

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова Химический факультет

Масс-спектрометрия: современные применения

С.В.Абрамов

Лекция 3 из 3

Масс-спектрометрия • химический анализ • структурный анализ • изотопный анализ • элементный анализ • комбинации с другими методами

- Полимеры
- Нефтепродукты
- Криминалистика
- Пищевые продукты
- Контроль окружающей среды
- Фармацевтика, допинги, наркотики
- Косметика, парфюмерия
- Протеомика

• Клиническая химия

• Биохимия

Химический и структурный анализ

Элементный анализ

- Археология
 - Геохимия
 - Экология
- Ядерная энергетика
- Медицина и токсикология
- Фармацевтика, косметика
 - Продукты питания
 - Металлургия
- Полупроводниковая промышленность
 - Нефть и нефтепродукты
 - Криминалистика

• Криминалистика

- Климатические исследования
- Контроль окружающей среды
- Геология, гидрология, разработка нефти
- Геохронология (радиоуглеродный метод)
- Медицинская диагностика, допинг-контроль
- Сельское хозяйство, пищевые продукты

• Ядерная промышленность

Изотопный анализ

Последние достижения



Go right to the source with your intact sample for instant, exact mass analysis.

The new DART[™] ion source revolutionizes mass spectrometry by directly analyzing solids, liquids, and gases in open air, under ambient conditions. DART unleashes the analyzing power and versatility of the JEOL AccuTOF[™] mass spectrometer. No LC. No GC. Just the sample you want to analyze. With "Istantaneous results.

Visit our DART board at www.jeol.com/DART and see what DART has already found on currency, in clothing, food,

pills, plastics,



mass spectrometry products and the JEOL commitment to reliability, service, and support.

¹³С уреазный дыхательный тест

(диагностика язвы желудка и других заболеваний, вызываемых H. Pylori)

Helicobacter Pylori и её уреаза (энзим)



CO(NH₂)₂ + 2H₂O ℝ ℝ H₂O + CO₂↑ + 2NH₃ pH ≈ 1.5-2 (NH₃ ℝ NH₄Cl)

- 1) Выдох СО₂ (эталон)
- Раствор 50 мг ¹³СО(NH₂)₂ per os
- 3) Ожидание: 30 минут
- 4) Повторный выдох CO₂
- 5) Измерение отношения ¹³С/¹²С
 - и сравнение с эталоном

"Золотой стандарт диагностики" неинвазивный экспресс-метод на базе GC/MS электронная ионизация, изотопный анализ ¹³C/¹²C по сигналам CO₂⁺ (*m/z* = 45 и 44)

Альтернативы:

- (1) Биопсия
- (2) Антитела

Генотипирование по точным массам

СНИПЫ (SNP- single nucleotide polymorphism)



Всего СНИПов в нашей ДНК более 3х миллионов. Мы имеем 1 замену на каждые 1,200 - 1,500 оснований.

Так как только 3 - 5 процентов всей последовательности нашей ДНК кодирует белки, большинство СНИПов находятся вне кодирующих последовательностей.

СНИПы внутри этих последовательностей чрезвычайно важны, так как они связаны с генетической предрасположенностью к заболеваниям-

" персонифицированная медицина ".

Как отличить TAGGCTCAAGGTTA от TAGGCTCATGGTTA??

Генерируем "комплиментарную" к TAGGCTCA последовательность АТССGAGT(праймер) и сшиваем ее с нашей ДНК

> ATCCGAGT TAGGCTCAAGGTTA

M1

ATCCGAGT TAGGCTCATGGTTA

Проводим один шаг наращивания нитей и получаем ATCCGAGTT M2 TAGGCTCAAGGTTA

АТССGAGTA M3 ТАGGCTCATGGTTA Разрываем цепи и анализируем на масс-спектрометре



M1

M2M3



Vol. 43, No. 6

The Ibis Approach to Pathogen ID and Strain-Typing



Masses to Base Composition



Mass spectrum

Derived and Expected Base Compositions

Primer 356 (RpIB) Expected Products









Viral Coverage



Принцип генотипирования по точным массам



wA+xT+yG+zC=MW1

- для первой цепи

xA+wT+zG+yC=MW2

- для второй цепи

 $32,785.0 \text{ Da} \longrightarrow \begin{array}{c} A_w G_x C_y T_z \\ 32,588.9 \text{ Da} \end{array} \xrightarrow{A_w G_x C_y T_z} \begin{array}{c} A28 G29 C25 T24 \\ T_w C_x G_y A_z \end{array} \xrightarrow{A24 G25 C29 T28} \begin{array}{c} \end{array} \xrightarrow{A28 G29 C25 T24} \end{array}$

Дефект массы



FT-ICR масс-спектр продуктов ПЦР длинной 111 пар оснований



FT-ICR масс-спектр продуктов ПЦР длинной 111 пар оснований Зарядовое состояние -37

ДНК полимераза довешивает аденин на конец каждой из цепей, однако этот процесс происходит не со 100% эффективностью.

921



Определение нуклеотидного состава для продуктов ПЦР длиной 111 пар оснований

wA+xG+yC+zT=MW1=34441.8 Да

- для первой цепи

{1} zA+yG+xC+wT=MW2=34620.2 Да

- для второй цепи

из системы {1} находим: w =35, x=20, y=26, z=30. Таким образом, состав ДНК оказался: А35 Т30 G20 C26 для одной цепи ДНК и А30 Т35 G26 C20 для другой.

Идентификация бактерий по белковому профилю

Robust protein identification: on probe digestion

Traditional technique: 24 hours

Cells grown on Amp enriched LB-agar

E. coli



E. coli + plasmids (Amp-resistant)



Mass spectrometry: <5 minutes





Белок

protein



Трипсинолиз Trypsinolyses

> **Метод 1** – Метод отпечатков пальцев Method 1- PMF-peptide mass

> > Finger



Maccы пептидов Peptide masses

База данных по последовательностям

DNA and protein sequences data base

Поиск в базе Search in data base

Оценка достоверности Reliability evaluation





Фрагментация Fragmentation

ранспортировка в вакуум Transport into vacuum



анализ масс Mass analyses

Метод 3 – (тор-down) прямая

масс-спектрометрия

База данных по последовательностям ДНК и белков

Достоверности (DNA and protein sequence database) Search reliability evaluation

(top-

Массы фрагментов Fragment masses

Two forms of acyl-CoA binding protein produced from a singlesubject leukocyte pellet



Первичная структура



Первичная структура – масс-спектрометрия(сейчас почти 100%!!!)

Вторичная и третичная -Рентгеновская дифракция (95%), ЯМР(5%)

Точная массовая метка Accurate mass tag

Если масса пептида уникальна в данном протеоме, она может быть использована как его идентификатор и идентификатор порождающего его белка.

При точности 1 ppm можно однозначно определить элементный состав (H,C,N,O,S) пептида с массой до 600 Дальтон и аминокислотный состав пептида с массой до 500 Дальтон

If peptide mass is unique in given proteom it could be used as peptide ID and as ID of parent proteinAt mass acuracy of 1 ppm we can find elemental composition of peptides with mass up to 600 Da and amino acid composition of peptides with masses up to 500 Da

M = 750.468 ± 0.001 Da: только Leu3Phe2Val.



белок

Метод 4 – точная массовая метка

Method 4 – accurate mass tag retention time

Точный анализ масс-Массовая метка Accurate mass analyses



Очень большие массы




Matt Bush,^a Zoe Hall,^a Kevin Giles,^b John Hoyes,^b Carol Robinson^a ,Brandon Ruotolo^c ^aUniversity of Oxford, ^bWaters,^cUniversity of Michigan



Building a Diverse Database



Interpreting Collision Cross Sections



model courtesy of Argyris Politis (Oxford)

Polyhedral Coarse-Grain Models



Matt Bush,^a Andy Baldwin,^d Justin Benesch,^a & Carol Robinson^a ^aUniversity of Oxford, ^aUniversity of Toronto



History of MALDI Mass Spectrometric Imaging



Rat Testis: MALDI Imaging and H&E Staining from the Same Section

Blood vessel



Image Resolution: 20 µm

Ablation resolution:

mouse liver section single laser shot vs 50 shots



Metal-assited SIMS on Neuroblastoma cells



Metal-assisted SIMS on Neuroblastoma cells

Identification Using MS/MS





Металлы в тканях

Finnigan XR: ICP MS covering 12 Orders of Magnitude



Detection range of the combination Faraday and SEM detector system in the Finnigan ELEMENT XR. The plot shows the intensities from the measurement of single element 175Lu solutions with concentrations between 2 fg/g and 2000 µg/g (10 ms sample time for Analog and Faraday).

LA-ICP-MS: INSTRUMENTAL





ICP-QMS, Agilent 7500 ce (with octopole reaction cell)

ADVANTAGES of

Laser Ablation Inductively Coupled Plasma MS

- direct imaging of tissues
- imaging of protein spots in gels
- easy quantification possibility
- no matrix required, no charging effects
- J.S. Becker, Inorganic Mass Spectrometry (Wiley, 2007)



Imaging of Metals in Brain



Quantification using matrix matched laboratory standards







Scanning of tissue by focused laser beam



Images in Rat Brain Tissues (with small tumor)







Parkinson's Disease Mouse Brain **ØMPTP** * - neurotoxin that causes Parkinson's disease by killing certain neurons in the substancia nigra Iron Copper Concentration Substantia nigra max

A. Matusch et al., Philipps University of Marburg



Rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS)



- Analogous with Thermospray Ionization
 - Filament-off mode
- IR-Laser Desorption Ionization is a particular implementation
- Factors
 - Dielectric constant of solvent
 - Dissociation constant of analyte
 - Rate of evaporation

REIMS - Electrosurgery



REIMS spectra of vital tissues – identification



 Spectral similarity index was defined as cosine of two data vectors given by:



LCQ Deca Negative ion mode

REIMS spectra of vital tissues – identification **Principal Component Ananlysis (PCA)**



- Rat adenocarcinoma graft in 2 m old male Wistar rats
- Surgery
 - Ketamine/Xylazine anesthesia
- Spectra were collected from all tissues
 - ERBOTOM ICC 300
 - LCQ Deca, ion mode
- Spectra were processed
 - Centroid conversion
 - Elimination of conservative regions
- PCA analysis was performed on 120 D data vectors

Изотопный анализ

Радиоуглеродный метод (14С/12С)



Радиоактивный ¹⁴С в атмосфере



Радиоактивный ¹⁴С в атмосфере



Atmospheric ¹⁴C at different latitudes. Error bars are too small to be shown

- Fruholmen, Norway 71°06'N, 23°59'E, (1962-1993)(Nydal & Lovseth, 1996)
- Vermunt, Austria 47°N, 10°E, (1959-1983)(Levin et al., 1994)
- Schauinsland, Germany 48°N, 8°E, (1976-1997)(Levin & Kromer., 1997)
- Izana, Canary Islands 28°22'N, 16°30'W, (1963-1967)(Nydal & Lovseth, 1996)
- Wellington, New Zealand 41°18'S, 174°48'E (1954-1993)(Manning & Melhuish, 1994)
- ∆ Suva, Fiji, 18.1°S, 178.4°E, (1958-1975)(Manning et al., 1990)

- N'Djamena, Chad 12°08'N, 15°57'E, (1966-1976)(Nydal & Lovseth, 1996)
- ▲ Debre Zeit, Ethiopia 8°40'N, 38°58'E, (1963-1969)(Nydal & Lovseth, 1990
- Fianarantsoa, Madagascar 21°27′S, 47°05′E, (1964-1978)(Nydal & Lovs∈
- o Pretoria, South Africa 26°S, 28°E (1950-1994)(Vogel, pers. comm.)
- Cape Grim, Australia 40°41'S, 144°41'E (1994-1995)(Levin et al., 1996)
- Scott Base, Antartica, 77.9°S, 166.7°E, (1961-1976)(Manning et al., 199

Исследование нефти с помощью FT-ICR масс-спектрометрии

•Камчатская нефть (Кальдера вулкана Узон Институт вулканологии и сейсмологии РАН) •Сибирская нефть (ВНИ ГНИ МПР) Нефть в растворе 30% толуол, 70% метанол
Исследована самая легкая (верхняя) фракция
Концентрация 1 mg/ml







Сибирская нефть (положительные ионы)

Full FT R(400)=100000

More than 200 peaks in 1 Da range!!



Камчатская нефть (отрицательные ионы)



Камчатская нефть (отрицательные ионы)

Состав Нефти обычно выражается формулой: С_с Н_{2с+z}Х, где Z – число характеризующее углеводороды (каждая 2й ная связь уменьшает z на 2) Например С₁₂Н₉N будет иметь обозначение -15N



2.0 0.38 0.36 H,O degree of unsaturation 0.34 - 0 0.32 Kendrick mass defect 0.30 0.28 월 1.0 -0.26 0.24 N NO 0.22 NO2 CO. 0.20 0.18 0.16 0.0+ 0.5 200 300 500 600 700 800 0.0 400 900 1.0 Nominal Kendrick mass O/C

Диаграммы Ван Кревелена

Диаграмма Кендрика

Macca $CH_2 = 14$



Nominal Kendrick Mass

Kendrick Mass Defect

Kamchatka oil



Nominal Kendrick Mass



Что делать, если Вы столкнулись с масс-спектром?
Прежде чем интерпретировать незнакомый масс-спектр, обязательно узнайте метод ионизации, при помощи которого он был получен, а также изучите и визуализируйте изотопное распределение частиц (ионов) предполагаемого состава для облегчения их поиска среди "частокола"

Использованные источники информации

http://www.vmso.ru/datadocs/Ponkin.pdf http://loza.tomsk.ru/projects/turin/htm/science/methodRCA.htm http://hbar.phys.msu.ru/gorm/dating/wally-1.htm http://www.textronica.com/ http://www.chem.agilent.com http://www.leco.com http://www.thermoscientific.com J.H.Gross Mass Spectrometry, Springer, 2004 Материалы Е.Н.Николаева Материалы А.В.Кепмана Интернет

Спасибо за внимание!