Мосқовский 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

Химический и структурный анализ

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

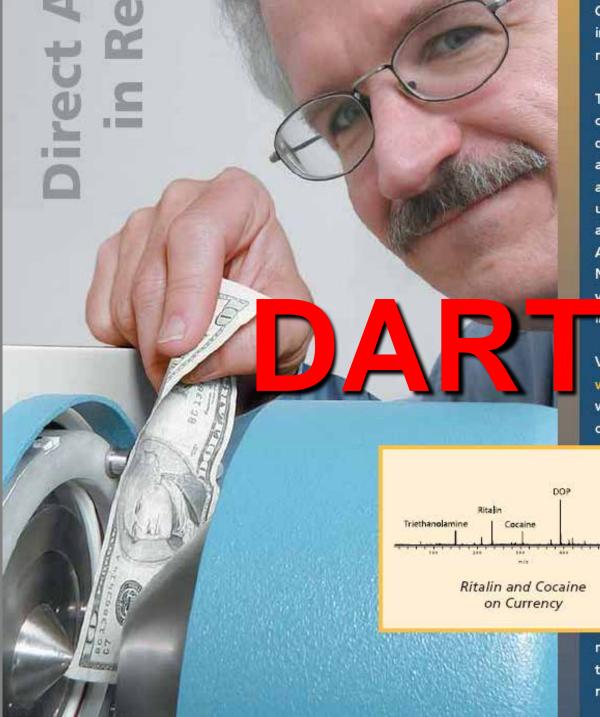
Элементный анализ

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

Изотопный анализ

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

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 instantaneous results.

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

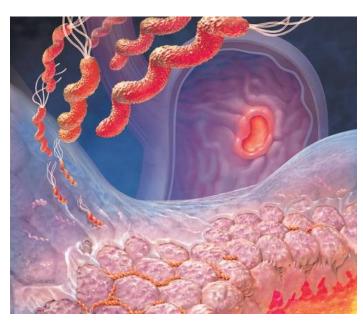
pills, plastics, biological fluids, paper, beverages, and more. Or contact us directly at 978-535-5900 or ms@jeol.com to learn more about our innovative

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 ®

 $\mathbb{R} H_2 O + CO_2 \uparrow + 2NH_3$

pH ≈ 1.5-2 (NH₃ ® NH₄CI)

- Выдох СО₂ (эталон)
- 2) Pactbop 50 Mr 13 CO(NH₂)₂ per os
- 3) Ожидание: 30 минут
- 4) Повторный выдох СО2
- 5) Измерение отношения ¹³C/¹²C и сравнение с эталоном

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

Альтернативы:

- (1) Биопсия
- (2) Антитела

Генотипирование по точным массам

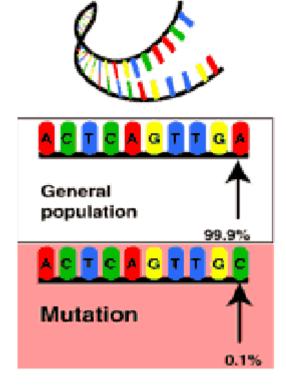
СНИПЫ (SNP- single nucleotide polymorphism)

Полиморфизм появляется, когда отдельный нуклеотид, например A, заменяет один из трех других-C, G, или T. AAGGTTA to ATGGTTA

Если такая замена происходит более чем в 1 проценте случаев, то это СНИП, если меньше, то

мутация.

General population 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 ATCCGAGT(праймер) и сшиваем ее с нашей ДНК

> ATCCGAGT TAGGCTCAAGGTTA

M1

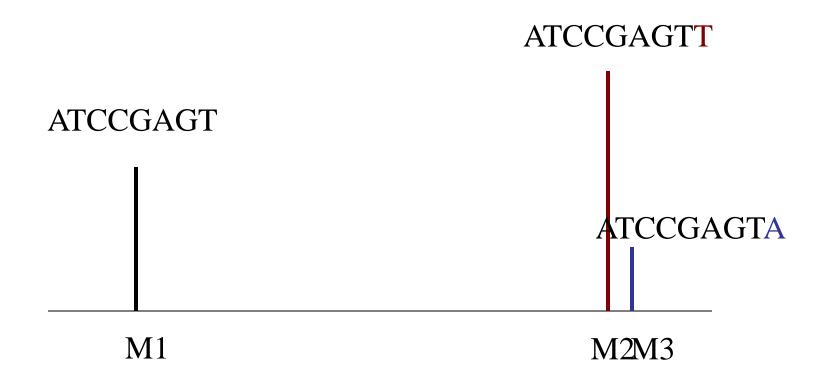
ATCCGAGT TAGGCTCATGGTTA

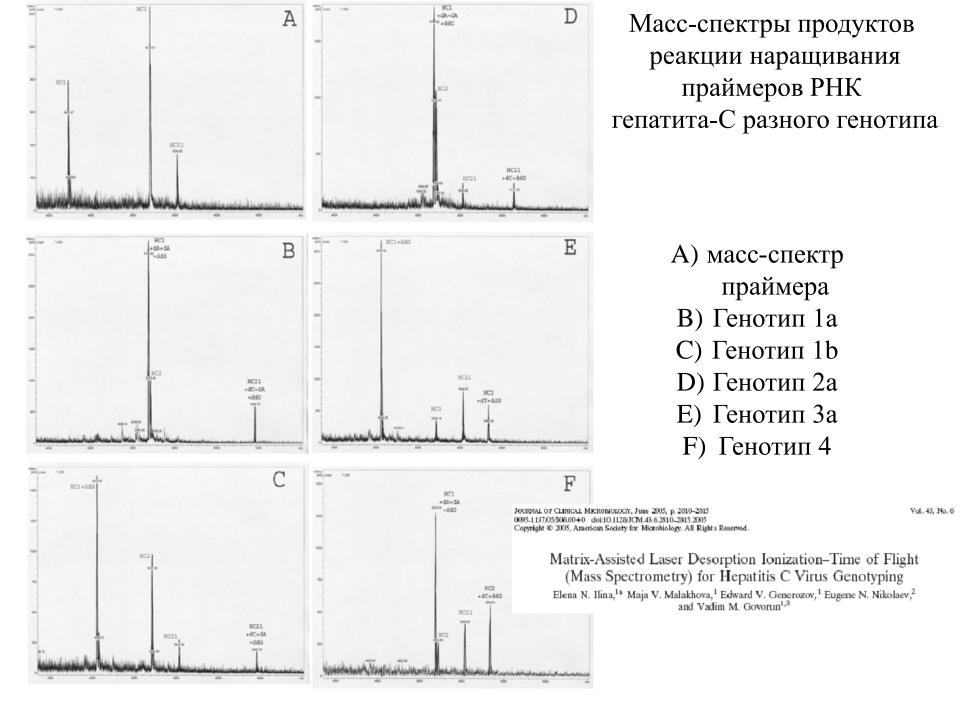
Проводим один шаг наращивания нитей и получаем ATCCGAGTT TAGGCTCAAGGTTA

M2

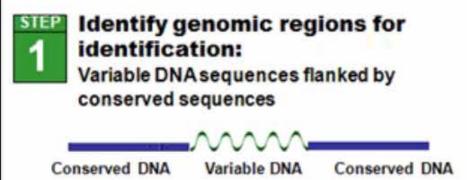
ATCCGAGTA TAGGCTCATGGTTA **M**3

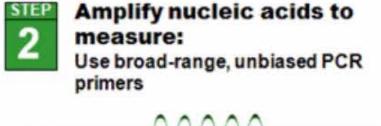
Разрываем цепи и анализируем на масс-спектрометре

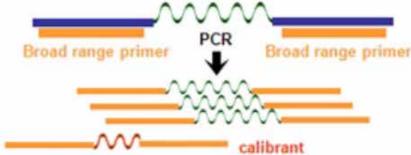




The Ibis Approach to Pathogen ID and Strain-Typing

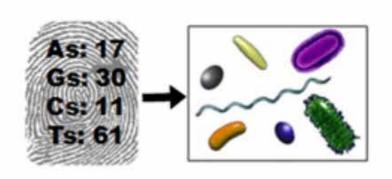




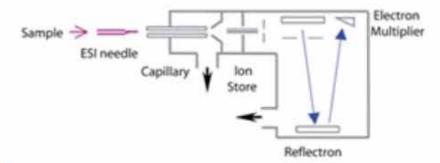




Identify the organisms: Base-composition fingerprints



Measure nucleic acid: ESI-TOF (Bruker MicrOTOF)





Masses to Base Composition

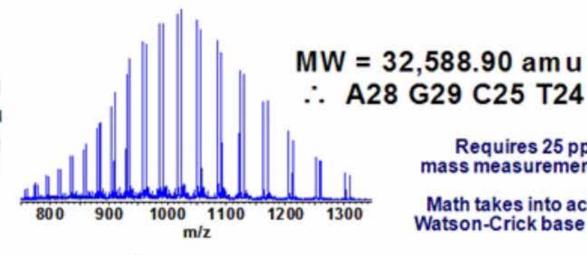


Penny = 2.500 gNickel = 3.950 gDime = 2.268 gQuarter = 5.670 g



Weight = 4.6 grams ∴ 2 dim es

A = 313.0576 amu G = 329.0526 amu C = 289.0464 amu T = 304.0461 amu



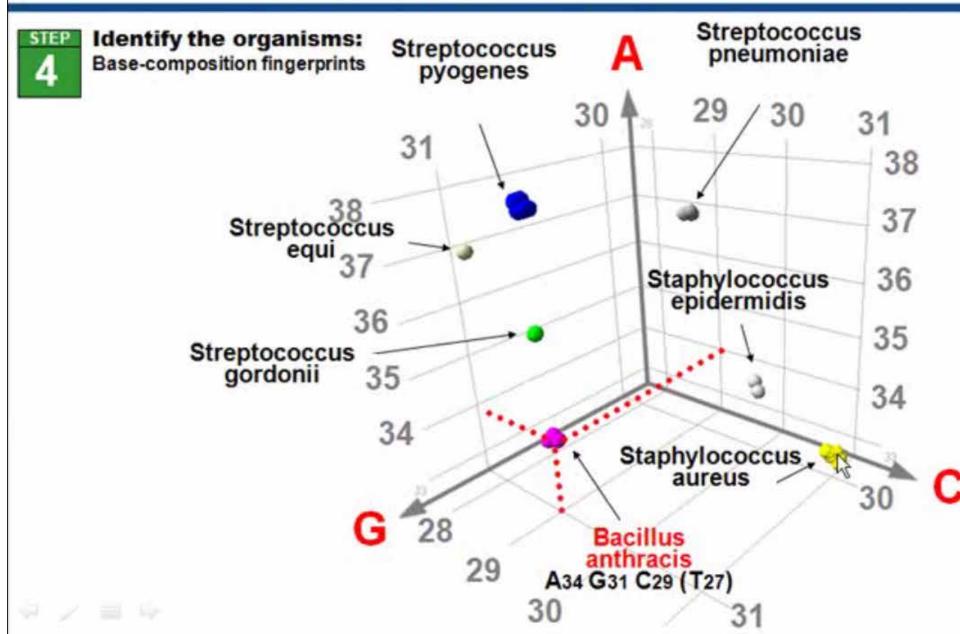
Requires 25 ppm mass measurement error

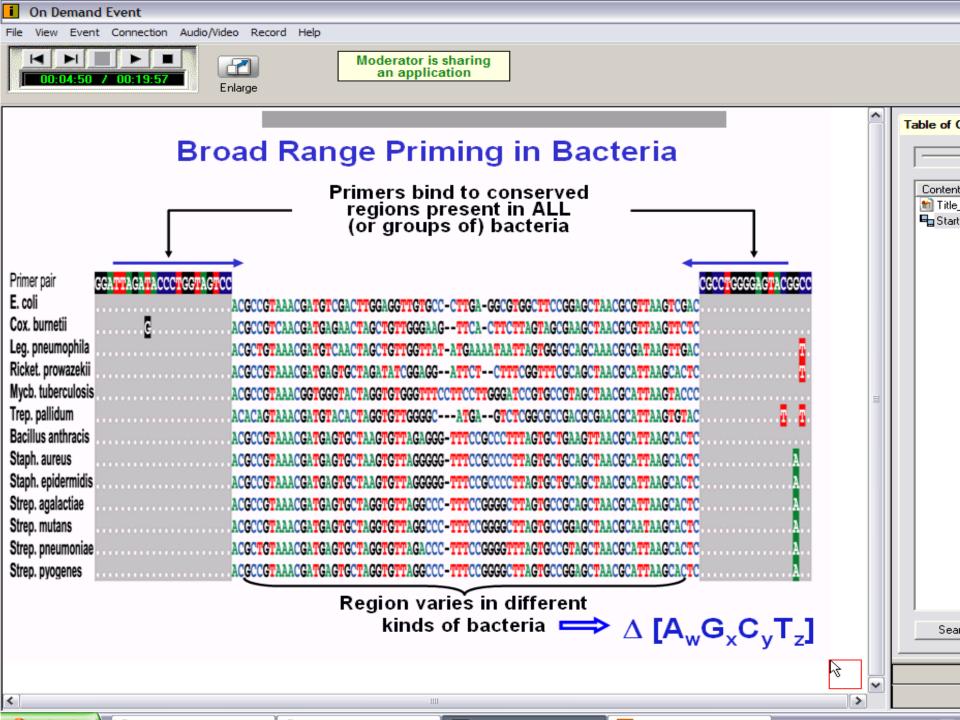
Math takes into account Watson-Crick base pairing

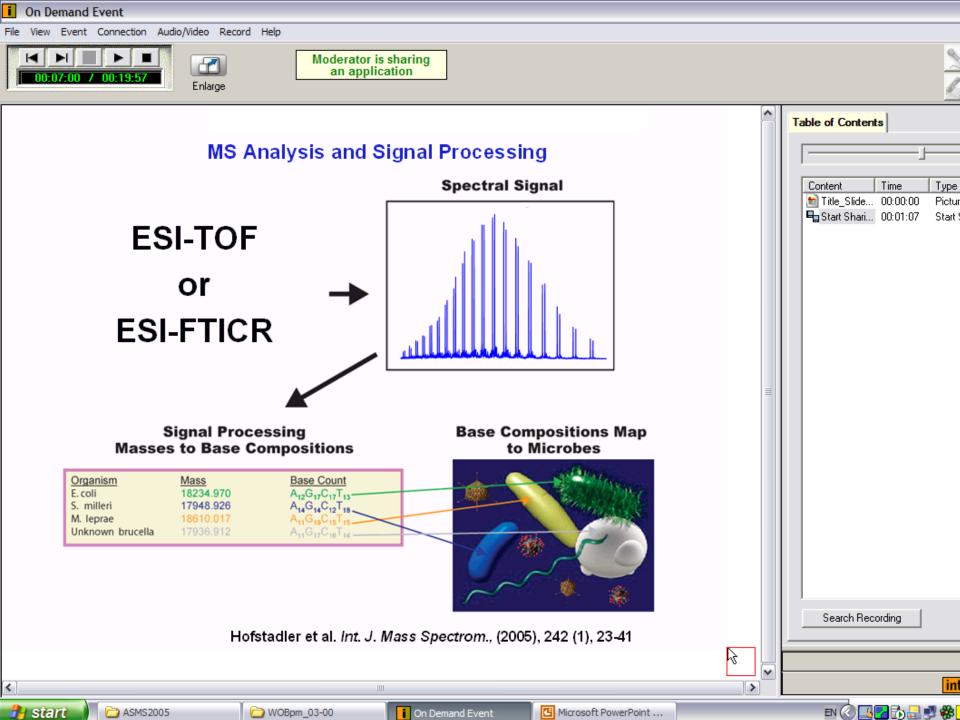
Mass spectrum

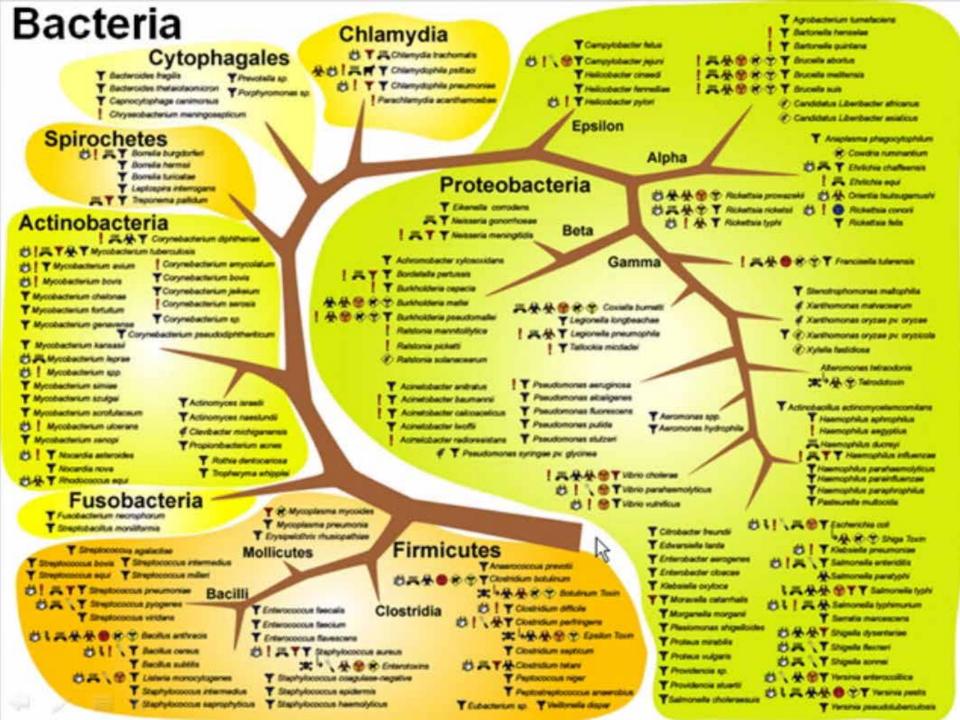
Derived and Expected Base Compositions

Primer 356 (RpIB) Expected Products

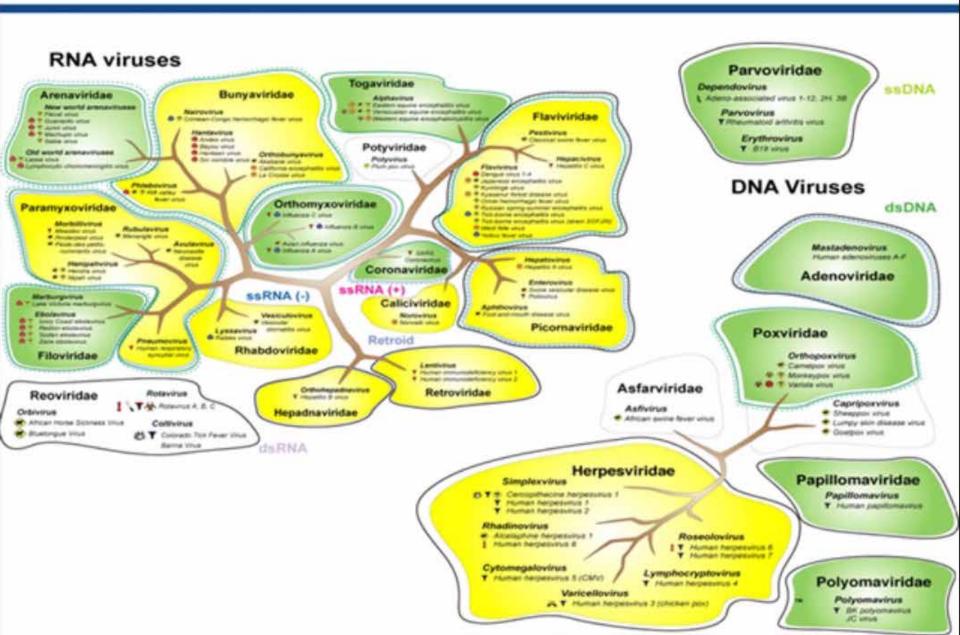








Viral Coverage



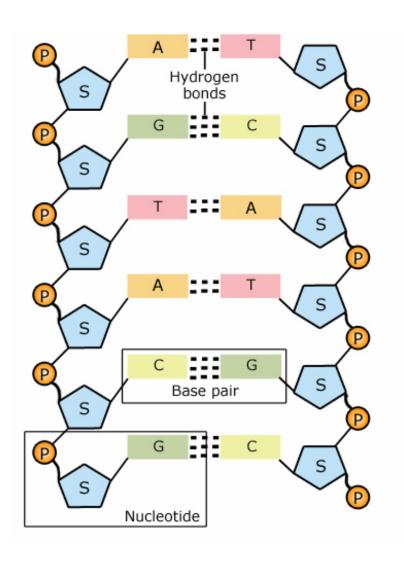
Принцип генотипирования по точным массам

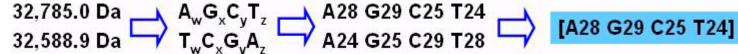
WA+xT+yG+zC=MW1

- для первой цепи

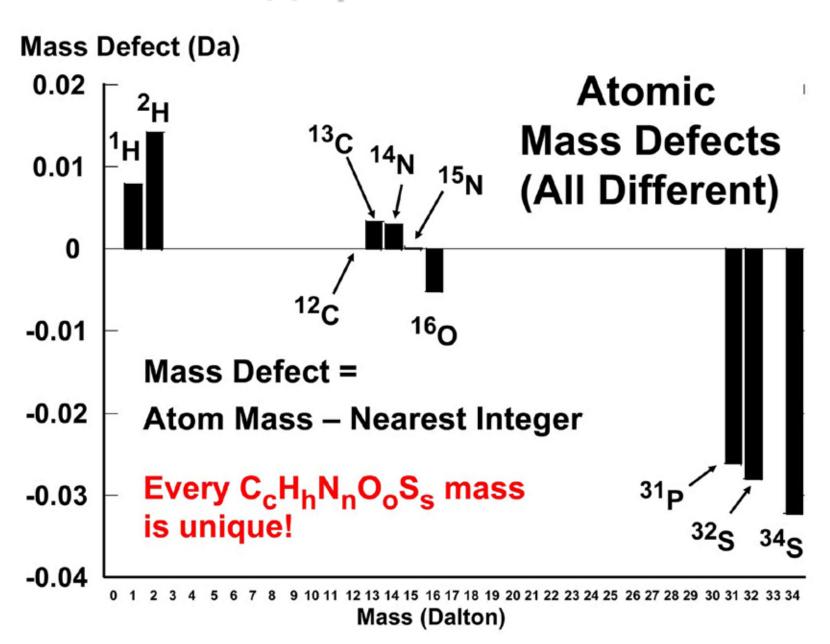
XA+WT+ZG+yC=MW2

- для второй цепи

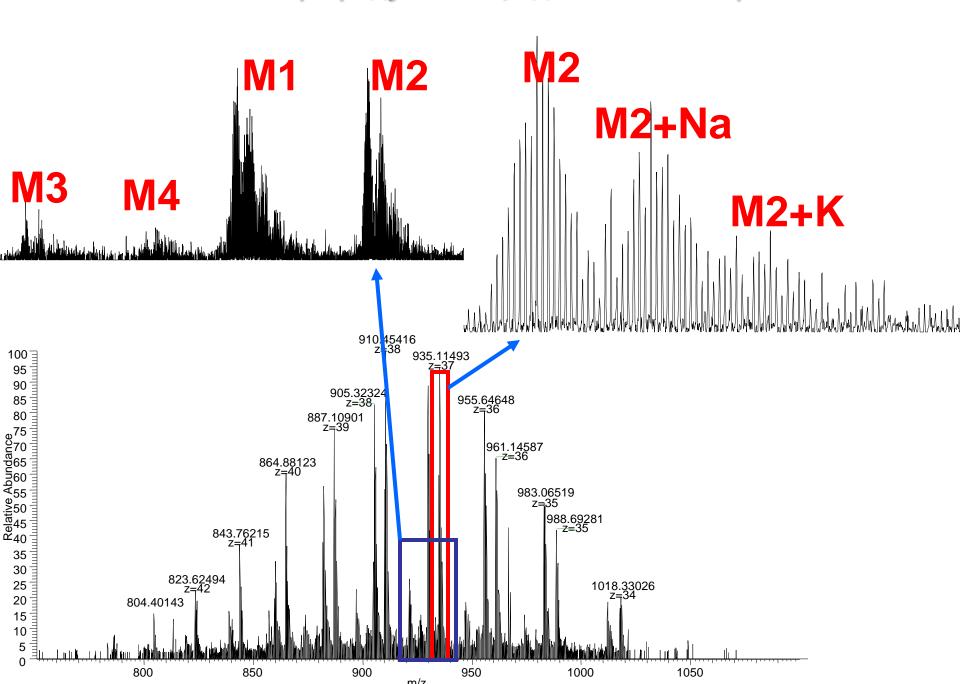




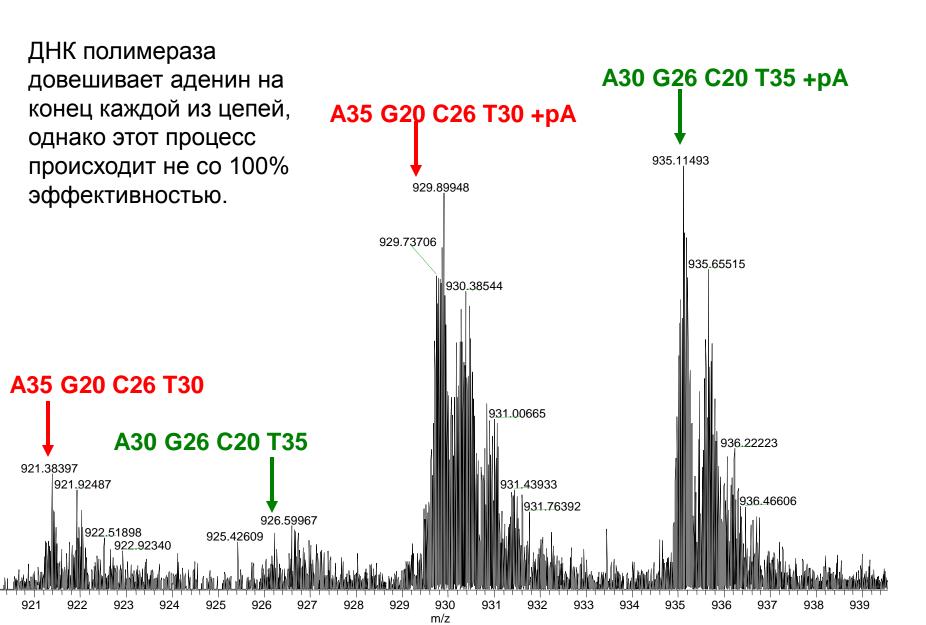
Дефект массы



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



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



Определение нуклеотидного состава для продуктов ПЦР длиной 111 пар оснований

- для первой цепи

- для второй цепи

из системы {1} находим: w =35, x=20, y=26, z=30. Таким образом, состав ДНК оказался: A35 T30 G20 C26 для одной цепи ДНК и A30 T35 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

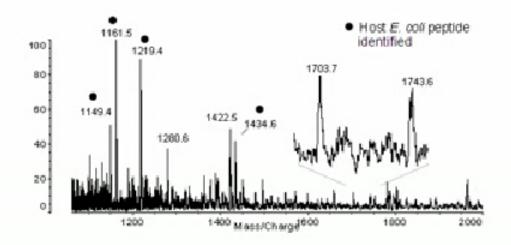
E. coli

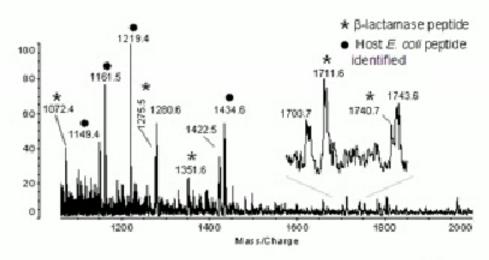


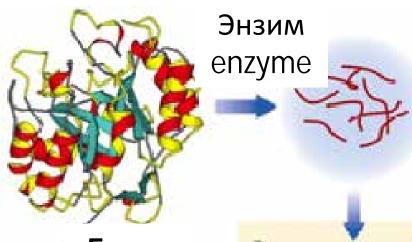
E. coli + plasmids (Amp-resistant)



Mass spectrometry: <5 minutes







Белок protein Трипсинолиз Trypsinolyses

> Метод 1 – Метод отпечатков пальцев

> Method 1- PMF-peptide mass

Finger

Массы пептидов Peptide masses

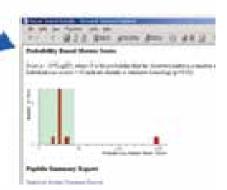
База данных по последовательностям

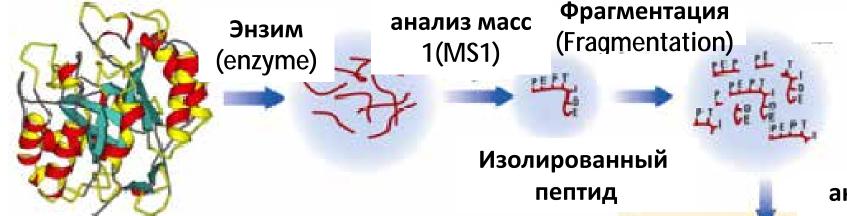
DNA and protein sequences data base



Поиск в базе Search in data base

Оценка достоверности Reliability evaluation





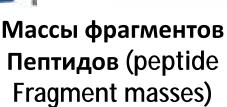
Белок (protein)

Метод 2 – (МС/МС) двойная масс-спектрометрия Method 2 MS/MS double MS

База данных по Последовательностям ДНК и белков (DNA and protein sequence database)

Поиск в базе

Search in the data base Оценка достоверности (Evaluation of search reliability) анализ масс 2 (MS2)





Фрагментация Fragmentation

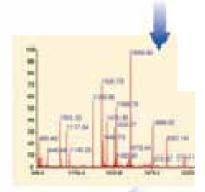
ранспортировка в вакуум Transport into vacuum

белок

Метод 3 – (тор-down) прямая

масс-спектрометрия

База данных по (topпоследовательностям ДНК и белков

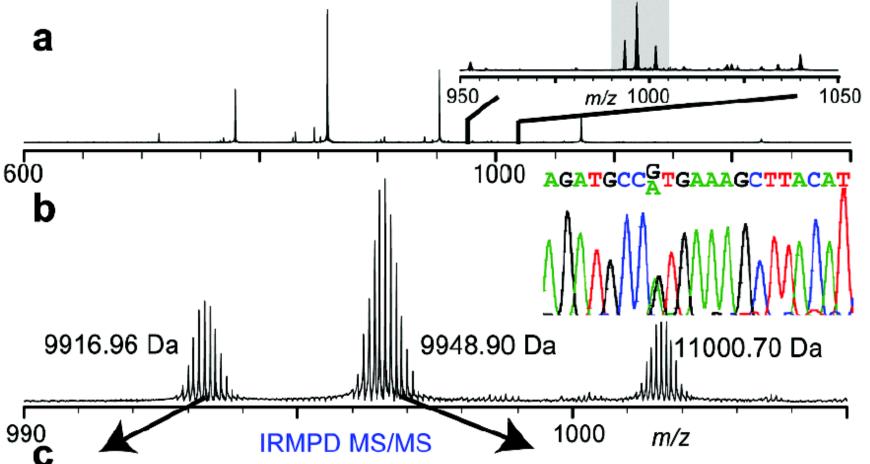


анализ macc Mass analyses

Массы фрагментов Fragment masses

Достоверности Search reliability

(DNA and protein sequence database) evaluation Two forms of acyl-CoA binding protein produced from a singlesubject leukocyte pellet



28 Matching Fragment ions, 10E-25 Expect value SOAEFEKAAEEVRHLKTKPSDEEMLFIYGH YKOATVGDINTERPGMLDFTGKAKWDAWNE LKGTSKEDAVKAYINKVEELKKKYGI

11 more ions matching than other allele

23 Matching Fragment ions, 10E-23 Expect value $M_{theo} = 9917.02$ $M_{exp} = 9916.96$, 6 ppm mass error $M_{theo} = 9948.99$ $M_{exp} = 9948.90$, 9 ppm mass error SOAEFEKAAEEVRHLKTKPSDEEMLFIYGH YKQATVGDINTERPGMLDFTGKAKWDAWNE LKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI 10 more ions matching than other allele

Первичная структура

```
1 20

NH3+—KETAAAKFERQHMDSSTSAASSSNYC
N
Q
VAQVDALSEHVFTNVPKCRDKTLNRSKM

58C
SQKNVACKNGQTNCYQSYSTMSITDCRETGS
S 90

COO--VSADFHVPVYPNGECAVIIHKNAQTTKYACNPYK
124
```

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

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

Точная массовая метка Accurate mass tag

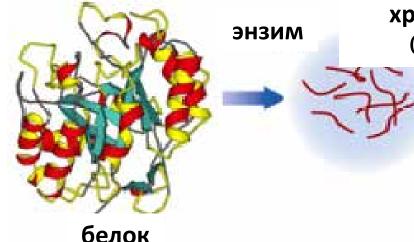
Если масса пептида уникальна в данном протеоме, она может быть использована как его идентификатор и идентификатор порождающего его белка.

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 protein

At 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

 $M = 750.468 \pm 0.001$ Da: только Leu3Phe2Val.



хроматография – точное время удержания Chromatography- accurate retention time

> Изолированный пептид

> > Точный анализ масс-Массовая метка Accurate mass analyses

Метод 4 – точная

массовая метка

Method 4 – accurate mass tag retention time



Точные массы пептидов

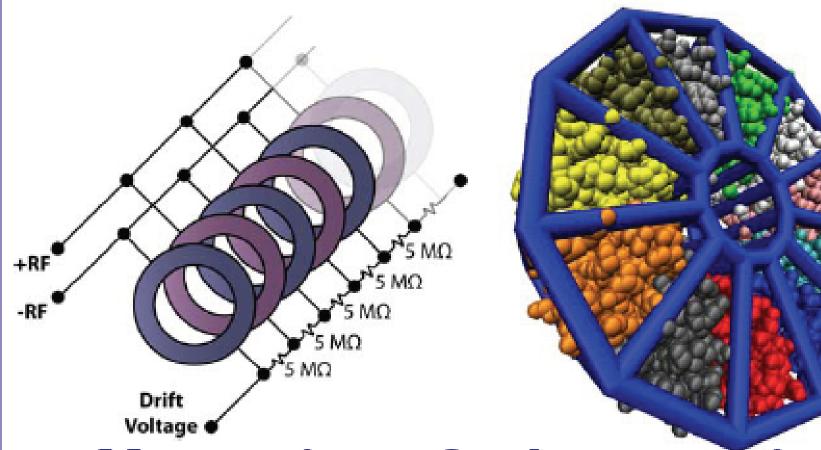
Оценка достоверности идентификации



База данных по Последовательностям ДНК и белков

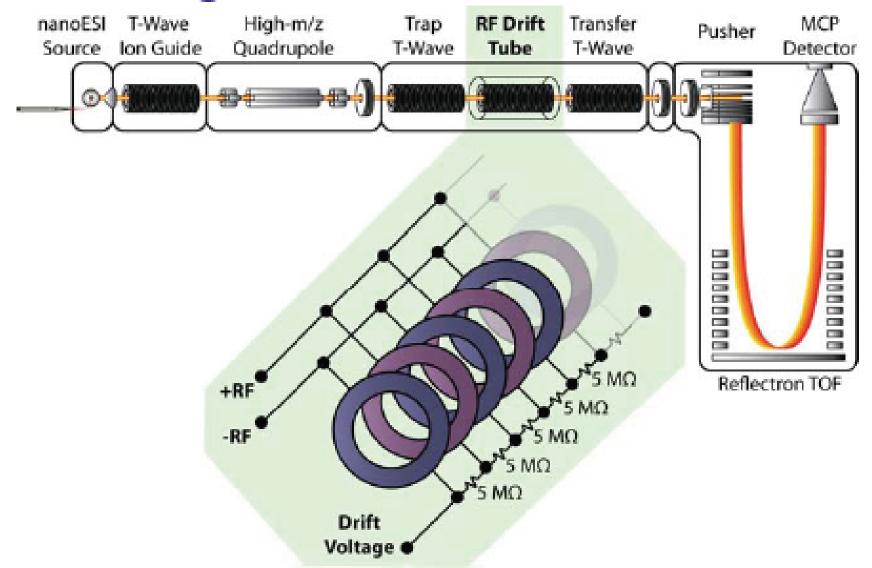
Очень большие массы

Gas-Phase Structural Biology

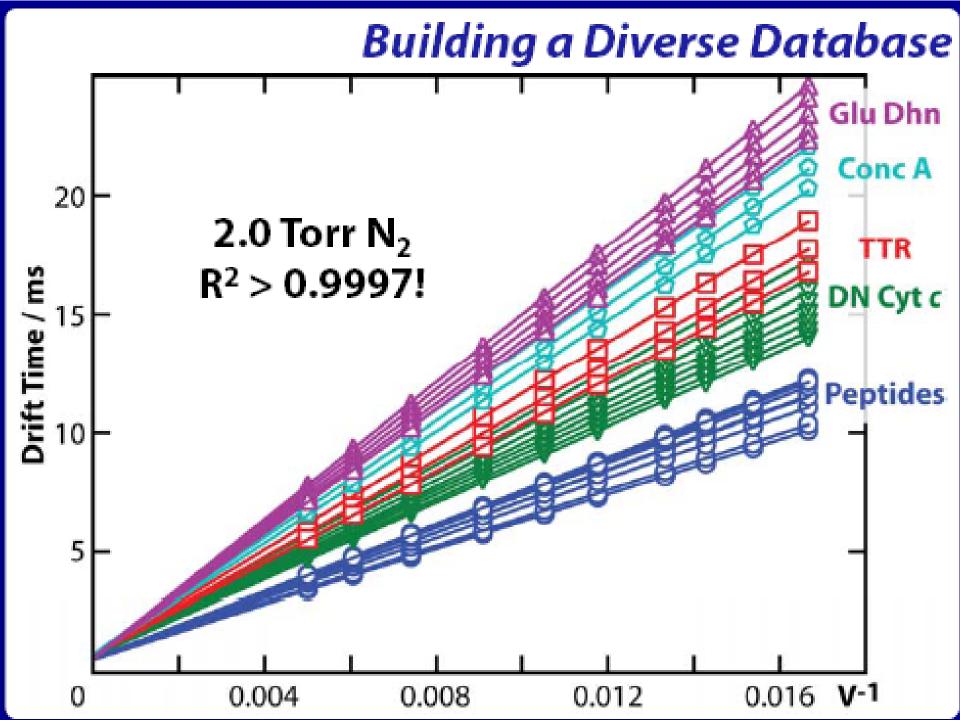


Measuring & Interpreting Collision Cross Sections

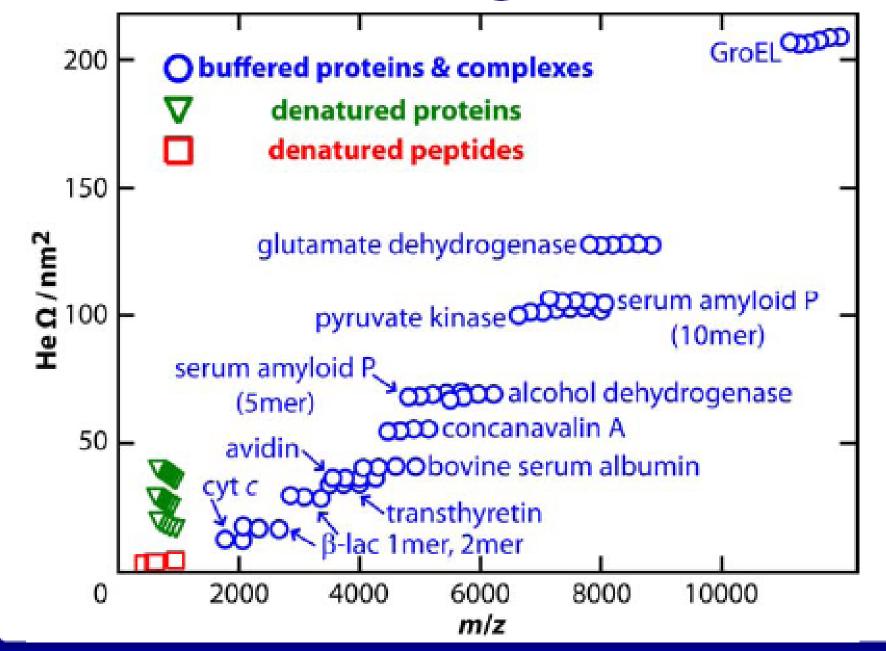
Measuring Accurate Collision Cross Sections



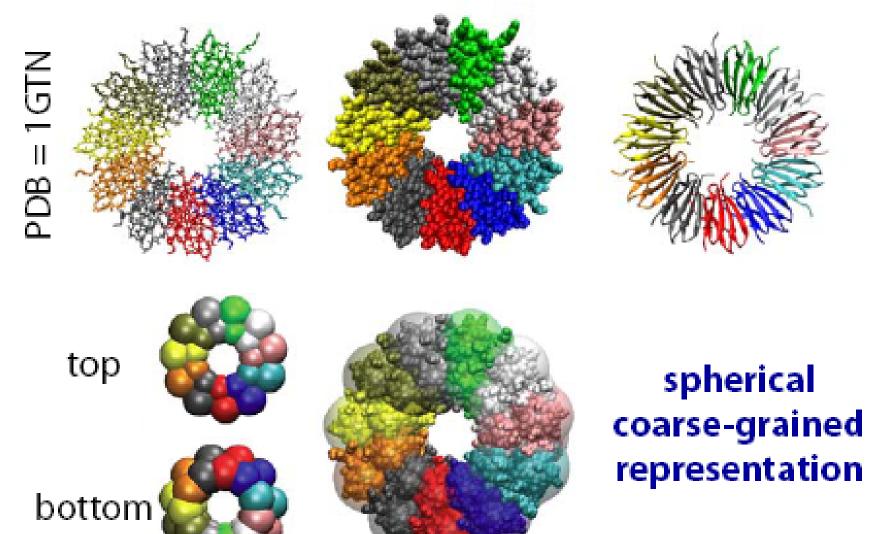
Matt Bush, a Zoe Hall, a Kevin Giles, b John Hoyes, b Carol Robinson a, Brandon Ruotolo aUniversity of Oxford, bWaters, aUniversity of Michigan



Building a Diverse Database

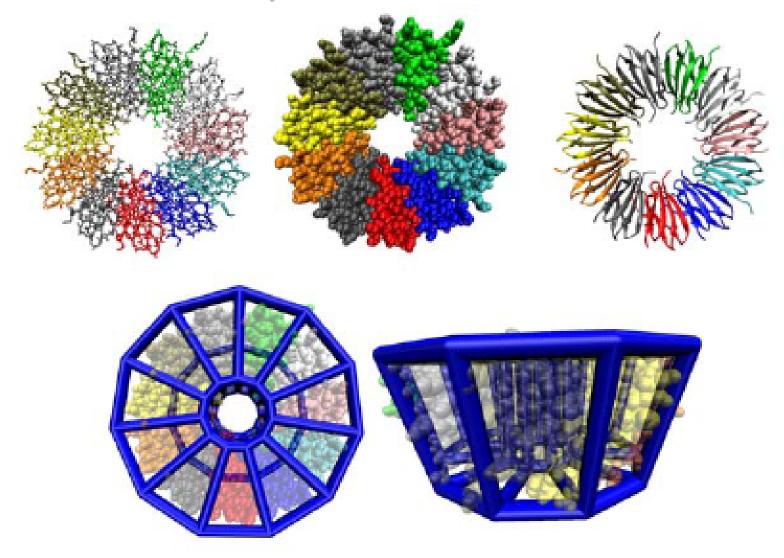


Interpreting Collision Cross Sections



model courtesy of Argyris Politis (Oxford)

Polyhedral Coarse-Grain Models



Matt Bush, a Andy Baldwin, d Justin Benesch, a & Carol Robinson a University of Oxford, dUniversity of Toronto

Imaging

History of MALDI Mass Spectrometric Imaging



Patent

Patent

Patent

Metabolites

UT Houston Vanderbilt U Novartis

Deposits Skin Micromass

Metabolites

Molecular Scanner

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

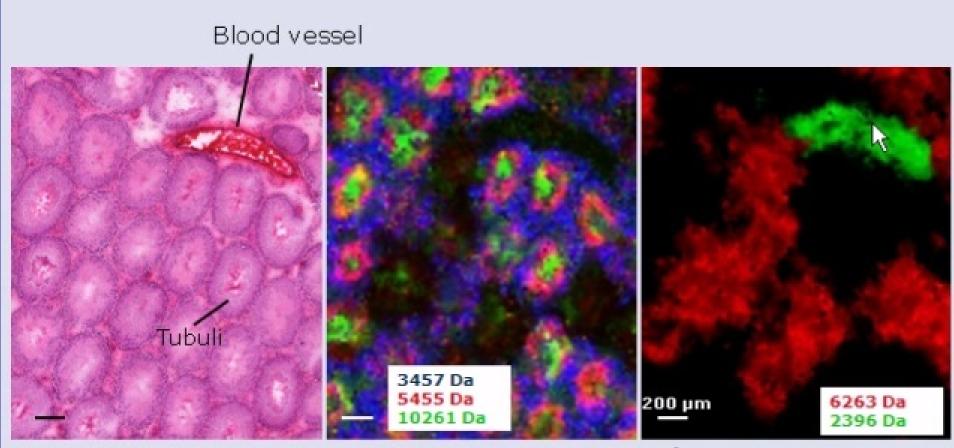
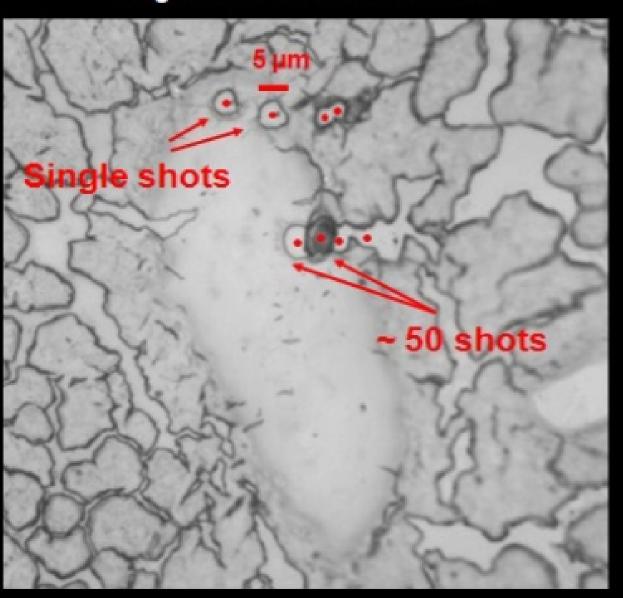


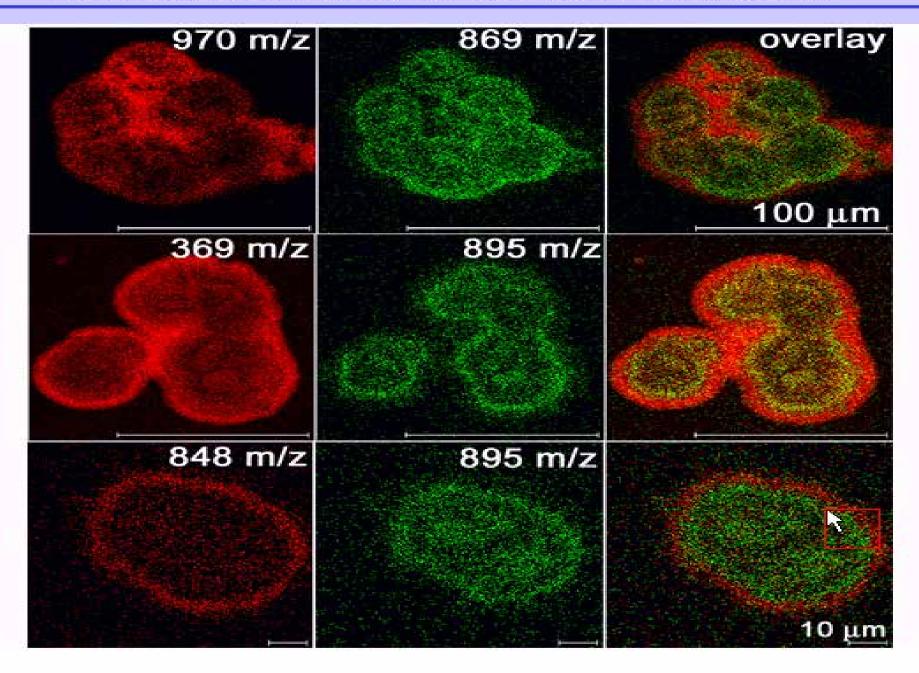
Image Resolution: 20 µm

Ablation resolution:

mouse liver section single laser shot vs 50 shots

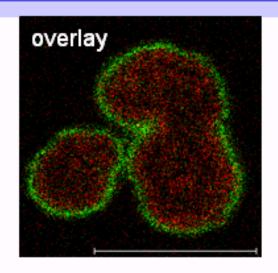


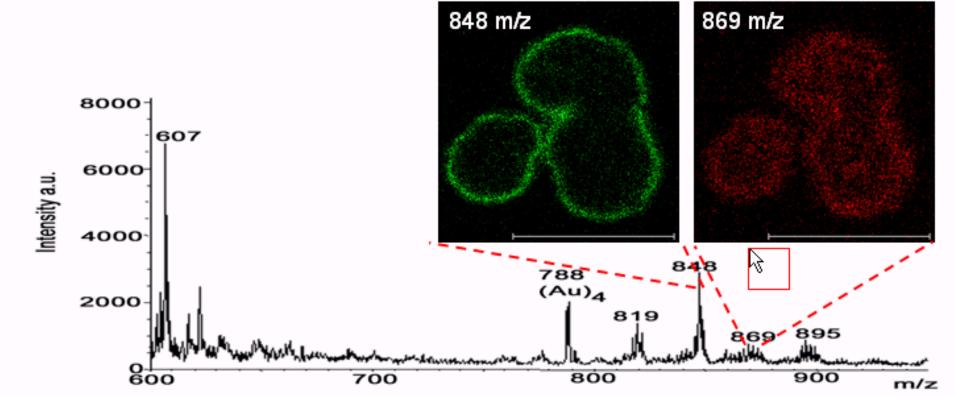
Metal-assited SIMS on Neuroblastoma cells



Metal-assisted SIMS on Neuroblastoma cells

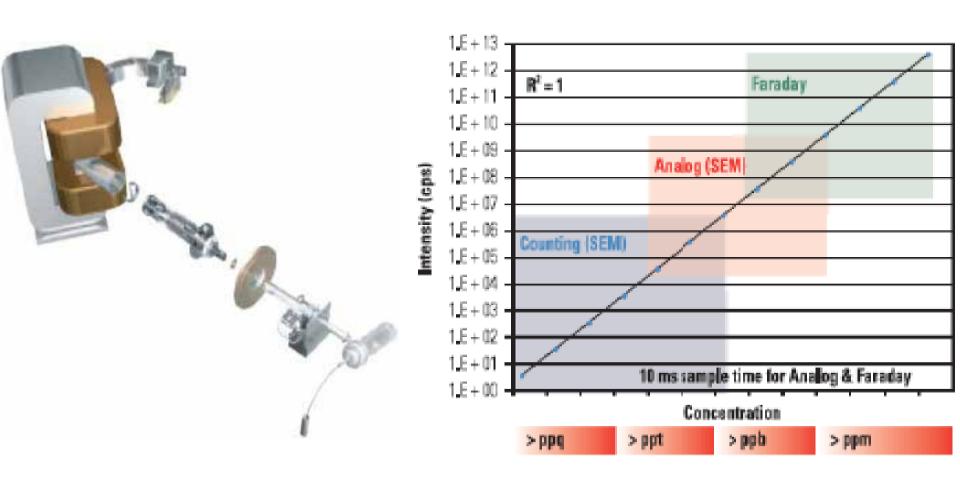
Identification Using MS/MS





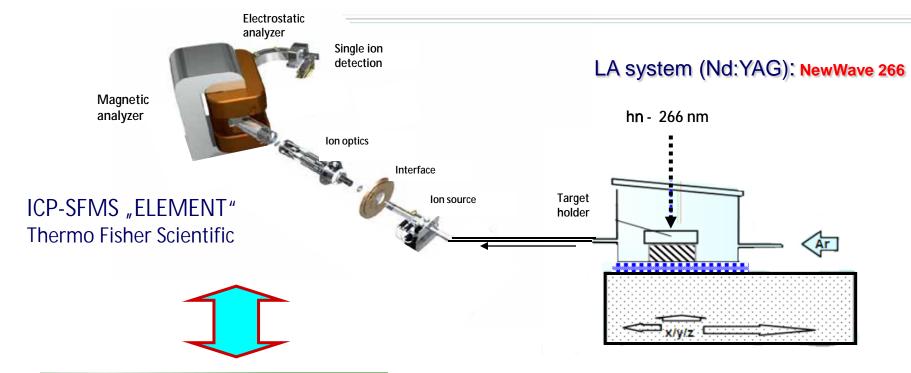
Металлы в тканях

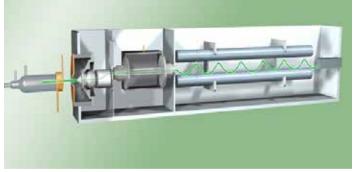
Finnigan XR: ICP MS covering 12 Orders of Magnitude



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 μ g/g (10 ms sample time for Analog and Faraday).

LA-ICP-MS: INSTRUMENTAL





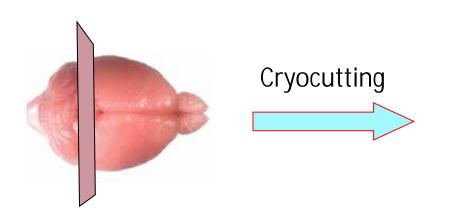
ICP-QMS, Agilent 7500 ce (with octopole reaction cell)

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)

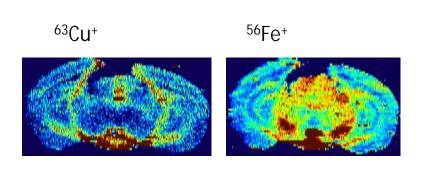




Thickness: 20 µm

LA-ICP-MS

Imaging of Metals in Brain

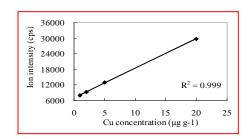


Data acquisition

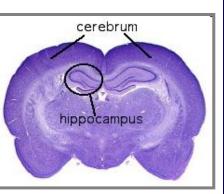
Scanning of tissue by focused laser beam

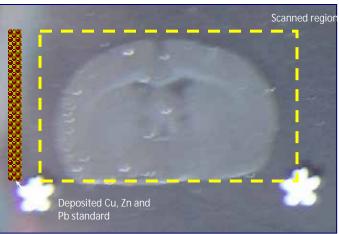
Quantification using matrix matched laboratory standards

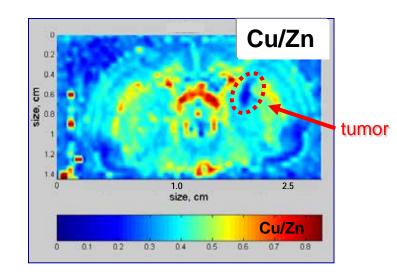
Quantitative images of metals

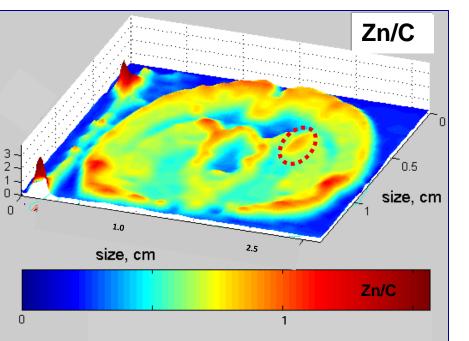


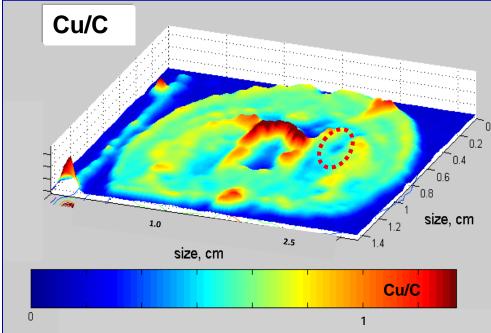
Images in Rat Brain Tissues (with small tumor)



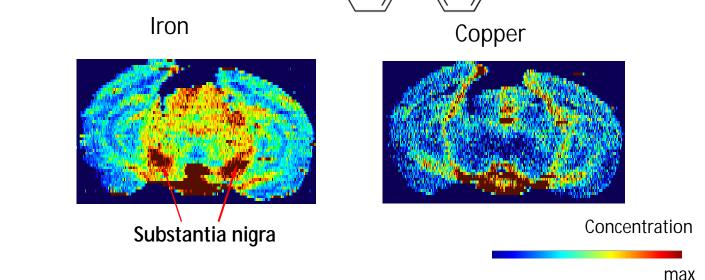








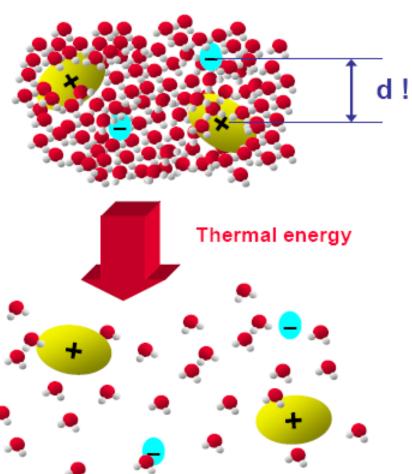
Parkinson's Disease Mouse Brain ØMPTP * - neurotoxin that causes Parkinson's disease by killing certain neurons in the substancia nigra (*



A. Matusch et al., Philipps University of Marburg

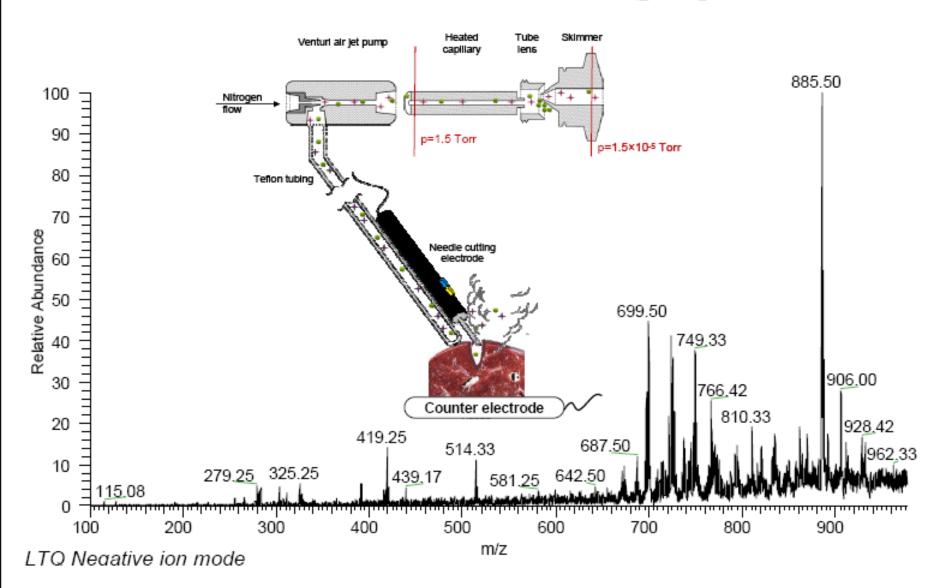
Хирургия

Rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS)

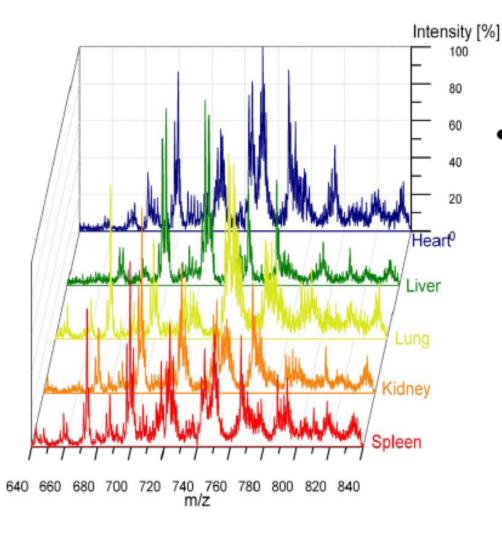


- Analogous with Thermospray Ionization
 - Filament-off mode
- IR-Laser Desorption Ionization is a particular implementation
- Factors
 - Dielectric constant of solvent
 - Dissociation constant of analyte
 - Rate of evaporation

REIMS - Electrosurgery



REIMS spectra of vital tissues – identification

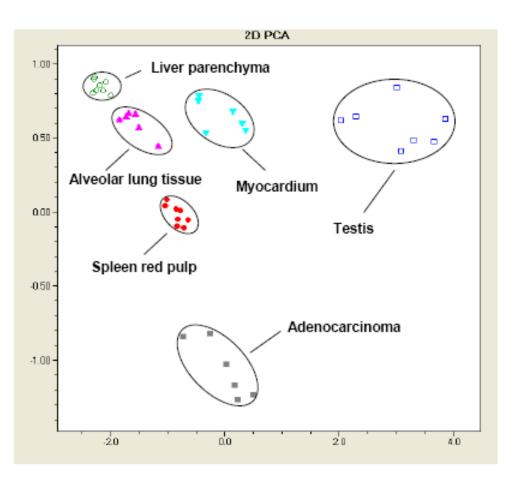


 Spectral similarity index was defined as cosine of two data vectors given by:

$$\cos \theta = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_{i} y_{i}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} x_{i}^{2} \sum_{i=1}^{n} y_{i}^{2}}}$$

LCQ Deca Negative ion mode

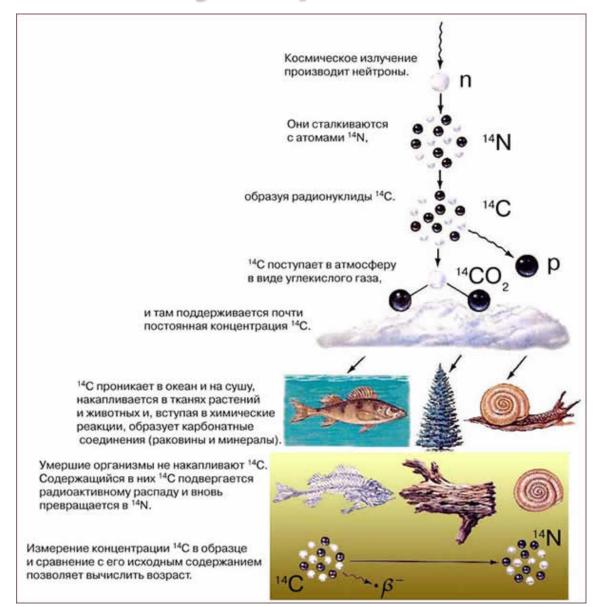
REIMS spectra of vital tissues – identification Principal Component Ananlysis (PCA)



- 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 (¹⁴C/¹²C)

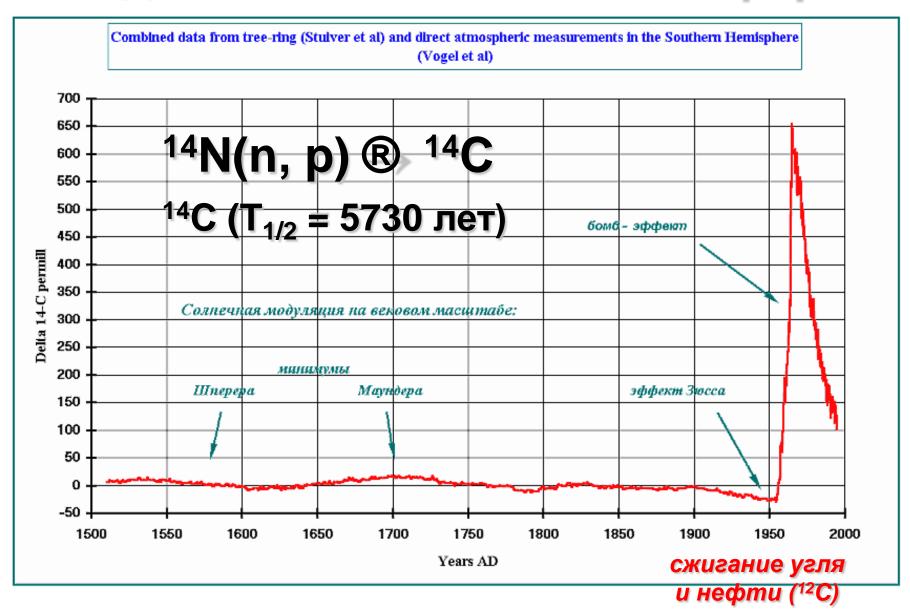




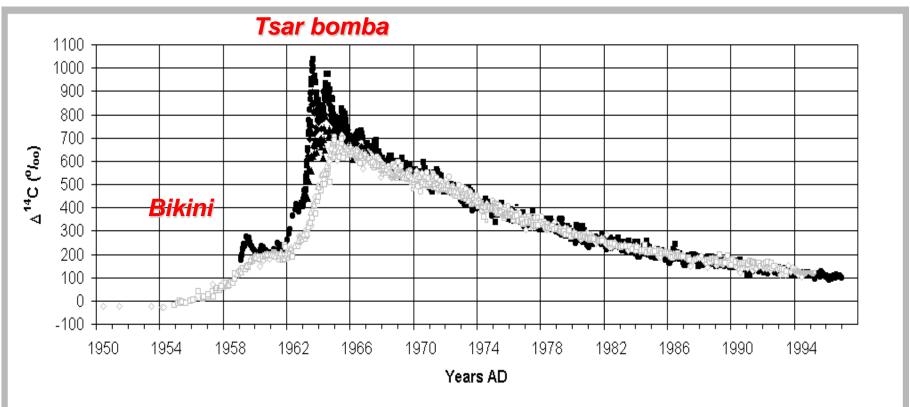
Willard Frank Libby

Нобелевская премия по химии (1960)

Радиоактивный ¹⁴С в атмосфере



Радиоактивный ¹⁴С в атмосфере



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

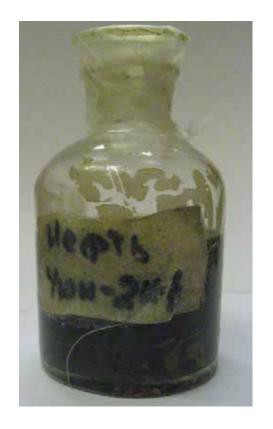
- Fruholmen, Norway 71°06'N, 23°59'E, (1962-1993)(Nydal & Lovseth, 1996).
- Vermunt, Austria 47°N, 10°E, (1959-1983)(Levin et al., 1994)
- Schauinsland, Germany 48°N, 8°E, (1976-1997)(Levin & Kromer., 1997)
- Izana, Canary Islands 28°22'N, 16°30'W, (1963-1967)(Nydal & Lovseth, 1996).
- Wellington, New 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, 1999
- Fianarantsoa, Madagascar 21°27′S, 47°05′E, (1964-1978)(Nydal & Lovse
- 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



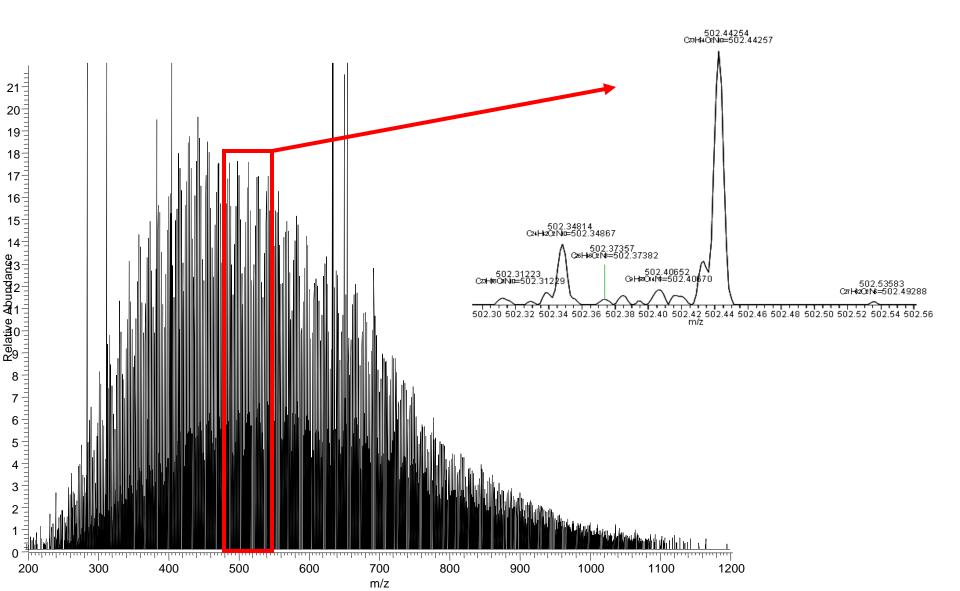




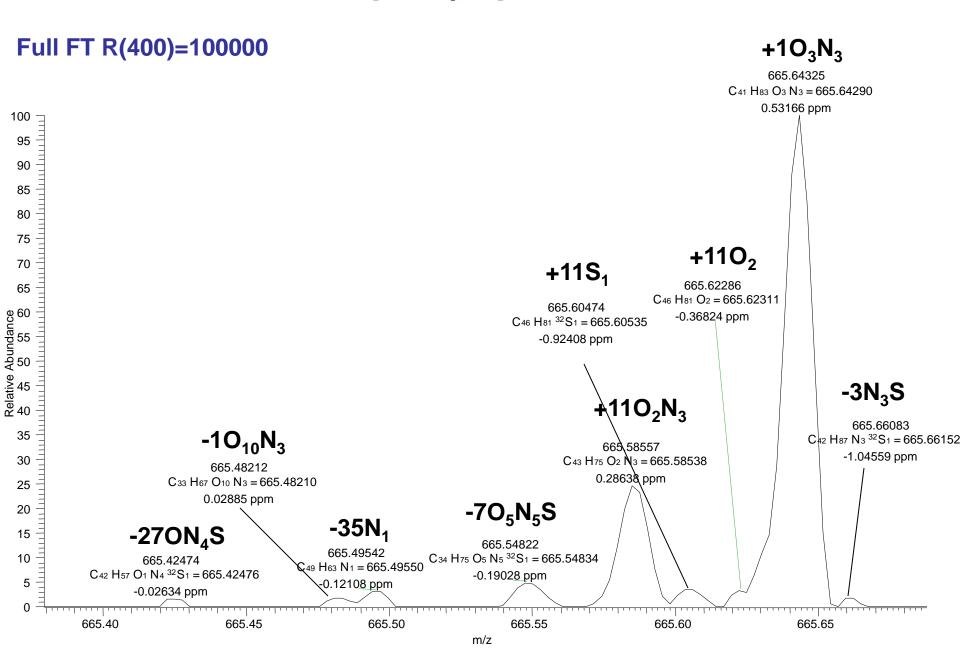
Сибирская нефть (положительные ионы)

Full FT R(400)=100000

More than 200 peaks in 1 Da range!!

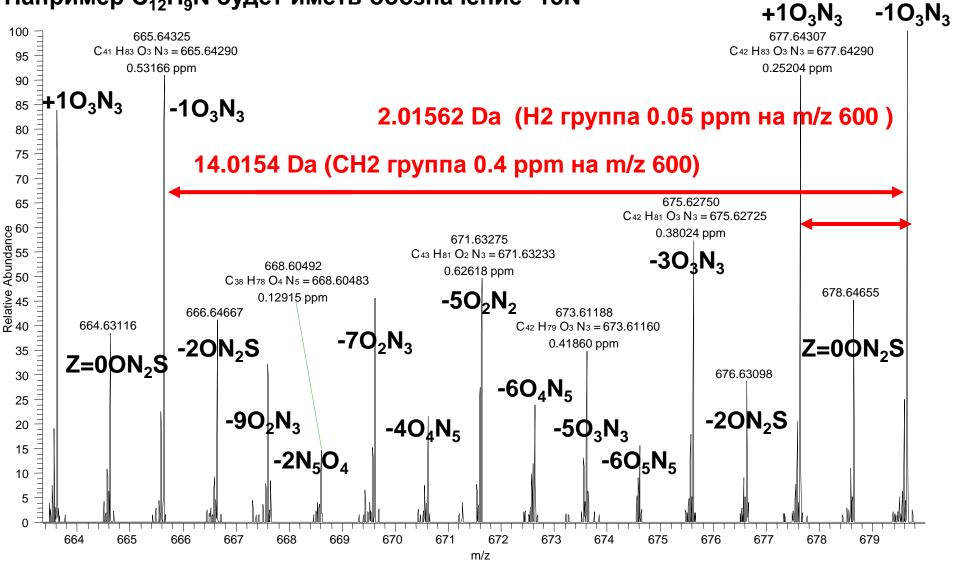


Камчатская нефть (отрицательные ионы)



Камчатская нефть (отрицательные ионы)

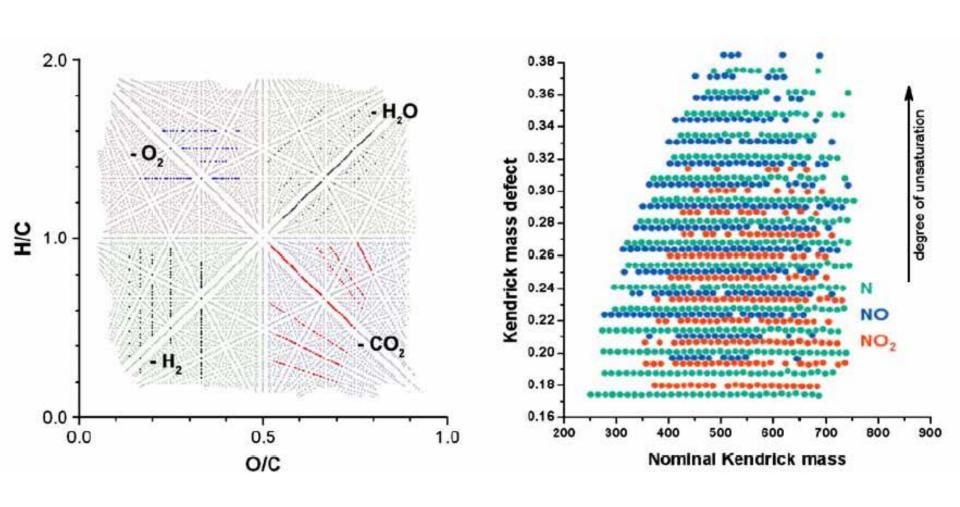
Состав Нефти обычно выражается формулой: $C_c H_{2c+z} X$, где Z – число характеризующее углеводороды (каждая 2й ная связь уменьшает z на 2) Например $C_{12}H_9N$ будет иметь обозначение -15N

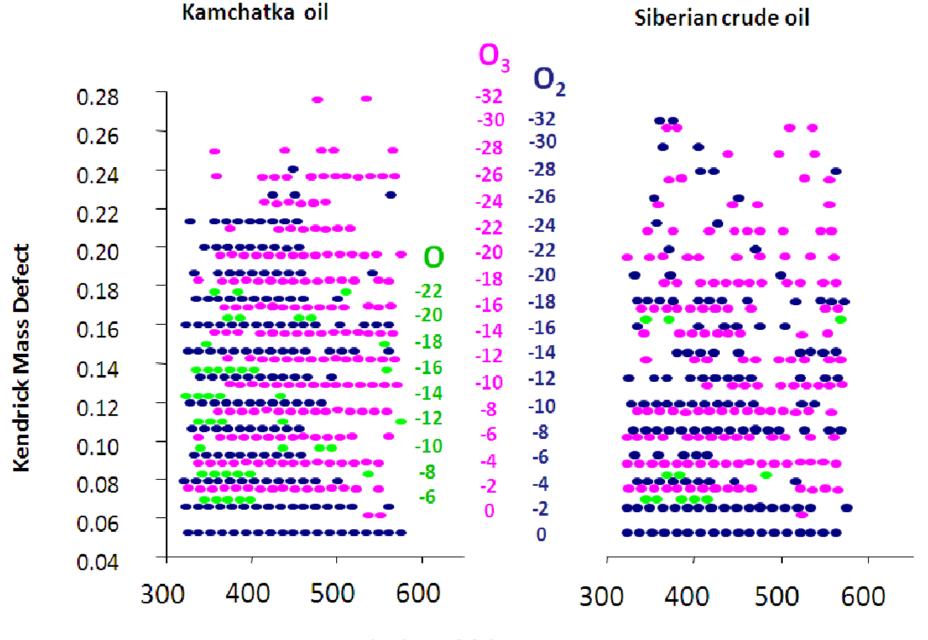


Диаграммы Ван Кревелена

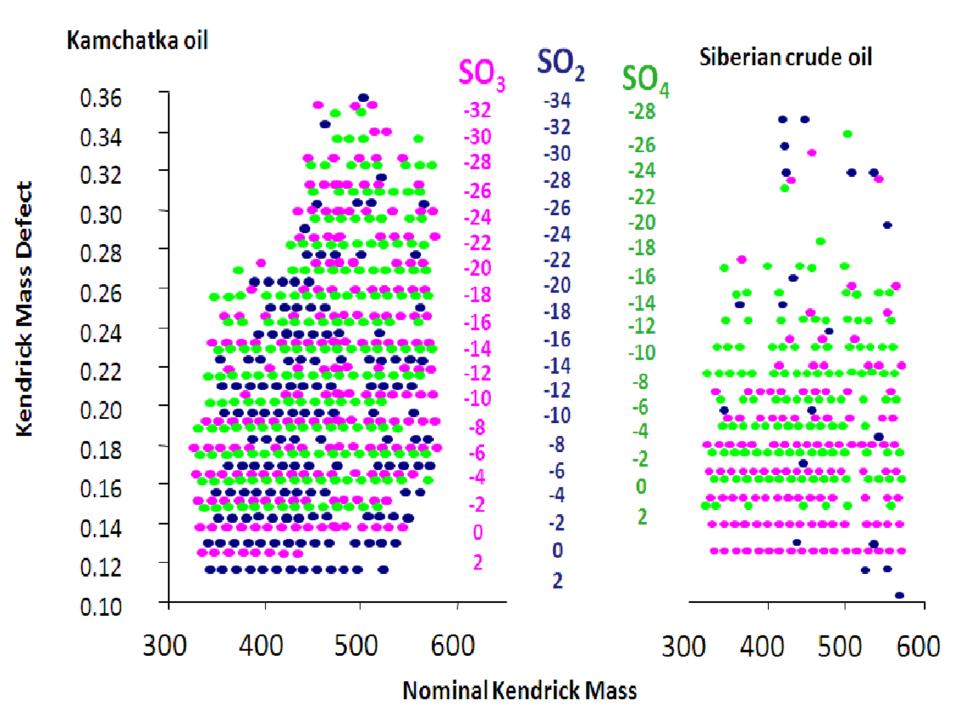
Диаграмма Кендрика

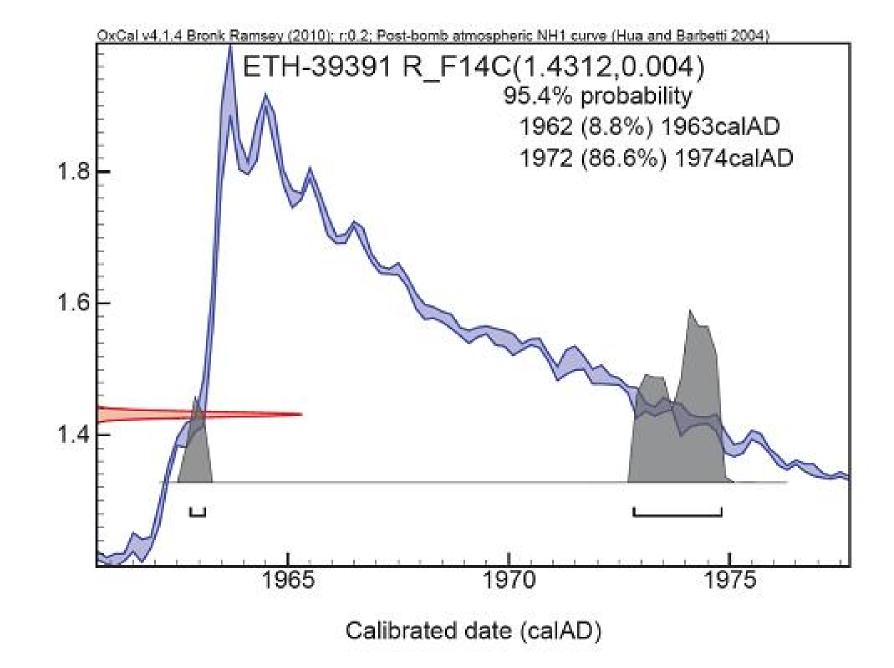
Macca
$$CH_2 = 14$$





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!