

Определение уникальных пептидных маркеров изоформ ботулотоксина для их качественного и количественного определения методом масс-спектрометрии

Н.А.Петухов¹, А.К.Сурин^{1,2}, М.М.Рогозин¹, К.В.Детушев¹, В.В.Фирстова^{1,3}

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Московская область, Оболensk, Российская Федерация;

²ГНЦ «Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Московская область, Пущино, Российская Федерация;

³Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Московская область, Пущино, Российская Федерация

Ботулинический токсин – это один из наиболее опасных биологических токсинов, применяемый в медицине, однако несущий потенциальную опасность в качестве агента биологической угрозы. В данном исследовании проведен комплексный *in silico* анализ аминокислотной последовательности ботулинического токсина разных серотипов с целью идентификации уникальных пептидных маркеров для специфической детекции методами масс-спектрометрии. Проведение биоинформатического анализа и теоретического протеолиза позволило идентифицировать уникальные пептиды, покрывающие различные функциональные домены ботулинических токсинов. Предложенные маркеры демонстрируют полную специфичность к целевым серотипам ботулотоксинов при анализе в базах данных UniProt и NCBI. Отобранные уникальные пептидные маркеры могут быть использованы при проведении анализа биологических образцов, продуктов питания или объектов окружающей среды на наличие ботулотоксинов методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в режиме множественного мониторинга реакций или методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

Ключевые слова: ботулотоксин типа А, пептидные маркеры, MALDI-TOF, серотипы, LC-MS/MS, триптический гидролиз, уникальные пептиды, биоинформатический анализ

Для цитирования: Петухов Н.А., Сурин А.К., Рогозин М.М., Детушев К.В., Фирстова В.В. Определение уникальных пептидных маркеров изоформ ботулотоксина для их качественного и количественного определения методом масс-спектрометрии. Бактериология. 2025; 10(4): 36–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-36-40

Definition of unique peptid markers of botulinum neurotoxin isoforms for their qualitative and quantitative determination by mass spectrometry

N.A.Petukhov¹, A.K.Surin^{1,2}, M.M.Rogozin¹, K.V.Detushev¹, V.V.Firsova^{1,3}

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²The Branch of the M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation;

³Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University (ROСБИОТЕСН), Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Botulinum toxin is one of the most dangerous biological toxins, used in medicine but also posing a potential threat as a biological warfare agent. This research conducted a comprehensive *in silico* analysis of the amino acid sequences of botulinum toxin from different serotypes to identify unique peptide markers for specific detection using mass spectrometry methods.

Для корреспонденции:

Петухов Никита Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-1915

Статья поступила 12.11.2025, принята к печати 25.12.2025

For correspondence:

Nikita A. Petukhov, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1915

The article was received 12.11.2025, accepted for publication 25.12.2025

Bioinformatic analysis and theoretical proteolysis allowed us to identify unique peptides covering various functional domains of botulinum toxins. The proposed markers demonstrate complete specificity towards target serotypes of botulinum toxins when analyzed against UniProt and NCBI databases.

The selected unique peptide markers can be used for analyzing biological samples, food products, or environmental samples for the presence of botulinum toxins using LC-MS/MS or MALDI TOF.

Key words: *Botulinum toxin type A, peptide markers, MALDI TOF, serotypes, LC-MS/MS, tryptic hydrolysis, unique peptides, bioinformatic analysis*

For citation: Petukhov N.A., Surin A.K., Rogozin M.M., Detushev K.V., Firsova V.V. Definition of unique peptid markers of botulinum neurotoxin isoforms for their qualitative and quantitative determination by mass spectrometry. *Bacteriology*. 2025; 10(4): 36–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-36-40

Ботулотоксин, синтезируемый бактериями рода *Clostridium botulinum*, относится к числу наиболее токсичных биологических агентов. Из семи известных серотипов (A–G) ботулотоксин типа А (BoNT/A) обладает наибольшей токсичностью. Потенциальное использование BoNT/A в рамках биотеррористических актов требует внедрения высокочувствительных и высокоспецифичных методов его обнаружения и идентификации. Масс-спектрометрические технологии, в частности целевые методы анализа, такие как Selected Reaction Monitoring (SRM) и Parallel Reaction Monitoring (PRM), считаются золотым стандартом для идентификации и количественного определения белковых токсинов [1]. Эффективность данных методов обусловлена наличием пептидных маркеров, уникально идентифицирующих целевой белок в сложных биологических матрицах.

Биоинформатический анализ, направленный на выявление уникальных пептидов белка, представляет собой ключевой этап в современных методах масс-спектрометрической идентификации белков. На стадии *in silico* протеолиза белковые последовательности из референсных баз данных подвергаются виртуальному ферментативному расщеплению с учетом специфичности используемых протеаз, чаще всего трипсина. В результате формируется перечень теоретических пептидов с рассчитанными молекулярными массами и последовательностями. Критерием уникальности пептида служит его аминокислотный состав, не встречающийся в иных белках выбранного протеома, что достигается путем системного сопоставления с исследуемой базой данных белковых последовательностей.

При сопоставлении экспериментально полученных масс-спектров с теоретическими данными осуществляется процесс, известный как Peptide Spectrum Matching (PSM), представляющий собой алгоритмическое выравнивание фрагментных масс-спектров с последовательностями пептидов.

Использование уникальных пептидов существенно повышает чувствительность и специфичность детекции целевого белка в анализируемом образце. Концентрация внимания на уникальных пептидах оптимизирует вычислительный процесс, позволяя сузить поисковое пространство и тем самым увеличить скорость и надежность идентификации.

В количественном протеомном анализе уникальные пептиды выступают в качестве надежных суррогатных маркеров, что особенно важно при применении методов направленной масс-спектрометрии, таких как SRM и Multiple Reaction Monitoring (MRM) [2]. Эти методы обеспечивают высокую избирательность и чувствительность, позволяя точно определять концентрацию целевых белков в сложных биологических матрицах, даже при их низкой концентрации. Таким образом, внедрение уникальных пептидов как ключе-

вого звена протеомных методик способствует значительному улучшению детекции и количественной оценки целевых белков, что критически важно для биомедицинских исследований и клинических приложений.

Целью настоящего исследования является выявление уникальных пептидов методом биоинформатического анализа и оценка воспроизводимости полученных результатов в процессе масс-спектрометрической детекции на примере ботулотоксина типа А, содержащегося в анализируемом образце.

Материалы и методы

Биоинформатический анализ

Проведен анализ полной аминокислотной последовательности тяжелой цепи ботулотоксина типа А (UniProt ID: P10845) [3]. Для теоретического протеолиза использовали алгоритм PeptideCutter (ExPASy) с параметрами: фермент – трипсин (расщепление после Lys/Arg), максимальное число пропущенных возможных мест сцепления (missed cleavage) – 2.

Оценку уникальности пептидов проводили с помощью алгоритма BLAST (NCBI) путем попарного сравнения с последовательностями других серотипов ботулотоксина (А, В, С, D, Е, F, G). Пептиды считались уникальными при отсутствии полных аналогов (гомология <90%) в других серотипах. Молекулярные массы пептидов и продуктивных ионов рассчитывали с использованием инструмента MS-Product (ProteinProspector, UCSF).

Подготовка образцов к проведению масс-спектрометрического анализа

Для выделения рекомбинантного белка применяли метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле по Лэммли. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков в гелях красителем Кумасси (Coomassie Blue). Полученные белки вырезали из геля и помещали в эппендорф (1,5 мл). Для удаления SDS (Sodium dodecyl sulfate) использовали метанол (40%) и уксусную кислоту (5%). Для отмывки от красителя Кумасси добавляли 50%-й ацетонитрил в 50 мМ NH₄HCO₃ и инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин, повторяя этап до полной отмывки. Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводились с использованием 5 мМ дитиотреитола (в течение 30 мин при температуре 25°C) и 15 мМ йодацетамида (в течение 30 мин при температуре 25°C). Затем к гелю добавляли ацетонитрил (100%), после удаления которого происходило высушивание геля на вакуумном концентраторе [4]. К полученным образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мг/мл) в буфере 50 мМ NH₄HCO₃ и инкубировали 20 ч при температуре 37°C, после чего реакция

Таблица. Уникальные триптические пептиды ботулотоксина типа А
 Table. Unique tryptic peptides of botulinum toxin type A

№	Пептидная последовательность / Peptide sequence	Позиция / Position	Длина, а.о. / Length (amino acid residues)	m/z [M+H] ²⁺	Примечание / Note
1	MASMTGGHHHHHGNEDLEQK	1–21	21	1122,1	Искусственная N-метка / Artificial N-label
2	LISEEDLEDLEQKLISEEDLEDPGNQR	22–49	27	1430,1	Участок с мус-эпитопами / Site with myc epitopes
3	NAIVYNSMYENESTSFWIR	116–135	19	1174,1	Каталитический домен LC / LC catalytic domain
4	PISNLGNIHASNNIMFK	227–243	17	940,5	Консервативный участок / Conservative site
5	DLYDNQSNNSGILK	273–286	13	783,4	Транслокационный домен / Translocation domain
6	NLQDNNGGNDIGFIGFHQFNIAK	425–448	23	1362,7	Рекомбинантный участок / Recombinant site
7	TLGCSWEFIPVDDGWGER	464–483	19	1035,9	Участок дисульфидной связи / Disulfide bond site

действия протеаз останавливалась 0,1 TFA (Trifluoroacetic acid) в 80%-м ацетонитриле в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации гель полностью высушивался в вакуумном концентраторе. Затем образцы растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1 TFA.

Для удаления следов красителя, примеси солей и крупных пептидов проводилась очистка образцов на зип-типах. Зип-тип – это наконечник, набитый стационарной фазой C18, которая выполняет роль фильтра. Фаза C18 в наконечнике промывалась ацетонитрилом (сначала 90%-м, затем 4%-м) с добавлением 0,1 TFA. На подготовленный зип-тип наносился образец, который отмывали с фазы ацетонитрилом (сначала 4%-м, затем 90%-м) с добавлением 0,1 TFA. Полученный образец высушивали на вакуумном концентраторе. Далее хранение белков осуществлялось при температуре 4°C. Перед масс-спектрометрическим анализом образец растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1% TFA.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения. Пептиды, полученные при гидролизе ботулотоксина, предварительно разделяли с помощью нанопотокового хроматографа Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Пептиды разделяли на капиллярной колонке диаметром 75 мкм и длиной 200 мм, набитой в лабораторных условиях частицами 3,6 мкм с порами 90 Å с привитой фазой C18. Образец элюировали в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0,1% TFA. Изменение концентрации ацетонитрила с 4 по 50% проводили линейно в течении 120 мин. Смываемые с колонки пептиды ионизировали методом электрораспыления. Панорамные масс-спектры снимали в диапазоне от 300 до 1600 m/z. После каждого панорамного спектра снимали 10 спектров фрагментации для наиболее интенсивных ионов. Фрагментацию ионов проводили методом активации соударениями с молекулами инертного газа ДАС (диссоциация, активированная соударениями) в высокоэнергетической ячейке соударений.

Обработка результатов масс-спектроскопических исследований

Данные масс-спектрометрического анализа обрабатывали с помощью коммерческих программ PeaksStudio 7.5 и Xcalibur 2.2.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате *in silico* триптического гидролиза ботулинического токсина 7 серотипов с проведением последующего биоинформатического анализа последовательностей были отобраны уникальные пептиды для каждого серотипа. В частности, для наиболее токсичного серотипа А ботулинического токсина (BoNT/A) после *in silico* триптического гидролиза был отобран и проанализирован 51 пептид. После анализа уникальности было отобрано 7, удовлетворяющих критерию гомологии с другими серотипами <90% (таблица).

Из 7 отобранных наиболее специфичными признаны 3 пептида. Пептид LISEEDLEDLEQKLISEEDLEDPGNQR характеризовался высокой специфичностью (95%-я уникальность), обусловленной наличием повторов последовательности с-Мус эпитопа (LISEEDL). Пептид NAIVYNSMYENESTSFWIR, расположенный в области каталитического домена легкой цепи (LC), демонстрировал низкую гомологию с другими бактериальными или эукариотическими протеазами. Особенно ценным маркером для мониторинга нативной структуры токсина является пептид TLGCSWEFIPVDDGWGER с уровнем уникальности (92%), содержащий цистеин дисульфидного моста.

Данные пептиды покрывают ключевые функциональные домены BoNT/A: LC, домен транслокации и рецептор-связывающий домен (HC), что позволяет не только детектировать токсин, но и потенциально оценивать его структурную целостность.

Аналогичный анализ был осуществлен для остальных шести серотипов. Проведенный *in silico* анализ полных аминокислотных последовательностей ботулотоксина с последующим триптическим гидролизом и сравнительным анализом с другими серотипами позволил идентифицировать 8, 10, 12, 14, 15, 16, 9 высокоспецифичных пептидов с гомологией <90% для серотипов А, В, С, D, E, F, G, соответственно. В результате оценки пригодности выбранных пептидов в качестве биомаркеров для масс-спектрометрического анализа из дальнейшего рассмотрения были исключены пептиды с молекулярной массой <600 Да и >4 кДа. Так, в частности, среди пептидов ботулотоксина серотипа В был исключен низкомолекулярный пептид GTGR, высокомолекулярные пептиды ботулотоксина типа F LSTNVESSMLLNLLVLGAGPDI FESCCYPVRKLIDPDVYDPSNYGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGHNSSTESFIADPAISLAHELIALHGLYGARGVTYEETIEVK (10 892,2 Да) и ботулотоксина типа G KLRGLSCEGAACKVLLD TFEYPGLVHHTGGCHCGAVRFAVWAPADLRVVDSCRLCRKK

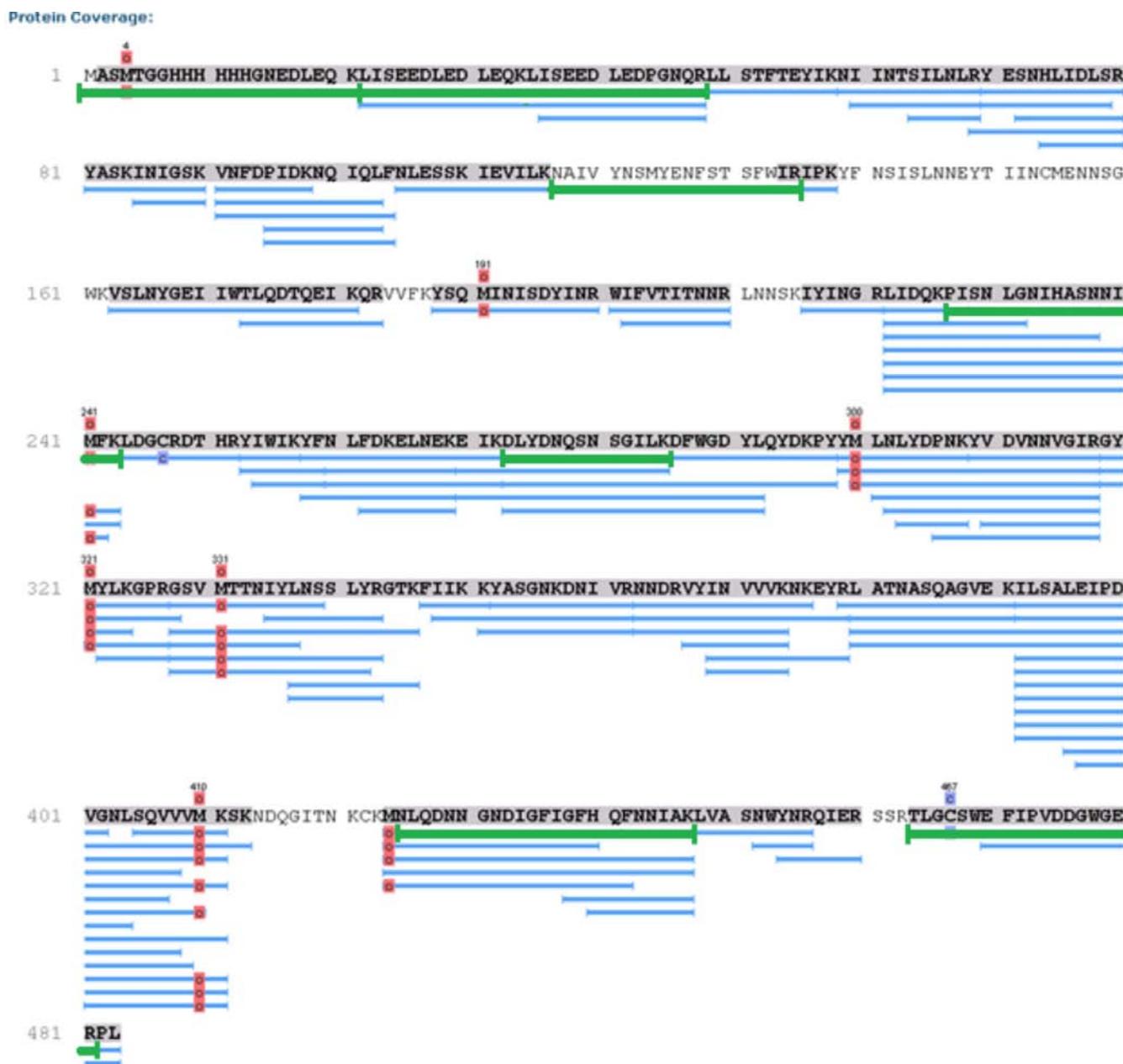


Рисунок. Схема расположения идентифицированных пептидов для тяжелой цепи ботулотоксина типа А относительно аминокислотной последовательности. Суммарное покрытие – 87%.
 Figure. Schematic diagram of the arrangement of identified peptides for the heavy chain of botulinum toxin type A relative to the amino acid sequence. Total coverage – 87%.

QHRHFLVPASRFTLLQGAESIVTYRSNTHPALHSFCSRCGVQS
 F H A A V S D P R V Y G V A P H C L D E G T V R S V V I E E V G G D P G E E A A E
 E N K (14 256,8 Да). В результате были выбраны 7, 9, 10, 12,
 13, 9 и 8 пептидов для серотипов А, В, С, D, E, F и G соот-
 ветственно, массы которых колебались в диапазоне 600-
 4000 Да.

Масс-спектрометрический анализ

В качестве экспериментального теста было проанализи-
 ровано 8 образцов ботулотоксина А легкой и тяжелой цепей,
 имеющих отличную друг от друга концентрацию и выделен-
 ных в различное время разными исследователями.

Пример результатов масс-спектрометрического анализа
 тяжелой цепи ботулотоксина А представлены на рисунке.
 На схеме представлена аминокислотная последователь-

ность тяжелой цепи ботулотоксина А в однобуквенном
 коде. Темным фоном отмечены участки полипептидной
 цепи, для которых были найдены соответствующие пепти-
 ды, которые указаны голубыми отрезками под последо-
 вательностью. Литерой «О» отмечены метионины, которые
 были подвержены окислению в ходе пробоподготовки,
 литерой «С» – цистеины, которые были алкилированы
 йодацетамидом. В ходе анализа было установлено соот-
 ветствие идентифицируемых пептидов с аминокислотной
 последовательностью для легкой и тяжелой цепей ботуло-
 токсина типа А. Суммарное покрытие последовательности
 белка для LC составило 75% (рисунок), для HC – 87%.
 Жирной (зеленой) линией отмечены уникальные пептиды
 для тяжелой цепи ботулотоксина А, которые были иденти-
 фицированы в масс-спектрометрическом анализе.

Валидация специфичности

Все предложенные пептиды продемонстрировали 100%-ю специфичность к серотипу А при анализе методом BLAST. Наибольшую перекрестную реактивность (67% гомологии) показал пептид KYASGNK с серотипом В, что не влияет на его специфичность при использовании в комбинации с другими маркерами. В таблице пептиды, которые были идентифицированы при масс-спектрометрическом анализе, выделены подчеркиванием.

Разработанные пептидные маркеры могут быть использованы для качественной и количественной детекции и определения серотипа ботулинического токсина в биологических образцах, продуктах питания или объектах окружающей среды.

В ходе исследования методом *in silico* анализа идентифицирован набор высокоспецифичных триптических пептидов ботулинического токсина 7 серотипов: А, В, С, D, Е, F и G. Отобранные уникальные пептидные маркеры с гомологией <90% рекомендованы для использования при проведении анализа биологических образцов, продуктов питания или объектов окружающей среды на наличие ботулинического токсина методом LC-MS/MS в режиме множественного мониторинга реакций (MRM) или MALDI-TOF.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 1.1.14.

Financial support

The work was performed within the framework of the state R&D assignment 1.1.14.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis*. 2014 Jan 15;209(2):192-202. DOI: 10.1093/infdis/jit450

2. Kalb SR, Moura H, Boyer AE, McWilliams LG, Pirkle JL, Barr JR. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal Biochem*. 2006 Apr 1;351(1):84-92. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.027
3. UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018 Mar 16;46(5):2699. doi: 10.1093/nar/gky092
4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0

Информация о соавторах:

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ГНЦ «Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН»; преподаватель БиомедФармТехнологического факультета биологической безопасности Пущинского филиала ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Рогозин Метхун Мадидинович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Детушев Константин Владимирович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности Пущинского филиала ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Information about co-authors:

Alexey K. Surin, PhD (Phys-Mathematical Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor; Senior Researcher, Biological Testing Laboratory, State Research Center "Branch of the M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences"; Lecturer, BioMedPharmTechnological Faculty of Biological Safety, Pushchino Branch, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH)

Methun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Konstantin V. Detushev, researcher at the Department of Collection Cultures of the Federal State Budgetary Scientific Institution, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor; Professor of the Faculty of Biological Safety of the Pushchino branch of the Russian Biotechnology University (ROSBIOTECH)

НОВОСТИ НАУКИ

Кишечные бактерии истощают макрофаги, способствуя развитию язвенного колита

Язвенный колит (ЯК) – воспалительное заболевание кишечника, связанное с дисфункцией клеток толстой кишки. Исследователи предположили, что токсины, продуцируемые микробиотой, могут повреждать макрофаги в кишечнике и способствовать развитию патологии ЯК. Образцы кала пациентов с ЯК содержали вид бактерий, вариант рода *Aeromonas*, который выделяет токсин, называемый аэролизин. При патологических состояниях этот вариант *Aeromonas* мог колонизировать кишечник мышей, истощать макрофаги и повышать чувствительность мышей к воспалению кишечника. Эти эффекты были связаны со способностью аэролизина напрямую убивать макрофаги. Введение антител к аэролизину обеспечивало защиту от колита у мышей, подвергшихся воздействию варианта *Aeromonas*.



Jiang Z, Wang Y, Gong J, Chen X, Hang D, Chen C, et al.
An *Aeromonas* variant that produces aerolysin promotes susceptibility to ulcerative colitis.
Science. 2025 Nov 20;390(6775):eadz4712. doi: 10.1126/science.adz4712