

15.2

## Формирование наноразмерных мультимолекулярных структур стеарата лантана с использованием монослоев Ленгмюра для масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией

© А.Ю. Горбунов<sup>1,2</sup>, Е.П. Подольская<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: gorbunov-a@inbox.ru

Поступило в Редакцию 22 июля 2022 г.

В окончательной редакции 22 июля 2022 г.

Принято к публикации 15 сентября 2022 г.

Исследована матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) с поверхности наноразмерных мультимолекулярных структур на основе монослоев стеарата лантана, наличие которых на поверхности подтверждалось экспериментально по лазерной десорбции лантансодержащих органических ионов. Показано, что такая функционализация поверхности стандартной МАЛДИ-мишени приводит к значительному увеличению выхода ионов целевых пептидов, причем оптимум достигается при толщине пленки порядка шести монослоев. Предложен подход в формате „Лаборатория на мишени“, позволяющий проводить специфичную экстракцию пептидов, модифицированных хлорсодержащими соединениями, и включающий следующие стадии: функционализация поверхности мишени, металл-аффинная экстракция, нанесение матрицы, МАЛДИ масс-спектрометрический анализ.

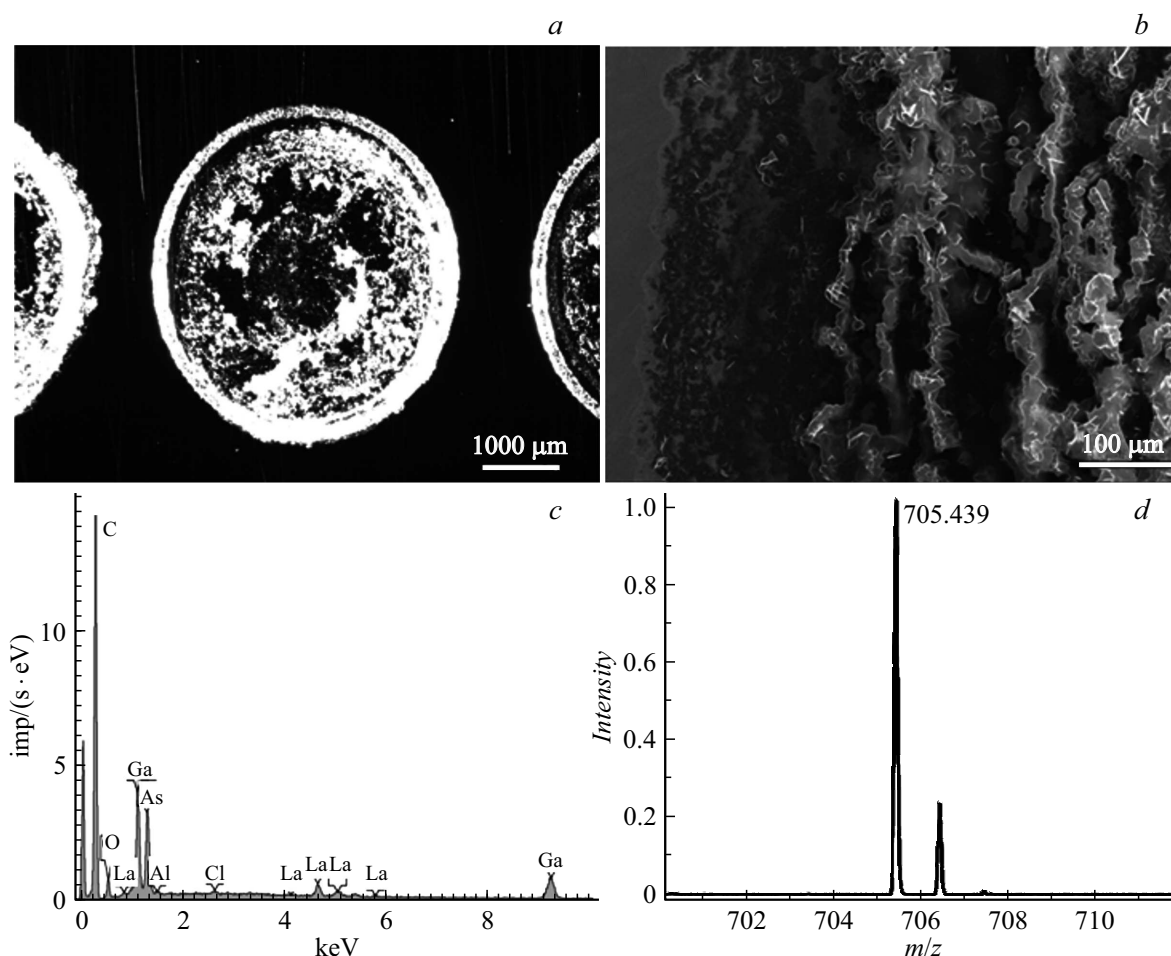
**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, поверхность, монослой Ленгмюра, металл-аффинная хроматография.

DOI: 10.21883/PJTF.2022.21.53711.19320

Масс-спектрометрия в сочетании с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) широко используется в молекулярной биофизике и биохимии для анализа белковых молекул. Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени самособирающимися монослоями позволяет придать поверхности новые уникальные свойства, способствующие значительному повышению эффективности масс-спектрометрического анализа [1]. Ранее нами было продемонстрировано, что монослой стеаратов металлов (FMe), полученные при самосборке молекул стеариновой кислоты (HSt) на поверхности водной субфазы, содержащей ионы металлов, проявляют свойства металл-аффинного сорбента [2–4]. Кроме того, недавно нами был предложен подход, позволяющий проводить формирование такой регулярной двумерной структуры непосредственно на твердой подложке, в качестве которой использовали МАЛДИ-мишень (MTP 384 target plate polished steel BC, Bruker Daltonics) [5]. Было показано, что нанесение раствора стеариновой кислоты в гексане на помещенную на твердую подложку каплю водной субфазы, содержащей ионы лантана, приводит к образованию коллапсированного монослоя стеарата лантана (FLa). Полученная структура характеризовалась развитой поверхностью, сформированной из четко выраженных агрегатов стеарата металла со средним диаметром

300–400 nm, высоким уровнем адгезии к поверхности полированной МАЛДИ-мишени и наличием свойств, соответствующих металл-аффинным сорбентам. Следует отметить, что такая функционализация поверхности предназначена для проведения металл-аффинной хроматографии непосредственно в пределах ячейки мишени (формат „Лаборатория на мишени“) [1], что позволяет не только в разы снизить затраты на реактивы, сократить время эксперимента, но и заметно повысить выход ионов целевых соединений и, как следствие, чувствительность анализа. Эффективность сорбента в значительной степени зависит от поверхности, доступной для взаимодействия с аналитом. Соответственно представлялось интересным исследовать формирование мультимолекулярных структур FLa в пределах ячейки МАЛДИ-мишени, изучить морфологию и состав полученного сорбента, а также исследовать возможность проведения металл-аффинной хроматографии в формате „Лаборатория на мишени“ на примере аддуктов глобина человека с продуктами окисления (ПО) хлорсодержащего лекарственного средства амодиахин (AQ) [6].

Для этого на ячейках мишени (внутренний диаметр 3.1 mm) путем нанесения органической фазы на каплю водной субфазы (см. дополнительные материалы, рис. S1) были сформированы один, два, четыре, шесть и восемь слоев FLa, в трех последних случаях вод-



**Рис. 1.** *a* — изображение шести слоев FLa, сформированных на мишени МАЛДИ (стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой DS-2MBWc (Nikon, Япония)), *b* — изображение шести слоев FLa, сформированных на мишени МАЛДИ (сканирующий электронный микроскоп S-3400N (Hitachi, Japan)), *c* — EDX-спектр подложки с шестью сформированными слоями FLa (сканирующий электронный микроскоп Hitachi S-3400N с аналитической приставкой EDX), *d* — фрагмент МАЛДИ масс-спектра FLa.

ную каплю удаляли и наносили заново после формирования каждого двух слоев. Во всех экспериментах в качестве водной субфазы использовали раствор  $\text{LaCl}_3$  ( $C = 10^{-2} \text{ mol/l}$ ,  $\text{pH} = 3$ ,  $V = 0.7 \mu\text{l}$ ), а в качестве органической — насыщенный при  $20^\circ\text{C}$  раствор HSt в *n*-гексане ( $V = 0.7 \mu\text{l}$ ). Затем сформированные FLa дважды промывали водой и высушивали при  $25^\circ\text{C}$ . Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована морфология полученных структур непосредственно на поверхности подложки. По интенсивности свечения было установлено, что при увеличении количества слоев образуются скопления гетероморфных частиц, при этом наибольшее количество материала остается после промывки при формировании шести слоев FLa (рис. 1, *a*).

По всей видимости, при нанесении большего количества слоев нарушаются взаимодействия между слоями, и часть сформированного материала не удерживается на подложке. Сорбент, полученный непосредственно на МАЛДИ-мишени, обладает характерной структурой.

Многokратное наложение слоя на слой порождает специфическую объемную структуру с надломами поверхности. При стекании с капли у краев ячейки *n*-гексан быстро испаряется, что приводит к многократному наполнению новых частей слоя на предыдущие, их деформации и разрушению. В результате на мишени образуется структура с периодическими утолщениями и взломами. Результаты, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, свидетельствуют о формировании на мишени материала с довольно развитой поверхностью (рис. 1, *b*), что соответственно позволило ожидать от сформированных FLa хорошей сорбционной способности. Для подтверждения состава были получены энергодисперсионные рентгеновские (EDX) спектры с шестью сформированными слоями FLa, которые подтвердили наличие атомов лантана в составе структуры (рис. 1, *c*, см. также дополнительные материалы, рис. S2). Структурное звено сорбента определяли методом МАЛДИ масс-спектрометрии в режиме рефлектрона при

**Таблица 1.** Последовательность подготовки сорбента и образца для МАЛДИ масс-спектрометрического анализа в формате „Лаборатория на мишени“

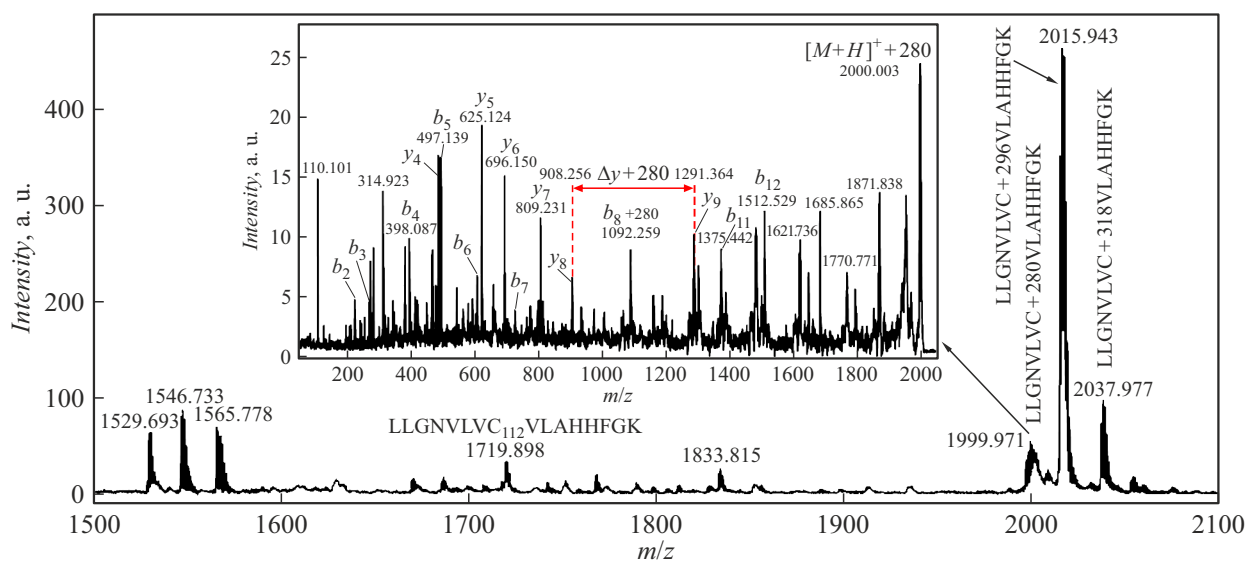
Номер этапа	Наименование этапа	Номер этапа	Наименование этапа
1	<b>Нанесение водной субфазы</b> На ячейку нанести 0.7 $\mu$ l водного раствора нитрата лантана (III) с концентрацией $10^{-2}$ mol/l (субфаза)	7	<b>Инкубация сорбента</b> На сорбент нанести 7 $\mu$ l буфера для сорбции, выдержать в течение 5 min
2	<b>Нанесение раствора стеариновой кислоты в гексане</b> На поверхность субфазы трижды нанести 0.7 $\mu$ l насыщенного раствора (20°C) стеариновой кислоты в гексане	8	<b>Сорбция образца</b> В каплю буфера внести 1 $\mu$ l раствора образца, инкубировать в течение 20 min, на время сорбции мишень поместить под крышку
3	<b>Удаление остатков субфазы</b> Остатки водного раствора удалить	9	<b>Удаление несвязавшейся фракции</b> Несвязавшуюся фракцию с поверхности сорбента собрать и при необходимости анализа перенести в свободную ячейку, добавить раствор матрицы — $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (5 $\mu$ g/ml в 70% водном ацетонитриле с 0.1% трифторуксусной кислоты)
4	<b>Высушивание сорбента</b> Мишень выдержать при комнатной температуре в течение 2 min	10	<b>Промывка сорбента</b> На сорбент нанести 7 $\mu$ l буфера для сорбции, выдержать 1 min, каплю удалить. На сорбент нанести 7 $\mu$ l дистиллированной воды, выдержать 1 min, каплю удалить
5	<b>Промывка сорбента</b> На поверхность слоев нанести 7 $\mu$ l дистиллированной воды, выдерживать 1 min, каплю удалить. Повторить процедуру еще раз	11	<b>Подготовка к анализу</b> На сорбент нанести 3 $\mu$ l 30% водного раствора ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислоты и 2 $\mu$ l раствора матрицы — $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (5 mg/ml в 70% водном ацетонитриле с 0.1% трифторуксусной кислоты), высушить при комнатной температуре в течение 20 min
6	<b>Высушивание сорбента</b> Мишень выдержать при комнатной температуре в течение 20 min	12	<b>МАЛДИ масс-спектрометрический анализ</b>

Примечание. Этапы 1–6 — блоки, посвященные формированию сорбента на ячейке МАЛДИ-мишени, этапы 7–11 — процедуре металл-аффинной экстракции, этап 12 — МАЛДИ масс-спектрометрическому анализу.

регистрации положительных ионов с использованием UltrafleXtreme TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) на базе ресурсного центра Научного парка СПбГУ „Развитие молекулярных и клеточных технологий“.

Анализ проводили после нанесения раствора матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота в 70% водном ацетонитриле, 10 mg/ml, 2  $\mu$ l) на сформированные монослои FLа. В масс-спектре был обнаружен сигнал с  $m/z = 705.439$  (рис. 1, d). На основании этого был сделан вывод, что основным структурным звеном слоев является  $(C_{17}H_{35}COO)_2La^+$ . Это полностью согласуется с результатами, полученными ранее [5,7]. Последующий фрагментный анализ также подтвердил эту структуру (см. дополнительные материалы, рис. S3). Таким образом, нами была проведена функционализация поверхности МАЛДИ-мишени мультимолекулярными структурами FLа для выполнения процедуры металл-аффинной хроматографии в формате „Лаборатория на мишени“.

Ранее нами была впервые продемонстрирована возможность экстракции хлорсодержащих органических соединений из образцов методом металл-аффинной хроматографии [7]. Соответственно представлялось интересным оценить специфичные и селективные свойства полученных мультимолекулярных структур FLа на примере аддуктов глобина человека с хлорсодержащими соединениями. Нами были получены продукты окисления амодиахина (см. дополнительные материалы, табл. S1) и проведена модификация глобина человека по методике, представленной в работе [8]. Объектом исследования стал пептид LLGNVLC<sub>112</sub>VLANHFGK, образующийся в результате триптического гидролиза  $\beta$ -субъединицы глобина человека. Формирование сорбента и подготовку образца для анализа проводили согласно последовательности, представленной в табл. 1. Результаты МАЛДИ масс-спектрометрического анализа продемонстрированы на рис. 2. Как показано на рис. 2, в диапазоне  $m/z$ ,



**Рис. 2.** МАЛДИ масс-спектр триптического гидролизата глобина человека, модифицированного продуктами окисления амодиаквина (показан пептид  $\beta$ -субъединицы глобина LLGNVLCVLAHHFGK, модифицированный ПО AQ: ПО1, ПО4 и ПО7). На вставке — фрагмент масс-спектра пептида LLGNVLCVLAHHFGK, модифицированного ПО1 по  $\beta$ Cys112 ( $m/z = 1999.971$ ).

**Таблица 2.** Идентифицированные ПО AQ, образующие аддукты с глобином человека

Обозначение	Брутто-формула [M + H] <sup>+</sup>	m/z		Разница масс, Da	Mascot score
		ПО [M + H] <sup>+</sup>	Аддукт [M + H] <sup>+</sup>		
AQ	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>3</sub> O	356.15242	—	—	—
ПО1	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>3</sub> O	354.13678	1999.971	280*	86
ПО4	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	299.05832	2015.943	296	66
ПО7	—	—	2037.977	318	47

\*С учетом нейтральной потери диэтиламина 73 Da.

соответствующем пептиду LLGNVLC<sub>112</sub>VLAHHFGK ( $m/z = 1719.898$ ), модифицированному ПО AQ, присутствует ряд интенсивных сигналов с  $m/z = 1999.971$ , 2015.943, 2037.977, два из которых по результатам фрагментного анализа были идентифицированы как аддукты LLGNVLC<sub>112</sub>VLAHHFGK с ПО1 и ПО4 (табл. 2, см. также дополнительные материалы, рис. S4, S5). Сигнал с  $m/z = 2037.977$  (ПО7) по виду изотопного распределения нами также был определен как аддукт, но разницу масс  $\Delta = 318$  Da мы не смогли отнести ни к одному из ранее описанных ПО AQ. Тем не менее это соединение было идентифицировано программой Mascot с достаточным уровнем достоверности как пептид LLGNVLCVLAHHFGK, содержащий модификацию по  $\beta$ Cys112 (табл. 2, см. также дополнительные материалы, рис. S6).  $\Delta = 318$  Da может соответствовать структуре с предположительной брутто-формулой C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Следует отметить, что в масс-спектре этого же образца до металл-аффинной экстракции сигнал с  $m/z = 2037.977$  отсутствует, а сигналы, соответствующие аддуктам с ПО1 и ПО4, незначительно превышают уровень шума и маскируются сигналами дру-

гих пептидов (см. дополнительные материалы, рис. S7). Исчезновение (или значительное снижение интенсивности) из масс-спектра сигналов нецелевых пептидов свидетельствует о высоком уровне селективных и специфических свойств мультимолекулярных структур FLA, сформированных на МАЛДИ-мишени, для проведения металл-аффинной экстракции в формате „Лаборатория на мишени“.

Таким образом, показана возможность функционализации поверхности МАЛДИ-мишени мультимолекулярными структурами на основе самособирающихся монослоев стеарата лантана. Показано, что сформированные непосредственно на поверхности мишени структуры обладают развитой поверхностью и могут быть использованы для металл-аффинной экстракции белковых аддуктов с хлорсодержащими соединениями при проведении эксперимента в формате „Лаборатория на мишени“, поскольку проявляют высокий уровень специфических и селективных свойств и обеспечивают высокий выход ионов целевых аддуктов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность за техническую поддержку ресурсным центрам „Развитие молекулярных и клеточных технологий“ и „Геомодель“ Научного парка СПбГУ, а также Н.В. Томилину за помощь с оптической микроскопией, В.В. Шиловских за помощь со сканирующей электронной микроскопией и А.А. Селютину за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] P.L. Urban, A. Amantonico, R. Zenobi, *Mass Spectrom. Rev.*, **30** (3), 435 (2011). DOI: 10.1002/mas.20288
- [2] E.V. Shreyner, M.L. Alexandrova, N.G. Sukhodolov, A.A. Selyutin, E.P. Podolskaya, *Mendeleev Commun.*, **27** (3), 304 (2017). DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030
- [3] V. Gladilovich, U. Greifenhagen, N. Sukhodolov, A. Selyutin, D. Singer, D. Thieme, P. Majovsky, A. Shirkin, W. Hoehenwarter, E. Bonitenko, E. Podolskaya, A. Frolov, *J. Chromatogr. A*, **1443**, 181 (2016). DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044
- [4] V.N. Babakov, E.V. Shreiner, O.A. Keltsieva, Y.A. Dubrovskii, V.V. Shilovskikh, I.M. Zorin, N.G. Sukhodolov, I.G. Zenkevich, E.P. Podolskaya, A.A. Selyutin, *Talanta*, **195**, 728 (2019). DOI: 10.1016/j.talanta.2018.11.103
- [5] A.S. Gladchuk, E.S. Silyavka, V.V. Shilovskikh, V.N. Bocharov, I.M. Zorin, N.V. Tomilin, N.A. Stepashkin, M.L. Alexandrova, N.V. Krasnov, A.Yu. Gorbunov, V.N. Babakov, N.G. Sukhodolov, A.A. Selyutin, E.P. Podolskaya, *Thin Solid Films*, **756**, 139374 (2022). DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374
- [6] H. Jewell, J.L. Maggs, A.C. Harrison, P.M. O’neill, J.E. Ruscoe, B.K. Park, *Xenobiotica*, **25** (2), 199 (1995). DOI: 10.3109/00498259509061845
- [7] D.A. Kurdyukov, E.N. Chernova, Y.V. Russkikh, D.A. Eurov, V.V. Sokolov, A.A. Bykov, V.V. Shilovskikh, O.A. Keltsieva, E.V. Ubyivovk, Y.A. Anufrikov, A.V. Fedorova, A.A. Selyutin, N.G. Sukhodolov, E.P. Podolskaya, V.G. Golubev, *J. Chromatogr. A*, **1513**, 140 (2017). DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.043
- [8] A. Gorbunov, A. Bardin, S. Plyushonok, J. Kovach, A. Petrenko, N. Sukhodolov, K. Krasnov, N. Krasnov, I. Zorin, A. Osborne, V. Babakov, A. Radilov, E. Podolskaya, *Microchem. J.*, **178**, 107362 (2022). DOI: 10.1016/j.microc.2022.107362