

УДК 636.085.3:577.18:543:54.724:539.1.04

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКА БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© 2025 г. А. В. Браун^a, У. А. Близнюк^{b, c}, П. Ю. Борщеговская^{b, c},
В. С. Ипатов^c, А. П. Черняев^{b, c}, И. А. Ананьева^a, И. А. Родин^{a, d, *}

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, Москва, 119991 Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 2, ГСП-1, Москва, 119991 Россия

^cНаучно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына
Ленинские горы, 1, стр. 2, ГСП-1, Москва, 119991 Россия

^dПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский университет) Минздрава России
ул. Б. Пироговская, 2, стр. 2, Москва, 119435 Россия

*E-mail: igorrodin@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2024 г.

После доработки 04.12.2024 г.

Принята к публикации 05.12.2024 г.

Разработан и опробован способ оценки изменений структурных характеристик белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) в водном растворе в результате воздействия ионизирующего излучения. Способ состоит в идентификации уникальных пептидов доменных структур белка, а также установлении модификаций аминокислотной последовательности с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Раствор БСА облучали рентгеновским излучением с напряжением на трубке 80 кВ и средним значением тока 1 мА, мощность дозы составляла 2 Гр/с. Поглощенную дозу в объеме образца оценивали ферросульфатным методом дозиметрии. Водный раствор БСА облучали в дозах 0.1, 0.5, 1, 2, 4 и 8 кГр, после чего количественно оценивали содержание белковых молекул в растворе и анализировали структурную целостность нативной формы белка, а также устанавливали модификации аминокислот в последовательности БСА в результате действия излучения. Для более углубленного анализа проводили восстановление дисульфидных связей цистеин-цистеин БСА с последующим алкилированием образующихся тиольных остатков амидом бромуксусной кислоты. Ферментативный гидролиз БСА проводили с добавлением раствора трипсина. Полученные образцы анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. Далее оценивали изменение количества неповрежденных молекул белка методом определения уникальных пептидов, соответствующих каждому из трех доменов, из которых состоит аминокислотная последовательность БСА. С учетом оптимизации условий детектирования трех доменов как маркеров активной формы БСА рассчитывали предел обнаружения каждого пептида. Разработанный подход позволил установить изменение естественной конформации белка бычьего сывороточного альбумина (его денатурацию) в водных пробах в результате воздействия ионизирующего излучения в дозах 4–8 кГр при средней мощности 2 Гр/с.

Ключевые слова: масс-спектрометрия высокого разрешения, высокоэффективная жидкостная хроматография, рентгеновское излучение, радиационная обработка, бычий сывороточный альбумин, пептиды БСА, восстановление и алкилирование дисульфидных связей белков.

DOI: 10.31857/S0044450225030051 EDN: afrngv

Радиационные технологии с успехом применяются в различных сферах промышленности, в том числе в народном хозяйстве и медицине. Способность ионизирующего излучения при воздействии на биологические объекты изменять структуру, функции клеток, подавлять их деление привела к использованию радиационного воздействия для стерилизации, обработки продуктов питания с целью увеличения сроков хранения и обеспечения безопасности и качества продуктов, применения в генной инженерии, лучевой терапии для лечения онкологических заболеваний [1–5].

Воздействию ионизирующего излучения подвержены все клетки тканей. Разрывы связей между атомами в белковых молекулах, липидах, углеводах и других соединениях могут приводить к серьезным нарушениям в тканях, образованию новых продуктов [3, 4, 6]. Так, при радиационной обработке продуктов животного происхождения нарушения белковых молекул могут привести к изменению химического состава продукта, потере питательной ценности, изменению химического состава продукта, потере органолептических свойств [5, 6]. Белки составляют около 74 % органических молекул клеток биологических тканей и состоят из цепочки аминокислот, соединенных пептидными связями, образующими три-четыре структурных уровня. Первичная структура является последовательностью аминокислотных остатков в полипептидной цепи, которая определяет генетическую информацию. Нарушение последовательности может привести к потере свойств и функций белка. Вторичная структура строится за счет водородных связей, включает α -спирали и β -слои, обеспечивает сохранение стабильности белка. Третичная структура образуется на основе вторичной структуры, включает в себя гидрофобные взаимодействия, дисульфидные связи и ионные взаимодействия, определяет конфигурацию белка в пространстве, что важно для специфических функций. К примеру, многие белки являются ферментами, взаимодействующими с другими молекулами [5–9].

При исследовании воздействия ионизирующего соединения на белковые молекулы в продуктах животного и растительного происхождения обычно применяют дозы до 20–25 кГр [7, 10–16]. Такого воздействия достаточно для достижения поставленных целей, например для подавления роста микроорганизмов при радиационной обработке, однако аминокислотный состав белков значительных изменений не претерпевает [7, 11–16]. При облучении ускоренными электронами с энергией 10 МэВ мяса говядины в дозах 10 и 12 кГр белок трансформируется, но не разрушается [7]. Состав аминокислот остается стабильным в течение 10 дней, при этом дозы до 10 кГр сохраняют сбалансированность

аминокислот лучше, чем дозы 12 кГр. Количество аминокислот уменьшается не более чем на 5 % [7]. Наблюдается образование большого количества радикалов при облучении мяса яка в дозах 7 и 9 кГр, но количество аминокислот при дозе 9 кГр уменьшается лишь на 3 % [13]. Структурные изменения вторичной и третичной структуры белка бычьего сывороточного альбумина (БСА), агрегация полипептидной цепи без процесса фрагментации происходят при облучении в дозе 5 кГр [14], а изменение конформации альбумина яичного белка – при его облучении в дозах до 25 кГр, но первичная структура молекул в обоих случаях остается неизменной [15].

Для характеристики аминокислотной последовательности белков в настоящее время используют несколько подходов – *topdown*, *bottom up*, *middle down* и др. Они в первую очередь отличаются друг от друга молекулярными массами анализируемых молекул. Использование подхода *topdown* при определении структурных характеристик БСА затруднено его высокой молекулярной массой и низкой чувствительностью обнаружения таких высокомолекулярных соединений. Использование способа *bottom up*, когда установление аминокислотной последовательности происходит путем анализа продуктов ферментативного гидролиза БСА, предпочтительней, поскольку позволяет добиться высокой точности и чувствительности, а также более эффективного разделения низкомолекулярных компонентов.

Трипсин является наиболее часто используемой эндопротеазой для протеомного анализа. В основном применяют трипсины “протеомного класса”, в которых лизины метилированы для защиты от автолитического гидролиза. Функционально трипсин является сериновой специфической протеазой (расщепляет С-конец остатков аминокислот К и R) и сохраняет свою активность в выбранном диапазоне pH [17, 18]. Механизм переваривания трипсином хорошо изучен, и он обладает высокой активностью и специфичностью [19]. Безусловно, использование трипсина имеет ряд ограничений и недостатков – это в первую очередь не 100 %-ное покрытие аминокислотной последовательности при исследовании продуктов гидролиза белков. Тем не менее его использование позволяет добиться значений покрытия 90–95 %, что приемлемо для целей нашего исследования. Использование других ферментов необходимо в первую очередь для увеличения покрытия аминокислотной последовательности определяемого белка [20].

В работе [21] описан способ определения структурной целостности нативной формы БСА в водном растворе с использованием ферментативного гидролиза трипсином после облучения ускоренными электронами, при этом в ходе процедуры пробоподготовки дисульфидные

связи цистеин-цистеин БСА не подвергались восстановлению, что создавало стерические затруднения при проведении ферментативного гидролиза и существенно уменьшало возможности данного подхода при изучении структурных изменений белка под воздействием ионизирующего излучения. Тем не менее авторам удалось данным способом установить влияние ускоренных электронов на структурные характеристики БСА. Предел обнаружения составил 0.5 мкг/мл.

Несмотря на значительный потенциал имеющихся методов [22], необходимы дальнейшие исследования влияния излучения на структурные характеристики высокомолекулярных соединений, особенно модификации аминокислот белков, подвергшихся радиационному воздействию.

Цель данной работы состояла в разработке высокочувствительного способа определения структурных характеристик белков на примере БСА для изучения влияния радиационного воздействия на его структурные характеристики в водном растворе с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выполняли модельный эксперимент по установлению присутствия белка бычьего сывороточного альбумина в активной (нативной) форме в водном растворе, облученном рентгеновским излучением, а также количественно оценивали его содержание в контрольных и облученных образцах с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС.

Объект исследования – белок бычий сывороточный альбумин (BSA фракция V, BioClot GmbH, Германия), который разводили в физиологическом 0.9 %-ном растворе NaCl (35 мг/мл). Рабочие буферные и другие растворы, необходимые для анализа структурной целостности белка, готовили растворением точных навесок в соответствующих растворителях в день проведения эксперимента.

Белок БСА является удобной распространенной моделью в биомедицинских и биохимических исследованиях. Он составляет 60 % белков плазмы крови, содержит восемь незаменимых аминокислот, играет главную роль в транспортировке жирных кислот, гормонов, некоторых витаминов и выполняет широкий ряд функций [14, 23]. БСА хорошо взаимодействует с другими биомолекулами, что позволяет использовать его в качестве основы для создания различных биохимических систем и анализов; он часто используется в иммунодиагностических процедурах [24] и клинической химии [25], входит в состав питательных сред для выращивания клеточных культур [26], присутствует

в пищевых продуктах, содержащих коровье молоко или мясо. Структурные характеристики БСА подробно изучены, он легкодоступен и является ценным объектом для исследований, результаты которых можно адаптировать для изучения других белков и биомолекул.

Воздействие ионизирующим излучением и контроль дозы облучения. Для проведения облучения образцы раствора БСА в концентрации 35 мг/мл объемом 0.5 мл помещали в стерильные пластиковые микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл (АО “РЗП”, Россия). Для обеспечения равномерности облучения высота раствора не превышала 2 мм, после чего помещали по три пробирки на расстояние 11 см от бериллиевого окна рентгеновской трубки RAD-100 с молибденовым анодом. Облучение проводили на рентгеновском аппарате 1BPV23-100 ФГБУ ГНЦ “Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна” ФМБА России.

Во время облучения регистрировали время облучения, ток трубки, среднее значение которого устанавливали 1 мА, и напряжение – 80 кВ. Допустимая погрешность составляла не более 0.1 %. Воздействие проводили при 20°C.

Дозу D , поглощенную образцами, и мощность дозы во время проведения эксперимента оценивали с использованием ферросульфатного дозиметра Фрикке. Раствор FeSO_4 в объеме, соответствующем объему с образцами БСА, помещали в микроцентрифужные пробирки и облучали при тех же параметрах, что и опытные образцы. Дозиметрический раствор и образцы с раствором БСА близки по плотности к воде.

По изменению оптической плотности при 304 нм после облучения раствора Фрикке вследствие окисления ионов Fe^{2+} до ионов Fe^{3+} оценивали дозу, поглощенную образцами, и мощность дозы. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре УФ-3000 (ТМ ЭКОВЬЮ, Россия) [27]. Дозы облучения соответствовали значениям 0.1, 0.5, 1, 2, 4 и 8 кГр, при этом мощность дозы составляла 2 Гр/с с погрешностью не более 3 %.

Методика анализа. Для анализа структурной целостности нативной формы белка и оценки его содержания использовали муравьиную кислоту (95 %, Sigma-Aldrich, США, кат. № F0507), ацетонитрил (Panreac, Испания), высокомолекулярные фильтры (10 кДа, Amicon, Россия, кат. № Z677108), высокомолекулярные фильтры (30 кДа, Amicon, Россия, кат. № UFC503024), хлорид натрия (99 %, Sigma-Aldrich, США, кат. № S9888), бикарбонат аммония (99 %, Sigma-Aldrich, США, кат. № A6141), дитиотриэтол (98 %, Merck, Германия, кат. № D0632), 2-бромацетамид (98 %, Sigma-Aldrich, США, кат. № 301272), иодуксусную кислоту (98 %, Sigma-Aldrich, США, кат. № I4386), набор для проведения

ферментативного гидролиза с использованием трипсина SMART Digest Trypsin Kits (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 60109-101), деионизованную воду после очистки системой Milli-Q (Millipore, США), стандартный образец БСА, фракция V (Bioclot GmbH, Германия, партия № 61171334).

Идентификацию пептидов и количественный анализ проводили с использованием аналитической станции, состоящей из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 RSLC (Германия), оборудованного системой автоматического ввода пробы, с масс-селективным тандемным анализатором высокого разрешения Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos (США) с источником ионов и ионизацией электрораспылением. Специфические пептиды БСА выделяли на колонке 100 мм × 2.1 мм Zorbax 300 SB – C18 с диаметром зерна сорбента 3.5 мкм (Agilent, США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов Xcalibur (ThermoScientific, США). Использовали системы для центрифугирования MPW-352R (MPW Med. Instruments, Польша) и термостатирования MAXQ 4450 (Thermo Scientific, США) для проведения алкилирования и восстановления дисульфидных связей БСА, а также ферментативного гидролиза.

Методика обнаружения специфических пептидов бычьего сывороточного альбумина. Подготовка водных растворов. Ферментативный гидролиз проводили согласно ранее опубликованной методике [21] с добавлением стадии восстановления и алкилирования дисульфидных связей молекулы БСА. Для этого к 50 мкл водного раствора, содержащего 0.9 % NaCl, добавляли 150 мкл 1 М раствора NH_4HCO_3 и помещали в центрифужный фильтр Amicon 0.5 мл с отсечкой по массам 30 кДа (фильтр предварительно дважды промывали в течение 15 мин с использованием 500 мкл деионизованной воды при частоте оборотов 10 000 об/мин), далее раствор центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 об/мин. Далее к концентрату белка на фильтре добавляли 150 мкл буферного раствора из набора для трипсинолиза SMART Digest Trypsin Kits (Thermo Fisher Scientific, США) и 5 мкл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл из того же набора для проведения денатурации и ферментативного гидролиза БСА, далее фильтр закрывали герметичной пленкой и инкубировали в термостате при 70°C в течение 30 мин. К полученной смеси на фильтре добавляли 2 М раствор дитиотреитола для восстановления дисульфидных связей и инкубировали в течение 40 мин при 55°C. После этого проводили алкилирование образовавшихся тиольных остатков цистеинов двумя разными реагентами – 2-бromoацетамидом (добавляли 21 мг) и иодуксусной кислотой (добавляли 28 мг)

при 40°C в течение 30 мин. Далее образовавшуюся смесь пептидов на фильтре центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 об/мин, фильтрат собирали. После этого на фильтр добавляли 100 мкл смеси ацетонитрил–вода–муравьиная кислота (20 : 79.9–0.1, по объему) и повторяли процедуру центрифугирования. Фильтраты объединяли и высушивали досуха при 50°C. Сухой остаток вновь растворяли в 100 мкл смеси ацетонитрил–вода–муравьиная кислота (20 : 79.9 : 0.1, по объему). Полученную пробу помещали в микрофлакон для последующего анализа методом ВЭЖХ–МС/МС.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Использовали источник ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных реакций положительных ионов. Величина разрешения масс-анализатора составляла не менее 60 000 отн. ед., погрешность при определении величины m/z не превышала 3 млн^{-1} . Температура переходного капилляра составляла 300°C, напряжение на распыляющем капилляре – 3500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов – 420 кПа.

Компоненты исследуемых образцов разделяли в режиме градиентного элюирования. Расход подвижной фазы 0.30 мл/мин, температура термостата колонки 40°C. Подвижная фаза А – 0.1 об. % HCOOH в воде, подвижная фаза Б – ацетонитрил. Программа градиентного элюирования: 0–3 мин: 95 % А; 3–35 мин: 5–40 % Б; 35–40 мин: 40–80 % Б; 40–44 мин: 80 % Б; 44–50 мин: 95 % А. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Масс-спектрометрическое детектирование и выбор оптимального способа пробоподготовки. На первом этапе работы исследовали образующиеся пептиды и выбирали специфические для БСА пептиды. Для этого отбирали 50 мкл раствора БСА (35 мг/мл) и проводили денатурацию и ферментативный гидролиз БСА, используя фильтры с отсечкой по массам 30 кДа. Полученную смесь пептидов обрабатывали дитиотреитолом для восстановления дисульфидных связей цистеин-цистеин. Образующиеся тиольные остатки алкилировали с использованием двух реагентов – 2-бromoацетамида и иодуксусной кислоты. В первом случае в масс-спектре наблюдали карбамидометильные производные цистеиновых остатков БСА, во втором случае – карбоксиметильные производные цистеиновых остатков. Для поиска и выбора специфических аминокислотных последовательностей использовали базы данных строения БСА Swissprot database (в базе БСА соответствует номер P02769 [28]).

Таким образом, на данном этапе осуществляли поиск уникальных пептидов БСА с использованием двух реагентов для алкилирования, а также измеряли аналитический сигнал каждого идентифицированного пептида (в виде площади хроматографического пика пептида)

В ходе исследования продуктов ферментативного гидролиза БСА удалось идентифицировать 62 уникальных пептида при использовании 2-бromoацетамида в качестве алкилирующего агента и 29 уникальных пептидов при модификации восстановленных остатков цистеина иодуксусной кислотой, характеристики которых представлены в табл. 1 и 2 соответственно. В таблицах указаны положения идентифицированных пептидов в структуре БСА, а именно домены, к которым они относятся. Согласно данным [29], пространственная структура молекулы сывороточного альбумина имеет форму сердца и состоит из трех гомологичных спиральных доменов (I, II, III). Каждый домен содержит два поддомена (А и В), которые имеют общие структурные мотивы.

Как видно из представленных данных, использование 2-бromoацетамида в качестве алкилирующего агента при определении БСА приводит к образованию большего числа уникальных пептидов в сравнении с применением иодуксусной кислоты, при этом интенсивность аналитического сигнала молекулярных ионов этих пептидов также на порядок выше. Это связано, по-видимому, с большей реакционной способностью 2-бromoацетамида при взаимодействии с тиольными остатками цистеина после восстановления дисульфидных связей БСА, поэтому в дальнейшем в качестве оптимального реагента для проведения алкилирования в ходе пробоподготовки БСА к анализу использовали 2-бromoацетамид.

Для изучения влияния излучения на структурные характеристики необходимо оценить содержание нативного белка БСА. Для этого следует убедиться в том, что белок присутствует в активной форме в растворе. Аминокислотная последовательность БСА содержит 607 аминокислот и состоит из трех доменов [29], поэтому для идентификации выбрали такие три уникальных пептида (LVNELTEFAK (T66-75), HLVDEPQNLIK (T402-412) и QTALVELLK (T549-557)), которые присутствуют в одном из трех доменов БСА и имеют наибольшую площадь хроматографического пика при его детектировании (табл. 1). Так, пептид LVNELTEFAK находится в положении 66–75 (I^A домен), пептид HLVDEPQNLIK – в положении 402–412 (II^B–III^A домен) и QTALVELLK – в положении 549–557 (III^B домен). Присутствие этих трех маркеров БСА в пробе после процедуры

трипсинолиза указывает на то, что образец БСА находится в активной форме.

Следующим этапом работы являлась оптимизация условий детектирования выбранных трех маркеров БСА. Использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительных ионов, поскольку образующиеся в результате ферментативного гидролиза БСА пептиды в своем составе имеют аминогруппы, отвечающие за образование протонированных положительно заряженных молекул в ходе ионизации. Условия масс-спектрометрического детектирования оптимизировали в режиме прямого ввода исходного раствора БСА после стадии ферментативного гидролиза трипсином непосредственно в источник ионов, минуя хроматографическую колонку. Изучили влияние напряжения источника ионизации в диапазоне от 2500 до 4500 В на величину сигнала протонированных молекулярных ионов специфических пептидов БСА. При этом использовали параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы – автотюнинга. Установили, что при увеличении напряжения источника ионизации с 3500 до 4500 В интенсивность сигналов увеличивается на 20–30 %, однако при этом величина шума возрастает на 50 %, поэтому в качестве оптимального напряжения источника ионизации выбрали значение 3500 В.

Далее выбирали оптимальные пары ионных реакций при определении исследуемых маркеров БСА. На рис. 1 представлены масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов выбранных пептидов БСА, полученные в режиме высокого разрешения. Видно, что в масс-спектрах имеется большое количество фрагментных ионов, что характерно для фрагментации многозарядных пептидов (все исследуемые пептиды в ходе ионизации образуют многозарядные ионы). Для подтверждения присутствия маркеров БСА применяли две выбранные ионные реакции для каждого пептида, используя ионы-фрагменты с максимальной интенсивностью сигнала в масс-спектре фрагментации. После выбора характерных пар фрагментных ионов исследовали влияние энергии фрагментации на величину аналитического сигнала этих ионов. Установили, что интенсивность сигналов выбранных ионных реакций при исследовании пептидов БСА после трипсинолиза максимальна при энергии фрагментации 28 В. Характеристики ионных реакций, выбранных для подтверждения присутствия трех уникальных пептидов БСА, представлены в табл. 3. Время сканирования при детектировании каждой выбранной ионной реакции составило 54 мс.

Таблица 1. Характеристики уникальных пептидов бычьего сывороточного альбумина, присутствующие в модельном водном растворе после трипсинолиза с использованием в качестве алкилирующего реагента 2-бromoацетамида* (величина стандартного отклонения при измерении площади пика не более 20 %, $n = 3$)

Аминокислотная последовательность	Домен	Заряд иона	Значение m/z иона-предшественника, Да	Время удерживания, мин	Площадь пика, $S \times 10^{-8}$
DTHKSEIAHR	I ^A	3	398.53909	1.02	3.7
TcVADESHAGcEK	I ^A	2	732.29803	2.09	1.9
TPVSEKVTK	III ^A	2	494.78870	2.70	42
DTHKSEIAHRFK	I ^A	4	367.94662	3.71	100
LRcASIQK	I ^B –II ^A	3	325.85150	3.92	12
SHcIAEVEK	II ^A	2	536.75867	6.04	20
EccDKPLLEK	II ^A	3	431.20593	8.43	1.5
DLGEEHFK	I ^A	2	487.73254	8.77	4.4
YIcDNQDTISSK	II ^A	2	722.32422	8.95	23
LKEccDKPLLEK	II ^A	2	766.89355	9.62	3.2
VHKEccHGDLLEcADDR	II ^A	2	1057.44360	10.06	0.26
FKDLGEEHFK	I ^A	3	417.21249	11.02	41
AEFVEVTK	II ^A	2	461.74796	11.12	210
LcVLHEKTPVSEK	III ^A	2	770.41278	11.42	1.0
YIcDNQDTISSKLLK	II ^A	2	842.91620	12.49	0.53
LcVLHEKTPVSEKVTK	III ^A	2	934.51831	11.79	0.49
EAcFAVEGPK	III ^B	2	554.26031	11.89	2.7
YNGVFQEcQAEDK	I ^B	2	874.35724	11.99	0.52
ccAADDKEAcFAVEGPK	III ^B	3	643.27094	12.39	4.8
LAKEYEATLEeccAK	II ^B	3	605.61377	12.43	0.37
VHKEccHGDLLEcADDRADLAK	II ^A	2	1306.58142	12.75	0.15
QEPERNEcFLSHKDDSPDLPK	I ^A	3	847.72919	12.86	0.85
NEcFLSHKDDSPDLPK	I ^A	2	951.43817	13.22	0.79
EccHGDLLEcADDRADLAK	II ^A	3	749.98840	14.03	0.26
HLVDEPQNLIK	II ^B –III ^A	2	653.36328	14.38	110
LKHLVDEPQNLIK	II ^B –III ^A	3	516.30347	14.54	4.9
LKPDPNTLcDEFKADEK	I ^A	2	1010.48865	15.49	6.8
LKPDPNTLcDEFKADEKK	I ^A	2	1074.53479	14.80	0.44
LVVSTQTALA	III ^B	2	501.79605	15.06	89
LKPDPNTLcDEFK	I ^A	2	788.88977	15.52	1.6
ADLAKYIcDNQDTISSK	II ^A	2	971.46295	15.69	0.30

Таблица 1. Окончание

Аминокислотная последовательность	Домен	Заряд иона	Значение m/z иона-предшественника, Да	Время удерживания, мин	Площадь пика, $S \times 10^{-8}$
LKHLVDEPQNLIKQNCQDFEK	II ^B –III ^A	4	649.83679	15.78	1.5
HLVDEPQNLIKQNCQDFEK	II ^B –III ^A	2	1178.07336	15.92	2.1
RHPEYAVSVLLR	II ^B	3	480.60941	16.70	210
RPcFSALTPDETYVVK	III ^A	2	940.96490	17.06	9.4
KQTALVELLK	III ^B	2	571.86200	17.50	140
LVNELTEFAK	I ^A	2	582.32019	17.57	180
SLHTLFGDELcK	I ^A	2	710.34882	18.10	13
HPEYAVSVLLR	II ^B	2	642.35986	18.23	7.0
LFTFHADIC ₁ TLPDTEKQIKK	III ^B	3	802.42090	19.14	0.43
QTALVELLK	III ^B	2	507.81442	19.75	160
LFTFHADIC ₁ TLPDTEKQIK	III ^B	2	1139.08496	20.26	0.28
LFTFHADIC ₁ TLPDTEK	III ^B	2	954.46509	20.52	8.7
DAIPENLPPLTADFAEDKDVcKNYQEAk	II ^B	3	1064.51123	20.74	5.9
DAIPENLPPLTADFAEDKDVcK	II ^B	2	1229.59668	21.36	0.95
RHPYFYAPPELLYYANK	I ^B	2	1023.02032	21.58	5.7
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	II ^A	3	1003.82428	22.11	0.34
DAIPENLPPLTADFAEDK	II ^B	2	978.48376	22.19	8.2
AFDEKLFTFHADIC ₁ TLPDTEK	III ^B	2	1249.60571	22.27	0.18
QNcDQFEKLGEGYGFQNALIVR	II ^B –III ^A	3	843.74603	22.87	1.0
HPYFYAPPELLYYANK	I ^B	2	944.96838	23.05	2.0
MPcTEDYLSLILNR	III ^A	2	862.92102	25.83	1.1
RHPYFYAPPELLYYANKYNGVFQeccQAEDK	I ^B	3	1258.57361	24.14	0.095
NYQEAkDAFLGSFLYEYSR	II ^B	2	1151.04285	24.53	0.30
HLVDEPQNLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVR	II ^B –III ^A	3	1272.64185	24.82	0.14
DAFLGSFLYEYSR	II ^B	2	784.37744	25.10	43
AEFVEVTKLVTDLTK	II ^A	2	846.97058	25.38	0.075
DDPHAcYSTVFDKLLKHLVDEPQNLIK	II ^B –III ^A	4	771.38910	25.71	0.23
DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLR	II ^B	4	747.88965	27.39	0.18
FKDLGEEHFkGLVLIAFSQYLQcPFDEHVk	I ^A	3	1241.62695	28.21	0.036
DLGEEHFkGLVLIAFSQYLQcPFDEHVk	I ^A	4	862.68195	29.34	0.012
GLVLIAFSQYLQcPFDEHVkLVNELTEFAK	I ^A	4	909.97833	31.60	0.050

*Каждый остаток цистеина в полученных пептидах присутствует в форме карбамидометильного производного.

Таблица 2. Характеристики уникальных пептидов бычьего сывороточного альбумина, присутствующие в модельном водном растворе после трипсинолиза с использованием в качестве алкилирующего реагента иодуксусной кислоты (величина стандартного отклонения при измерении площади пика не более 20 %, $n = 3$)

Аминокислотная последовательность	Домен	Заряд иона	Значение m/z иона-предшественника, Да	Время удерживания, мин	Площадь пика, $S \times 10^{-7}$
TcVADESHAGcEK	I ^A	2	733.28088	4.03	0.50
FKDLGEEHFK	I ^A	3	417.21048	14.70	280
LcVLHEKTPVSEK	III ^A	2	770.90448	12.35	0.94
LcVLHEKTPVSEKVTK	III ^A	2	935.01141	12.51	0.39
YIcDNQDTISSKLIK	II ^A	2	843.40698	13.22	0.45
QEPERNEcFLSHKDDSPDLPK	I ^A	3	848.05682	13.45	1.1
NEcFLSHKDDSPDLPK	I ^A	3	634.95569	13.93	5.7
HLVDEPQNLIK	II ^B –III ^A	2	653.36340	14.43	580
LKHLVDEPQNLIK	II ^B –III ^A	2	773.95227	14.53	5.5
LKPDPNTLcDEFKADEK	I ^A	2	1010.98206	16.52	7
HLVDEPQNLIKQNCdQFEK	II ^B –III ^A	3	786.04584	16.69	14
RHPEYAVSVLLR	II ^B	3	480.60928	16.70	1500
VPQVSTPTLVEVSR	III ^A	2	756.42688	17.10	48
LVNELTEFAK	I ^A	2	582.31989	25.16	1100
KQTALVELLK	III ^B	2	571.86157	17.51	880
DDPHAcYSTVFDKLIK	II ^B –III ^A	3	599.61115	17.72	4.1
SLHTLFGDELcK	I ^A	3	474.23187	18.79	30
LGEYGFQNAILVR	III ^A	2	740.40289	20.59	1400
RHPEYAVSVLLRLAK	II ^B	4	438.76288	20.84	0.73
LFTFHADICtLPDTEK	III ^B	2	954.95801	21.24	11
RHPYFYAPELlyYANK	I ^B	2	1023.02136	21.59	32
DAIPENLPPLTADFAEDK	II ^B	3	652.65796	22.20	7.9
HPYFYAPELlyYANK	I ^B	2	944.96667	23.08	6.5
TVMENFVAFVDK	III ^B	2	700.35095	23.60	6.4
DAFLGSFLYEYSR	II ^B	2	784.37708	25.13	300
NYQEAKDAFLGSFLYEYSR	II ^B	3	767.69965	24.44	2.6
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	I ^A	3	831.75134	28.77	2.0
ATEEQLKTVMENFVAFVDK	III ^B	3	733.70557	29.36	0.20
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVKLVNELTEFAK	I ^A	4	910.22015	31.94	0.062

*Каждый остаток цистеина в полученных пептидах присутствует в форме карбоксиметильного производного.

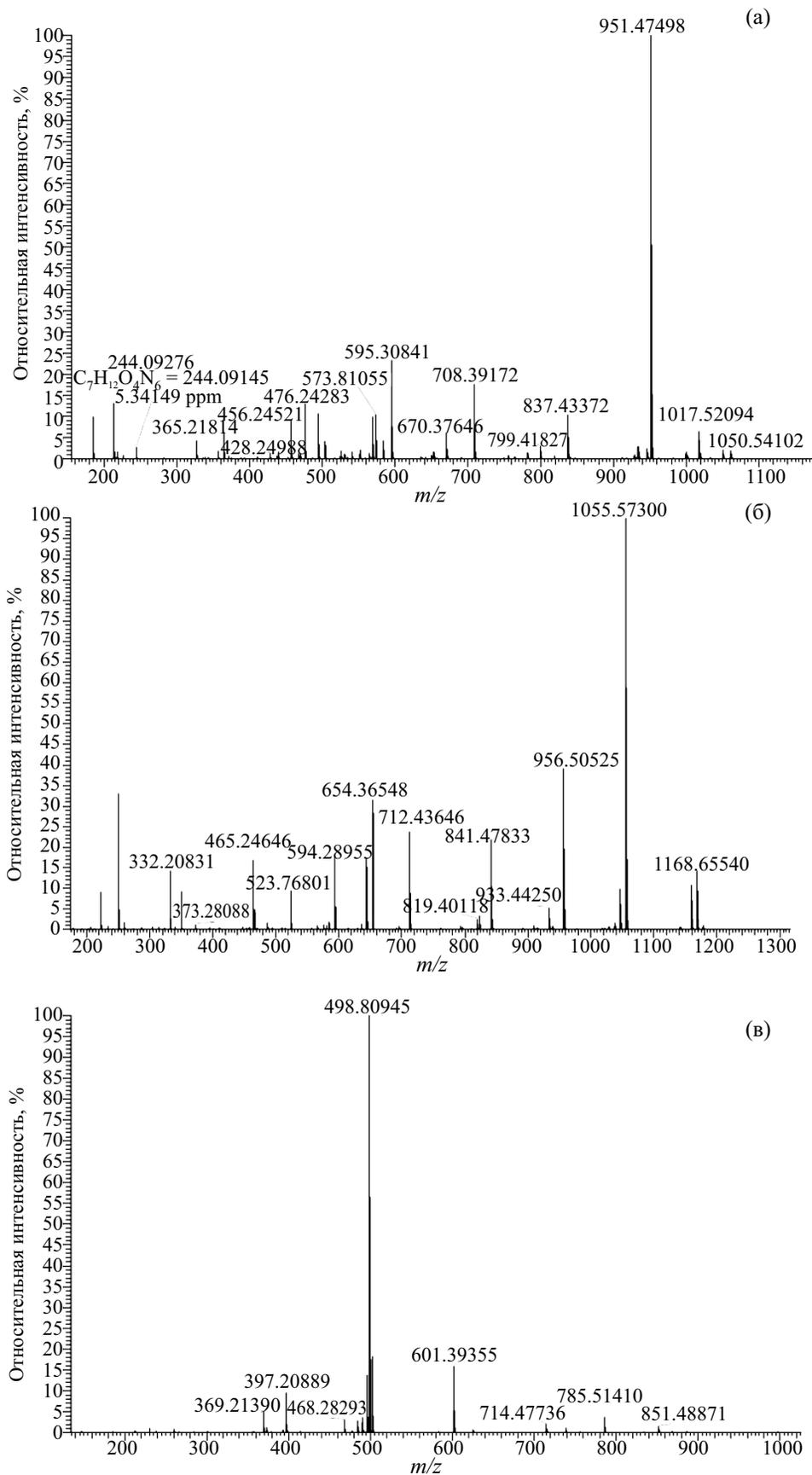


Рис. 1. Масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов пептидов, выбранных для обнаружения БСА после трипсинолиза в режиме регистрации положительно заряженных ионов: (а) – пептид Т66–75 (заряд иона-предшественника 2+); (б) – пептид Т402–412 (заряд иона-предшественника 2+); (в) – Т549–557 (заряд иона-предшественника 2+).

Таблица 3. Характеристики уникальных пептидов бычьего сывороточного альбумина, используемых для оценки его содержания в модельных растворах

Пептид	Точное значение m/z иона-предшественника	Аминокислотная последовательность предшественника	Выбранные ионные реакции
T66-75	582.3190	LVNELTEFAK	1. m/z 582.32 \rightarrow m/z 951.4749 2. m/z 582.32 \rightarrow m/z 595.3084
T402-412	653.3617	HLVDEPQNLIK	1. m/z 653.36 \rightarrow m/z 1055.5730 2. m/z 653.36 \rightarrow m/z 956.5053
T549-557	507.8134	QTALVELLK	1. m/z 507.81 \rightarrow m/z 498.8095 2. m/z 507.81 \rightarrow m/z 601.3936

Хроматографическое разделение и критерии оценки содержания. В методе ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения назначение хроматографической системы и требования, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. Масс-спектрометр высокого разрешения позволяет регистрировать строго специфический параметр каждого определяемого соединения – набор отношений значений m/z образующихся ионов. При работе в режиме мониторинга выбранных ионных реакций для большинства соединений не возникает необходимости полного хроматографического разделения компонентов смеси, поскольку набор выбранных ионных реакций для каждого соединения специфичен, и влияние сигнала от посторонних компонентов на сигнал аналита в этом случае ничтожно мало. Кроме того, подвижная фаза в варианте ВЭЖХ-МС может содержать только летучие компоненты.

Пептиды, образующиеся в результате ферментативного гидролиза БСА, обладают кислотными свойствами, поэтому для увеличения доли незаряженных частиц данных веществ и уменьшения размывания хроматографических пиков использовали подвижную фазу, состоящую из 0.1 %-ного раствора муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрила (Б). Поскольку использовали режим регистрации положительно заряженных ионов, присутствие муравьиной кислоты в подвижной фазе способствовало увеличению доли положительно заряженных ионов в камере ионизации за счет протонирования аминокислотных групп пептидов. Величины времен удерживания t_R , коэффициентов емкости k и эффективности N хроматографической колонки для выбранных аналитов в выбранных условиях разделения представлены в табл. 4.

При оценке содержания БСА в пробе предельно необходимо его идентифицировать. В качестве критериев установления присутствия БСА в водных пробах после облучения

Таблица 4. Хроматографические параметры разделения уникальных пептидов бычьего сывороточного альбумина ($t_0 = 1.1$ мин)

Пептид	t_R , мин	k	N , ТТ/м
T66-75	17.6 ± 0.2	15.0	240 000
T402-412	14.4 ± 0.2	12.1	202 000
T549-557	19.8 ± 0.2	17.0	266 000

использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных реакций для каждого из уникальных пептидов. Содержание БСА в пробе оценивали по площади пика молекулярного иона каждого уникального пептида и по его точному значению m/z (в табл. 3 соответствующее значение m/z иона-предшественника) – для пептида T66–75 – m/z 582.3190, для пептида T402–412 – m/z 653.3617, для пептида T549–557 – m/z 507.8134.

Предел обнаружения и оценка влияния рентгеновского облучения. В выбранных условиях анализировали контрольные водные растворы БСА, не подвергшиеся воздействию рентгеновского облучения, с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 и 10 мкг/мл. Факт присутствия нативного белка БСА в пробах считали надежно доказанным при обнаружении трех выбранных пептидов БСА (табл. 3).

Предел обнаружения рассчитывали при условии соблюдения соотношения интенсивности сигналов пиков маркеров БСА и величины шума $S/N > 5$ для каждого из пептидов. Оказалось, что предел обнаружения БСА при идентификации с использованием пептидов T66–75, T402–412 и T549–557 ограничен значением 0.1 мкг/мл.

После облучения возможна денатурация белка с разрывом амидных связей между аминокислотами и образование низкомолекулярных пептидов, поэтому на первом этапе пробоподготовки проводили фильтрацию через фильтр

Amicon 0.5 мл с отсечкой по массам 30 кДа для того, чтобы избавиться от низкомолекулярных продуктов разложения, которые могут давать ложноположительные результаты в ходе идентификации после процедуры трипсинолиза. Далее выполняли описанную выше процедуру денатурации белка и трипсинолиза, после чего восстанавливали дисульфидные связи цистеин-цистеин молекулы БСА и алкилировали образующиеся тиольные остатки 2-бромацетамидом, полученную смесь пептидов анализировали. В первую очередь устанавливали факт присутствия выбранных уникальных пептидов БСА и оценивали содержание БСА по каждому из них. При этом содержание БСА в пробе после облучения нормировали относительно контрольного водного раствора 35 мг/мл БСА, не подвергнутого радиационному облучению. Результаты исследования влияния рентгеновского облучения на содержание уникальных пептидов в образцах раствора БСА представлены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты оценки содержания бычьего сывороточного альбумина в пробах после рентгеновского облучения с мощностью дозы 2 Гр/с ($n = 3$)

Доза облучения, кГр	$c_{\text{отн T35-44}} (s_r), \%$	$c_{\text{отн T402-412}} (s_r), \%$	$c_{\text{отн T548-556}} (s_r), \%$
0 (контроль)	100	100	100
0.1	105 (8)	105 (10)	110 (2)
0.5	98 (8)	90 (4)	97 (12)
1	95 (2)	87 (8)	95 (13)
2	91 (13)	87 (26)	89 (5)
4	67 (19)	67 (9)	68 (2)
8	66 (3)	73 (10)	69 (7)

* $c_{\text{отн пептид X}} = 100 \% \times S_{\text{обл}}/S_{\text{контр}}$ — отношение площади пика иона, выбранного для оценки содержания соответствующего пептида к площади пика данного пептида в контрольной водной пробе БСА, не подвергнутой радиационному облучению.

На рис. 2 приведена диаграмма относительных концентраций идентифицированных уникальных пептидов T35–44, T2402–412, T549–557 для доз облучения 0–8 кГр. Из экспериментальных данных видно, что с увеличением дозы рентгеновского излучения концентрация уникальных пептидов в водном растворе уменьшается, а следовательно, уменьшается и концентрация нативного (неповрежденного) белка БСА. При радиационном воздействии со средней мощностью

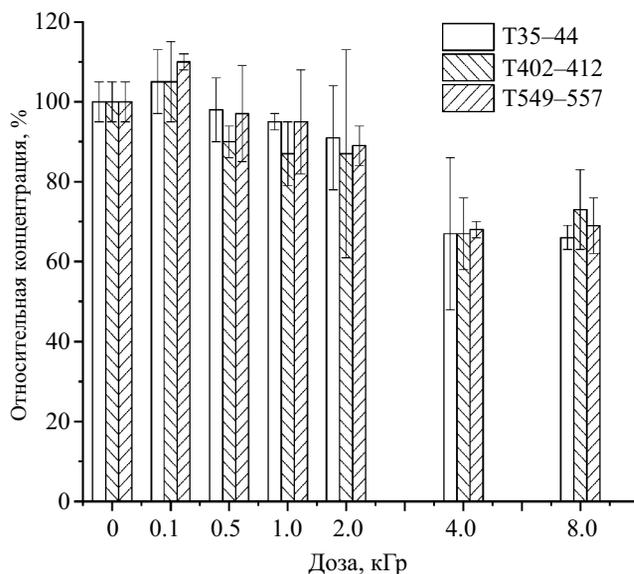


Рис. 2. Диаграмма относительной концентрации идентифицированных уникальных пептидов для доз облучения 0–8 кГр при мощности дозы рентгеновского излучения 2 Гр/с.

2 Гр/с при дозе 4 кГр наблюдается значимое уменьшение содержания активной формы БСА в водном растворе, соответствующее уменьшению на 30 % по сравнению с контрольными образцами. Вероятно, это связано с денатурацией белка в результате разрыва пептидных связей молекулы с образованием низкомолекулярных фрагментов. Такие же результаты наблюдаются при дозе облучения 8 кГр.

Важным направлением данного исследования являлось изучение модификаций аминокислотной последовательности БСА после рентгеновского излучения. Для этого устанавливали аминокислотные остатки в окисленной форме в фильтрате после проведения трипсинолиза. Сравнивали каждый образец, подвергшийся воздействию облучением, с контрольным образцом сравнения. Поиск модификаций проводили по наличию сдвига значения m/z на величину +15.9949 Да, что соответствует процессу окисления. Именно процесс окисления выбрали в качестве возможного побочного процесса при воздействии рентгеновского излучения на молекулу БСА, поскольку в растворе возможно образование свободных радикалов, которые могут окислять аминокислотные группы. В результате сравнительного анализа удалось установить наличие окисленной формы аспарагиновой кислоты в положениях ^{182}Asn , ^{341}Asn , ^{409}Asn и ^{428}Asn аминокислотной последовательности БСА при воздействии рентгеновского облучения с дозой 8 кГр. Отсутствие таких модификаций аспарагина при воздействии меньших доз

и в контрольном образце сравнения позволяет предположить, что окисление происходит в процессе воздействия рентгеновского облучения на БСА, а не на этапе пробоподготовки.

* * *

Разработан и опробован в водных образцах бычьего сывороточного альбумина способ идентификации и оценки содержания активной формы БСА методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, который характеризуется высокой чувствительностью (0.1 мкг/мл БСА) и специфичностью при изучении влияния радиационного облучения на структурные характеристики белка. Способ основан на предварительной денатурации и разложении пробы белка трипсином с последующим восстановлением дитиотреитолом и алкилированием 2-бromoацетамидом. В рамках данной работы обнаружено влияние ионизирующего излучения на модификации аминокислотной последовательности БСА – в результате воздействия происходит окисление ряда аминокислот белка. Впервые получены данные о влиянии рентгеновского облучения на структурные характеристики белка в растворе БСА, облученном при средней мощности 2 Гр/с дозами 0.1, 0.5, 1, 2, 4 и 8 кГр способом, описанном выше. Данный метод позволил выявить значимое уменьшение содержания нативного белка БСА в пробах при дозах облучения 4 и 8 кГр. В результате сравнительного анализа удалось установить наличие окисленной формы аспарагиновой кислоты в положениях ¹⁸²Asn, ³⁴¹Asn, ⁴⁰⁹Asn и ⁴²⁸Asn аминокислотной последовательности БСА при воздействии рентгеновского облучения с дозой 8 кГр.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела электромагнитных процессов и взаимодействия атомных ядер Научно-исследовательского института ядерной физики МГУ им. Д.В. Скобельцына Шведунову В.И. и Юрову Д.С. за возможность проведения облучений на ускорителе УЭЛР-1-25-Т-001.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №22-63-00075.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черняев А.П. Радиационные технологии. Наука. Народное хозяйство. Медицина. М.: Издательство Московского университета, 2019. С. 231.
2. Черняев А.П., Колыванова М.А., Борщеговская П.Ю. Радиационные технологии в медицине. Часть 1. Медицинские ускорители // Вестн. Моск. ун-та. Серия 3: Физика, астрономия. 2015. № 6. С. 28. (Chernyaev A.P., Kolyvanova M.A., Borshchegovskaya P.Yu. Radiation technology in medicine. Part 1. medicine accelerators // Moscow Univ. Phys. Bull. 2015. V. 70. № 6. P. 457.)
3. ISO 11137-3-2006 Sterilization of health care products Radiation Part 3: Guidance on dosimetric aspects. Стерилизация медицинской продукции. Облучение. Часть 3. Руководство по вопросам дозиметрии.
4. ISO 14470-2011 Food irradiation – Requirements for the development, validation and routine control of the process of irradiation using ionizing radiation for the treatment of food. Радиационная обработка пищевых продуктов. Требования к разработке, валидации и повседневному контролю процесса облучения пищевых продуктов ионизирующим излучением.
5. Zhang Rong Ke, Lyu Jia Hua, Li Tao. Effects of radiation on protein // J. Nutr. Oncol. 2020. V. 5. № 3. P. 116. <https://doi.org/10.34175/jno202003002>
6. Пузан Н.Д., Чешик И.А. Молекулярные механизмы действия ионизирующего излучения. Влияние облучения на белок (обзор литературы) // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2023. № 1. С. 14. (Puzan N.D., Cheshik I.A. Molecular mechanisms of effects of ionizing radiation action. Irradiation effect on protein (literary review) // Medical and Biological Problems of Life Activity. 2023. № 1. P. 14 (in Russ.)) [https://doi.org/10.58708/2074-2088.2023-1\(29\)-14-26](https://doi.org/10.58708/2074-2088.2023-1(29)-14-26)
7. Тумакова Р.Т. Влияние ионизирующего излучения на биологическую ценность белков говядины // Пищевая промышленность. 2020. № 5. С. 12.
8. Rozhko T.V., Nemtseva E.V., Gardt M.V., Raikov A.V., Lisitsa A.E., Badun G.A., Kudryasheva N.S. Enzymatic responses to low-intensity radiation of tritium // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 22. P. 1. Article 8464. <https://doi.org/10.3390/ijms21228464>
9. Adibian M., Mami Y. Effect of electron-beam irradiation on enzyme activities in *Agaricus brunnescens* // J. Pure Appl. Microbiol. 2018. V. 12. № 3. P. 1435. <https://doi.org/10.22207/JPaM.12.3.46>
10. Павлов А.Н., Чиж Т.В., Снегирев А.С., Санжарова Н.И., Черняев А.П., Борщеговская П.Ю. и др. Технологический процесс радиационной обработки пищевой продукции и дозиметрическое обеспечение // Радиационная гигиена. 2020. Т. 13. № 4. С. 40. <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2020-13-4-40-50>

11. *Giroux M., Lacroix M.* Nutritional adequacy of irradiated meat – A review // *Food Res. Int.* 1998. V. 31. № 4. С. 257.
12. *Дриль А.А., Рождественская Л.Н.* Повышение биологической ценности белка и увеличение сроков хранения полуфабриката из вешенки обыкновенной методом электронной стерилизации // *Изв. вузов. Прикл. химия и биотехнология.* 2019. Т. 9. № 3. С. 500.
13. *Zhao L., Zhang Y., Pan Z., Venkitasamy C., Zhang L., Xiong W. et al.* Effect of electron beam irradiation on quality and protein nutrition values of spicy yak jerky // *LWT.* 2017. № 87. P. 1.
14. *Zarei H., Bahreinipour M., Eskandari K., Eskandari K., Zarandi S.-M., Ardestani S.* Spectroscopic study of gamma irradiation effect on the molecular structure of bovine serum albumin // *Vacuum.* 2016. № 136. P. 91.
15. *Liu G.X., Liu J., Tu Z.C., Sha X.M., Wang H., Wang Z.X.* Investigation of conformation change of glycated ovalbumin obtained by Co-60 gamma-ray irradiation under drying treatment // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2018. № 47. P. 286.
16. *Liu Y.-F., Oey I., Bremer P., Carne A., Silcock P.* Modifying the functional properties of egg proteins using novel processing techniques: A review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2019. V. 18. № 4. P. 986. 10.1111/1541-4337.12464
17. *Olsen J.V., Ong S.E., Mann M.* Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3. № 6. P. 608. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>
18. *Keil B.* Proteolysis data bank: Specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages // *Protein Seq. Data Anal.* 1987. V. 1. № 1. P. 13.
19. *Walmsley S.J., Rudnick P.A., Liang Y., Dong Q., Stein S.E., Nesvizhskii A.I.* Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics // *J Proteome Res.* 2013. V. 12. № 12. P. 5666. <https://doi.org/10.1021/pr400611h>
20. *Saveliev S., Bratz M., Zubarev R., Szapacs M., Budamgunta H., Urh M.* Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 11. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.371>
21. *Браун А.В., Близнюк У.А., Борщеговская П.Ю., Ипатов В.С., Хмелевский О.Ю., Черняев А.П. и др.* Исследование влияния ускоренных электронов на структурные характеристики бычьего сывороточного альбумина с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2023. Т. 89. № 3. С. 14.
22. *Sam K.C. Chang, Yan Zhang.* Protein analysis / *Food Analysis.* New York: Springer. 2017. P. 315. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18
23. *Марри П., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.* Биохимия человека. М.: Мир, 1993. Т. 1. С. 384. ISBN 5-03-001774-7
24. *Gonzalez V.D., Gugliotta L.M., Giacomelli C.E., Meira G.R.* Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. № 19. С. 789.
25. *Doumas B.T., Bayse D.D., Carter R.J., Peters T., Schaffer R.* A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation // *Clin. Chem.* 1981. V. 27. № 10. P. 1642.
26. *Francis G.* Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications // *Cyto-technology.* 2010. № 62. P. 1.
27. *Спектрофотометр УФ-3000.* <https://istina.msu.ru/equipment/card/615320740/> (дата обращения сентябрь 2024).
28. *Swissprot.* Swiss Institute of Bioinformatics: Geneva, Switzerland. <http://www.uniprot.org/contact> (дата обращения 17.01.2018).
29. *Huang B.X., Kim H.Y., Dass C.* Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. № 15. P. 1237.

STUDY OF THE EFFECT OF X-RAY RADIATION ON THE STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF BOVINE SERUM ALBUMIN PROTEIN USING HIGH-RESOLUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

A. V. Brown^a, U. A. Bliznyuk^{b, c}, P. Yu. Borshchegovskaya^{b, c}, V. S. Ipatova^c,
A. P. Chernyaev^{b, c}, I. A. Ananyeva^a, I. A. Rodin^{a, d, *}

^aLomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia

^bLomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, Russia

^cSkobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Moscow, Russia

^dI.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

*E-mail: igorrodin@yandex.ru

Abstract. A method for assessing changes in the structural characteristics of bovine serum albumin (BSA) protein in aqueous solution as a result of exposure to ionizing radiation has been developed and tested. The method consists of identifying unique peptides of the protein domain structures, as well as establishing amino acid sequence modifications using high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry. The BSA solution was irradiated with X-ray radiation with a tube voltage of 80 kV and an average current of 1 mA, the dose rate was 2 Gy/sec. The absorbed dose in the sample volume was estimated by the ferrosulfate dosimetry method. Aqueous solution of BSA was irradiated at doses of 0.1, 0.5, 1, 2, 4, and 8 kGy, after which the content of protein molecules in the solution was quantitatively assessed and the structural integrity of the native form of protein was analyzed, as well as the modifications of amino acids in the BSA sequence as a result of the radiation action were determined. For more in-depth analysis, the reduction of cysteine-cysteine disulfide bonds by BSA followed by alkylation of the resulting thiol residues with bromoacetic acid amide was performed. Enzymatic hydrolysis of BSA was carried out with the addition of trypsin solution. The obtained samples were analyzed by high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry with high-resolution tandem mass spectrometric detection. Next, we evaluated the change in the number of intact protein molecules by detecting unique peptides corresponding to each of the three domains that make up the amino acid sequence of BSA. The detection limit of each peptide was calculated taking into account the optimization of conditions for detection of the three domains as markers of the active form of BSA. The developed approach made it possible to determine the change in the natural conformation of bovine serum albumin protein (its denaturation) in aqueous samples as a result of ionizing radiation exposure at doses of 4-8 kGy at an average power of 2 Gy/sec.

Keywords: high-resolution mass spectrometry, high-performance liquid chromatography, X-ray, radiation treatment, bovine serum albumin, BSA peptides, protein disulfide bond reduction and alkylation.