектах окружающей среды, но давать новое понимание молекулярных механизмов токсичности.

Первый этап работы включает определение биологической активности водных проб, что дает важную информацию для последующего масс-спектрометрического анализа и идентификации компонентов. Далее тип биологической активности пробы соотносят со свойствами обнаруженных ксенобиотиков с учетом аддитивных или синергетических эффектов. Для оценки возможных воздействий экотоксикантов на отдельные виды и экосистему в целом необходимо выяснить механизмы токсичности вещества на молекулярном уровне. Здесь экотоксикология выступает в комплексе с протеомикой, транскриптомикой, метаболомикой, причем во всех этих исследованиях ключевым методом служит масс-спектрометрия [8].

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ РЕШЕНИЯ В МЕТАБОЛОМИКЕ И ПРОТЕОМИКЕ

Г.М.Шайдуллина (LECO Corporation) рассказала о применении газовых времяпролетных хромато-масс-спектрометров (ГХ/ВПМС) серии Pegasus в метаболомных исследованиях. Корпорация LECO исторически специализируется на системах, сочетающих газовую хроматографию и времяпролетную масс-спектрометрию. Ее визитная карточка – решения на основе двумерной газовой хроматографии (ГХ-ГХ). При создании нового поколения ГХ/ВПМС – настольных приборов Pegasus BT – разработчики стремились в полной мере использовать преимущества данного подхода. Причем во главу угла ставилось сочетание уникальных аналитических характеристик с простотой эксплуатации и возможностью применения столь сложного инструмента для рутинных анализов. Новую линейку составляют Pegasus BT с традиционным одномерным газовым хроматографом и Pegasus BT 4D (рис.5) с системой двумерной газовой хроматографии.

Времяпролетные масс-спектрометры семейства Pegasus BT отличаются высочайшей производительностью, до 500 полных масс-спектров в секунду. Эта особенность крайне важна при совместной работе с системами традиционной и двумерной ГХ, формирующими узкие пики, шириной в десятки миллисекунд. Двумерный режим работы хроматографа позволяет сочетать колонки разной селективности. В результате многократно возрастает пиковая емкость системы, улучшается разделение компонентов. Становится возможной визуализация структурных закономерностей, что облегчает интерпретацию масс-спектральных данных. Существенно снижаются пределы детектирования – менее 5 фг в случае Pegasus BT 4D, что позволяет обнаруживать целевые аналиты в следовых количествах даже в сложных, многокомпонентных образцах.

Другая особенность ВПМС – возможно одновременное измерение ионов во всем диапазоне масс, от 10 до 1500 m/z, что позволяет за один проход проводить как целевой, так и обзорный анализ всех компонентов пробы по масс-спектрам в каждой точке полученной хроматограммы. Это не только исключает потерю важной аналитической информации, но и существенно повышает эффективность работы лаборатории в целом. Более того,

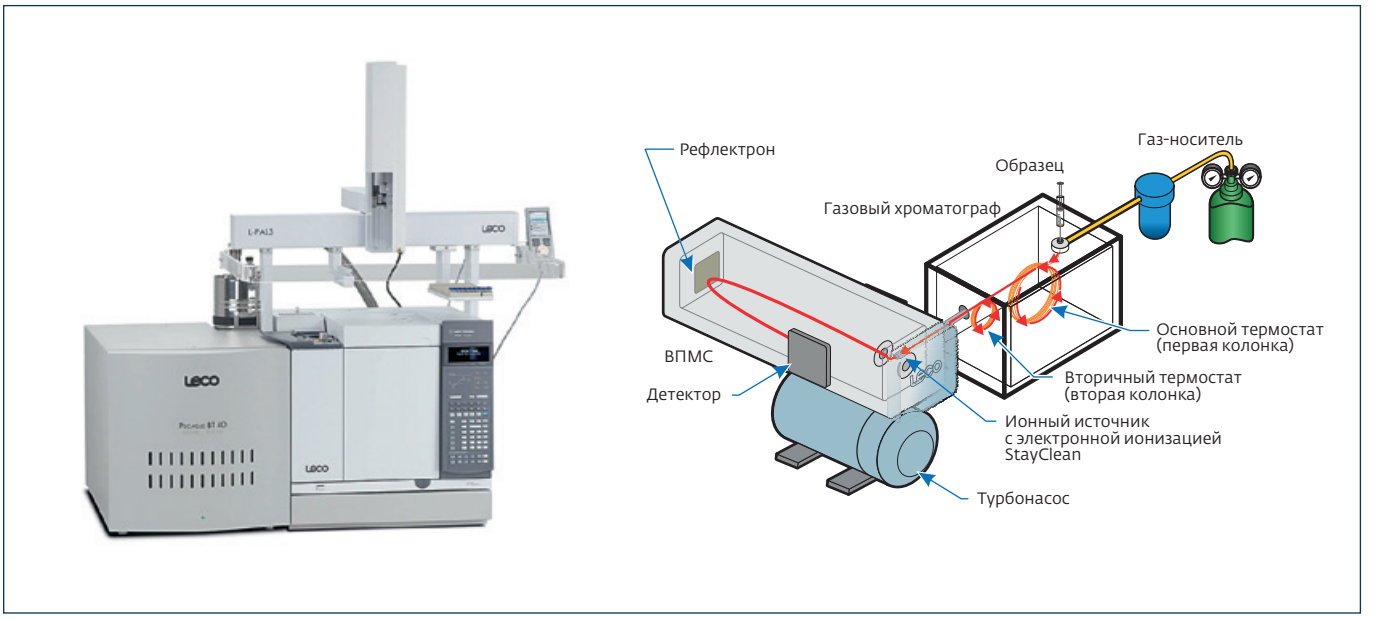

Рис.5. *ГХ-ГХ/ВПМС Pegasus BT 4D*

благодаря субноминальному разрешению ВПМС улучшается селективность. Корректной работе автоматических алгоритмов обработки данных способствует то, что во всем диапазоне масс детектируются единообразные масс-спектры с неискаженной интенсивностью пиков и в изотопных кластерах, и на разных склонах хроматографических пиков. В результате работы алгоритма деконволюции осуществляется выделение чистых спектров из исходных аналитических сигналов. Как следствие, упрощается сопоставление полученных масс-спектров с библиотечными, а в изотопных кластерах интенсивность сигналов оказывается соответствующей теоретической, что также помогает подтвердить правильность расшифровки масс-спектра. Этому способствуют и изменения в программном обеспечении ChromaTOF, которое осуществляет управление прибором и обработку результатов. Оно было дополнено новыми встроенными автоматическими функциями, что еще более повысило удобство работы с прибором.

В Pegasus BT и Pegasus BT 4D используется новый ионный источник с электронной ионизацией открытого типа, в котором реализована технология StayClean. Благодаря особенностям конструкции, он не требует очистки даже при работе со сложными многокомпонентными образцами или с тяжелыми биологическими матрицами и большими сериями образцов при статистических исследованиях.

ГХ-ГХ-системы LECO традиционно оснащаются термомодуляторами QUAD JET, обеспечивающими высочайшую чувствительность прибора. В ВПМС Pegasus BT 4D вместо термомодулятора может применяться также модулятор газового потока FLUX. Он использует принцип прерывания потока между двумя колонками посредством струи газа-носителя (гелия). FLUX стал экономичным решением для реализации принципа двумерной газовой хроматографии. Новый модулятор, отличаясь простотой, обеспечивает очень высокую точность управления потоком. Как следствие, ширина хроматографических пиков на выходе из второй колонки оказывается сопоставимой с применением термомодулятора.

Неудивительно, что высокие аналитические и эксплуатационные характеристики сделали приборы Pegasus BT и Pegasus BT 4D востребованными во многих лабораториях мира. Эффективность этих инструментов подтверждает широкий ряд научных работ: от анализа выдыхаемого воздуха для клинической диагностики и поиска биомаркеров различных заболеваний до изучения связи метаболомного состава растений с их вкусом, ароматом, урожайностью и т.п. В частности, в рамках исследования метаболомного профиля при индуцированной митохондриальной дисфункции было выявлено изменение состава метаболитов в миокардных тканях трансгенных крыс. Изучены изменения в обмене веществ при определенных диетах, выявлены метаболические отклики организма при трансплантации тканей и органов. Проведены клинические исследования компонентов выдыхаемого воздуха у пациентов, страдающих астмой, в результате выработаны методы снижения риска неправильного лечения. Выявлены отличия метаболитов в мокроте,

сыворотке и в одноядерных клетках периферической крови пациентов, страдающих ожирением, и влияние этого на протекание заболеваний и процессы выздоровления. И это – лишь некоторые работы из огромного множества. Подобные исследования открывают для приборов Pegasus BT и Pegasus BT 4D путь к более массовым применениям в клинической и лабораторной практике.

Представители компании Bruker Daltonics Д.А.Бурмыкин и В.С.Казаков развили тему комплексных подходов и представили решения компании для высокопроизводительных протеомных исследований и использования масс-спектрометрии высокого и сверхвысокого разрешения в протеомике, метаболомике и липидомике: от анализа биологических жидкостей до пространственной локализации метаболитов в тканях. Были показаны преимущества спектрометрии ионной подвижности TIMS, открывающей новое измерение в протеомных исследованиях, и MALDI-TOF – экспрессного и информативного метода определения и визуализации биологических объектов.

Доклад П.С.Метальникова (ООО "М-Спектр") был посвящен приложению новых масс-спектрометрических технологий в протеомике и метаболомике. Было рассказано о современных способах извлечения информации при анализе сложных биологических смесей и уделено особое внимание сочетанию методов SWATH и масс-спектрометрии ионной подвижности, одновременное применение которых существенно повышает качество биоаналитических измерений

***

На протяжении последних 25 лет масс-спектрометрия служит неотъемлемой составляющей исследований в области протеомики и метаболомики. С ее помощью секвенируют белки и олигонуклеотиды, определяют посттрансляционные модификации, обнаруживают небольшие молекулы и их метаболиты, проводят количественные измерения концентраций биомолекул в биологических пробах. Новые технологии, а также сочетание масс-спектрометрии с комплементарными методами, например, спектрометрией ионной подвижности и жидкостной хроматографией, позволяют преодолеть такие недостатки масс-спектрометрического анализа, как неполное извлечение информации, и получить исчерпывающие данные о биологическом или ином образце любой степени сложности.

Науки о жизни – это огромный пласт исследований, однако область применения масс-спектрометрии несравненно шире. На конференции "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы" обсуждались проблемы и решения по применению масс-спектрометрии в органической, аналитической и неорганической химии, материаловедении, ядерно-физических исследованиях, рассматривались вопросы современного приборостроения и инструментального сопровождения метода [9]. Научный форум еще раз подтвердил высокий уровень отечественной масс-спектрометрии, включая как теоретические аспекты, так и практические приложения для различных областей науки и промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ludwig C.**, **Gillet L.**, **Rosenberger G.**, **Amon S.**, **Collins B.C.**, **Aebersold R.** Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial // Mol Syst Biol. 2018. V. 14. No. 8. e8126. doi: 10.15252/msb.20178126.
2. **Tarasova I.A.**, **Masselon C.D.**, **Gorshkov A.V.**, **Gorshkov M.V.** Predictive chromatography of peptides and proteins as a complementary tool for proteomics // Analyst. 2016. V. 141. P. 4816–4832.
3. **Vyatkina K.**, **Wu S.**, **Dekker L.J.**, **Van Duijn M.M.**, **Liu X.**, **Tolić N.**, **Dvorkin M.**, **Alexandrova S.**, **Luider T.M.**, **Paša-Tolić L.**, **Pevzner P.A.** De novo sequencing of peptides from top-down tandem mass spectra // J. Proteome Res. 2015. V. 14. P. 4450–4462.
4. Гармония химического пространства. Интервью с А.А.Аксеновым // Лаборатория и производство. 2019. № 6. С. 8–15.
5. **Wang M.**, **Carver J.J.**, **Phelan V.V.**, **Sanchez L.M.** et.al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // Nature Biotechnology. 2016. V. 34. P. 828–837.
6. **Kuznetsova K.G.**, **Kliuchnikova A.A.**, **Ilina I.U.**, **Chernobrovkin A.L.** et al. Proteogenomics of Adenosine-to-Inosine RNA Editing in the Fruit Fly // J. Proteome Res. 2018. V. 17. P. 3889–3903.
7. **Corver J.**, **Cordo V.**, **van Leeuwen H.C.**, **Klychnikov O.I.**, **Hensbergen P.J.** Covalent attachment and Pro-Pro endopeptidase (PPEP-1)-mediated release of Clostridium difficile cell surface proteins involved in adhesion // Molecular Microbiology. 2017. V. 105, No. 5. P. 663–673. https://doi.org/10.1111/mmi.13736.
8. **Groh K.J.**, **Suter M.J.-F.** Mass Spectrometry in Environmental Chemistry and Toxicology // Molecular Technologies for Detection of Chemical and Biological Agents, NATO Science for Peace and Security. Springer Science+ Business Media B. 2017. DOI 10.1007/978-94-024-1113-3_10.
9. Всероссийское масс-спектрометрическое общество. Девятый Съезд ВМСО // Масс-спектрометрия. 2019. Т. 16. № 1. С. 87–89.

BIO TECH WORLD

XVIII МЕЖДУНАРОДНАЯ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХПРОМ & АНАЛИТИКА

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

- Аналитика
- БИОФарма
- Функциональные продукты питания
- БИОЛаб
- БИОСофт
- БИОМед
- БИОАгро
- БИОВенчур, БИОФранчайзинг, Стартапы, Кластеры, Технопарки
- Промышленная биотехнология
- Лабораторная мебель БИОЛабДрайв

XVIII МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ ФОРУМА

- Фундаментальные вопросы биотехнологии
- Геномная инженерия
- Биотехнология и медицина
- Биофарма
- Биоинформатика
- Сельское хозяйство
- Life science

2020

27-29 МАЯ
МОСКВА
ГОСТИНЫЙ ДВОР

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

RED GROUP
+7 (495) 780-41-09
+7 (495) 722-20-74
info@biomos.ru
www.biomos.ru