

*На правах рукописи*

**МЕЛЬНИКОВ Игорь Олегович**

**РАЗРАБОТКА МИКРОМЕТОДОВ АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ,  
КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОФ ВЭЖХ И КАПИЛЛЯРНОГО  
ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

**Специальность: 02.00.02 – Аналитическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

**МОСКВА 2006**



Диссертационная работа выполнена на кафедре аналитической химии Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова и в группе аналитической химии белка института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

*Научный руководитель:*

кандидат химических наук, доцент  
Глубоков Юрий Михайлович

*Официальные оппоненты:*

доктор химических наук, профессор  
Макаров Николай Васильевич  
кандидат химических наук  
Кириллова Юлия Геннадьевна

*Ведущая организация:*

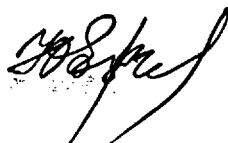
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Защита состоится 20 декабря 2006 года в 12<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета Д 212.120.05 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, проспект Вернадского, д. 86, ауд. М-119.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «15» ноября 2006 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Ю.А. Ефимова

**Актуальность работы.** В настоящее время клинические исследования все больше ориентируются на использование инструментальных микрометодов анализа для диагностики наиболее распространенных и опасных социально-значимых заболеваний. Значительная часть этих методов не полностью и не всегда обеспечивает своевременное и качественное их диагностирование, что часто не отвечает современным требованиям мониторинга биохимического статуса человека.

Свободные аминокислоты и короткие пептиды, входящие в состав физиологических жидкостей, имеют важное функциональное значение. В ряде случаев они могут выступать в роли молекулярных маркеров определенных заболеваний. Изменение их концентрации часто связано с метаболическими нарушениями, которые свидетельствуют о развитии того или иного заболевания. Большинство существующих методов аминокислотного анализа является либо недостаточно чувствительными и селективными для их идентификации, либо требуют дериватизации аминокислот, что существенно усложняет процесс их определения. Проблема простого и экономичного анализа свободных генетически кодируемых аминокислот до сих пор до конца не решена. В то же время клинический анализ аминокислот требует их пред- или постколоночной модификации для высокочувствительного и селективного определения. Изменение содержания молекулярных маркеров в физиологических жидкостях может быть связано также с генетической предрасположенностью пациента к конкретному заболеванию. Отсюда следует необходимость проведения сравнительного анализа фрагментов ДНК с целью повышения достоверности определения причины исследуемого заболевания и более эффективной его терапии.

Между тем необходимая для аминокислотного и нуклеотидного анализа аппаратура импортного производства, как правило, является дорогостоящей и малодоступной для большинства клинических лабораторий. Ситуация усугубляется еще и тем, что многие приборы являются узкоспециализированными для каждого вида заболевания, вследствие чего наблюдается множественное дублирование диагностических методов как по аппаратуре, так и по методологии. Это резко повышает стоимость клинических исследований и усложняет сравне-

---

\* Автор выражает благодарность руководителю группы аналитической химии белка ИБХ РАН ст.н.с., к.х.н. И.В. Назимову за постоянную помощь, внимание и обсуждение результатов.

ние полученных результатов анализа. Таким образом, разработка новых методик, расширяющих возможности использования общедоступного аналитического оборудования отечественного производства для высокочувствительного экспрессного и надежного определения свободных и модифицированных аминокислот, коротких пептидов и олигонуклеотидов как для структурного анализа биополимеров и их фрагментов, так и в клинико-диагностических целях является актуальной научной задачей.

**Цель работы.** Целью диссертационной работы является разработка комплекса инструментальных высокочувствительных микрометодов анализа свободных и модифицированных аминокислот, коротких пептидов и олигонуклеотидов с использованием отечественной инструментальной базы.

#### **Научная новизна.**

1. Разработаны методики определения не модифицированных генетически кодируемых  $\alpha$ -аминокислот с использованием методов капиллярного зонального электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии с прямым УФ-фотометрическим и рефрактометрическим способами детектирования.
2. Разработаны и применены в клинической практике методики совместного определения низкомолекулярных аминотиолов в плазме крови с использованием методов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного зонального электрофореза с флуориметрическим и прямым УФ-фотометрическим способами детектирования.
3. Разработана методика определения фрагментов мутантного гена венозных тромбозов на основе анализа продуктов аллель-специфичной полимеразной цепной реакции методом капиллярного гель-электрофореза с флуориметрическим детектированием.

**Практическая значимость.** Разработанный метод аминокислотного анализа позволяет определять микроколичества генетически кодируемых аминокислот без их предварительной дериватизации, что существенно упрощает существующую схему анализа. Разработан и предложен для практического использования комплекс методов анализа молекулярных маркеров сосудистых катастроф (гомоцистеин, цистеин, глутатион), а также фрагментов мутантного гена венозных тромбозов. В результате проведенной работы удалось показать

возможность эффективного использования отечественной аппаратуры для проведения биохимического анализа как белковых, так и нуклеиновых компонентов на одном и том же приборе для капиллярного электрофореза. Определение серосодержащих аминокислот и пептидов в плазме крови по разработанной в данной работе методике использовали для оценки фактора риска десятков пациентов с достоверно установленным инфарктным и предынфарктным состоянием. Результаты проведенной работы использованы при создании и апробировании в практике биомедицинского анализа универсального экономичного автоматизированного комплекса приборов и методов молекулярной диагностики некоторых социально-значимых заболеваний (инфаркты, инсульты, тромбозы), разрабатываемого в институте аналитического приборостроения РАН.

**На защиту выносятся:**

- способы определения генетически кодируемых аминокислот в водном растворе без их предварительной дериватизации с использованием капиллярного зонального электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии;
- оптимизированные условия дериватизации низкомолекулярных аминокислот плазмы с использованием флуорогенных реагентов (монобромобиман и 5-нодоацетамидофлуоресцеин);
- методика анализа низкомолекулярных аминокислот плазмы крови с использованием ОФ ВЭЖХ и капиллярного электрофореза;
- результаты определения содержания гомоцистеина в плазме крови методами ОФ ВЭЖХ и капиллярного зонального электрофореза;
- способ определения мутантного гена венозных тромбозов с использованием капиллярного гель-электрофореза в линейном поли- $N,N'$ -диметилакриламиде.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на 8-м Всероссийском симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу (15-19 октября 2001 г. Москва, Россия), 3-м Международном симпозиуме по методам разделения в бионауках (13-18 мая 2003 г., Москва, Россия), Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005» (Секция химия. 12-15 апреля 2005 г., Москва,

Россия), 2-ой научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии» (12-14 сентября 2005 г., Анапа, Россия), 3-м съезде общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (25-27 октября 2005 г., Москва, Россия), 1-ой конференции молодых ученых МИТХТ им. М.В. Ломоносова (13-14 октября 2005 г., Москва, Россия), Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (25-30 июня 2006 г., Москва, Россия), 31-м Международном конгрессе федерации европейских биохимических обществ (24-29 июня 2006 г., Стамбул, Турция), 26-м Международном симпозиуме по разделению белков, пептидов и полинуклеотидов (16-20 октября 2006 г., Инсбрук, Австрия).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 работ в виде статей и тезисов докладов.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы.

Материал диссертации изложен на 147 страницах, содержит 19 таблиц и 42 рисунка. Список литературных источников состоит из 187 наименований.

### **Содержание работы**

Во введении дано обоснование темы, сформулированы цели исследования и положения, выносимые на защиту, отмечена его научная новизна и практическая значимость. Приведены данные об апробации и публикации результатов исследования, а также о структуре и объеме диссертации.

**1-ая глава.** Приведены общие сведения о существующих методах анализа исследуемых соединений. Более подробно описаны хроматографические методы и ряд общепринятых способов идентификации. Рассмотрены методы определения низкомолекулярных аминокислот плазмы крови, а также фрагментов ДНК. Проведено сравнение существующих методик анализа аминокислот, коротких пептидов и олигонуклеотидов и обоснована актуальность проведения дальнейших исследований в этой области.

**2-ая глава.** Приведены данные о материалах, реагентах, способах приготовления используемых растворов и выполнении работы.

**3-я глава.** Результаты и обсуждение.

### Определение свободных кодируемых аминокислот

Содержание свободных аминокислот (АК) в физиологических жидкостях является диагностическим параметром ряда заболеваний. Выполненное исследование направлено на разработку методики, позволяющей быстро и надежно их разделять и идентифицировать. Анализ смесей таких АК проводили, используя

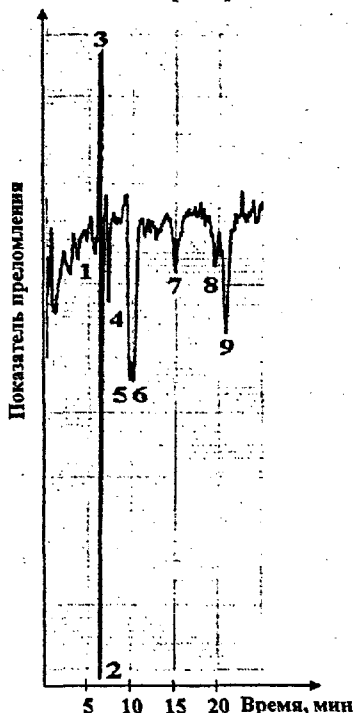


Рис. 1. Разделение смеси 8 свободных АК методом КЗЭ с использованием рефрактометрического детектирования

Капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, полная длина 90 см, эффективная длина 75 см.

А) Буфер: 60 мМ борат натрия, pH 11,0. Напряжение: 20 кВ. Сила тока: 93 мкА. Температура: 21,0 °C. Время ввода пробы: 7,0 с (электрокинетически, напряжение при вводе пробы — 5 кВ). Введенные количества АК — 0,1 нг; аланин, тирозин — 0,2 нг. Идентификация: 1 — Аргинин; 2 — Лизин; 3 — ЭОП; 4 — Пролин; 5 — Аланин; 6 — Тирозин; 7 — Серин; 8 — Аспарагиновая к-та; 9 — Метионин.

капиллярный зональный электрофорез (КЗЭ) и мицеллярную электрокинетическую хроматографию (МЭКХ). Выбор этих методов был обусловлен простотой и доступностью используемого в них оборудования, а также низкой себестоимостью необходимых реактивов и расходных материалов. Изучали возможность детектирования свободных АК с использованием простого универсального и экономичного рефрактометрического способа, применение которого невозможно в классическом методе аминокислотного анализа. Установлено, что для этих целей также возможно применение прямого УФ детектирования.

При разработке методики анализа смесей АК методом КЗЭ с рефрактометрическим детектированием особое внимание уделяли определению оптимального состава фоновых электролита. Для этого был проведен скрининг с использованием боратных, фосфатных, ацетатных, цитратных, TRIS и

CAPS буферных систем, а также их различных сочетаний на примере модельной смеси из 8 АК с различными по природе и свойствам радикалами и максимально различающимися значениями  $pK_a$  аминокислот. Пример разделения такой смеси с использованием боратного фонового электролита приведен на рис. 1.

Оптимальным фоновым электролитом для разделения свободных АК данным методом является раствор, содержащий 60 мМ боратного буфера (pH 11,0). С его использованием было изучено влияние различных факторов (напряжение, сила тока, внутренний диаметр и эффективная длина капилляра, способ ввода пробы) на эффективность разделения и показано, что в условиях эксперимента не удастся провести полное разделение смеси всех кодируемых АК. Из эксперимента следует, что приемлемо разделяются АК, для которых разница во времени миграции превышает 1 мин. По этой причине методом классического КЗЭ не могут быть разделены и идентифицированы при совместном присутствии глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, гистидин, фенилаланин и тирозин, а также аспарагиновая, глутаминовая кислоты и цистеин. Коэффициент селективности для них очень низок и близок к 1. Легко выделяются и идентифицируются аргинин, лизин, пролин, серин, аспарагиновая кислота и метионин, т.е. АК, имеющие время миграции 5,5-10,0, 15 и 19,5-20,8 мин. Коэффициент селективности для этой группы АК имеет значение в интервале 1,1 – 1,3. При использовании фосфатного фонового электролита (pH 11,4) наблюдалась аналогичная общая картина разделения, но с худшим разрешением пиков. Выполненные исследования показывают, что классический КЗЭ с рефрактометрическим окончанием позволяет в лучшем случае провести полное разделение и идентификацию в водном растворе не более 8 АК. При этом содержание индивидуальных АК из указанных неразделяемых в такой смеси не должно превышать двух.

Эффективность разделения АК заметно улучшается при добавлении метанола к фоновым электролитам с  $pH < 7$ . При использовании в качестве фонового электролита 150 мМ фосфатного буфера (pH 2.0) с добавкой 30%об. метанола удалось разделить 16 из 20-ти генетически кодируемых АК (рис. 2). К сожалению, для полного разделения данной смеси требуется значительное время.

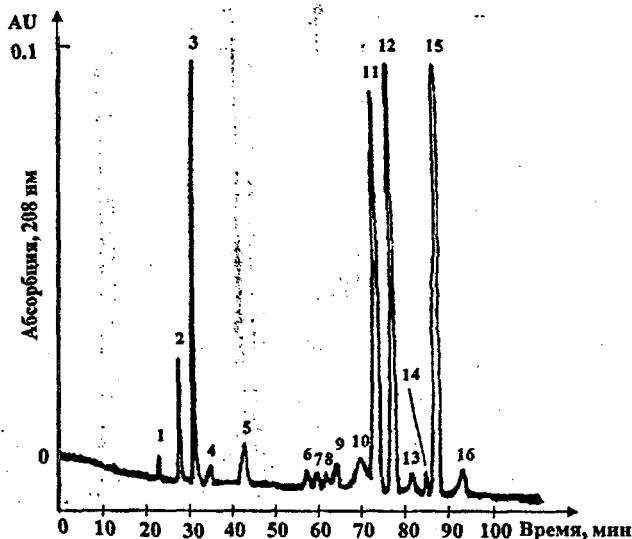


Рис. 2. КЗЭ смеси 16 свободных аминокислот с прямым УФ детектированием ( $\lambda_{\text{полл}} = 208 \text{ нм}$ )

Капилляр: внутренний диаметр 75 мкм, полная длина – 65 см, эффективная длина – 50 см.  
 Буфер: 150мМ фосфат + 30% метанола, pH=2,0. Напряжение: 10 кВ. Сила тока: 76 мкА.  
 Температура: 28,0 °С. Время ввода пробы: 1,5 с (вакуум).  
 Идентификация: 1 – лизин, 2 – аргинин, 3 – гистидин, 4 – глицин, 5 – аланин, 6 – валин, 7 – изолейцин, 8 – лейцин, 9 – серин, 10 – треонин, 11 – метионин, 12 – фенилаланин, 13 – глутаминовая кислота, 14 – пролин, 15 – аспарагиновая кислота, 16 – тирозин.

Поскольку примененный классический КЗЭ при  $\text{pH} > 7$  не обеспечил требуемого качества разделения, то было решено применить к анализу свободных АК метод МЭХХ с прямым УФ детектированием. В качестве детергента в буферные растворы добавляли додецилсульфат натрия (ДДСН). В процессе работы применяли различные концентрации компонентов фонового электролита. Наилучшие результаты были получены при использовании фонового электролита, содержащего 133 мМ борной кислоты, 33 мМ бората натрия и 100 мМ ДДСН, pH 9,5. Использование электролита указанного состава существенно увеличило число анализируемых АК при одновременном их определении при значениях pH фонового электролита, лежащих в основной области. На рис. 3 приведена электрофореграмма смеси 14 АК.

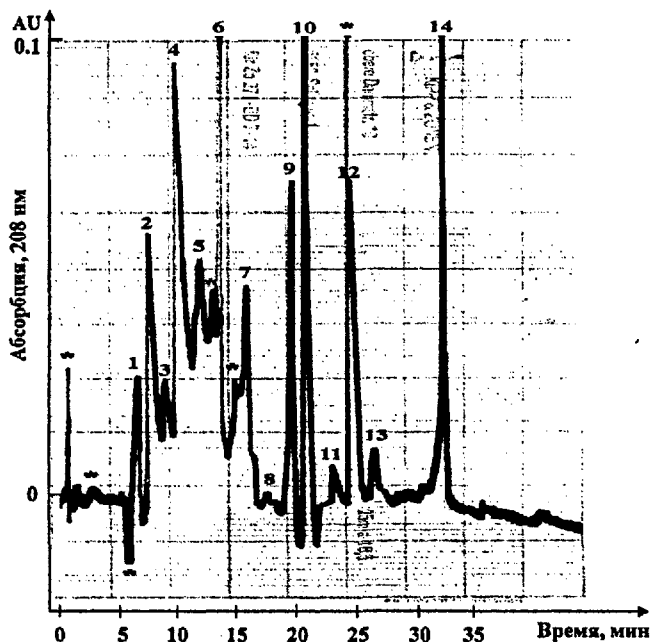


Рис. 3. Разделение смеси 14 свободных АК методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с прямым УФ-детектированием

Капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, полная длина 122 см, эффективная длина 35 см. Буфер: 133 mM борная кислота, 33 mM тетраборат натрия (pH 9.5) 100 mM додецилсульфат натрия. Напряжение: 20 кВ. Сила тока: 48 мкА. Температура: 27,5 °С. Время ввода пробы: 3,0 с (вакуум). Введенные количества АК – 5,0 нг. Аланин, валин, изолейцин и глицин – 7,0 нг. Идентификация: 1 – Валин, 2 – Аланин, 3 – Изолейцин, 4 – Глицин, 5 – Серин, 6 – Треонин, 7 – Тирозин, 8 – Гистидин, 9 – Фенилаланин, 10 – Аргинин, 11 – Лизин, 12 – Цистеин, 13 – Метионин, 14 – Глутаминовая кислота. \* - Системные пики.

Обращают на себя внимание полученные значения времен миграции. Несмотря на меньшую эффективную длину капилляра они, как правило, выше, чем в случае классического КЗЭ, что достаточно хорошо согласуется с природой МЭКХ. Это также может быть связано с величиной приложенного напряжения на единицу длины капилляра. Необходимая для разделения АК разница во времени миграции значительно меньше, чем в случае КЗЭ. Достаточно, чтобы она составляла 0,5 мин.

Более детально провели исследование условий разделения 14 генетически кодируемых АК, обычно присутствующих в плазме крови здоровых до-

норов в свободном состоянии. Изучали влияние pH и добавок к фоновому электролиту различных органических растворителей на степень разрешения пиков. Из эксперимента следует, что для достижения полного разделения смеси 14 АК значение pH должно лежать в интервале 9,0-10,0. При pH, лежащим за пределами указанного интервала, не обеспечивается необходимое разрешение АК. Очевидно, при  $\text{pH} < 9$  это связано с разницей между значениями  $\text{pK}_a$  (АК), а при  $\text{pH} > 10$  - из-за частичного распада конъюгатов ДДСН-АК. Влияние добавок органических растворителей изучали, используя метанол, 2-пропанол и ацетонитрил. Полученные данные показывают, что добавка любого из органических растворителей приводит к существенному изменению времен миграции и коэффициентов селективности. Характер изменения определяется природой и концентрацией добавки. Метанол и ацетонитрил не улучшают разделение изученных АК, что, по-видимому, связано с их малой способностью образовывать смешанные конъюгаты АК-ДДСН-R, где R - молекула органического растворителя. Добавка 3-5% 2-пропанола существенно улучшает степень разрешения компонентов, при относительно небольшом увеличении времени миграции АК. При увеличении концентрации 2-пропанола наблюдается заметный рост времен миграции АК, что приводит к снижению экспрессности определения. Специально проведенные исследования показали, что наилучшее разделение АК в присутствии эффективного количества органического растворителя (2-пропанола) происходит, если фоновый электролит содержит 50 мМ борной кислоты, 33 мМ бората натрия и 50 мМ ДДСН. На рис. 4 приведена электрофореграмма смеси 14 АК.

Приведенные данные свидетельствуют об эффективном разделении 13 из 14 генетически кодируемых АК. Общее время разделения не превышает 30 мин.  $S_r$  времени миграции составляет  $< 0,03$ . Несколько большие значения  $S_r$ , близкие к 0,06-0,08, наблюдается для аланина, валина и гистидина.

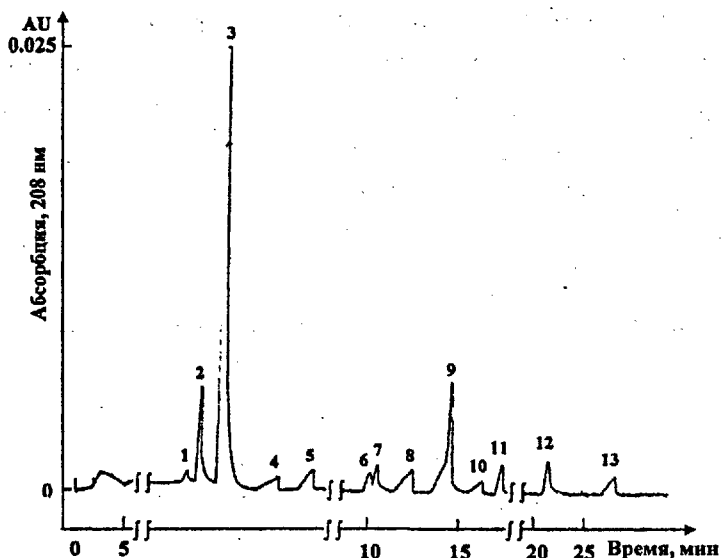


Рис. 4. Разделение смеси 14 АК методом МЭКХ с прямым УФ детектированием ( $\lambda_{\text{полл}} = 208 \text{ нм}$ )

Капильяр: внутренний диаметр 75 мкм, полная длина 61 см, эффективная длина 41 см.  
 Буфер: 33 мМ тетраборат натрия, 100 мМ борная кислота, 50 мМ ДДСН, 5% 2-пропанол, pH=10,2. Напряжение: 25 кВ. Сила тока: 65 мкА. Температура: 29,5 °С. Время ввода пробы: 1,5 с (вакуум). Введенные количества АК – 0,5 нг.  
 Идентификация: 1 - Лизин; 2 - Пролин; 3 - Фенилаланин; 4 - Аланин; 5 - Валин; 6 - Глицин; 7 - Гистидин; 8 - Тирозин; 9 - Лейцин+Изолейцин; 10 - Серин; 11 - Треонин; 12 - Глутаминовая кислота; 13 - Цистеин.

Достигнутый уровень разрешения позволил провести исследования по количественному определению рассмотренных АК. Был проведен анализ модельной смеси 14 АК известного состава. Исследования показали, что метод МЭКХ с прямым УФ детектированием при использовании боратного буферного раствора, содержащего 3-5% 2-пропанола позволяет количественно определять 14-16 генетически кодируемых АК с погрешностью ( $S_r$ ) 6-8% менее чем за 30 мин. Правильность полученных результатов дополнительно проводили методом «введено-найдено» (табл.1)

Таблица 1

Проверка правильности определения содержания генетически кодируемых АК методом МЭКХ ( $m^o(АК) = 0,50$  нг; введено – 1,00 нг)

| АК          | Найдено, нг<br>( $n = 5$ ; $P = 0,95$ ) | $S_r$ | АК       | Найдено, нг<br>( $n = 5$ ; $P = 0,95$ ) | $S_r$ |
|-------------|-----------------------------------------|-------|----------|-----------------------------------------|-------|
| Лизин       | $1,54 \pm 0,14$                         | 0,072 | Гистидин | $1,54 \pm 0,16$                         | 0,084 |
| Пролин      | $1,54 \pm 0,12$                         | 0,061 | Тирозин  | $1,47 \pm 0,14$                         | 0,078 |
| Фенилаланин | $1,48 \pm 0,07$                         | 0,040 | Лейцин   | $1,51 \pm 0,15$                         | 0,067 |
| Аланин      | $1,52 \pm 0,15$                         | 0,079 | Цистеин  | $1,51 \pm 0,14$                         | 0,076 |
| Валин       | $1,49 \pm 0,14$                         | 0,076 | Серин    | $1,49 \pm 0,20$                         | 0,084 |
| Глицин      | $1,55 \pm 0,16$                         | 0,082 | Треонин  | $1,49 \pm 0,15$                         | 0,070 |

Анализ гомоцистеина и других низкомолекулярных аминокислот плазмы крови методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Гомоцистеин (Hcy) и сопутствующие ему аминокислоты (АК) (кодируемая аминокислота - цистеин (Cys), трипептид глутатион (GSH)) в плазме крови являются молекулярными маркерами нарушения функций сердечно-сосудистой системы. Основной целью данного исследования являлась разработка метода определения содержания гомоцистеина как достоверного фактора риска таких заболеваний.

Количественный анализ низкомолекулярных аминокислот плазмы крови включает в себя восстановление дисульфидных связей, депротенинизацию плазмы крови, модификацию аминокислот соответствующими реагентами, разделение и идентификацию модифицированных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ или КЭ с тем или иным способом детектирования. В данной работе окисленные и связанные с белком аминокислоты восстанавливали трифенилфосфином. Для удаления катионов тяжелых металлов использовали добавку ЭДТА. Предложенная методика восстановления обеспечила быстрое ( $< 15$  мин) и полное восстановление ( $> 96\%$ ) дисульфидов и высвобождение сульфгидрильных групп при комнатной температуре. Выходы реакций восстановления определяли, используя стандартную методику измерения содержания свободных АК. Высокомолекулярные белки плазмы крови осаждали 5-сульфосалициловой кислотой. Ее концентрация была оптимизирована в процессе исследования, что позволило избежать потери чувствительности из-за разбавления на стадии нейтрализации. Модификацию свободных сульфгидрилов проводили монобромобиманом (mBrB) или 5-иодоацетидами-флуоресцеином (5-IAF). Необходимое значение pH поддерживали с помощью диэтаноламина ( $pK_a = 8,9$ ) и ортофосфата на-

трия, в зависимости от используемого для модификации АТ реагента. Использование диэтанолamina позволило проводить прямое контролирование образование целевых продуктов масс-спектрометрически. Для идентификации производных АТ применяли фотометрический и флуориметрический способы детектирования. Производные охарактеризовывали методами абсорбционной, флуориметрической и масс-(MALDI-TOF, ESI) спектроскопии. Фотометрическое и флуориметрическое детектирование проводили при длинах волн, выбранных по спектрам поглощения (Hcy-MB – 234 нм) и флуоресценции производных Hcy (390 нм (возбуждение) и 478 нм (флуоресценция)). Из спектра флуоресценции конъюгата Hcy-AF следует, что при флуориметрическом детектировании для возбуждения оптимальна длина волны 462 нм, а для флуоресценции - 504 нм. Для унификации методик определения и проверки принципиальной возможности использования одного и того же детектора для идентификации как монобромановых, так и флуоресцеиновых производных изучали эффективность возбуждения на длине волны 390 нм. Интенсивность полученного максимума флуоресценции, и, как следствие, чувствительность определения была на порядок величины ниже, чем при использовании для возбуждения излучения на длине волны 462 нм.

Проанализированы индивидуальные монобромбимановые (MB) и ацетамидофлуоресцеиновые (AF) производные АТ, а также их модельные смеси. Индивидуальные монобромбимановые производные Cys, Hcy и GSH элюировались со временами удерживания (мин)  $6,01 \pm 0,19$ ,  $10,76 \pm 0,17$  и  $11,89 \pm 0,11$  соответственно (рис. 5)<sup>1</sup>.

Такое же время удерживания сохраняется при использовании смесей аминокислот известного состава. Полученные экспериментальные данные позволили рассчитать выход реакции модификации. Он составил не менее 97%, что хорошо согласуется с известными данными, но полученными в более жестких условиях пробоподготовки. Образующиеся производные были выделены из смеси и охарактеризованы масс-спектрометрически.

Флуоресцеиновые производные Cys, Hcy и GSH элюировались со временами удерживания (мин)  $8,49 \pm 0,12$ ;  $10,46 \pm 0,15$  и  $12,96 \pm 0,14$  соответственно (рис. 6).

<sup>1</sup> Хроматографический анализ проводился на отечественном высокоэффективном жидкостном хроматографе «МилиХром А-02» (ЭкоНова, Новосибирск)

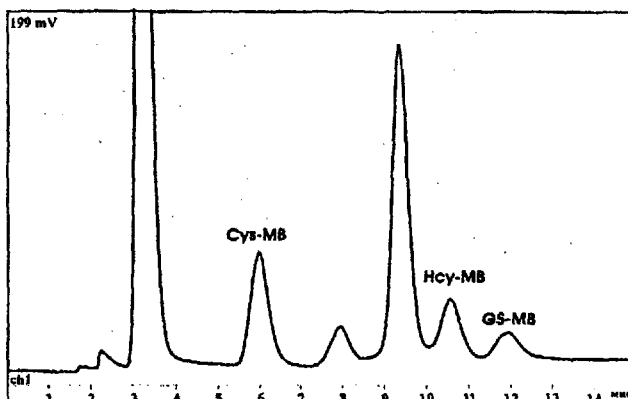


Рис. 5. ОФ ВЭЖХ модельной смеси аминотиолов, модифицированных монобромобиманом. Cys-MB-50,0 мкМ, Hcy-MB-25,0 мкМ, GS-MB-25,0 мкМ. Флуориметрическое детектирование ( $\lambda_{\text{возб}} = 390 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 478 \text{ нм}$ )

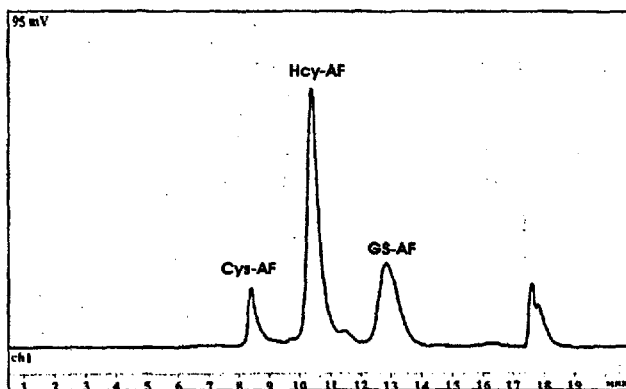


Рис. 6. ОФ ВЭЖХ модельной смеси аминотиолов, модифицированных 5-иодоацетидафлуоресцеином. Cys-AF-100,0 мкМ, Hcy-AF-150,0 мкМ, GS-AF-130,0 мкМ. Флуориметрическое детектирование ( $\lambda_{\text{погл}} = 390 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 478 \text{ нм}$ )

При использовании в качестве метки 5-IAF достигается лучшее разрешение пиков тиол-флуоресцентных конъюгатов по сравнению с тиол-монобимановыми конъюгатами. Выход реакции модификации АТ 5-IAF, определенный экспериментально по уменьшению интенсивности пика флуоресцентной метки, составил 95%. Все полученные производные были выделены из смеси и охарактеризованы масс-спектрометрически.

Полученные данные послужили основой для разработки способа количественного определения гомоцистеина. Для построения градуировочной кривой использовали образцы смесей с его содержанием от 2,5 до 100 мкМ. Выбранный интервал включает диапазон физиологических концентраций Нсу (5-50 мкМ). В качестве метки использовался мВгВ. Полученная градуировочная зависимость площади хроматографического пика от содержания гомоцистеина в смеси линейна во всем изученном концентрационном интервале и описывается уравнением:

$$H = 13,32C(\text{Hcy}) + 6,13 \quad (R^2 = 0,9994).$$

Относительное стандартное отклонение результатов определения по площади пика не превышает 0,083, а по времени выхода – 0,026. Предел обнаружения флуориметрического детектирования МВ-производных составляет ~1 мкМ (рис. 7).

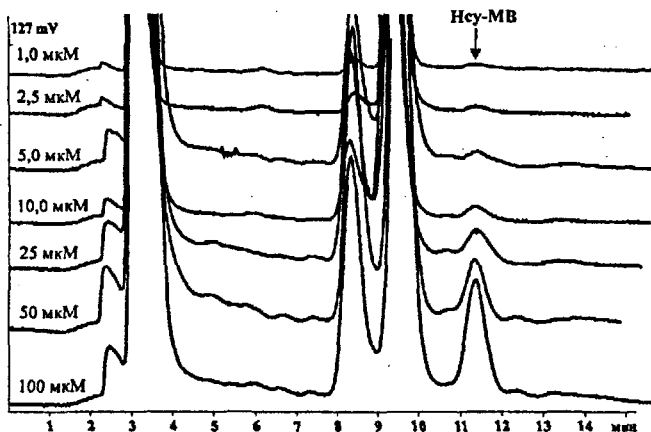


Рис. 7. Изменение площади хроматографического пика от концентрации Нсу

Эффективность методики подтверждается сравнением хроматограмм, полученных для индивидуальных веществ и для образцов плазмы крови, подготовленных по предлагаемой методике. Выполненные исследования позволили разработать методику количественного определения гомоцистеина, цистеина и глутатиона в плазме крови и успешно использовать ее для рутинного анализа вышеупомянутых АТ в виде их МВ-производных (рис. 8). При разработке методики дополнительный контроль проводили методом «зведено-найдено» (табл. 2).

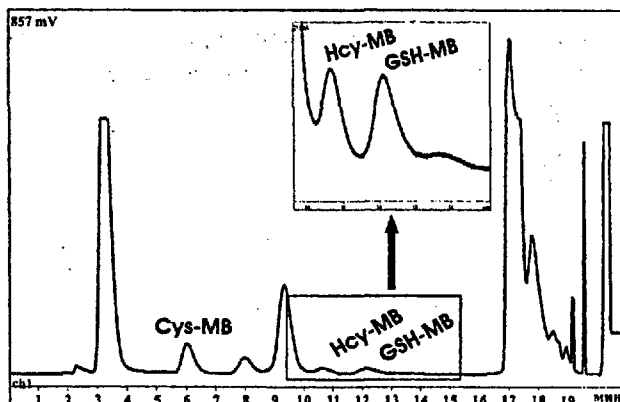


Рис. 8. ОФ ВЭЖХ плазмы крови здорового донора. Cys-MB-192,4 мкМ, Hcy-MB-10,1 мкМ, GS-MB-15,7 мкМ. Флуориметрическое детектирование

Таблица 2

Определение Hcy в виде MB-производных методом микроколоночной ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием

| C <sup>0</sup> (Hcy), мкМ | Введено, мкМ | Найдено, мкМ<br>(n = 5; P = 0,95) | S <sub>r</sub> |
|---------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------|
| 9,7                       | 100,0        | 110,8±10,7                        | 0,078          |
| 18,8                      | 100,0        | 120,7±9,3                         | 0,062          |
| 31,1                      | 100,0        | 131,1±8,0                         | 0,049          |

По разработанной методике проанализированы более 50 образцов плазмы крови здоровых и страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями различной степени тяжести пациентов. Для здоровых пациентов среднее значение содержания (мкМ) АТ в плазме крови, полученной из вены, натощак, утром составляло: для Hcy  $12,75 \pm 3,21$ , для GSH  $9,53 \pm 1,17$  и для Cys  $206,34 \pm 24,61$ . Полученные значения концентраций попадают в интервал референсных значений, приводимых в литературе. Для пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, найденная концентрация Hcy в плазме крови зависела от тяжести заболевания. Результаты коррелируют с клиническим состоянием пациентов.

Исследована возможность анализа АТ с применением такого более дешевого и распространенного способа детектирования как фотометрический. Эксперимент показал, что он обеспечивает чувствительность, которая позволяет определять патологически высокое содержание АТ в плазме крови. При использовании фотометрического детектирования предпочтительней использовать в качестве

метки 5-IAF, поскольку в этом случае достигается разрешение пиков до базовой линии (рис. 9), что позволяет проводить количественное определение.

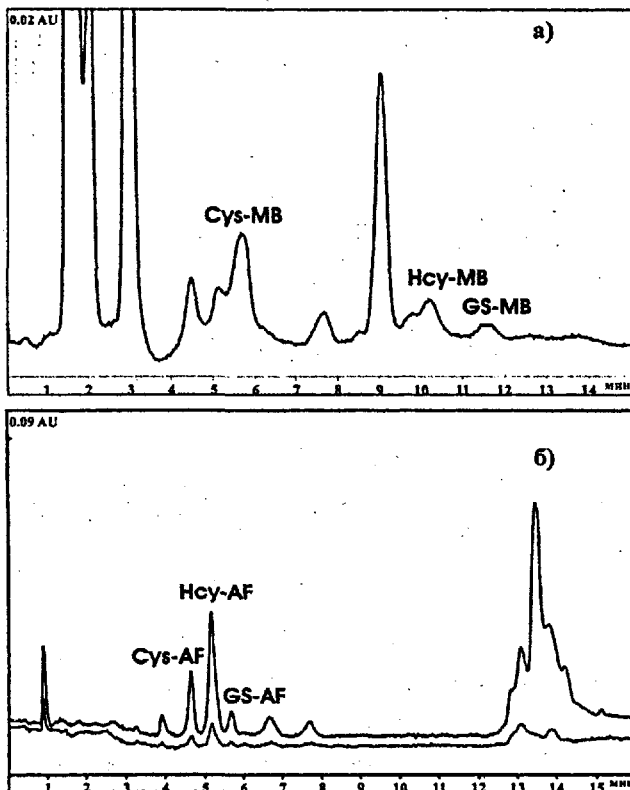


Рис. 9. ОФ ВЭЖХ модельных смесей аминотиолов, модифицированных монобромобиманом (а) и 5-иодоацетамидофлуоресцеином (б). А) Cys-MB-50,0 мкМ, Hcy-MB-25,0 мкМ, GS-MB-25,0 мкМ. Б) Cys-AF-50,0 мкМ, Hcy-AF-75,0 мкМ, GS-AF-25,0 мкМ. Фотометрическое детектирование ( $\lambda_a = 234$  нм,  $\lambda_b = 250$  и 300 нм).

Таким образом, выполненная работа позволила оптимизировать стадию пробоподготовки, проводить ее в «мягких условиях» с гарантированным количественным выходом анализируемого компонента. На ее основе разработана методика, позволяющая быстро и достоверно определять содержание низкомолекулярных АТ в плазме крови здоровых и больных пациентов. Погрешность измерений не превышает 8,5%. Нижняя граница интервала измеряемых концентраций (2,5 мкМ) свидетельствует о принципиальной возможности применения

данной методики для определения пониженного содержания Нсу в плазме крови. Предел обнаружения описанного метода составляет 1мкМ. Разработанная методика апробирована на реальных образцах плазмы крови пациентов и может быть использована для рутинного применения.

Определение гомоцистеина и других низкомолекулярных аминотиолов плазмы крови с применением капиллярного электрофореза

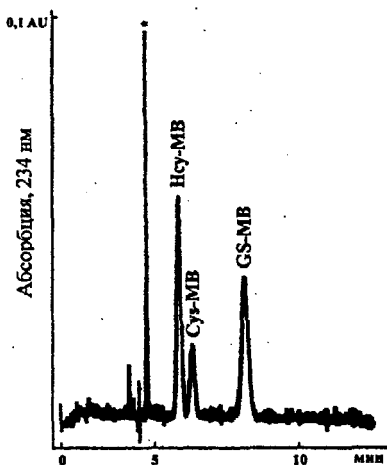


Рис. 10. КЭЗ модельной смеси АТ, модифицированных mBrV  
Нсу-МВ-700,0 мкМ, Сус-МВ-300,0 мкМ  
ГС-МВ- 700,0 мкМ. ( $\lambda_{\text{погл}} = 234$  нм).

Капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, полная длина 82 см, эффективная длина 62 см.  
Буфер: 50 мМ тетраборат натрия pH=11.0.  
Напряжение: 25 кВ. Сила тока: 58 мкА.  
Температура: 29,5°C Время ввода пробы: 3 с.  
(вакуум)

прямым УФ-детектированием недостаточно для определения малых количеств Нсу в плазме крови. При содержании гомоцистеина 10 мкМ отношение сигнал/фон составляет 2,5-3, а относительное стандартное отклонение лежит в интервале 0,3-0,5. Данный метод применим для контроля содержания Нсу в плазме крови больных с патологически высоким его содержанием ( $> 25$  мкМ). Относительное стандартное отклонение при определении таких концентраций составляет 0,12 для МВ-Сус, 0,18 для МВ-Нсу и 0,17 для МВ-ГС.

Для анализа АТ данным методом применяли фотометрический и флуориметрический<sup>2</sup> способы детектирования. Стадия пробоподготовки существенно не отличалась от разработанной для хроматографического анализа АТ.

Модельную смесь МВ-производных Нсу, Сус и GSH анализировали методом капиллярного электрофореза (КЭ) с прямым УФ детектированием. Длина волны детектирования (234 нм) была выбрана в соответствии с локальным максимумом поглощения МВ-АТ конъюгатов. При выбранных условиях разделения конъюгат гомоцистеина имеет время миграции  $6,18 \pm 0,16$ ; цистеина -  $6,83 \pm 0,20$  и глутатиона -  $8,54 \pm 0,17$  мин, соответственно (рис. 10). По сравнению с ВЭЖХ применяемый метод КЭЗ позволяет сократить время анализа АТ на 2-3 мин.

Выполненные исследования показали, что чувствительности метода КЭЗ с

<sup>2</sup> Капиллярный зональный электрофорез с флуориметрическим детектированием проводился на капиллярном ионном анализаторе «Нанофор 02» (ИАН РАН, Санкт-Петербург)

Таблица 3

Анализ Нсу в виде МВ-производных методами ОФ ВЭЖХ с флуориметрическим и КЗЭ с фотометрическим детектированием ( $n = 5$ ;  $P = 0,95$ )

| Метод определения | $C \pm \Delta C, \text{мкМ}$  | $S_r$        |
|-------------------|-------------------------------|--------------|
| ОФ ВЭЖХ           | $9,7 \pm 0,4$                 | 0,035        |
| ОФ ВЭЖХ / КЗЭ     | $22,5 \pm 1,8 / 26,9 \pm 6,5$ | 0,066 / 0,18 |
| ОФ ВЭЖХ / КЗЭ     | $28,1 \pm 2,9 / 26,4 \pm 5,1$ | 0,082 / 0,12 |
| ОФ ВЭЖХ / КЗЭ     | $31,1 \pm 1,3 / 27,4 \pm 5,2$ | 0,033 / 0,14 |

Модельные смеси АФ-производных исследовали методом КЗЭ с прямым фотометрическим (рис. 11) и флуориметрическим (рис. 12) детектированием (табл. 3). Фотометрическое детектирование проводили на длине волны 492 нм, что соответствует длине волны возбуждения 5-ИАФ. При флуориметрическом детектировании длина волны возбуждения составляла 473 нм, а эмиссии 514 нм. Установлено, что использование 5-ИАФ позволяет увеличить чувствительность определения Нсу методом КЗЭ с флуориметрическим детектированием.

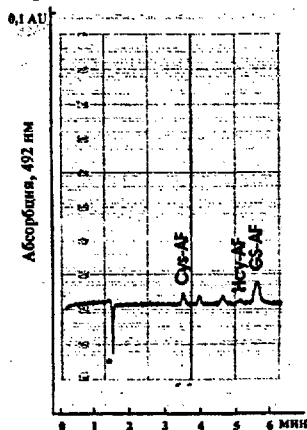


Рис. 11. КЗЭ модельной смеси АТ, модифицированных 5-йодоацетамидо-флуоресцеином с прямым УФ детектированием

Нсу-АФ-100,0 мкМ, Cys-АФ-300,0 мкМ, GS-АФ-700,0 мкМ. ( $\lambda_{\text{погл}} = 492 \text{ нм}$ ).

Капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, полная длина 68 см, эффективная длина 53 см.

Буфер: 25 мМ тетраборат натрия, 25 мМ фосфат натрия pH = 11,2. Напряжение: 20 кВ. Сила тока: 22 мкА. Температура: 25,0 °С. Время ввода пробы: 5 с (электрокинетически, напряжение при вводе пробы - 5 кВ).

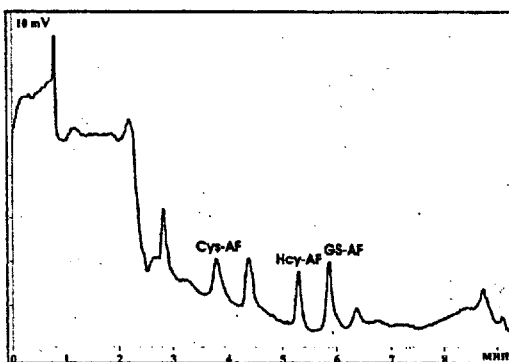


Рис. 12. КЗЭ модельной смеси АТ, модифицированных 5-йодоацетамидо-флуоресцеином с флуориметрическим детектированием

Нсу-АФ-15,0 мкМ, Cys-АФ-15,0 мкМ, GS-АФ-15,0 мкМ. ( $\lambda_{\text{погл}} = 473 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 514 \text{ нм}$ )

Капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, полная длина 65 см, эффективная длина 57 см.

Буфер: 25 мМ тетраборат натрия, 25 мМ фосфат натрия pH = 11,2. Напряжение: 20 кВ. Сила тока: 18 мкА. Температура: 25,0 °С. Время ввода пробы: 5 с (электрокинетически, напряжение при вводе пробы - 5 кВ).

Разработанные методики определения содержания гомоцистеина в плазме крови с использованием ОФ ВЭЖХ и капиллярного электрофореза внедрены в практику биомедицинского анализа ЗАО «Медицинские технологии, Лтд».

Определение мутаций в молекулах ДНК  
методом капиллярного гель-электрофореза

Изменение содержания молекулярных маркеров в физиологических жидкостях также может быть обусловлено генетической предрасположенностью пациента к конкретному заболеванию. Отсюда следует необходимость проведения сравнительного анализа фрагментов ДНК с целью повышения достоверности определения причины исследуемого заболевания и более эффективной его терапии.

В данной работе исследовали возможность использования доступной отечественной КЭ аппаратуры для определения мутаций в молекулах ДНК на примере фрагментов мутантного гена венозных тромбозов, с применением аллель-специфичной ПЦР. Разделение нуклеотидов проводили методом капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) с применением немодифицированных капилляров из кварцевого стекла диаметром от 25 до 100 мкм. В качестве сепаративной матрицы использовали линейный поли-*N,N*-диметилакриламид (пДМА) отечественного производства. Выбор данного полимера связан с возможностью его использования в чип-варианте КГЭ. пДМА синтезировали в ЗАО «Синтол» из мономера диметилакриламида путём радикальной полимеризации. Длину цепи контролировали изменением температуры или добавлением ловушек радикалов. Использовали полимеры, содержащие 5-8% мономера пДМА. В качестве фоновых электролитов применяли 0,1 М TBE (0,1 М TRIS, 0,1 М борной кислоты и 2,5 мМ ЭДТА; pH = 8,3) и 0,1М TAPS (N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновая кислота; pH = 8,3) Все исследуемые полимеры имели низкий уровень нативной флуоресценции (<0,5 AU). Полимеры, приготовленные с использованием 0,1М TAPS, позволяют проводить до 5 разделений без перезаполнения капилляра гелем, в то время как содержащие TBE допускали не более 3. Указанные полимеры обеспечивают разрешающую способность, сравнимую с соответствующими западными аналогами, но при этом более доступны по цене.

Исследования смеси флуоресцентно меченых полинуклеотидов с длинами 5-15-25-35-45-55-65-75-85-95-100-101 н.о. соответственно при содержании  $10^{-9}$  М каждого из них позволили определить оптимальный состав полимера для разделения

олигонуклеотидов с длиной цепи до 100 н.о. (рис. 13). Таковым является гель на основе пДМА, содержащий 6% мономера, 7М мочевины и 0,1М TAPS.

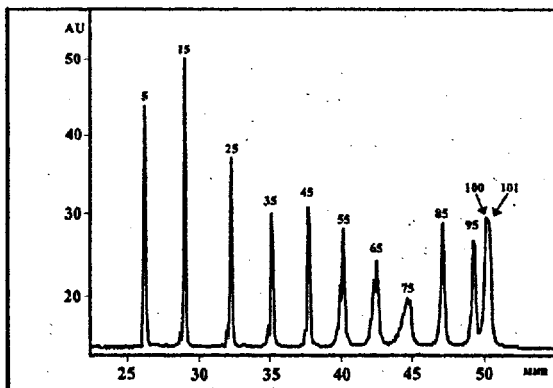


Рис. 13. Разделение смеси полинуклеотидов с длинами 5-15-25-35-45-55-65-75-85-95-100-101 н.о.

Капилляр: внутренний диаметр – 50 мкм, полная длина – 45 см, эффективная длина – 38,5 см. Полимер: 6% мономера пДМА, 0,1М TAPS, 7М мочевины. Рабочий электролит: 0,1М TAPS. Напряжение: 10 кВ. Сила тока: 4,3 мкА. Температура: 25,0 °С. Время ввода пробы 10 с (электрокинетически, напряжение при наборе пробы – 10 кВ).

Оптимизация условий разделения (напряжение, сила тока, эффективная длина и диаметр капилляра) позволила достичь разделения до базовой линии олигонуклеотидов общей длиной менее 100 н.о. и разницей по длине 1 н.о. (рис. 14.).

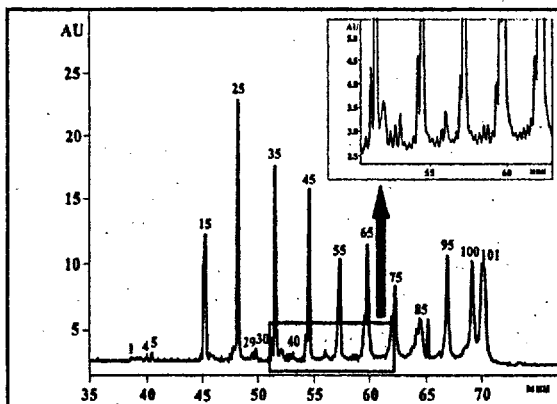


Рис. 14. Разделение смеси полинуклеотидов с разницей по длине в 1 н.о.

Капилляр: внутренний диаметр – 50 мкм, полная длина – 65 см, эффективная длина – 57,5 см. Полимер: 6% мономера пДМА, 0,1М TAPS, 7М мочевины. Рабочий электролит: 0,1М TAPS. Напряжение: 11 кВ. Сила тока: 5,1 мкА. Температура: 25,0 °С. Время ввода пробы 10 с (электрокинетически, напряжение при наборе пробы – 10 кВ).

Полученные данные были положены в основу разработки системы быстрой и эффективной диагностики мутантного гена венозных тромбозов (Leiden гена фактора V системы свёртывания крови человека).

Для доказательства возможности совместного определения продуктов дикого и мутантного типов (разница 5 н.о.) были проведены следующие ПЦР: 1. ДНК дикого типа (без мутации) + праймер дикого типа; 2. ДНК дикого типа (без мутации) + праймер FV Leiden; 3. ДНК с гетерозиготной мутацией FV Leiden + праймер FV Leiden; 4. праймер FV Leiden без ДНК. Продукты реакции после обработки формамидом и разведения водой подвергали анализу методом КГЭ с флуориметрическим детектированием. Анализ образцов 1 и 3 показал в смеси после ПЦР наличие продукта, а образцов 2 и 4 – его отсутствие. Для подтверждения указанной закономерности был проведен анализ смеси образцов мутантный праймер/мутантный продукт и праймер дикого типа/продукт дикого типа в соотношении 1:1 (рис. 15).

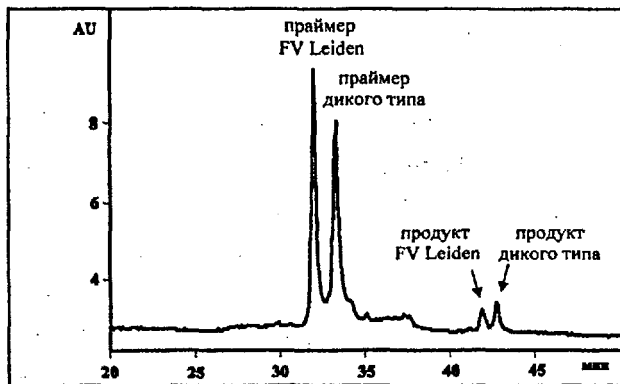


Рис. 15. Совместное определение мутантного и немутантного продукта ПЦР

Капилляр: внутренний диаметр – 50 мкм, полная длина – 45 см, эффективная длина – 38,5 см. Полимер 6% мономера пДМА, 0,1М TAPS, 7М мочевины. Рабочий электролит: 0,1М TAPS. Напряжение: 12 кВ. Сила тока: 6,5 мкА. Температура: 25,0 °С. Время забора пробы: 10 с (электрокинетически, напряжение при наборе пробы – 10 кВ).

Полученные данные показывают возможность совместного определения продуктов аллель-специфичной ПЦР мутации FV Leiden и дикого типа. Предложенный подход, а именно подбор и синтез аллель-специфичных праймеров разной длины и общего встречного праймера с последующим анализом методом КГЭ с флуориметрическим детектированием, может быть распространен для диагностики и других генетически обусловленных заболеваний. Следует также отметить возможность проведения анализа олигонуклеотидов на стандартной отечественной аппаратуре, применяемой для анализа аминокислот и коротких пептидов.

## Выводы.

1. Разработаны методики анализа генетически кодируемых аминокислот без их предварительной дериватизации методами мицеллярной электрокинетической хроматографии и капиллярного зонального электрофореза с рефрактометрическим и прямым УФ детектированием. Изучено влияние состава и значения pH фонового электролита, а также добавок органических растворителей на эффективность разделения.
2. Методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с прямым УФ детектированием проведено количественное определение модельной смеси 14 генетически кодируемых свободных аминокислот.
3. Разработана методика быстрого и достоверного определения содержания низкомолекулярных аминотиолов в плазме крови здоровых и больных пациентов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Показана принципиальная возможность применения данной методики для определения пониженного содержания гомоцистеина в плазме крови. Разработанная методика апробирована на реальных образцах плазмы крови пациентов.
4. Показана возможность определения патологически высоких концентраций гомоцистеина в плазме крови методом капиллярного зонального электрофореза с фотометрическим детектированием. Разработанная методика апробирована на реальных образцах плазмы крови пациентов. Изучена возможность применения 5-иодоацетамидофлуоресцеина в качестве поглощающей и флуорогенной метки.
5. Разработана методика селективного определения фрагментов мутантного гена венозных тромбозов (мутация FV Leiden) методом капиллярного гель-электрофореза с флуориметрическим детектированием. Показана возможность анализа нуклеотидов с длиной цепи до 100 н.о. и с разницей по длине в 1 н.о.

**Основные материалы диссертации изложены в следующих работах:**

1. Мельников И.О., Назимов И.В., Стукачева Е.А., Глубоков Ю.М. Определение содержания гомоцистеина и других низкомолекулярных аминотиолов в плазме крови. // Ж. Анал. Хим. -2006. -Т. 61. -№ 11. -С. 1185-1191.
2. Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Назимов И.В. Капиллярный электрофорез свободных аминокислот с рефрактометрическим и прямым УФ-детектированием. // Инф.-анал. бюлл. «Ученые записки МИТХТ». М.: МИТХТ. -2004. Вып. 11. -С. 54-57.
3. Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Назимов И.В. Анализ низкомолекулярных аминотиолов методами капиллярного электрофореза и ОФ ВЭЖХ с флуоресцентной и прямой УФ-детекцией. // Ж. «Современные наукоемкие технологии». М.: Академия Естествознания, -2005. -№3. -С.40-41.
4. Melnikov I.O., Nazimov I.V., Stukacheva E.A., Glubokov Yu.M. HPLC and HPCE determination of homocysteine as a criterion of vascular diseases risk factor. // FEBS J. -2006. -V. 273. -S.1. -P. 256.
5. Мельников И.О., Назимов И.В., Лобазов А.Ф., Попкович Г.В. Капиллярный электрофорез немодифицированных аминокислот. // Тез. докл. 8-ой Всероссийский симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу, Москва, октябрь 2001, С. 23.
6. Melnikov I.O., Nazimov I.V., Lobazov A.F., Popkovich G.B. Capillary Electrophoresis Of Coded Nonmodified Amino Acids With Refractometric Detection. // 3<sup>rd</sup> International Symposium on Separations in BioSciences, Москва, май 2003, - P. 263.
7. Мельников И.О., Стукачева Е.А., Глубоков Ю.М., Назимов И.В. Определение гомоцистеина и других низкомолекулярных аминотиолов плазмы крови методами КЭФ и ОФ ВЭЖХ. // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005». М.: МГУ, 2005. Секция химия. -Т. 1. -С. 31.
8. Назимов И.В., Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Сивоплясова Е.А. Инструментальные микрометоды определения гомоцистеина как фактора риска

сердечно-сосудистых заболеваний. // Материалы 2-ой научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии», Анапа, сентябрь 2005, -С. 15-16.

9. Мельников И.О., Назимов И.В., Сивоплясова Е.А., Глубоков Ю.М. Микрометоды количественного определения гомоцистеина в плазме крови. // Материалы 3-го съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва, октябрь 2005, -С. 61.
10. Мельников И.О., Сивоплясова Е.А., Глубоков Ю.М., Назимов И.В. Определение фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний с использованием хроматографических методов анализа. // Материалы 1-ой конференции молодых ученых МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, октябрь 2005, -С. 31.
11. Melnikov I.O., Nazimov I.V., Stukacheva E.A., Glubokov Yu.M. Separation and identification of blood low molecular weight aminothiols by reversed phase high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. // International congress on analytical sciences ICAS-2006, Москва, июнь 2006, -Р. 204.
12. Melnikov I.O., Nazimov I.V., Patrushev L.I., Alekseev Ya.I., Glubokov Yu.M., Mosina A.G. Determination of human leiden gene mutation by high performance capillary gel electrophoresis. // 26<sup>th</sup> International Symposium on the Separations of Proteins, Peptides and Polynucleotides, LMP, Инсбрук, Австрия, октябрь 2006, -Р. 24.

**Мельников Игорь Олегович**

**Автореферат диссертации  
«Разработка микрометодов анализа аминокислот, коротких пептидов  
и олигонуклеотидов с использованием ОФ ВЭЖХ  
и капиллярного электрофореза»**

**Подписано в печать 31.10.2006.  
Формат 60х90 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Усл. печ.л. 1,5                      Тираж 100 экз.  
Заказ 218**

---

**Отпечатано в типографии ООО «Связь-Принт»  
Москва, ул. Казакова, д.8а, стр.3**





