

УДК 57.088.1:621.384.83:621.384.82

## ПРОТЕОМИКА

© 2014 г. Е.А. Демидов, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: EDemidov@bionet.nsc.ru; peltek@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 4 февраля 2013 г. Принята к публикации 28 февраля 2014 г.

Протеомика – наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул (Арчаков, 2000). Протеомный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, что характеризует исследуемый объект в целом. После расшифровки генома человека и геномов многих других организмов появились исчерпывающие базы данных о структуре всех белков человека и многих других организмов, а также о молекулярной массе их протеолитических фрагментов, полученных в стандартных условиях, что позволяет идентифицировать белки. Развитие протеомики обусловлено использованием высокотехнологичных методов, позволяющих определить количество того или иного белка в образце, идентифицировать белок, его первичную структуру и посттрансляционные модификации (Conrotto, Souchelnytskyi, 2008).

В настоящее время большая часть работ в протеомике выполняется с использованием таких методов, как 2-D PAGE (двумерный гель-электрофорез в полиакриламиде), ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и масс-спектрометрия.

### МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПРОТЕОМИКЕ

Основной причиной бурного развития протеомики в последние десятилетия, несомненно, стало интенсивное развитие масс-спектромет-

рических технологий. На сегодняшний день масс-спектрометрия занимает лидирующее положение среди других спектральных методов анализа в решении многих структурно-аналитических задач. Это обусловлено ее исключительно высокой чувствительностью (относительная  $10^{-4}$ – $10^{-8}\%$ ; абсолютная  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  г), скоростью анализа, характером получаемой информации, уникальной возможностью исследования многокомпонентных смесей благодаря легкому комбинированию с такой мощной разделительной техникой, как газовая, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, а также благодаря реализации метода многостадийной tandemной масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия является физико-химическим методом анализа, заключающимся в переводе молекул образца в ионизированную форму с последующим разделением и регистрацией образующихся при этом положительных или отрицательных ионов. Масс-спектр позволяет сделать выводы о молекулярной массе соединения, его составе и структуре.

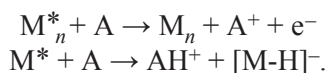
На сегодняшний день существует огромное количество различных способов ионизации исследуемого вещества, а также способов регистрации и разделения полученных ионов. Все они в той или иной мере применяются для анализа различных соединений. Однако для анализа больших биологических молекул, таких как белки и пептиды, на данный момент наибольшее распространение получили такие методы ионизации, как MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) и ESI (ионизация электрораспылением). Эти методы

позволяют переводить в газообразное состояние неразрушенные молекулы, одновременно ионизовать их и проводить внутри масс-спектрометра их индуцируемую диссоциацию.

Метод MALDI заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Над поверхностью образца создается плотная высокотемпературная плазма, в которой наряду с молекулами и ионами матрицы оказываются и молекулы анализируемого соединения. Ионизация последних путем поглощения энергии фотонов или в результате ионно-молекулярных реакций приводит к образованию положительных и отрицательных ионов, которые вытягиваются высоким потенциалом из области ионизации и направляются во времяпролетный масс-анализатор (рис. 1). Метод характеризуется интенсивными пиками молекулярных ионов разного типа и низкой фрагментацией и позволяет исследовать термолабильные, труднолетучие высокомолекулярные соединения (Лебедев, 2003). Матрица в методе MALDI играет важную роль при «мягкой» десорбции исследуемого образца и участвует в его ионизации. Считается, что матрица является донором протонов. Механизмы ионизации образца в условиях MALDI пока недостаточно изучены (Zenobi, Knochennuss, 1998; Karas *et al.*, 2000; Knochennuss *et al.*, 2000). В масс-спектрах

наблюдаются в основном пики однозарядных молекулярных ионов, причем катионы и анионы могут регистрироваться при простой смене полярности выталкивающего электрода. Обычно процессы ионизации разделяют на первичные и вторичные. Первичная ионизация включает процессы возникновения заряда у молекулы образца в момент ее перехода из конденсированной в газовую фазу. Вторичная ионизация обусловлена взаимодействием молекул образца с ионами матрицы в газовой фазе. Поскольку доля образца по сравнению с долей матрицы очень мала, взаимодействия молекул и ионов образца друг с другом маловероятны и не имеют большой значимости.

Среди предложенных механизмов первичной ионизации можно выделить взаимодействие молекулы образца  $A$  с кластером молекул возбужденной матрицы  $M_n^*$  и протонирование молекулы образца возбужденной молекулой матрицы:



Одновременно с переходом молекулы образца в газовую фазу может осуществляться ее взаимодействие с катионами, присутствующими в пробе случайно или добавленными намеренно. В этом случае возникают ионы  $[A+\text{катион}]^+$  (Лебедев, 2003).

Электроспрейная ионизация (ESI) произвела революцию в исследовании сложных многокомпонентных смесей, поскольку позволяет совместить методы ВЭЖХ с масс-спектрометрическими техниками. Суть ESI заключается в следующем. Электрическое напряжение на игле распылителя приводит к большому электрическому градиенту на жидкости, который распределяет заряды на поверхности. Это вынуждает жидкость выпячиваться с иглы в форме конуса Тейлора. Верхушка конуса вытягивается в нить до тех пор, пока не достигнет предела Рэлея, при котором поверхностное натяжение и электростатическое отталкивание сравниваются и сильно заряженная капля не оторвется от нити. Капли, которые оторвались от конуса, притягиваются к входу в масс-спектрометр из-за большой разности потенциалов между иглой и входом в масс-анализатор (Александров и др., 1984). По мере продвижения капли к анализатору кулоновское отталкивание на поверхности превосходит



**Рис. 1.** Схематическое представление механизма MALDI.

поверхностное натяжение и капля «взрывает-ся», окончательно высвобождая ионы (рис. 2). ESI благоприятствует образованию единично заряженных малых молекул, но также хорошо известно образование в ходе нее многократно заряженных больших молекул. Это важное явление, так как масс-спектрометр измеряет отношение массы к заряду ( $m/z$ ) и поэтому многократная зарядка позволяет исследовать очень большие молекулы при помощи инструмента с относительно малым диапазоном масс.

Полученные при ионизации ионы с помощью электрического поля переносятся в масс-анализатор. Там начинается второй этап масс-спектрометрического анализа – сортировка ионов по массам. Существует достаточно большое количество масс-анализаторов, но применительно к ионизации MALDI или ESI чаще всего используют времяпролетный масс-анализатор (TOF), ионную ловушку или систему квадрупольных масс-фильтров.

Времяпролетный масс-анализатор (Wiley, McLaren, 1955) основан на простейшем принципе: скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массам:

$$eV = mv^2/2 \quad \text{или} \quad m = 2eV/v^2,$$

где  $V$  – ускоряющее напряжение.

Если ионы движутся в полой трубе, то места регистрации они достигают в порядке увеличения своей массы (рис. 3). Время достижения ионом детектора можно рассчитать по формуле:

$$t = d\sqrt{\frac{m}{2zeV}}.$$

Основная проблема времяпролетных приборов – это разброс ионов с одной массой по

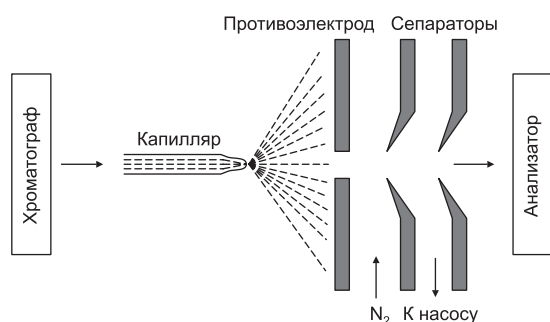


Рис. 2. Принципиальная схема метода ионизации электрораспылением.

времени, скорости (энергии) и в пространстве. Ионы, образовавшиеся в левой части источника, ускоряются разностью потенциалов между стенкой источника и сеткой по направлению к детектору. В области дрейфа происходит разделение ионов по скоростям (следовательно, по массам). Детектор регистрирует интенсивность пучков изобарных ионов. В результате генерируется масс-спектр. Следует отметить, что на детектор поступают все ионы, что существенно улучшает чувствительность метода по сравнению со сканирующими анализаторами, в которых детектора достигает фактически менее 1 % ионов. Разброс по энергиям связан с тем, что ионы уже изначально (до ускорения) имеют различную кинетическую энергию  $\Delta U$ . В результате полная энергия движения ионов в области дрейфа будет ( $eV + \Delta U$ ). Пространственный разброс связан с тем, что ионы в источнике не находятся на одной линии, а занимают конкретный объем. Часть их оказывается ближе, часть – дальше. Если обозначить это отклонение в пространстве от среднего значения  $\Delta s$  и принять, что  $V = Es$ , то получается, что энергия ионов в области дрейфа равна  $eE(s \pm \Delta s)$ . Таким образом, происходит расширение сигнала и, соответственно, потеря разрешения. Решением проблемы разброса по энергиям и повышение разрешающей способности линейных анализаторов стало использование отражателя (рефлектрона, ионное зеркало), предложенного Б.А. Мамыриным (Мамырин и др., 1973).

В рефлектроне при помощи электростатического поля ионы отражаются под небольшим углом в направлении детектора рефлектрона. Из группы ионов с одной массой частицы с большей кинетической энергией проникают глубже внутрь отражающего поля рефлектрона, тем самым затрачивая больше времени на замедление и последующее ускорение. Первыми достигая ионного зеркала, они последними покидают его и догоняют более медленные ионы в фокальной

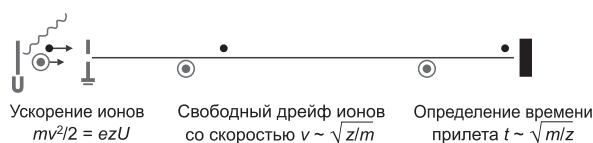


Рис. 3. Схема времяпролетного масс-анализатора.

плоскости, в которой располагается детектор (рис. 4). Такой принцип приводит к значительному увеличению разрешения времяпролетных приборов с рефлектроном по сравнению с линейными масс-спектрометрами и увеличивает точность определения масс.

Квадрупольный анализатор, часто называемый квадрупольным фильтром масс, состоит из 4 параллельных стержней круглого или гиперболического сечения. Противоположные стержни находятся под напряжением, складывающимся из компоненты постоянного тока  $U$  и радиочастотной компоненты  $V_0 \cos \mu t$ . Вторая пара стержней имеет равную по величине, но противоположную по знаку компоненту постоянного тока, а фаза радиочастотной компоненты сдвинута на  $180^\circ$ . Ионы, вводимые в анализатор небольшим ускоряющим напряжением (10–20 В), под действием электрического поля колеблются относительно осей  $X$  и  $Y$ . Так как каждый ион имеет свою собственную частоту, зависящую от массы, через квадруполь пролетают лишь те частицы, частота которых находится в резонансе с радиочастотой квадруполь (рис. 5). Масс-спектр генерируется сканированием  $U$  и  $V_0$  при сохранении постоянной величины  $U/V_0$ . Регистрируемая масса  $m$  пропорциональна  $V_0$ , т. е. линейное изменение  $V_0$  предоставляет калируемую линейную шкалу масс (Dawson, 1986). К недостаткам анализаторов этого типа можно отнести не самый широкий диапазон масс (до  $m/z$  3000–4000 Да) и низкую разрешающую способность.

Дальнейшее развитие квадрупольных анализаторов привело к созданию ионной ловушки. Одна пара стержней была закручена в кольцо, а вторая пара превратилась в шарообразные чашки. Теперь комбинация радиочастотных и постоянных напряжений, прикладываемых к электродам ионной ловушки, стала позволять удерживать ионы внутри нее или выбрасывать их наружу.

Все описанные масс-анализаторы обладают рядом уникальных характеристик и могут быть использованы для решения различного типа экспериментальных задач. Так, времяпролетный масс-анализатор обладает самой высокой разрешающей способностью (до 60 000 Да), ионная ловушка позволяет аккумулировать ионы с определенным  $m/z$ , что делает ее наи-

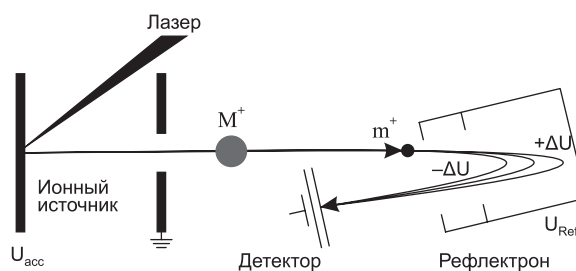


Рис. 4. Использование отражающего напряжения (рефлектрона Мамырина).

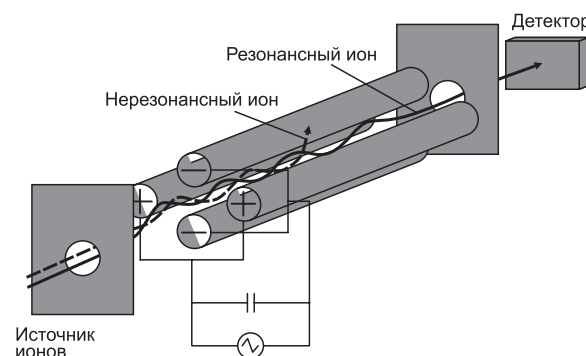


Рис. 5. Схема работы квадрупольного масс-анализатора.

более чувствительным масс-анализатором; квадрупольный масс-фильтр позволяет проводить одновременную количественную оценку нескольких сотен соединений, так называемый мониторинг множественных реакций (MRM).

## ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

При анализе белков и пептидов одной из ключевых стадий является предварительное разделение исследуемых соединений. На сегодняшний день существует множество различных методов для решения данной задачи: электрофорез, хроматография, твердофазная экстракция, обогащение и т. д. Среди всех перечисленных методик стоит отдельно остановиться на методе двумерного гель-электрофореза в полиакриламиде (2-D PAGE). Данный метод решает задачу не только разделения, но и визуализации, а также может быть использован для оценки количества определенных белков.

2-D PAGE представляет собой метод разделения смеси белков, основанный на по-



следовательном использовании двух свойств белков: заряда и массы. Использование таких не связанных между собой свойств белков необходимо, чтобы разделение смеси белков было максимальным (Laemmli, 1970).

Первое направление (также называемое изоэлектрофокусированием, IEF) разделения белков основано на таком их свойстве, как изоэлектрическая точка ( $pI$  – isoelectric point). Изоэлектрическая точка определяется аминокислотным составом белка и меняется при посттрансляционных модификациях. Когда белок попадает в гель с градиентом  $pH$ , к которому приложено электрическое поле, он начинает двигаться к электроду с противоположным зарядом: положительно заряженные белки перемещаются к катоду, а отрицательно заряженные – к аноду. Во время миграции белок присоединяет или теряет протоны, в результате чего его заряд и подвижность снижаются и становятся нулевыми при достижении белком точки в градиенте  $pH$ , равной его  $pI$ . В этой точке он считается «сфокусированным», а на геле он выглядит как четко очерченное пятно. С помощью 2DE возможно разделить белки с очень близкими  $pI$ .

Далее гель, полученный в ходе изоэлектрофокусирования, кладут горизонтально на вершину полимеризованного между двумя стеклами геля, и начинается второе направле-

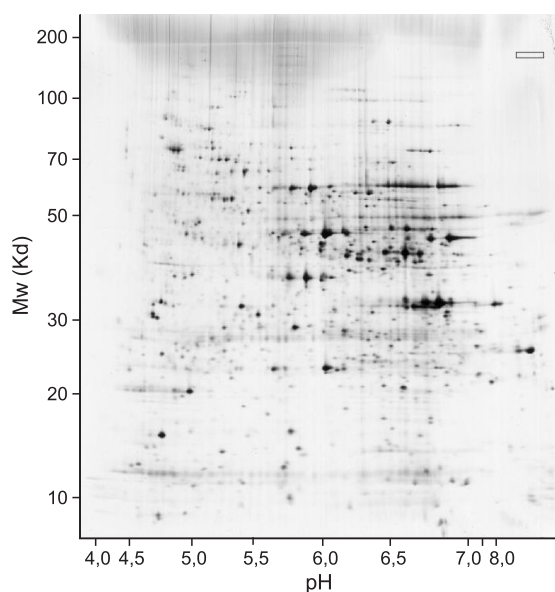
ние электрофореза, в ходе которого происходит разделение белков по массе (рис. 6).

Разновидностью 2-D PAGE является метод дифференциальной окраски разных белковых образцов флюоресцентными красителями (Cy3, Cy5, Cy2) с последующим разделением их на одном геле (Unlü *et al.*, 1997). По сравнению со стандартным 2-D PAGE этот метод позволяет избежать вариабельности внутри гелей и значительно упрощает их анализ (рис. 7).

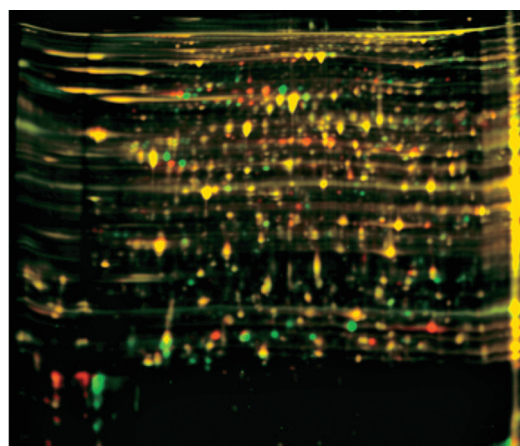
К недостаткам метода следует отнести то, что он достаточно сложно воспроизводим.

### ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ПРОТЕОМИКЕ

Индивидуальность белка (пептида) определяется его первичной структурой, и его масса может быть легко рассчитана. При этом надо иметь в виду, что в природе представлены разные изотопы элементов, входящих в состав аминокислот. Так, 1,1 % всего углерода представлена изотопом  $^{13}C$ ; 4,2 % всей серы – изотопом  $^{34}S$ . При синтезе любого пептида (белка) в его состав с некоторой вероятностью включается один или несколько изотопов  $^{13}C$ , а в случае серосодержащих пептидов –  $^{34}S$ , что приводит к увеличению моноизотопной массы пептида на один или несколько Да. Моноизотопная масса пептида – это масса пептида, имеющего в составе только самые легкие изотопы элементов:



**Рис. 6.** Разделение белков на двумерном геле-электрофорезе.



**Рис. 7.** Пример дифференциальной окраски белков флюоресцентными красителями.

$^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  и  $^{32}\text{S}$ . Вероятность включения в пептид  $^{13}\text{C}$  и  $^{34}\text{S}$  растет с увеличением общего числа атомов углерода и серы в его составе. Поскольку на масс-спектрах регистрируется сигнал от огромного числа ионов определенного пептида ( $10^{-3}$ – $10^{-8}$  шт.) и каждый ион может иметь разный изотопный состав, то речь идет о наблюдении среднего естественного изотопного распределения (рис. 8).

Первой задачей при изучении белка является его идентификация – соотнесение белка с кодирующим его геном. Измерение масс целых белков в силу недостаточной точности измерения или наличия каких-либо модификаций, как правило, не дает достоверной информации. Поэтому прибегают к получению масс-спектрометрической пептидной карты белка – определению набора значений масс пептидов после высокоспецифического гидролиза – химического или ферментативного («MS-peptide fingerprint»).

Общий принцип идентификации белка масс-спектрометрическим методом заключается в сопоставлении реального, экспериментально полученного масс-спектра с теоретическими, находящимися в базе данных и соответствующими известным белкам. Масс-спектрометрическая картина продуктов протеолитического гидролиза белка, как правило, является уникальной для каждого белка и при использовании поисковых алгоритмов может быть сопоставлена с теоретическим масс-спектром.

Существующие программы по идентификации белков по их масс-спектрам используют общедоступные базы данных, содержащие аминокислотные последовательности белков

или нуклеотидные последовательности генов. Ниже приведены наиболее известные из них:

SWISS-PROT – база данных аннотированных белковых последовательностей, которая содержит также дополнительную информацию о функции белка, его доменной структуре, посттрансляционной модификации и т. д.

TrEMBL – приложение к SWISS-PROT, которое содержит все белковые последовательности, транслированные из нуклеотидных последовательностей базы данных EMBL.

PIR-International (Protein Identification Resource, National Biomedical Research Foundation, Washington, USA) – также аннотированная база данных белковых последовательностей.

NCBI nr (национальный центр биотехнологической информации) – база данных белков, содержащая последовательности, транслированные из последовательностей ДНК, хранящихся в GenBank, а также последовательности из баз данных PDB, SWISS-PROT и PIR.

ESTdb (Expressed Sequence Tags database, NCBI, NIH).

Существующие алгоритмы и соответствующие программы можно разделить на три основные группы:

1. Программы, использующие для идентификации белка протеолитический пептидный фингерпринт (MASCOT, Peptide, Mutident, ProFound);

2. Программы, работающие дополнительно с MS/MS спектрами (PepSeq, MASCOT, MS-Fit) или только с MS/MS спектрами;

3. Программы, работающие только с MS/MS спектрами (SEQUEST, PepFrag, MS-Tag, Sherpa).

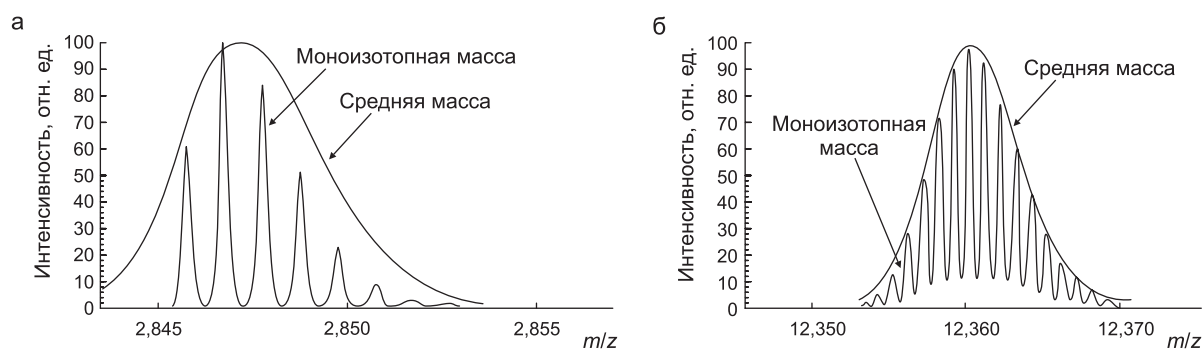


Рис. 8. Естественное изотопное распределение.

Простейший алгоритм поиска белка по базе данных – сопоставление экспериментальных и теоретических масс пептидов и ранжирование белков в базе данных в соответствии с количеством совпавших масс пептидов. У таких алгоритмов есть существенный недостаток: они дают завышенную оценку для больших белков, для которых возможно большее количество рассчитанных пептидов, таким образом повышая вероятность случайного совпадения.

К более совершенным относятся алгоритмы, использующие дополнительную информацию о белке, такую как изоэлектрическая точка белка, его молекулярная масса, аминокислотный состав и т. д. (Peptident, Mutident) (Wilkins *et al.*, 1998).

Алгоритм MOWSE (Pappin *et al.*, 1993), который обладает большей избирательностью и чувствительностью по сравнению с другими алгоритмами, считающими только количество совпавших пептидов, при расчете оценки принимает во внимание относительный избыток пептидов данной массы в базе данных, а также учитывает размер белка.

Программа MASCOT (Perkins *et al.*, 1999) основана на алгоритме MOWSE, но дополнительно рассчитывает вероятность того, что наблюдаемое совпадение экспериментальных и теоретических пептидных масс – случайное событие. Программа MASCOT позволяет путем последовательных запросов оптимизировать параметры поиска. С помощью этой программы можно идентифицировать белки из несложных смесей.

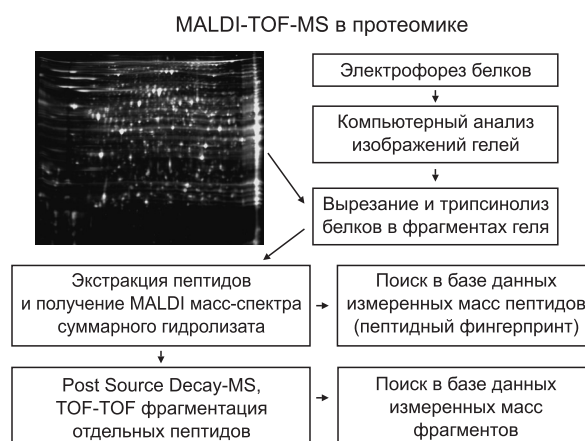
Существуют алгоритмы, осуществляющие ранжирование результатов по вероятности соответствия запросу. Так, алгоритм программы ProFound (Zhang, Chait, 2000) использует байесовскую статистику для ранжирования белков в базе данных, которая минимизирует ожидаемую вероятность ошибочной классификации. ProFound использует поэтапный подход к идентификации белков. Сначала белки в базе данных ранжируются согласно тому, насколько хорошо они совпадают с экспериментальными данными, предполагая, что в запросе представлен один белок. Затем спектры масс пептидов из белков, получивших высокую оценку, объединяются по 2, по 3 и т. д., и такие объединенные спектры снова ранжируются по

сходству с запросом. Подобный алгоритм позволяет идентифицировать несколько белков по их пептидному фингерпринту.

Программа SEQUEST, предназначенная для идентификации белков на основе масс-спектров фрагментов ионов, рассчитывает коэффициент корреляции между экспериментальными спектрами масс и рассчитанными по последовательностям из базы данных. На основании этого коэффициента корреляции и происходит формирование оценок для белков из базы данных. Этот подход не требует от исследователя какой-либо другой информации помимо спектра фрагментов ионов, но поиск занимает много времени.

Наряду с измерением масс целых ионов пептидов некоторые масс-спектрометры (тандемные) предоставляют возможность получения спектров фрагментации отдельных пептидов в сложных смесях, например в гидролизатах белков. Частичная фрагментация пептидов происходит непосредственно в приборе в результате индуцированных столкновений. Общая схема протеомного анализа в данном случае выглядит следующим образом (рис. 9).

Пептиды являются сложными молекулами, состоящими из тысяч атомов, поэтому количество теоретически возможных путей фрагментации может быть практически не ограничено. Однако основные направления распада оказываются общими для всех соединений этого класса. Они обусловлены, в первую очередь,

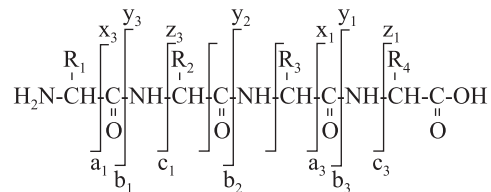


**Рис. 9.** Схема проведения протеомного анализа неизвестных белков после разделения методом 2-D PAGE.

колебательными возбуждениями исходного иона и суперпозицией этих колебаний и связаны с разрывами связей вдоль скелета молекулы с образованием характеристических серий дочерних ионов. В зависимости от того, какая связь рвется и на какой части молекулы сохраняется заряд (на N- или C-конце), выделяют следующие серии ионов: фрагменты, в которых заряд сохраняется на C-концевой части молекулы, обозначаются символами x, y и z; на N-концевой части исходной молекулы – символами a, b и c (рис. 10) (Papaannopoulos, 1995). Как пептидный фингепринт характеристичен для целого белка, так спектр фрагментации характеристичен для пептида.

Другой областью применения MALDI времяпролетной масс-спектрометрии является идентификация микроорганизмов. Масс-спектры белковых профилей микроорганизмов в диапазоне 2–20 кДа являются видоспецифичными и демонстрируют высокую воспроизводимость. Это объясняется тем, что в данном диапазоне масс большинство мажорных пиков спектра относятся к рибосомальным белкам (Ryzhov, Fenselau, 2001), которые всегда и в большом количестве представлены в цитоплазме клетки вне зависимости от условий и фазы роста бактериальной культуры. Для проведения анализа могут использоваться как целые клетки, непосредственно нанесенные на масс-спектрометрическую мишень (Seibold *et al.*, 2010), что существенно сокращает время анализа, так и белковые экстракты, выделенные из них (Ferreira *et al.*, 2010), что повышает качество спектров и устраняет опасность бактериального загрязнения.

Для идентификации микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии необходима база данных характеристичных (эталонных) спектров, представляющих собой суперспектры, полученные усреднением серии единичных спектров, что позволяет добиться большей точности и воспроизводимости анализа. В рамках процедуры идентификации происходит попарное сравнение пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных суперспектров, находящихся в базе данных. Каждому сравнению с суперспектром в базе данных присваивается численный рейтинг, определенный на основании количества совпадений. Идентифи-



**Рис. 10.** Номенклатура ионов фрагментации пептидов в зависимости от точки разрыва и локализации заряда.

кация происходит по наилучшему совпадению (Freiwald, Sauer, 2009).

MALDI времяпролетная масс-спектрометрия выгодно отличается от остальных методов идентификации высокой скоростью и простотой анализа. При этом она не уступает, а иногда и превосходит по точности анализа такие широко распространенные методы, как секвенирование участка гена 16S рПНК и биохимические тесты (Sandrin, 2012; Böhme *et al.*, 2013).

## ЛИТЕРАТУРА

- Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В. и др. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа // Докл. АН СССР. 1984. Т. 277. Вып. 2. С. 379–383.
- Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика – науки о жизни XXI столетия // Вопр. мед. химии. 2000. Вып. 1. С. 4–7.
- Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмик Д.В., Загулин В.А. Ионное зеркало из трех сеток // Журн. эксперим. теор. физики. 1973. Т. 64. С. 82–89.
- Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бинوم, 2003. 493 с.
- Böhme K., Fernández-No I. C., Pazos M. *et al.* Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing vs. MALDI-TOF MS fingerprinting // Electrophoresis. 2013. V. 34. P. 877–887.
- Conrotto P., Souchelnytskyi S. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications // Exp. Oncol. 2008. V. 30. No. 3. P. 171–180.
- Dawson P.H. Quadrupole mass analyzers: performance, design and some recent applications // Mass Spectrom. Rev. 1986. V. 5. P. 1–37.
- Ferreira L., Vega Castaño S., Sánchez-Juanes F. *et al.* Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures // PloS One. 2010. V. 5. P. e14235.
- Freiwald A., Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry // Nat. Protoc. 2009. V. 4. P. 732–742.
- Zenobi R., Knochennuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry // Mass Spectrom. Rev. 1998. V. 17. P. 337–366.



- Karas M., Gluckmann M., Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors // *Mass Spectrom. Rev.* 2000. V. 35. P. 1–12.
- Knochenmuss R., Stortelder A., Breuker K., Zenobi R. On secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization // *J. Mass. Spectrom.* 2000. V. 35. P. 1237–1245.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Papayannopoulos I.A. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides // *Mass Spectrom. Rev.* 1995. V. 14. P. 49–73.
- Pappin D.J., Hojrup P., Bleasby A.J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting // *Curr. Biol.* 1993. V. 3. P. 327–332.
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3551–3567.
- Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // *Analyt. Chem.* 2001. V. 73. P. 746–750.
- Sandrin T. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review // *Mass Spectrom. Rev.* 2012. V. 32. P. 188–217.
- Seibold E., Maier T., Kostrzewa M. *et al.* Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. P. 1061–1069.
- Unlü M., Morgan M.E., Minden J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2071–2077.
- Wiley M.C., McLaren I.H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution // *Rev. Sci. Instrum.* 1955. V. 26. P. 1150–1158.
- Wilkins M.R., Gasteiger E., Wheeler C. *et al.* Multiple parameter cross-species protein identification using MultiIdent—a world-wide web accessible tool // *Electrophoresis*. 1998. V. 19. P. 3199–3206.
- Zhang W., Chait B.T. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 2482–2489.