

УДК 577.113.088.52:543.51:616

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

© 2009 г. Е. Н. Ильина**, В. М. Говорун*, **

*ФГУ НИИ Физико-химической медицины Росздрава, 119992, Москва, Малая Пироговская, 1а;

**Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 25.01.2008 г. Принята к печати 08.07.2008 г.

В последние десятилетия наметилась устойчивая тенденция к модернизации в сфере медицинской диагностики путем внедрения в практику высокотехнологичных и наукоемких аналитических систем, позволяющих проводить исследования на молекулярном уровне. Ярким примером таких технологий служат масс-спектрометрические методы анализа биомолекул. Настоящий обзор ставит своей целью осветить возможности современного парка масс-спектрометрического оборудования и проиллюстрировать применение масс-спектрометрии нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) для решения практических задач, связанных с исследованиями геномной ДНК человека и клинически значимых микроорганизмов бактериальной и вирусной природы.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; нуклеотидный полиморфизм; мутации; секвенирование; лекарственная устойчивость.

Развитие фундаментальной и прикладной наук в настоящее время опирается на мощную технологическую базу и широкий арсенал аналитических методов изучения строения и свойств вещества вообще и макромолекул в частности. Важное, если не лидирующее, место в этом процессе занимает масс-спектрометрия. По определению, масс-спектрометрия (масс-спектроскопия, масс-спектральный анализ) – это метод анализа вещества путем определения массы (чаще, отношения массы к заряду m/z) и относительного количества ионов, получаемых при ионизации и фрагментации исследуемого вещества. Совокупность значений m/z и относительных величин интенсивности потоков этих ионов, представленная в виде графика или таблицы, носит название масс-спектра вещества.

Сегодня масс-спектрометрия представляет собой фундаментальную и прикладную физико-химическую науку, в задачи которой входит получение и накопление знаний о составе веществ, их структуре, физико-химических свойствах, а также происходящих с ними процессах. При этом масс-спектрометрия, как метод детекции, не только прочно вошла в методический арсенал научных подразделений, но и нашла применение для решения сугубо практиче-

ских задач, связанных с клинически значимыми исследованиями в области генетики человека, микробов, вирусов.

Принципы и аналитические возможности масс-спектрометрии макромолекул

Широкое использование масс-спектрометрии в исследовании структуры и функции биологически активных макромолекул, в том числе молекул нуклеиновых кислот и белков, стало возможным благодаря технологическому прорыву, случившемуся в 80-х годах прошлого века. В это время были разработаны новые методы ионизации, в частности, “электроспрей” [1, 2] и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI) [3]. “Ионные крылья для молекулярных слонов” – так образно назвал предложенные принципы ионизации макромолекул Джон Фенн (John B. Fenn, Virginia Commonwealth University, Richmond, США), получивший совместно с Коичи Танаке (Koichi Tanaka, Shimadzu Corp., Kyoto, Япония) в 2002 г. Нобелевскую премию по химии за разработку методов ионизации макромолекул в масс-спектрометрии.

На сегодняшний день MALDI и электроспрей являются альтернативными способами ионизации биомолекул, имеющими свои достоинства и ограничения.

Принципиальное различие этих методов заключается в образовании преимущественно однозарядных ионов вещества при MALDI и многозарядных – при электроспрей-ионизации. За счет образования многозарядных ионов электроспрей-

Сокращения: FTICR – ионно-циклотронный резонанс с Фурье-преобразованием сигнала (Fourier-transform ion cyclotron resonance); MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionization); TOF – времяпролетный (time-of-flight); dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфаты; ddNTP – дидезоксинуклеозидтрифосфаты; НК – нуклеиновые кислоты.

* Автор для связи (тел.: (499) 245-04-71; факс: (499) 246-77-21; эл. почта: ilinaen@gmail.com).

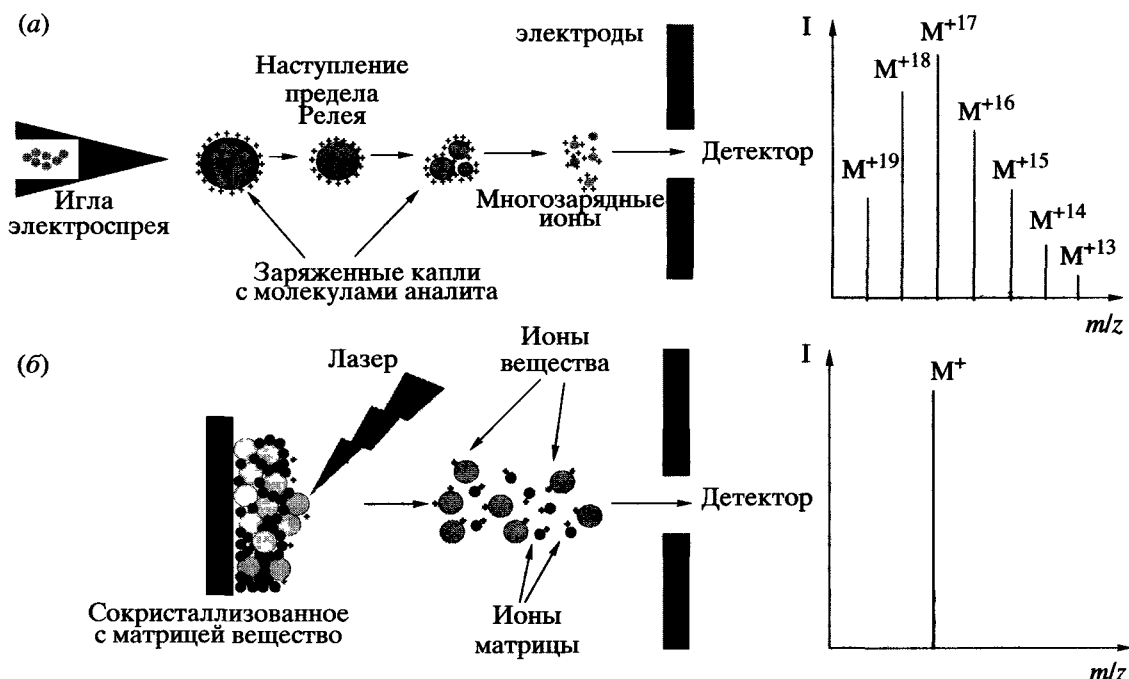


Рис. 1. Принципиальные схемы образования заряженных частиц при электроспрейной ионизации (а) и MALDI (б). Приведены схематичные масс-спектры, получаемые в каждом методе.

ионизация позволяет проводить анализ более крупных молекул (зарегистрированный рекорд составляет 100000 кДа), чем MALDI, но при этом интерпретация результатов исследования несколько сложнее и требует специальной математической обработки (деконволюции).

При электроспрей-ионизации образование ионов достигается путем непрерывного распыления раствора образца в процессе прохождения через капилляр, на который подается высокое электрическое напряжение (2.5–4 кВ). На выходе образуется совокупность микрокапель раствора, обладающих высоким поверхностным зарядом. Пучок заряженных микрокапель, уменьшающихся в размере за счет потери молекул растворителя, движется к противоэлектроду, имеющему потенциал Земли. Достигая критического размера, при котором силы поверхностного натяжения не могут противостоять силам кулоновского отталкивания (предел Релея), капли “взрываются” с образованием более мелких капель. Этот процесс повторяется, и в итоге, после нескольких серий фрагментации, возникают капли, содержащие всего одну заряженную частицу вещества. Образовавшиеся многозарядные ионы в дальнейшем улавливаются анализатором (рис. 1а).

Принцип MALDI основан на десорбции анализата вместе с летучим органическим веществом – матрицей – под действием коротких, но мощных лазерных импульсов (рис. 1б). Правильный выбор вещества матрицы и подбор оптимального соотношения анализат/матрица обуславливает чувствительность

метода, определяемую эффективностью перевода анализата в газообразную фазу. Как правило, матрица – это низкомолекулярное, полярное, легко поддающееся ионизации органическое вещество, способное образовывать кристаллоиды в присутствии анализата и инертное по отношению к нему. Если большие нелетучие молекулы анализата изолированы друг от друга в матрице, то их можно выбить из окружения без разрушения, в виде ионов, частично с захватом молекул матрицы, то есть с образованием квазимолекулярных ионов. В настоящее время предложены разнообразные органические соединения, используемые в качестве матрицы, однако большинство из них пригодны для анализа белковых молекул, тогда как проблема анализа олигонуклеотидов долгое время оставалась нерешенной.

Наиболее распространенным масс-анализатором для MALDI-масс-спектрометрии является времяпролетный (TOF) масс-спектрометр, работа которого основана на том, что скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массе. Если ионы движутся внутри трубы, то места регистрации они достигают в порядке увеличения своей массы. Анализаторы такого типа получили название линейных, а их сочетание с MALDI оказалось весьма эффективным для анализа как белков и пептидов – доступными для анализа стали биомолекулы с массой до 100 кДа [4], так и одно- и двухцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот. Основная проблема времяпролетных приборов – разброс ионов с одинаковой массой по времени, энергии и простран-

ству, решается за счет применения импульсных методов генерации ионов (импульсной подачи напряжения) и/или использования рефлектрона (ионного зеркала), предложенного в 1973 г. Б.А. Мамыриным [5]. Как правило, оснащенные рефлектронном TOF-масс-спектрометры позволяют снимать масс-спектры с лучшим разрешением, чем работающие в линейном режиме. Однако наблюдаемое при этом снижение аналитической чувствительности сделало их малоэффективными для исследования нуклеиновых кислот.

При MALDI-масс-спектрометрии эффективность регистрации ионов зависит от многих параметров, таких, как способ приготовления и очистки образца; количественное соотношение матрицы и анализируемого вещества и правильный выбор материала подложки. Кроме того, мощность лазерного излучения, выбор "горячей точки" на образце, давление в области ионизации также являются важными условиями получения устойчивого сигнала.

Для масс-спектрометров с электроспрейным ионным источником наиболее часто используемыми анализаторами являются ионные ловушки, позволяющие сфокусировать хаотично образующиеся ионы. Принцип действия таких анализаторов основан на изменении траектории движения заряженных частиц в статическом электрическом поле, создаваемом электродами внутри ловушки. Произвольное изменение электростатического напряжения позволяет управлять движением ионов, улавливая их и направляя на детектор. Исходя из формы и расположения электродов, различают линейные ионные ловушки, квадрупольные и орбитальные ловушки, в которых ионы, попадающие в поле, начинают двигаться по стабильным циклическим траекториям, концентрируясь вдоль центральной оси. Ионные ловушки позволяют, варьируя напряжение и частоту модуляции, удерживать ионы с определенным m/z и получать спектры их фрагментов. При этом возможен ряд последовательных фрагментаций иона.

Применение ионных ловушек в качестве масс-анализаторов позволяет обеспечить высокую точность измерения масс (до 2 м.д. при использовании внутренней калибровки) при хорошем разрешении масс-спектров (до 100000), что является безусловным требованием осуществления качественных исследований. На сегодняшний день сочетание квадрупольного с электроспрейным источником ионов является одним из инструментов, наиболее часто применяемых в биохимии и протеомике в связи с исследованием и идентификацией молекул биополимеров – пептидов, протеинов и полинуклеотидов, а также других сложных органических и неорганических молекул.

В современных масс-спектрометрах, сочетающих MALDI или электроспрей-ионизацию с различными техническими средствами управления ионным пучком (TOF-анализатор, ионные ловуш-

ки), наиболее распространенным детектором заряженных частиц служат микроканальные пластины, представляющие собой сборку большого (несколько миллионов) количества канальных электронных умножителей.

В масс-спектрометрах ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием сигнала (FTICR) реализован принцип пространственного и временного разделения ионов с различными значениями отношения массы к заряду в магнитном поле. В этом случае ионы "запираются" в мощный (до 15 тесла) секторный сверхпроводящий активно экранированный магнит, где вращаются под действием силы Лоренца с частотой, зависящей от величины m/z .

Два сектора магнита, играющих роль детектора, используются для снятия токов, наведенных пролетающими мимо них ионами. Сложный частотный сигнал, образуемый множеством ионов с разными m/z , подвергается Фурье-преобразованию. Преобразование Фурье выделяет каждую индивидуальную частоту и пересчитывает ее в величину отношения массы к заряду. Конфигурация масс-спектрометра FTICR с электроспрейным источником ионов обладает сверхвысоким разрешением (до 10000000) и точностью измерения масс (~1 м.д.). Масс-анализаторы этого класса сейчас считаются самыми точными и чувствительными на рынке масс-спектрометрического оборудования.

Развитие рынка масс-спектрометрического оборудования, совершенствование их технических характеристик, упрощение процедур обслуживания и эксплуатации приборов способствует распространению масс-спектрометрии в различных областях науки и техники: химии, физики, биологии, экологии и т.д. Тем не менее в медицинской диагностике сфера практического применения масс-спектрометрических детекторов до недавнего времени оставалась крайне узкой и ограничивалась областями контроля качества химической чистоты анализируемых соединений, например, в фармацевтической промышленности.

Настоящий обзор ставит своей целью проиллюстрировать возможности применения методов масс-спектрометрического анализа нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) для решения практических задач, связанных с исследованием геномной ДНК человека и клинически значимых микроорганизмов бактериальной и вирусной природы.

Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот

Исторически именно масс-спектрометрия НК одной из первых нашла практическое применение в медицинской диагностике. При использовании общего приборного парка, масс-спектрометрические подходы к анализу НК имеют свои особенности по сравнению с исследованием белковых молекул. В первую очередь это касается применяемых

при MALDI-масс-спектрометрии матриц. Типичная матрица для MALDI – это ароматическая кислота, которая эффективно адсорбирует энергию лазера. Именно от выбора компонентов матрицы зависят чувствительность и точность анализа. Решающим событием в истории MALDI-масс-спектрометрии олигонуклеотидов стало применение в качестве матрицы производных пиколиновой кислоты – 3-амино- [6] или 3-гидрокси-пиколиновой кислоты [7], последняя из которых сейчас является наиболее распространенным веществом для анализа молекул ДНК или РНК.

Кроме этого, в масс-спектрометрии НК нашли применение матричные вещества на основе фенолов – тригидроксиацетофеноны [8] и недавно аннотированное новое соединение – 3,4-диаминобензофенон, которое по данным исследователей позволяет достичь лучшего разрешения и соотношения сигнал/шум, чем 3-гидрокси-пиколиновая кислота [9]. Перечень возможных матричных веществ, используемых в масс-спектрометрии НК, приведен в табл. 1.

Помимо основного матричного вещества, для улучшения качества масс-спектров применяют различные добавки, в частности ацетат [12] или цитрат аммония [13], для уменьшения образования комплексов (аддуктов) между молекулами НК и ионами щелочных металлов (Na^+ , K^+) и фукозу [14] – для повышения гомогенности получаемых кристаллов, что существенно упрощает процедуру снятия масс-спектров в автоматическом режиме.

В масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией ведущую роль играют компоненты раствора, в котором аналит – НК образует многозарядные ионы. Обычно это смесь воды и летучего органического растворителя (метанол, ацетонитрил), легко испаряющегося при высоких температурах. Так же, как при MALDI, молекулы НК при электроспрей-ионизации склонны к присоединению ионов Na^+ или K^+ и формированию аддуктов. Добавление в раствор для масс-спектрометрического исследования гидрохлорида аммония или триэтиламина позволяет блокировать образование аддуктов при снятии масс-спектров отрицательно заряженных ионов. Вообще, при масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией регистрация отрицательных ионов дает большую чувствительность в исследовании НК, чем детекция положительных ионов, используемая главным образом для анализа белков.

Основным требованием при осуществлении масс-спектрометрического анализа НК (ДНК и РНК), независимо от способа ионизации – электроспрей-ионизация или MALDI, является высокая химическая чистота исследуемого соединения. Примеси веществ, часто используемых при проведении молекулярно-биологических реакций *in vitro*, таких, как SDS, глицерин, Твин, EDTA, хлорид магния и ряд других, существенно влияют на процессы ионизации,

приводя к снижению чувствительности масс-спектрометрического исследования.

Особенно чувствителен к примесям метод электроспрей-ионизации – присутствие посторонних молекул сказывается на ионизации анализируемого вещества за счет изменения силы поверхностного натяжения капли, а также приводит к образованию аддуктов, что затрудняет и без того сложную процедуру окончательной обработки данных. При MALDI, в силу необходимости сокристаллизации аналита с веществом матрицы, любые дополнительные вещества, содержащиеся в анализируемом объекте, попавшие туда либо в ходе проведения предварительных биохимических реакций, либо из паров воздуха, из лабораторного пластика и т.д., приводят к нарушению образования правильной кристаллической решетки, что отрицательно сказывается на эффективности ионизации макромолекул.

Существует множество методов очистки НК, предназначенных для масс-спектрометрии, общая задача которых – избавиться от химических примесей: это переосаждение спиртом и различные виды хроматографии, позволяющие элиминировать из раствора ионы Na^+ , K^+ [15–18].

Масс-спектрометрия НК имеет общие закономерности, но масс-спектрометрия одноцепочечных молекул ДНК (олигонуклеотидов), двухцепочечных молекул ДНК и РНК имеет свои индивидуальные особенности.

Хотя продемонстрирована возможность получения MALDI-масс-спектров для молекул ДНК весом около 90 кДа (~300 нт) [19] и РНК весом 150 кДа [20], среднестатистический предел MALDI-масс-спектрометрии НК составляет около 30 кДа (~100 нт). Кроме того, MALDI-ионизация накладывает ограничения на нижнюю границу диапазона измерения – 600 Да, ниже которого интерпретация масс-спектра затруднена из-за присутствия ионов матричного вещества.

Как правило, молекулы РНК более стабильны при масс-спектрометрии, чем молекулы ДНК, от которых в процессе ионизации могут отщепляться пуриновые основания [15]. Процессы депуринизации происходят как при MALDI-, так и при электроспрей-ионизации – в первом случае за счет электромагнитной энергии, во втором – за счет тепловой. Одним из способов решения этой проблемы является применение в биохимических реакциях, предшествующих масс-спектрометрическому исследованию, 7-диазапуринов, придающих дополнительную “прочность” молекуле НК [21].

На первый взгляд, электроспрей-ионизация должна позволять исследовать более протяженные молекулы, чем MALDI, однако диапазон, внутри которого мол. массы НК могут быть измерены с достаточной точностью, для обоих методов приблизительно одинаков – до 100 кДа, с оптимумом в районе

Таблица 1. Матрицы для MALDI-TOF-спектрометрии нуклеиновых кислот (по Sauer S., 2007 [10])

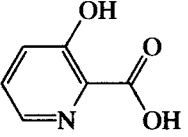
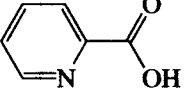
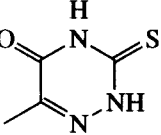
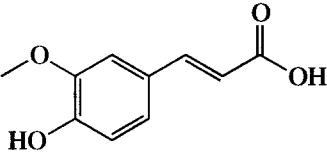
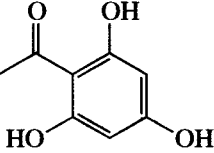
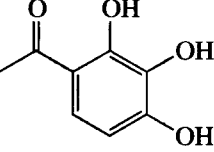
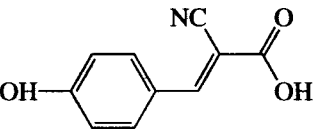
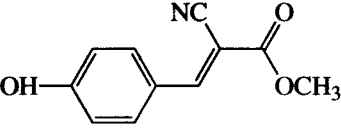
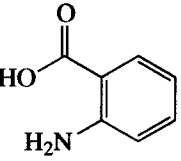
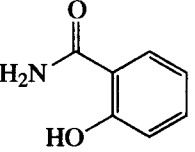
Наименование вещества	Формула	Комментарии
3-Гидроксипиколиновая кислота (3-НРА)		Применима для олигонуклеотидов длиной более 10 нт, меньше подходит для более коротких олигонуклеотидов в силу образования комплексов ДНК с матрицей
Пиколиновая кислота		Обычно используется в сочетании с 3-гидроксипиколиновой кислотой
6-Аза-2-тиотимин		Редко используется на практике, хотя подходит для исследования протяженных ДНК в силу низкой вероятности фрагментации последней
3-Метокси-4-гидроксикоричная (феруловая) кислота		Одна из первых матриц для ДНК [11]. Сейчас редко используется на практике, преимущественно для олигонуклеотидов массой более 3500 Да
2,4,6-Тригидроксиацетофенон (2,4,6-ТНАР)		Является альтернативой 3-НРА, в частности для коротких олигонуклеотидов, тогда как для длинных молекул ДНК высока вероятность фрагментации. Может использоваться в сочетании с 2,3,4-ТНАР
2,3,4-Тригидроксиацетофенон (2,3,4-ТНАР)		Является альтернативой 3-НРА, в частности для коротких олигонуклеотидов, тогда как для длинных молекул ДНК высока вероятность фрагментации. Может использоваться в сочетании с 2,4,6-ТНАР
α-Циано-4-гидроксикоричная кислота		Используется для анализа протеин-нуклеиновых кислот (PNA), модифицированных и коротких нейтрально заряженных олигонуклеотидов
Метилвый эфир α-циано-4-гидроксикоричной кислоты		Используется для анализа PNA, модифицированных и коротких нейтрально заряженных олигонуклеотидов
орто-Аминобензойная кислота		Редко используется на практике, преимущественно для олигонуклеотидов массой более 3500 Да
Салициламид		Редко используется на практике, преимущественно для олигонуклеотидов массой более 3500 Да

Таблица 2. Экспериментальная точность измерения масс олигонуклеотидов при MALDI-TOF-масс-спектрометрии (Voyager DE™, Applied Biosystems, США) в линейном режиме и масс-спектрометрии с электроспрейным источником ионов (Finnigan TSQ7000 LC-MS, Thermo Electron, США), объединенным с жидкостным хроматографом и оснащенный квадруполом (по Nail et al., 2004 [22])

Длина олигонуклеотида, нт	Молекулярная масса, Да		
	вычисленная	экспериментальная (ошибка, м.д.)	
		MALDI-TOF-масс-спектрометрия в линейном режиме	Масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией
10	2993.0	2992.1 (-300.7)	2993.1 (33.4)
20	6168.1	6167.4 (-113.5)	6167.6 (-81.1)
40	12300.0	12298.6 (-113.8)	12299 (-24.4)
60	18410.0	18414.6 (249.9)	18410.1 (5.3)
80	24661.1	24664.7 (146.0)	24661.0 (-4.1)
100	30951.1	30978.3 (878.8)	30950.6 (-16.2)
120	37031.0	37121.6 (2446.6)	37030.0 (-27.0)

10 кДа для MALDI и 20 кДа – для электроспрей-ионизации (табл. 2).

Заканчивая иллюстрацию возможностей масс-спектрометрических методов анализа образцов, следует отдельно упомянуть о масс-спектрометрическом секвенировании *de novo*. Этот подход реализован за счет тандемной масс-спектрометрии (MS/MS), когда молекулярные ионы подвергаются двойному последовательному масс-спектрометрическому анализу. На первом этапе осуществляется сортировка ионов по массе, на втором этапе за счет энергии лазерного излучения происходит разрыв химических связей отобранных ионов. Для НК разрывы образуются по фосфодиэфирным связям (рис. 2), что приводит к образованию набора продуктов деградации, отличающихся друг от друга по массе (лестница). Впервые возможность *de novo*-секвенирования непротяженных (до 10 нт) молекул ДНК была продемонстрирована в работах [23, 24], с применением тандемного масс-спектрометра, оснащенного ионной ловушкой и электроспрейным источником ионов. Следует отметить, что такой способ опреде-

ления нуклеотидной последовательности не применим для молекул РНК из-за малой разницы между молекулярной массой урацила и цитозина (1 Да) [25].

Применение масс-спектрометрии нуклеиновых кислот

Одним из первых приложений масс-спектрометрии НК как аналитического инструмента стал контроль качества при химическом синтезе олигонуклеотидов, в частности обнаружение примеси олигонуклеотидов с недостающими звеньями (N1, N2 и т.д.). Помимо возможности регистрации ошибок, происходящих в ходе элонгации цепочки ДНК, масс-спектрометрия позволяет контролировать процесс постсинтетической обработки олигонуклеотидов, заключающийся в снятии защиты с реакционных групп азотистых оснований нуклеотидов, включенных в цепочку ДНК. Известно, что аминогруппы оснований в фосфорамидитах dA, dC и dG защищены для предотвращения разветвления цепочки ДНК в ходе элонгации. Неполное отщепление защитных групп на последней стадии синтеза

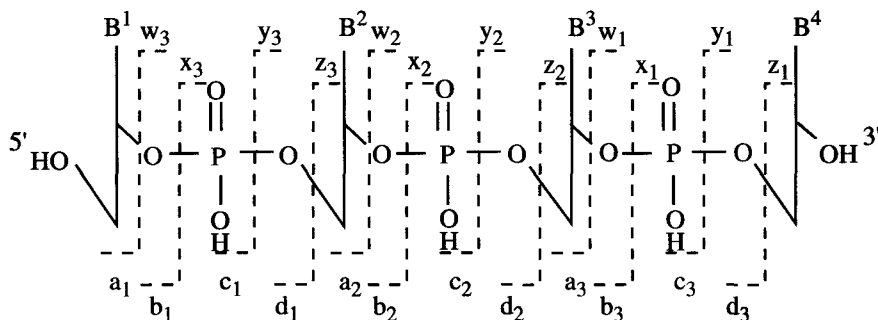


Рис. 2. Позиции разрыва фосфодиэфирного скелета олигонуклеотидного иона в процессе его дефрагментации по номенклатуре МакЛаки 1992 [23]. B¹ – B⁴ – нуклеиновые основания.

Применение MALDI для анализа полиморфизмов в молекуле ДНК является ярким примером практического использования масс-спектрометрического исследования. Среди существующих на сегодняшний день разных стратегий анализа генетических мутаций – рестриктазный анализ, гибридизация, аллель-специфичная амплификация, наиболее надежными остаются реакции секвенирования или мини-секвенирования (удлинения праймера). Дополненные TOF-анализатором, эти технологии пережили второе рождение и легли в основу создания высокопроизводительных систем сканирования геномной ДНК. Исторически такой подход был впервые реализован для анализа нуклеотидных полиморфизмов в геноме человека [39].

В основе методов секвенирования и мини-секвенирования лежит реакция ферментативного достраивания олигонуклеотидного праймера в соответствии с нуклеотидным контекстом матричной ДНК в присутствии набора дезокси- (dNTP) и дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). При реакции секвенирования в реакционной смеси находятся все четыре dNTP и ddNTP, в результате чего образуются продукты синтеза, вероятностным образом достроенные на 1, 2, 3, ... 10 и т. д. нуклеотидов. В реакции мини-секвенирования, как правило, олигонуклеотидный праймер своим 3'-концом непосредственно прилежит к точке мутации, а набор нуклеозидтрифосфатов формируется таким образом, чтобы праймер удлинялся только на 1–2–3 нуклеотида (используют “непересекающиеся” смеси нуклеозидтрифосфатов, например dATP, ddCTP, ddTTP). Элонгация праймера в ходе термоциклических реакций секвенирования и мини-секвенирования осуществляется модифицированным ферментом, как правило, *Taq*-полимеразой, обладающей способностью встраивать в растущую цепь ДНК ddNTP (например, TermiPol DNA Polymerase, Solis Biodyne, Эстония).

В зависимости от состава реакционной смеси различают однонуклеотидную (single base) реакцию мини-секвенирования, когда в реакционной смеси присутствует только набор из ddNTP (рис. 3а), и мульти-нуклеотидную (multiple base), когда в реакционной смеси присутствуют как dNTP, так и ddNTP (рис. 3б). В последнем случае нарабатываются продукты реакции, отличающиеся друг от друга как минимум на одно нуклеотидное основание, что существенно облегчает процесс интерпретации результатов, особенно при анализе аллельных вариантов. Еще одной разновидностью реакции мини-секвенирования является удлинение праймера в присутствии трех из четырех dNTP (смесь “–1”). В этом случае элонгация праймера обрывается за счет отсутствующего основания (рис. 3в), что является менее надежным критерием оценки, чем прерывание процесса за счет включения терминирующих ddNTP.

Из перечисленных вариантов, мульти-нуклеотидная реакция удлинения праймера в присутствии заданного набора dNTP/ddNTP одной из первых получила технологическую реализацию. Присутствие в реакционной смеси ddNTP обеспечивает специфическую остановку синтеза (в зависимости от нуклеотидной последовательности матричной ДНК) и получение набора олигонуклеотидных фрагментов, отличающихся друг от друга по длине на 1–4 нт. Детекция продуктов реакции проводится с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, аналитические возможности которой позволяют корректно определить молекулярные массы наработанных фрагментов ДНК. Этот метод по точности идентификации нуклеотидных полиморфизмов сопоставим с прямым определением нуклеотидной последовательности интересующих локусов, но является более простым и дешевым в исполнении и позволяет осуществлять мультипраймерные реакции мини-секвенирования, нацеленные на одновременный анализ 4–5 независимых локусов хромосомной ДНК.

Кроме того, мини-секвенирование обладает большей информативностью при исследовании гетерогенных популяций, в частности, при анализе гетерозиготных состояний человека, идентификации соматических мутаций на фоне присутствия интактных ДНК (при онкогенезе), выявления мутантных штаммов бактерий, возникающих под воздействием лекарственных препаратов [40].

Идея применения MALDI-TOF как детектора продуктов реакции мини-секвенирования породила множество разработок, ориентированных на исследование нуклеотидных полиморфизмов – высокопроизводительное тестирование геномной ДНК человека [41], обнаружение метилированной ДНК, что особенно важно при исследовании опухолевых тканей. В последнем случае используют традиционную бисульфитную обработку геномной ДНК [42], в результате которой незащищенный метильными группами цитозин во всех CpG-парах превращается в урацил (CG → UG). В амплифицированном с такой матрицы фрагменте ДНК исходные CpG-островки либо поменяли свою последовательность на T-G, либо остались неизменными в случае их метилирования, что можно обнаружить в реакции мини-секвенирования [43] или гибридизацией [44], в обоих случаях применяя MALDI-TOF как анализатор.

Существующие ограничения этой технологии, связанные с необходимостью оставаться в измерительном диапазоне не более 12000 Да (т.е. размер продуктов реакции мини-секвенирования не должен превышать 40 нт), легко обходятся путем введения в структуру праймера фоточувствительной метки, например производных нитрофенола (коммерчески доступный препарат PC-o-Nitrophenyl-CE-Phosphoramidite, Bruker Daltonik, Германия) [45]. Под действием ультрафиолета наработанные в ходе мини-секвенирования продукты реакции расщепля-

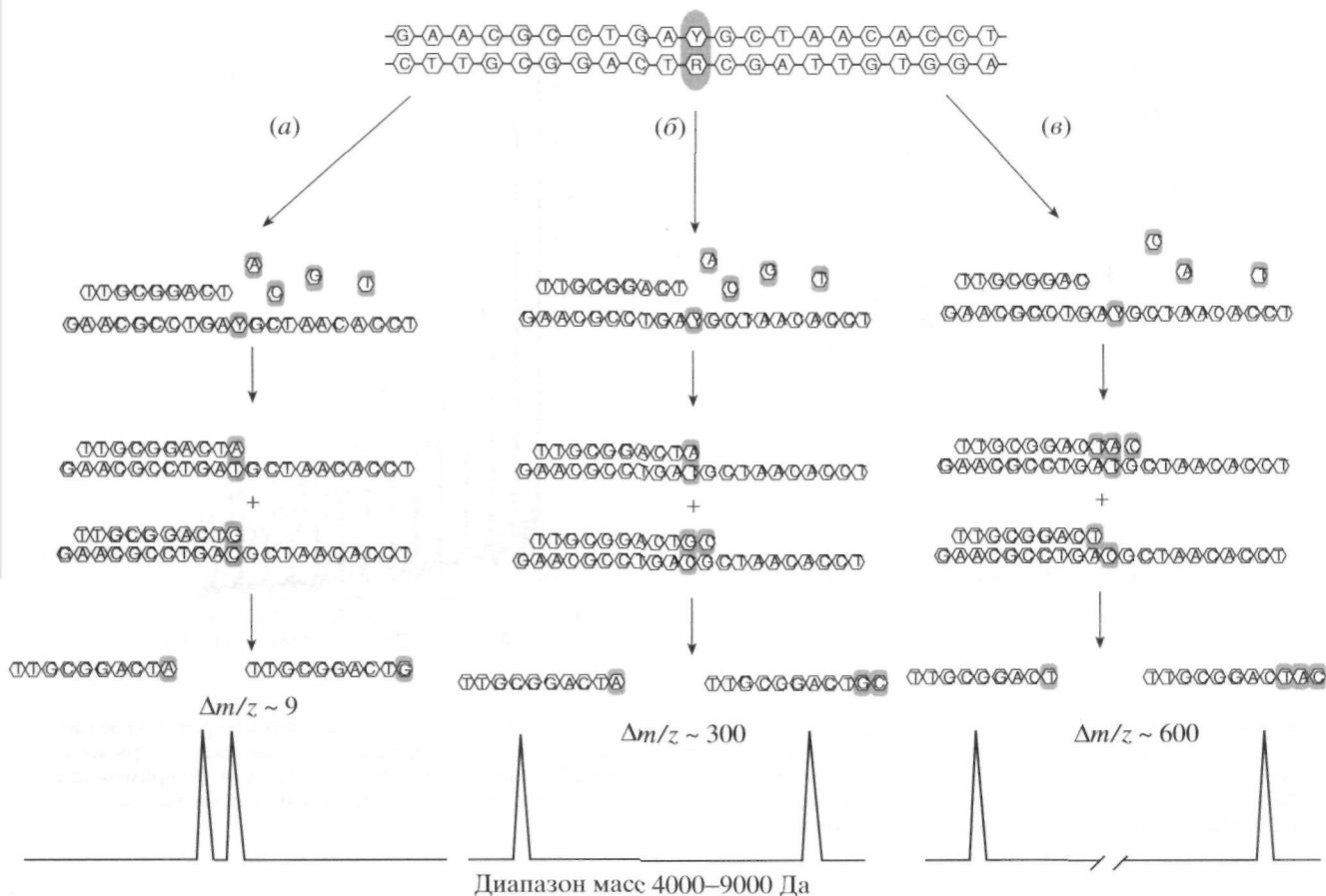


Рис. 3. Варианты реализации реакции мини-секвенирования с последующим MALDI-TOF-анализом (по [34]): (а) однонуклеотидная реакция мини-секвенирования; в состав реакционной смеси входят только ddNTP, для элонгации праймера применяется модифицированная *Taq*-полимераза; (б) мультинуклеотидная реакция мини-секвенирования; в состав реакционной смеси входят различные комбинации dNTP и ddNTP, для элонгации праймера применяется модифицированная *Taq*-полимераза; (в) реакция “отсутствующего нуклеотида”; в состав реакционной смеси входят три из четырех dNTP, для элонгации праймера используется обычная *Taq*-полимераза.

ются по месту локализации метки, образуя короткие фрагменты (5–6–7 нт), легко поддающиеся масс-спектрометрическому анализу. Использование фоточувствительных меток повышает точность измерения, тем самым расширяя возможности применения мультиплексорных систем – до 12 реакций мини-секвенирования в одной пробирке [46], позволяет анализировать протяженные олигонуклеотиды при осуществлении микросателлитного анализа [47], когда необходимо регистрировать одно-/двухбуквенные повторы, имеющие индивидуальный набор для каждого человека.

Однонуклеотидная реакция удлинения праймера, кажущаяся на первый взгляд более простой в исполнении, несколько реже используется на практике в силу сложности точного установления молекулярной массы молекул ДНК, отличающихся только единичными достроенными нуклеотидами. Так, разница в массах ddTTP и ddATP составляет всего 9 Да, что может в некоторых случаях затруднять правильную интерпретацию результатов реакции

мини-секвенирования, например, при применении немодифицированных праймеров длиной более 30 нт. В этом случае возможны проблемы, связанные с уменьшением разрешения масс-спектра (уширением пиков), что ведет к снижению точности измерения масс, особенно на фоне частичного присутствия примесей.

Тем не менее, принимая во внимание незаменимость однонуклеотидных реакций мини-секвенирования при исследованиях высокогетерогенных ДНК, например бактериальных или вирусных, предложен оригинальный способ увеличить разрешающую способность метода за счет использования дидезоксинуклеозидтрифосфатов с добавочными химическими группами, увеличивающими вес исходных молекул. Частным случаем таких ddNTP являются DyeDeoxy™-терминаторы, используемые в реакции секвенирования (Applied Biosystems, США). Добавление в реакцию мини-секвенирования ABI Dye-ddTTP (*M* 736 Да) позволяет легко различить продукты удлинения праймера при встраива-

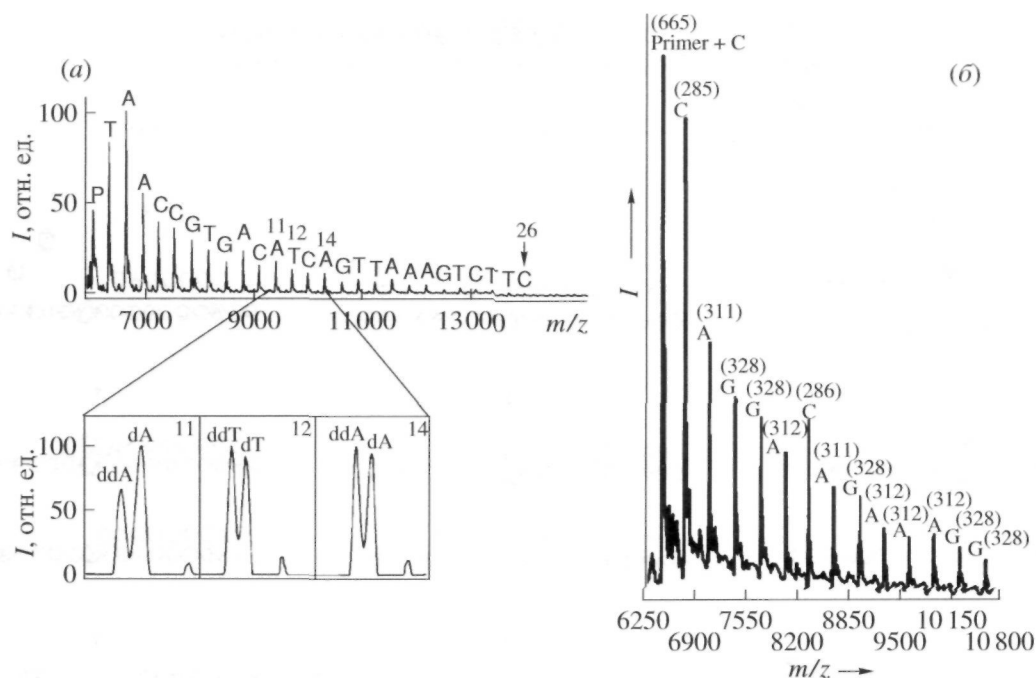


Рис. 4. Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции секвенирования по Сэнгеру. (а) Стандартный протокол без дополнительного разделения продуктов реакции (по [50]). Внизу приведен увеличенный масштаб наблюдаемых при масс-спектрометрическом анализе “фальшивых” остановок реакции секвенирования в позициях А11, Т12, А14; (б) применение биотин-меченых ddNTP с последующим разделением сепарацией продуктов реакции на стрептавидиновых шариках (по [25]). Масс-спектрометрический анализ продуктов секвенирования.

нии нативного ddATP или модифицированного ddTTP (разница в мол. массе 439 Да). Для аналогичных целей применяют также fluorescein-12-ddA (NEN™ Life Science Products, США) [48].

Сегодня реакция мини-секвенирования с последующей MALDI-TOF успешно реализована в коммерческих системах, нацеленных на высокопроизводительный скрининг нуклеотидных полиморфизмов в геноме человека и представленных на рынке компаниями Sequenom (San Diego, CA; <http://www.sequenom.com>) – MassARRAY™, и Bruker Daltonics (Leipzig, Германия; <http://www.bdal.com>) – GenoSNIP™ [49].

Другим принципиальным подходом является использование MALDI-TOF-масс-спектрометра как анализатора при считывании относительно протяженной нуклеотидной последовательности анализируемого участка ДНК. Из описанных технологий, предшествующих конечному масс-спектрометрическому исследованию, можно выделить реакции синтеза коротких одноцепочечных фрагментов (ДНК или РНК) и расщепления (химического или при помощи нуклеаз).

Технологии, реализующие процессы синтеза, как правило, опираются на классическую реакцию термоциклического секвенирования по Сэнгеру с некоторыми количественными изменениями реакционной смеси. Они касаются в первую очередь соотношения dNTP/ddNTP. В отличие от электрофо-

ретических способов детекции, масс-спектрометрия эффективно регистрирует продукты удлинения праймера на 1, 2, 3, ...10 нт, оказываясь несостоятельной для анализа более длинных (а значит, более тяжелых) молекул ДНК.

Универсальный рецепт реакционной смеси для секвенирования с помощью масс-спектрометрии пока не разработан. Публикуемые протоколы часто несут противоположные рекомендации о соотношении между используемыми в реакции нуклеозидтрифосфатами – от 10-кратного избытка dNTP по сравнению с ddNTP [50, 51] до обратной ситуации с 2–3-кратным избытком ddNTP [52, 53]. Возможно, это зависит от свойств ферментов, используемых в реакции термоциклического секвенирования. Несмотря на столь серьезные отличия в изложенных методиках, авторы демонстрируют убедительные результаты определения от 20 до 50 нт с их помощью. Одновременно обсуждается общее методическое ограничение, связанное с фальшивыми остановками синтеза, при которых процесс элонгации праймера прерывается при встраивании dNTP вместо соответствующего ddNTP. При этом нарабатываются продукты элонгации праймера, отличающиеся на 16 Да (молекулярный вес кислорода) и затрудняющие конечный процесс анализа масс-спектров (рис. 4а). Для преодоления описанного эффекта группой авторов предложено использовать биотин-меченые ddNTP, что позволяет отделить

Таблица 3. Основные компоненты смесей при осуществлении реакций направленной деградации. варианты 1 и 2

Вариант 1			
T7-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP	T7-РНК-полимераза rATP, rGTP, rCTP, dUTP (или dTTP)	SP6-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP	SP6-РНК-полимераза rATP, rGTP, rCTP, dUTP (или dTTP)
Обработка РНКазой А, расщепляющей молекулу РНК после остатков уридина и цитидина			
Вариант 2			
T7-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP	SP6-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP	T7-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP	SP6-РНК-полимераза rATP, rGTP, dCTP, rUTP
Обработка РНКазой А	Обработка РНКазой Т1, осуществляющей деградацию РНК по остаткам гуанина		Обработка РНКазой А

dNTP, препятствующие действию РНКаз, выделены жирным шрифтом.

“истинные” продукты реакции секвенирования от “фальшивых” и облегчает конечный масс-спектрометрический анализ (рис. 4б).

Использование направленной деградации для анализа нуклеотидной последовательности коротких фрагментов ДНК подробно изложено в 2004 г. сотрудниками компании Sequenome, США [54]. Принцип исследования заключается в нарботке продуктов амплификации с использованием праймеров, несущих промоторные области для T7- и SP6-РНК-полимераз. Последующая транскрипция *in vitro* происходит в четырех параллелях – с разными ферментами и комплектами нуклеозидтрифосфатов, добавленными в реакцию (табл. 3, вар. 1).

В свою очередь, полученные РНК-транскрипты подвергаются воздействию РНКазы А, расщепляющей молекулу РНК после остатков уридина и цитидина. В случае внесения в реакционную смесь dCTP или dUTP вместо соответствующих рибонуклеотидов деградации по этим позициям не происходит. Соответственно, после обработки РНКазой А полученных транскриптов получается набор фрагментов, масс-спектрометрический анализ которых позволяет установить нуклеотидную последовательность исследуемого ампликона.

Альтернативная схема процесса основана на использовании единой реакционной смеси, содержащей dCTP с последующей обработкой РНК-транскриптов РНКазой А и дополнительно РНКазой Т1, осуществляющей деградацию РНК по остаткам гуанина (табл. 3, вар. 2).

Схемы описанных процессов приведены на рис. 5.

Сегодня с использованием описанной технологии исследованы нуклеотидные полиморфизмы в *apov*- и *СЕТР*-генах человека, ассоциированные с нарушением транспорта липидов при сердечно-сосудистых патологиях [55], продемонстрировано ее применение для оценки степени метилирования ДНК [56]. Для микробной флоры показаны возможности видовой идентификации микобактерий

на основании секвенирования гена 16S РНК [57], обнаружения и типирования SHV-β-лактамаз [58].

Как уже упоминалось выше, общим требованием масс-спектрометрических методов исследования является химическая чистота анализируемого вещества. Хотя MALDI-масс-спектрометрия более терпима к присутствию солей, нежели электроспрей, присоединение катионов из примесей может существенно снизить чувствительность и разрешение этого метода. Для очистки образцов перед анализом применяют универсальные методы спиртового осаждения и жидкостной хроматогра-

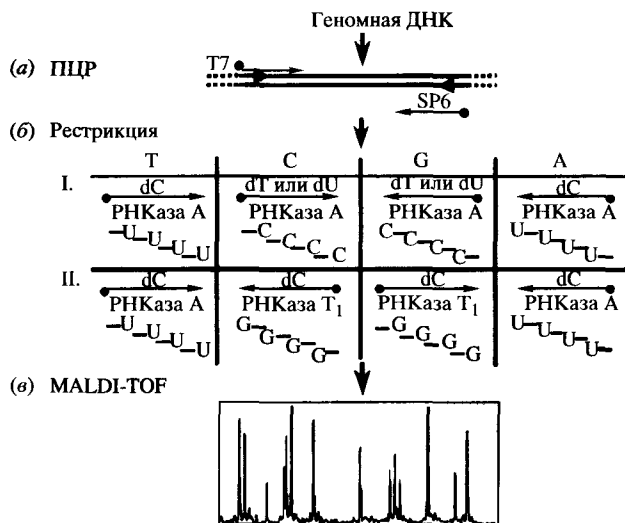


Рис. 5. Схемы использования стратегии секвенирования рестрикцией с последующим масс-спектрометрическим анализом (по материалам сайта www.sequenome.com): (а) первичные продукты ПЦР с включенными промоторными областями для T7- и SP6-РНК-полимеразы; (б) альтернативные схемы (I и II) мозаичной транскрипции ампликона с последующей сайт-специфичной деградацией; (в) MALDI-масс-спектрометрический анализ продуктов рестрикции.

фии. Однако, поскольку MALDI-масс-спектрометрия требует комбинации аналита с матричным веществом, становятся доступными ряд других подходов подготовки образцов.

Одним из первых был предложен подход обессоливания образцов за счет частиц катионообменной смолы, активированных в насыщенном растворе ацетата аммония [59]. Эти частицы могут быть добавлены либо в образцы, либо в раствор матрицы перед нанесением на мишень, либо в смесь образца и матрицы. Такие смолы легки в применении и достаточно эффективны, хотя могут быть проблемы из-за их ограниченной емкости и влияния на процесс сокристаллизации матрицы и аналита. На российском рынке катионообменные смолы представлены компанией Sequenome, США – SpectroClean Resin, и отечественным аналогом – SAC-50, производства АНО “Синтез полимерных сорбентов”, Москва. Также часткой олигонуклеотидов для последующего MALDI-масс-спектрометрического анализа возможна с применением диализных картриджей, C18 наконечников (C18 purification microtip tips, ZipTIPS™, Millipore Corporation), мембранных фильтров (molecular weight cutoff membrane filters).

Поскольку осуществление MALDI-масс-спектрометрического анализа требует наличия твердой подложки, чипа, с которого происходит выпаривание пробы, реализован оригинальный путь очистки молекул ДНК, образующихся в ходе реакций мини-секвенирования и секвенирования, путем иммобилизации их на подложке при помощи ДНК-связывающих полимеров (полиэтиленимин или поливинилпирролидон) [60]. Последующие промывки позволяют эффективно избавиться от солей и других примесей. Добавление раствора матрицы приводит к снятию молекул ДНК с полимера и их сокристаллизации с матрицей. Такой способ очистки позволяет увеличить разрешение масс-спектров за счет чистоты аналита, что крайне необходимо для мультипраймерных систем, и повысить общую чувствительность метода, поскольку происходит концентрация фрагментов ДНК на полимере.

В настоящее время высокопроизводительный подход выявления однонуклеотидных полиморфизмов, основанный на реакции мини-секвенирования с последующим MALDI-масс-спектрометрическим исследованием успешно используется для масштабного генотипирования человека как в медицинских, так и в популяционных исследованиях, проводимых в нашей стране и за рубежом [61, 62].

В клинической микробиологии достаточно давно применяется метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии (GC-MS). Этот подход используется либо для анализа жирных кислот бактериальных клеток в случае идентификации микробной флоры после первичного посева [63], либо для исследова-

ния отделяемого содержимого влагалища при установлении диагноза “бактериальный вагиноз” [64].

Знания, накопленные в результате выполнения геномных проектов, послужили основой для разработки молекулярно-биологических тестов, направленных на исследования клинически значимых микроорганизмов. Современные методы MALDI-масс-спектрометрического анализа ДНК востребованы в микробиологии для идентификации [65], типирования [58, 66] и характеристики детерминант лекарственной устойчивости бактерий и вирусов.

Формирование устойчивости микроорганизмов к действию антибактериальных препаратов, в том числе множественной устойчивости, т.е. к антибиотикам нескольких групп одновременно, остается одной из основных проблем использования в медицинской практике этих препаратов.

Для большинства путей ухода бактерий от воздействия лекарственных препаратов (инактивация антибиотика, модификация мишени действия, активное выведение антибиотика из клетки (эффлюкс), снижение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического шунта) можно выделить специфические молекулярные изменения, обнаружение которых возможно путем анализа геномной ДНК [67]. При этом реализуются два принципиальных варианта генетических изменений: 1) наличие в геноме бактерии определенного гена, кодирующего белок, имеющий решающее значение в формировании устойчивости по данному механизму; 2) полиморфизм определенного генетического локуса, как правило, единичные мутации. Определение изменений первого типа возможно с использованием обычной ПЦР. Тогда как задача оценки генетического полиморфизма может быть решена различными методами определения единичных или более крупных мутаций в геноме микроорганизма, в частности использованием реакции мини-секвенирования с последующей MALDI-масс-спектрометрической детекцией.

Яркой иллюстрацией возможностей применения MALDI-TOF для оценки устойчивости бактериальной флоры к широкому спектру лекарственных препаратов может служить разработанный молекулярно-генетический комплексный анализ геномной ДНК *Neisseria gonorrhoeae*.

В силу высокой пластичности генома, под пресом постоянного воздействия антибактериальных средств, *N. gonorrhoeae* реализует практически все известные механизмы формирования устойчивости. Способствующие этому генетические механизмы включают внутри- и межвидовую ДНК-трансформацию в любом периоде жизненного цикла, рекомбинационные процессы, активную передачу информации с помощью плазмид. Перечисленные качества позволяют возбудителю ускользать не только

Таблица 4. Известные молекулярные механизмы формирования устойчивости гонококка к применяемым в терапии антибиотикам с указанием регистрируемых генетических маркеров

Антибиотик	Ген мишени	Мишень	Маркеры резистентности (генетический уровень)
Пенициллины	<i>bla</i>	β-Лактамаза	Наличие в геноме гена <i>bla</i>
	<i>penA</i>	Пенициллинсвязывающий белок 2	<u>CGA1035</u>
Тетрациклины	<i>ponA</i>	Пенициллинсвязывающий белок 1	<u>T1261C</u>
	<i>tet(M)</i>	Tet(M)	Наличие в геноме <i>tet M</i> детерминанты
Макролиды	<i>rpsJ</i>	Рибосомальный белок S10	<u>G169A</u>
	<i>erm</i>	Белки метилирования рРНК 23S субъединицы: ErmB, ErmF	Наличие в геноме генов <i>ermB</i> , <i>ermF</i>
	<i>mef</i>	Белок специфического эффлюкса макролидов MefA	Наличие в геноме гена <i>mef</i>
Фторхинолоны	<i>rrl</i>	23S рРНК	<u>C2611T</u>
	<i>gyrA</i>	ДНК-гираза (субъединица A)	<u>C273T, C273A, A284G, A284C, G283A</u>
	<i>parC</i>	Топоизомераза (субъединица E)	<u>G253T, G256A, A259C, G260T, G260A, T262C, G265A, A266G</u>
	<i>norM</i>	Белок специфического эффлюкса фторхинолонов NorM	<u>C35T</u>
Спектиномицин	<i>rrs</i>	16S рРНК	<u>C1192U</u>
Пенициллины, тетрациклины, макролиды, фторхинолоны	<i>penB</i>	Por-белок, обеспечивающий проницаемость внешней мембраны	<u>G358A, G359A, G361A, C362A</u>
	промотор <i>mtrR</i>	Промотор <i>mtrR</i>	<u>DelA, InsTT</u>
	<i>mtrR</i>	Регулятор экспрессии белков, обеспечивающих неспецифический эффлюкс различных классов антибиотиков через внешнюю мембрану бактерии	<u>G134A</u>

от иммунного ответа человека, но и эффективно защищаться от воздействия лекарственной терапии.

Всю совокупность адаптивных изменений, происходящих в геноме гонококка в процессе формирования лекарственной устойчивости, можно разбить на две группы – наличие/отсутствие гена, что легко детектируется с привлечением амплификационных методов анализа, и однонуклеотидные мутации в генах-мишенях (табл. 4). Для регистрации последних сконструирован оригинальный масс-эрей, представляющий совокупность праймеров для амплификации исследуемых фрагментов ДНК и последующих реакций мини-секвенирования (или секвенирования) с MALDI-TOF-масс-спектрометрической детекцией. На рис. 6 показаны стратегия подбора праймеров и интерпретация результатов MALDI-масс-спектрометрического исследования продуктов мультипраймерной мультинуклеотидной реакции мини-секвенирования для оценки генетического полиморфизма в *gyrA* гене *N. gonorrhoeae*.

Получаемые в ходе такого генетического сканирования данные хорошо согласуются с результата-

ми микробиологического тестирования, что было продемонстрировано при изучении генетики формирования устойчивости к пенициллинам [68], фторхинолонам [69], тетрациклинам [70]. Кроме того, показана технологическая возможность регистрации перечисленных генетических маркеров лекарственной устойчивости гонококка непосредственно в клиническом образце, минуя стадию бактериологического посева, используя для анализа выделенную ДНК [71].

Сходная система, базирующаяся на сканировании геномных мутаций в реакции мини-секвенирования с последующим масс-спектрометрическим исследованием, разработана для осуществления комплексной оценки лекарственной устойчивости туберкулеза к препаратам первой и второй линий терапии – рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам [72, 73].

Таким образом, сегодня MALDI-TOF из сугубо научного подхода превратилась в системообразующую универсальную прикладную технологию, позволяющую в рамках клинико-диагностического центра решать практические задачи, связанные с

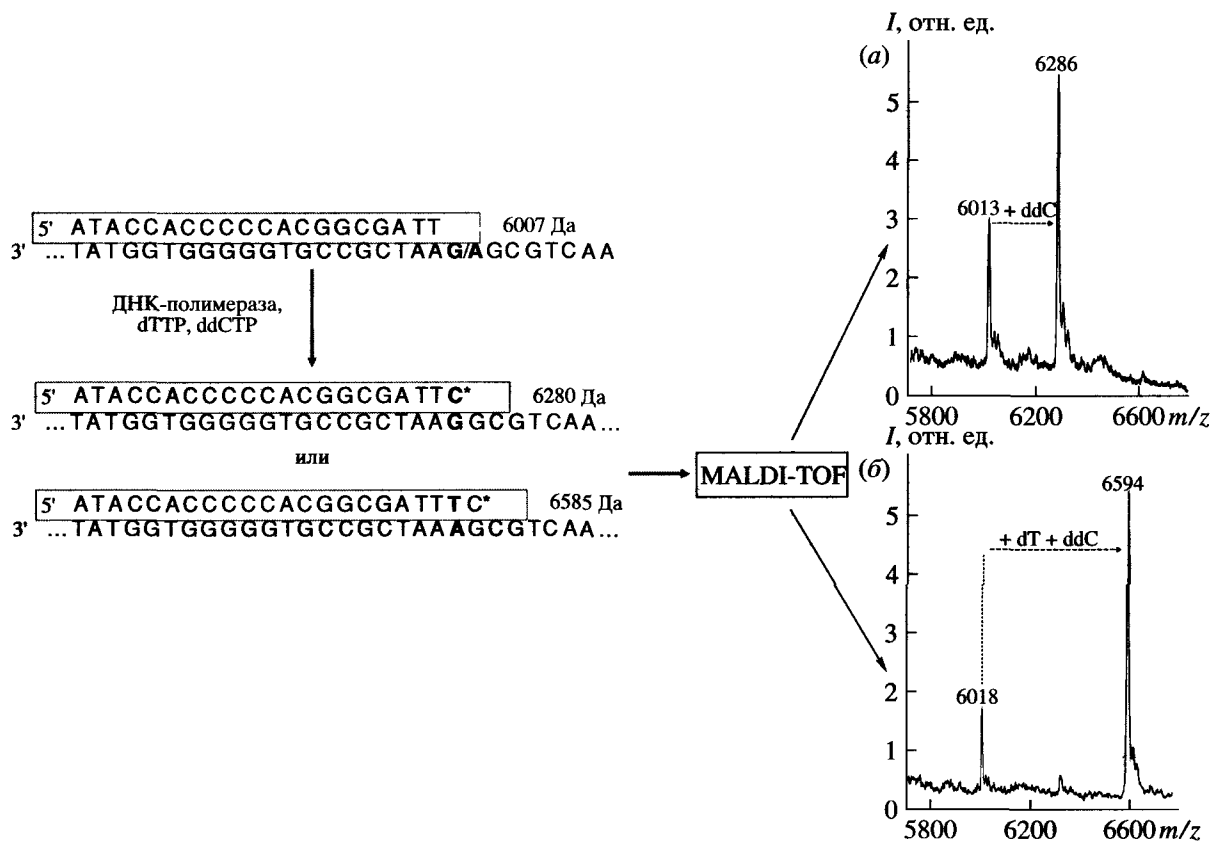


Рис. 6. Схематичное представление реакции мини-секвенирования с последующей MALDI-TOF-детекцией. В качестве матрицы в реакции используется амплифицированный фрагмент геномной ДНК *N. gonorrhoeae*. Внутренние олигонуклеотидные праймеры прилегают к точке полиморфизма (вариабельные нуклеотиды выделены жирным). Терминирующие процесс элонгации праймера дидезоксинуклеотиды обозначены звездочкой. Исходные праймеры и продукты реакции мини-секвенирования выделены рамкой. Последующий MALDI-TOF-анализ позволяет выявить отличия между праймером, не вступившим в реакцию, и продуктами реакции мини-секвенирования, которые различны для дикого (а) и мутантного (б) генотипов.

исследованием медицински значимых генетических полиморфизмов человека, видовой идентификацией, типированием и оценкой параметров лекарственной устойчивости бактериальных и вирусных патогенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Шкуров В.А. // ДАН СССР. 1984. Т. 277. С. 379–383.
2. Yamashita M., Fenn J.B. // J. Phys. Chem. 1984. V. 88. P. 4671–4675.
3. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988. V. 2. P. 151–153.
4. Karas M., Hillenkamp F. // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2299–2301.
5. Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмик Д.В., Загулин В.А. // Эксп. и теор. физика. 1973. Т. 64. С. 82–89.
6. Taranenko N.J., Tang K., Allman S.L., Chang L.Y., Chen C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1994. V. 8. P. 1001–1006.
7. Wu K.J., Steding A., Becker C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1993. V. 7. P. 142–146.
8. Zhu Y.F., Chung C.N., Taranenko N.I., Allman S.L., Martin S.A., Haff L., Chen C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996. V. 10. P. 383–388.
9. Fu Y., Xu S., Pan C., Ye M., Zou H., Guo B. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. e94.
10. Sauer S. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2007. V. 70. P. 311–318.
11. Beavis R.C., Chait B.T. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1989. V. 3. P. 432–435.
12. Currie G.J., Yates J.R. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993. V. 4. P. 955–963.
13. Zhu Y.F., Taranenko N.I., Allman S.L., Martin S.A., Haff L., Chen C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996. V. 10. P. 1591–1596.
14. Distler A.M., Allison J. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2001. V. 12. P. 456–462.
15. Nordhoff E., Cramer R., Karas M., Hillenkamp F., Kirpekar F., Kristiansen K., Roepstorff P. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 3347–3357.
16. Wang B.H., Biemann K. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 1918–1924.

17. Little D.P., Thannhauser T.W., McLafferty F.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2318–2322.
18. Willems A.V., Deforce D.L., Lambert W.E., van Peeteghem C.H., van Bocxlaer J.F. // J. Chromatography A. 2004. V. 1052. P. 93–101.
19. Ross P.L., Belgrader P. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 3966–3972.
20. Kirpekar F., Nordhoff E., Kristiansen K., Roepstorff P., Lezius A., Hahner S., Karas M., Hillenkamp F. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 3866–3870.
21. Kirpekar F., Nordhoff E., Kristiansen K., Roepstorff P., Hahner S., Hillenkamp F. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995. V. 9. P. 525–531.
22. Hail M.E., Elliott B., Anderson A. // Am. Biotech. Lab. 2004. V. 22. P. 12–14.
23. McLuckey S.A., van Berkel G.J., Glish G.L. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1992. V. 3. P. 60–70.
24. McLuckey S.A., Habibi-Goudarzi S. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. V. 5. P. 740–747.
25. Edwards J.R., Ruparel H., Ju J. // Mutation Research. 2005. V. 573. P. 3–12.
26. Elliott B. // Integrated DNA Technologies. 2005. Technical bulletin.
27. Hofstadle S.A., Sampath R., Blyn L.B., Eshoo M.W., Hall T.A., Jiang Yu., Drader J.J., et al. // Int. J. Mass Spectrom. 2005. V. 242. P. 23–41.
28. Hofstadle S.A., Cummins L.L. // Patent Application Publication № 2005/0164215 A1. US. 2005.
29. Ecker D.J., Sampath R., Blyn L.B., Eshoo M.W., Ivy C., Ecker J.A., Libby B., Samant V., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 8012–8017.
30. Ecker J.A., Massire C., Hall T.A., Ranken R., Pennella T.-T.D., Ivy C.A., Blyn L.B., et al. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 2921–2932.
31. Wolk D.M., Shepley D., Sloane D., Sampath R., Haprin V., Blyn L., Ecker D., Wysocki V., Hofstadler S. // San Francisco. 2006. K–1187 in Abstracts book of 46th ICAAC. P. 339.
32. van Ert M.N., Hofstadler S.A., Jiang Y., Busch J.D., Wagner D.M., Drader J.J., Ecker D.J., Hannis J.C., Huynh L.Y., Schupp J.M., Simonson T.S., Keim P. // Biotechnique. 2004. V. 37. P. 642–644, 646, 648 passim.
33. Null A.P., Hannis J.C., Muddiman D.C. // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 4514–4521.
34. Tost J., Gut I.G. // Clin. Biochem. 2005. V. 38. P. 335–350.
35. Taranenko N.J., Hurt R., Zhou J.Z., Isola N.R., Huang H., Lee S.H., Chen C.H. // J. Microbial. Methods. 2002. V. 48. P. 101–106.
36. Ilina E.N., Malakhova M.V., Generozov E.V., Nikolaev E.N., Govorun V.M. // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 2810–2815.
37. Fenselau C., Demirev P.A. // Mass Spectr. Rev. 2001. V. 20. P. 157–171.
38. Maier T., Klepel S., Renner U., Kostrzewa M. // NATURE METHODS, Nature Publishing Group. 2006. Application notes.
39. Storm N., Darnhofer-Demar B., van den Boom D., Rodi C.P. // Methods in Molecular Biology. 2002. V. 212. P. 241–262.
40. Sauer S. // Clinica Chimica Acta. 2006. V. 363. P. 95–105.
41. Tang K., Fu D.J., Julien D., Braun A., Cantor C.R., Köster H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 10016–10020.
42. Berlin K., Ballhause M., Cardon K. // Patent PCT/WO/2005/038051. 2005.
43. Tost J., Schatz P., Schuster M., Berlin K., Gut I.G. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. e50.
44. Schatz P., Distler J., Berlin K., Schuster M. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. e59.
45. Sauer S., Lehrach H., Reinhardt R. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. e63.
46. Ross P., Hall L., Smirnov I., Haff L. // Nature Biotechnology. 1998. V. 16. P. 1347–1351.
47. Paris M., Jones M.G.K. // Plant Molecular Biology Reporter. 2002. V. 20. P. 259–263.
48. Fei Z., Ono T., Smith L.M. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 2827–2828.
49. Wenzel T., Ellsner T., Fahr K., Bimmler J., Richter S., Thomas I., Kostrzewa M. // Nucleosides Nucleic Acids. 2003. V. 22. P. 1579–1581.
50. Nordhoff E., Luebbert C., Thiele G., Heiser V., Lehrach H. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 86–92.
51. Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 2554–2559.
52. Taranenko N.I., Allman S.L., Golovlev V.V., Taranenko N.V., Isola N.R., Chen C.H. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 2488–2490.
53. Roskey M.T., Juhasz P., Smirnov I.P., Takach E.J., Martin S.A., Haff L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4724–4729.
54. Stanssens P., Zabeau M., Meersseman G., Remes G., Gansemans Y., Storm N., Hartmer R., Honisch C., Rodi C.P., Bocker S., van den Boom D. // Genome Res. 2004. V. 14. P. 126–133.
55. Hartmer R., Storm N., Boecker S., Rodi C.P., Hillenkamp F., Jurinkel C., van den Boom D. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. e47.
56. Schatz P., Dietrich D., Schuste M. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. e167.
57. Lefmann M., Honisch C., Bocker S., Storm N., von Wintzingerode F., Schlötelburg C., Moter A., van den Boom D., Gobel U.B. // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. P. 339–346.
58. Sturenburg E., Storm N., Sobottka I., Horstkotte M.A., Scherpe S., Aepfelbacher M., Müller S. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 909–915.
59. Fu D.J., Tang K., Braun A., Reuter D., Darnhofer-Demar B., Little D.P., O'Donnell M.J., Cantor C.R., Köster H. // Nat. Biotechnol. 1998. V. 16. P. 381–384.
60. Smirnov I.P., Hall L.R., Ross P.L., Haff L.A. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001. V. 15. P. 1427–1432.
61. Погода Т.В., Маршова О.В., Костин П.А., Максимов В.Н., Куликов И.В., Опенко Т.Г., Симонова Г.И., Воевода М.И., Генерозов Э.В., Говорун В.М. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2007. Прил. 2. С. 8–12.
62. Ragoussis J., Elvidge G. P., Kaur K., Colella S. // PLoS Genet. 2006. V. 2. P. e100.
63. Осипов Г.А., Демина А.М. // Вестник РАМН. 1996. № 2. С. 52–59.

64. Wolrath H., Forsum U., Larsson P.G., Boren H. // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 4026–4031.
65. von Wintzingerode F., Bocker S., Schlotelburg C., Chiu N.H.L., Storm N., Jurinke C., Cantor C.R., Gobel U.B., van den Boom D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 7039–7044.
66. Lowe C.A., Diggle M.A., Clarke S.C. // *Br. J. Biomed. Sci.* 2004. V. 61. P. 8–10.
67. Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F.-J. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. V. 14. P. 836–871.
68. Малахова М.В., Верецагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Зубков М.М., Припутневич Т.В., Кисина В.И., Кубанова А.А. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2006. Т. 141. С. 549–554.
69. Верецагин В.А., Ильина Е.Н., Зубков М.М., Припутневич Т.В., Кубанова А.А., Говорун В.М. // *Молекулярная биология.* 2005. Т. 39. С. 923–932.
70. Боровская А.Д., Малахова М.В., Верецагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Припутневич Т.В., Аль-Хафаджи Н., Кубанова А.А. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007. Прил. 2. С. 61–66.
71. Ильина Е.Н., Малахова М.В., Верецагин В.А., Говорун В.М., Припутневич Т.В., Кубанова А.А. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007. Т. 144. С. 194–197.
72. Ikryannikova L.N., Afanas'ev M.V., Akopian T.A., Il'ina E.N., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Govorun V.M. // *J. Microbiol. Methods.* 2007. V. 70. P. 395–405.
73. Afanas'ev M.V., Ikryannikova L.N., Il'ina E.N., Sidorenko S.V., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Kataev E.Y., Skorniakov S.N., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., Govorun V.M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. P. 1057–1064.

Mass Spectrometry of Nucleic Acids in Molecular Medicine

E. N. Il'ina^{a, #} and V. M. Govorun^{a, b}

[#]Phone: +7(499) 245-04-71; fax: +7(499) 246-77-21; e-mail: ilinaen@gmail.com

^a Institute of Physicochemical Medicine, Federal Agency for Public Health and Social Development, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119992 Russia

^b Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A stable streamlining trend in the field of medical diagnostics by practical adoption of high-tech and knowledge-intensive analytical systems providing for molecular level studies has appeared during the last few decades. An illustrative example of such technologies is mass spectrometry methods for analyzing biomolecules. This review is intended to brief the potential of the state-of-the-art inventory of spectrometry equipment and illustrate the application of mass spectrometry of nucleic acids (DNA and RNA) for solving practical problems related to the analysis of human genomic DNA and clinically significant microorganisms of bacterial and viral natures.

Key words: mass spectrometry, nucleotide polymorphism, mutations, sequencing, drug resistance