

Moderní nástroje v analýze biomolekul

Vojtěch Adam

21. 11. 2013

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Definice

- ✓ **Hmotnostní spektrometrie** (zkratka **MS** z anglického *Mass spectrometry*) je fyzikálně chemická metoda.
- ✓ Metoda umožňující určit molekulovou hmotnost chemických látek.
- ✓ Prvky a molekuly jsou charakterizovány svou hmotností a tou se vzájemně odlišují.
- ✓ Měříme pseudomolekulární ionty v plynné fázi (M^+ , $M+H^+$, $M+Na^+$, $M-H^-$, atd.).

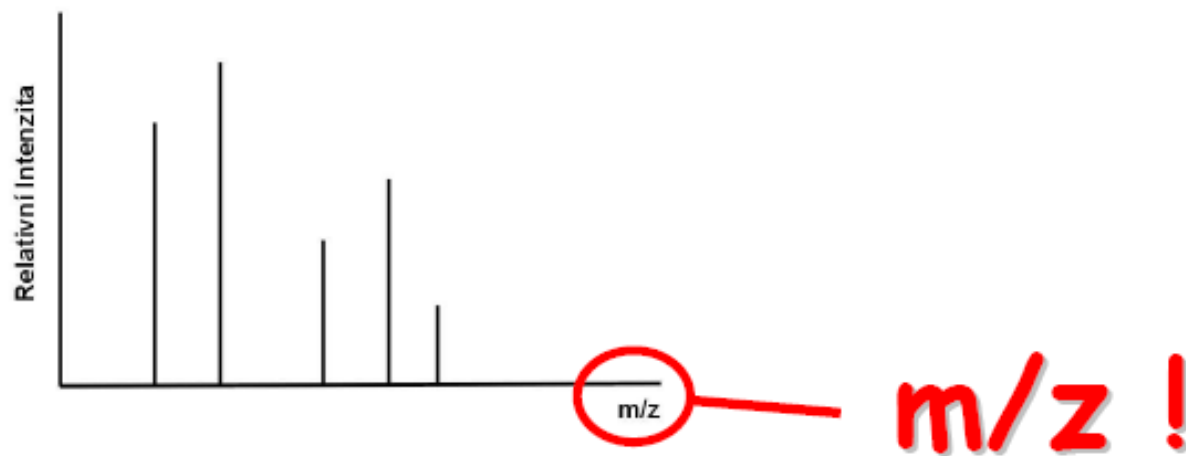
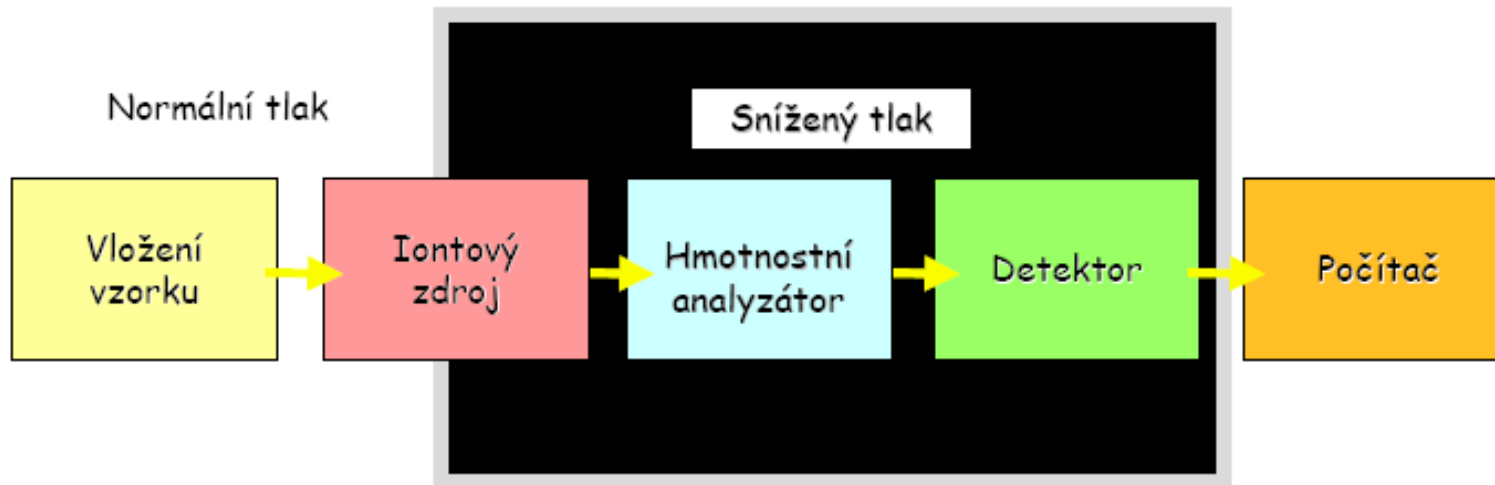
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Definice

- ✓ Hmotnostní spektrometr generuje ze vzorku ionty v plynné fázi, rozdělí je podle poměru hmoty a náboje (m/z) a zaznamená hmotnostní spektrum = grafické znázornění četnosti iontu na hodnotě m/z .
- ✓ Fragmentace iontu v hmotnostním spektrometru umožní získat strukturní informaci, která se využívá při:

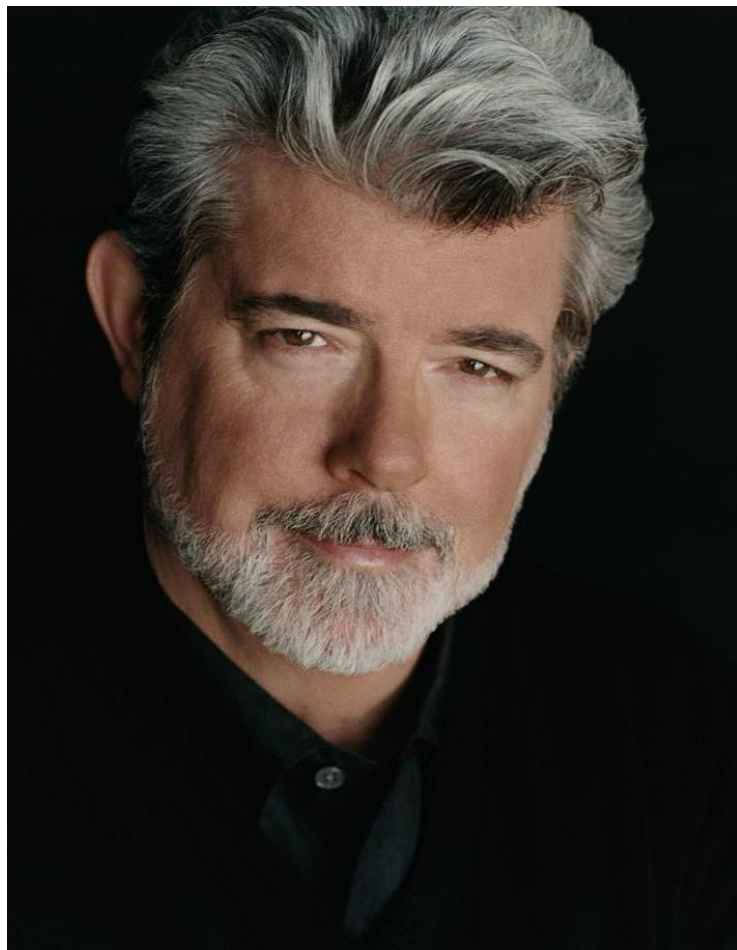
Identifikace látek

Určení struktury

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Definice



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Historie



George Lucas

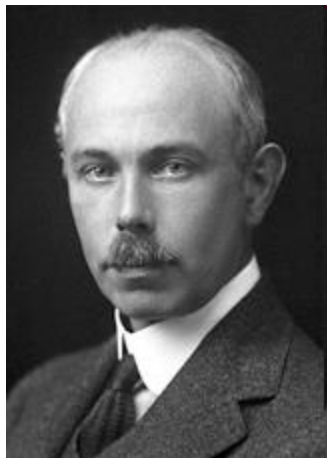
<http://www.starwarstoymuseum.com/lucas.html>



<http://www.mymovie-downloads.com/sci-fi/index.html>

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Historie

- ✓ První vědecká hmotnostně spektrometrická aparatura byla vyvinuta Francisem Williamem Astonem na začátku dvacátého století (Mass Spectrograph, *Phil. Mag.* 38, 209 (1919)).
- ✓ Aston využil hmotnostní spektrometrii pro studium izotopů, za což obdržel v roce 1922 Nobelovu cenu v oboru Chemie.



Francis William Aston





**Hmotnostní spektrometrie
je mrtva, vše je hotovo.**

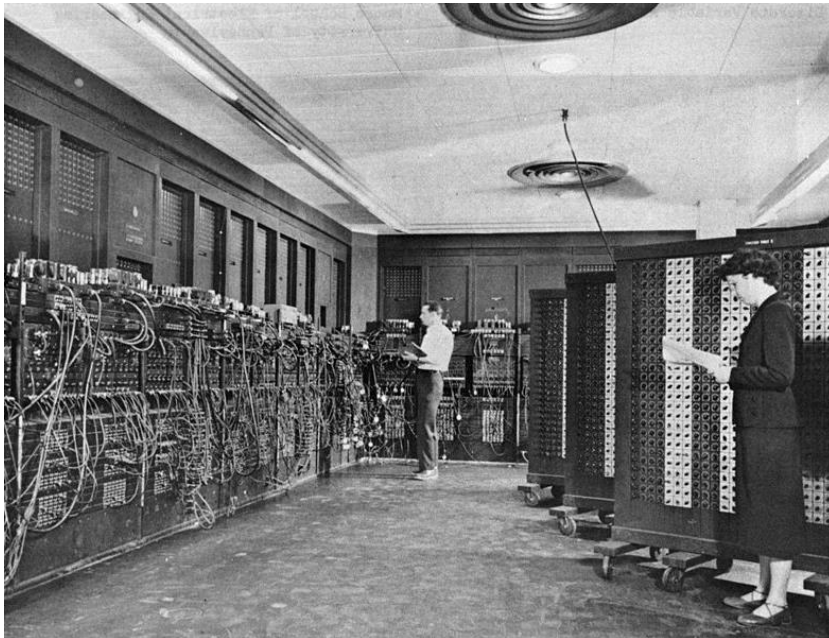
**Francis William Aston,
1934**



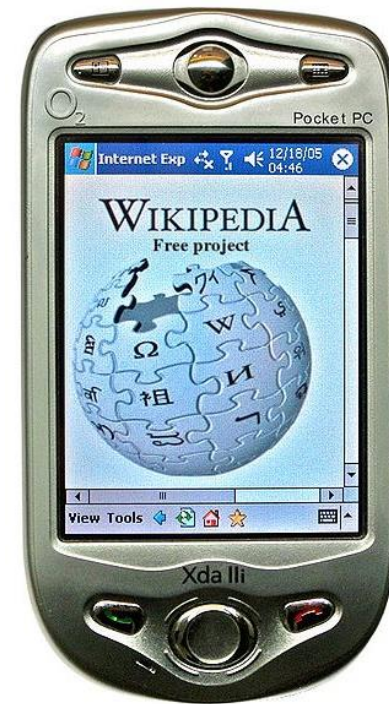
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Historie

- ✓ Hmotnostní spektrometrie pomalu vyvíjela směrem ke změnám v instrumentaci.
- ✓ 1940 – C. Berry vyvinul Elektronovou ionizaci (Electron Impact, EI).
- ✓ **1950 - 1960** – Hans Dehmelt a Wolfgang Paul vyvíjejí techniku zvanou Iontová past. Jejich výzkum doslova ztroskotal na nedostatečné technologii, díky které nebyli schopni realizovat své plány.
- ✓ 1950 - 1970 – Hmotnostní spektrometrie je používána v petrochemickém průmyslu pro analýzu kvality produktů rafinace ropy (velké finanční náklady).

70-80-tá léta – Rozvoj počítačů jde výrazným způsobem kupředu



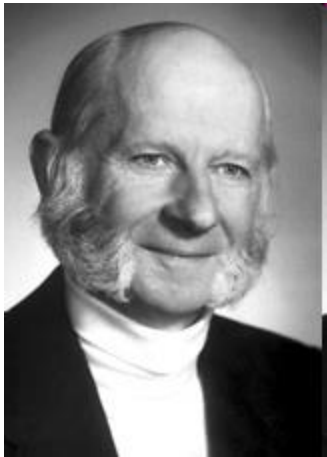
ENIAC, 1947-1955



O₂ XDA III PDA Phone, 2005

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Historie

✓ Hans Dehmelt a Wolfgang Paul získali v roce 1989 za objev techniky nazvané „Iontová past“ Nobelovu cenu v oboru Fyzika.



Hans Dehmelt a Wolfgang Paul

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Přesnost

- ✓ V roce 1988 John B. Fenn a Kiochi Tanaka nezávisle na sobě objevili tzv. měkkou desorpci/ionizaci biomolekul, za kterou byli v roce 2002 vyznamenáni Nobelovou cenou za Chemii.
- ✓ Franz Hillenkamp a Michael Karas vyvinuli v roce 1987 techniku zvanou Laserová desorpce za účasti matrice (angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization). Jejich objev zůstal „nepovšimnut“.



John B. Fenn a Kiochi Tanaka

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Izotopy

✓ Chemické prvky se vyskytují v přírodě jako směs **izotopů**. Izotop je označení pro nuklid v rámci souboru nuklidů jednoho prvku.

✓ Jádra atomů izotopů jednoho chemického prvku mají stejný počet protonů, ale mohou mít rozdílný počet neutronů. Mají tedy stejné atomové číslo a rozdílné hmotové číslo a atomovou hmotnost.

✓ Uhlík: 98,90 % ^{12}C
 1,10 % ^{13}C

Monoizotopická hmotnost 12,000000/13,003355

Průměrná hmotnost 12,011

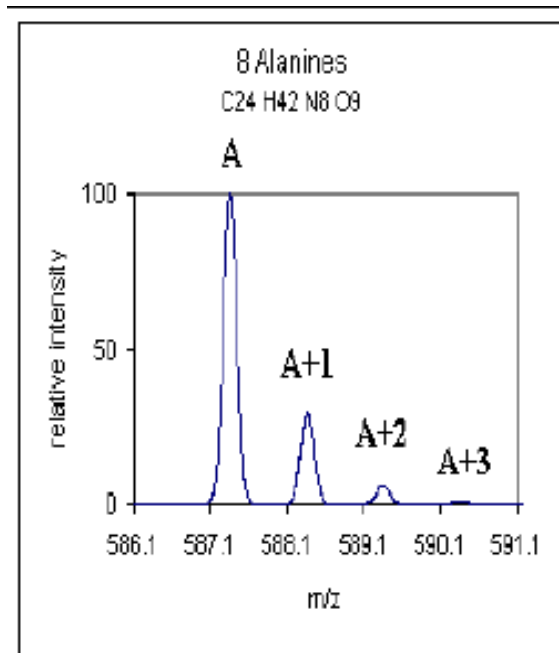
✓ Brom: 50,69 % ^{79}Br
 49,31 % ^{81}Br

Monoizotopická hmotnost 78.918/80.916

Průměrná hmotnost 79.904

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – Izotopy

Přítomnost izotopů (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ...) se projeví na tvaru píku.



Unikátní vlastnosti hmotnostní spektrometrie

Specifita

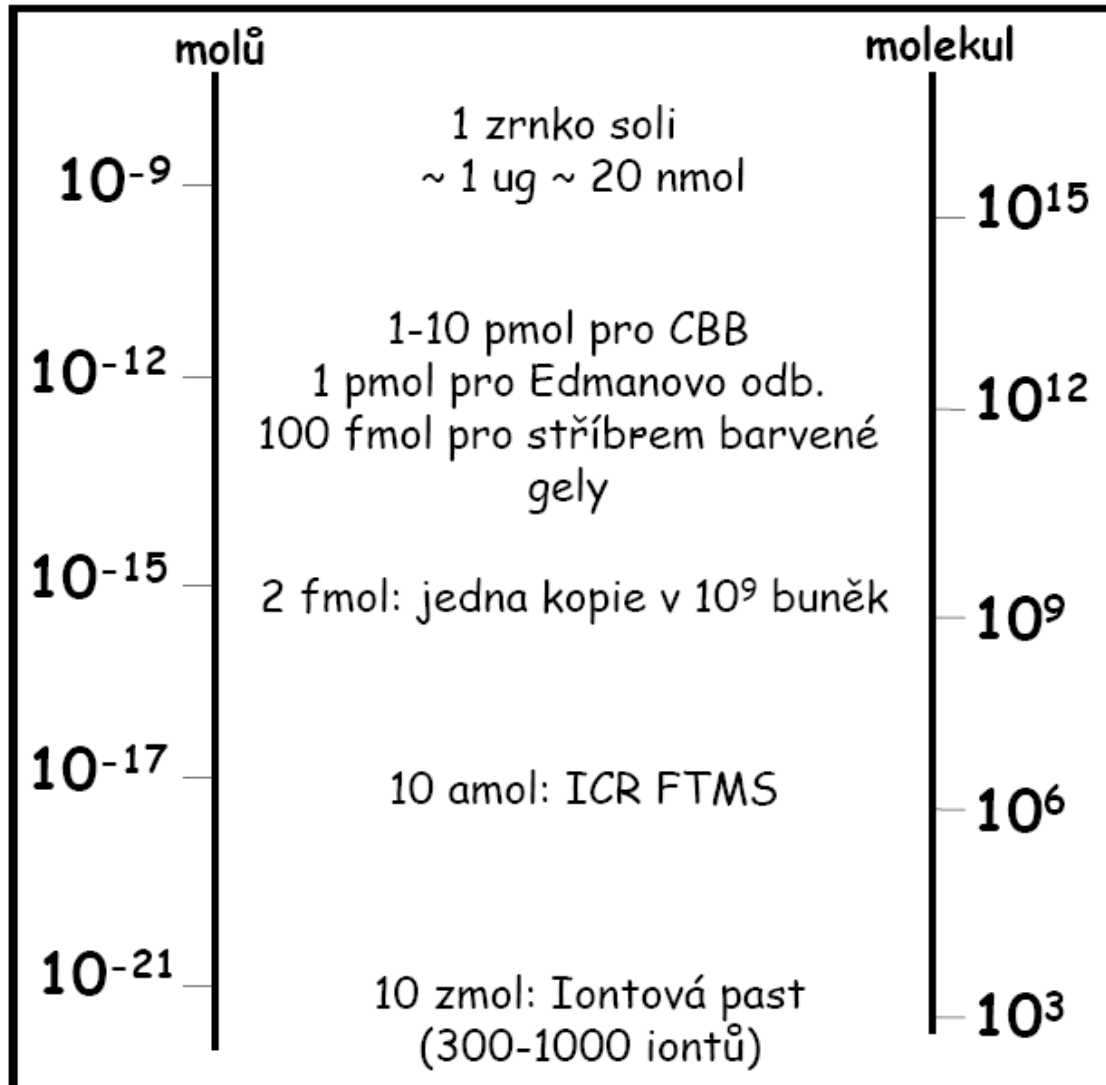
Rychlost

Citlivost

Jednoduchá interpretace dat

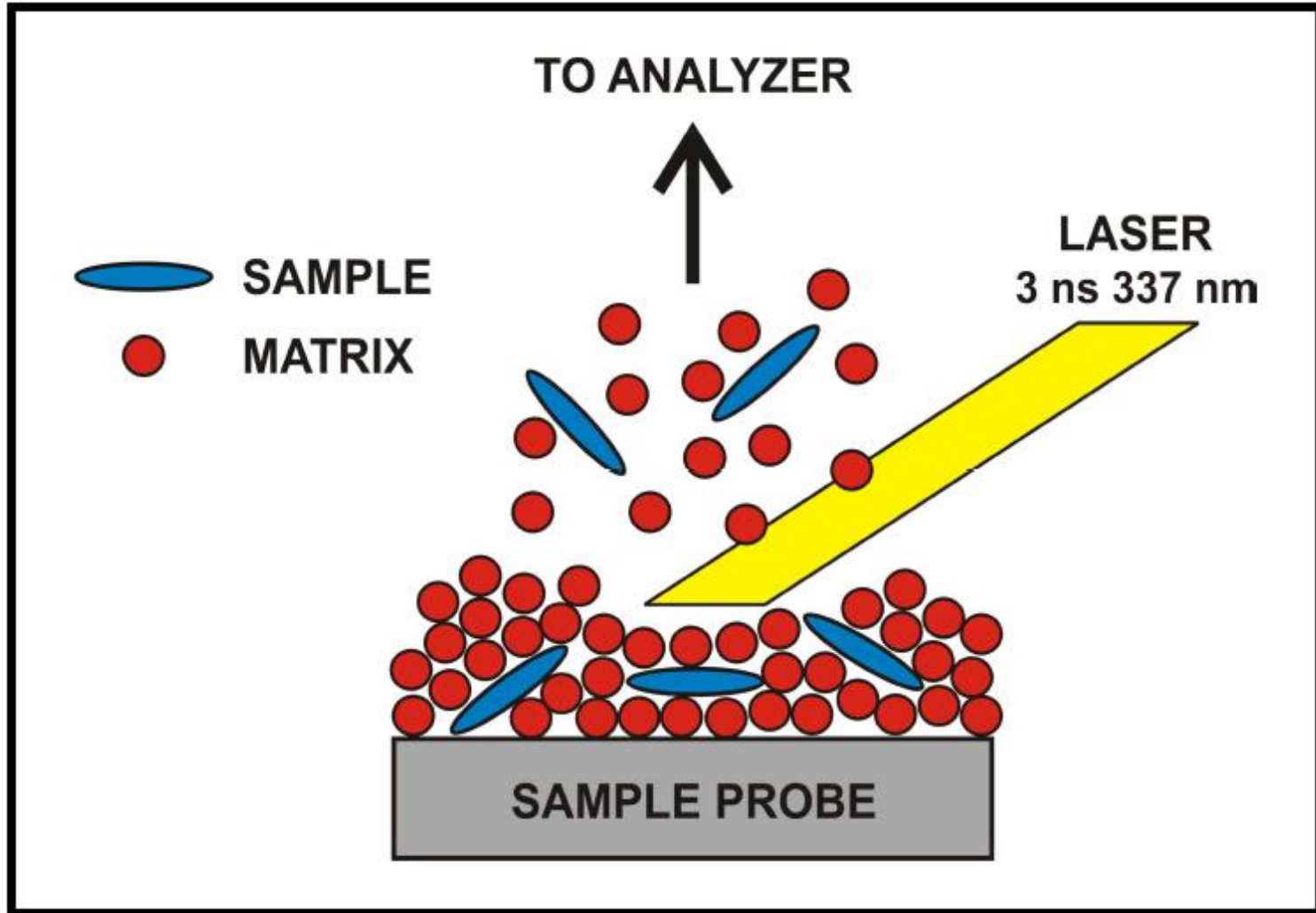
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Čísla k zapamatování
(1 mol $\sim 6.023 \times 10^{23}$ molekul)



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MALDI ionizační proces

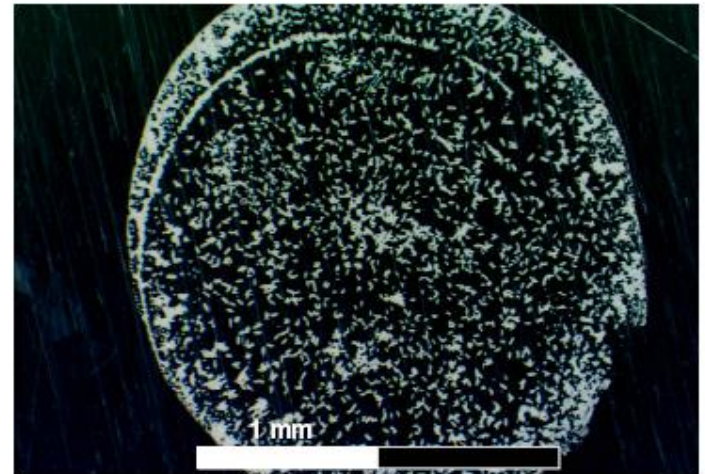


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MALDI ionizační proces



MALDI destička



**krystaly matrice
a vzorku**

MALDI ionizační proces

MALDI matrice

silná absorpce vlnové délky laseru

ϵ (matrice) \gg ϵ (analytu)

stabilita ve vakuu, netěkavá

přenos protonu (na analyt / z analytu) \Rightarrow ionizace
mísitelná se vzorkem v tuhé fázi

vzorek : matrice = 1 : 10^4 - 10^5

solventy : MeOH, EtOH, MeCN, H₂O, THF, aceton ...

UV-MALDI

337 nm dusíkový laser

355 nm Nd:YAG

266 nm Nd:YAG

solid state 1-200 Hz

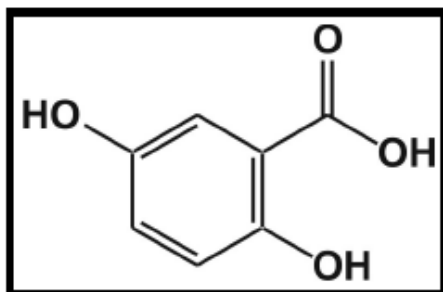
IR-MALDI

2.94 μ m Er:YAG laser

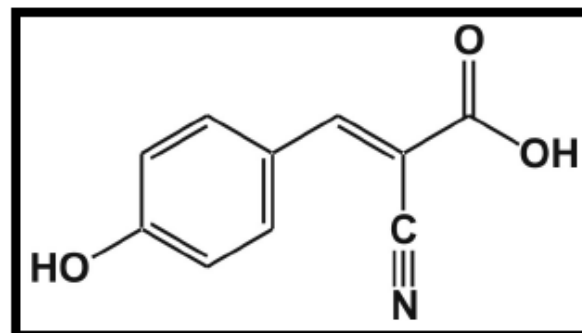
10.6 μ m CO₂ laser

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

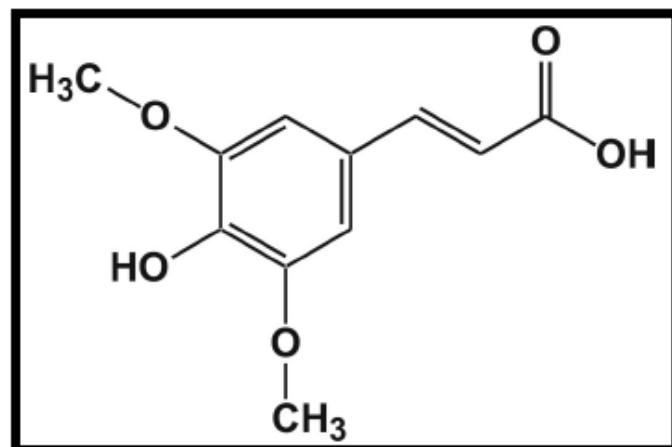
MALDI matrice



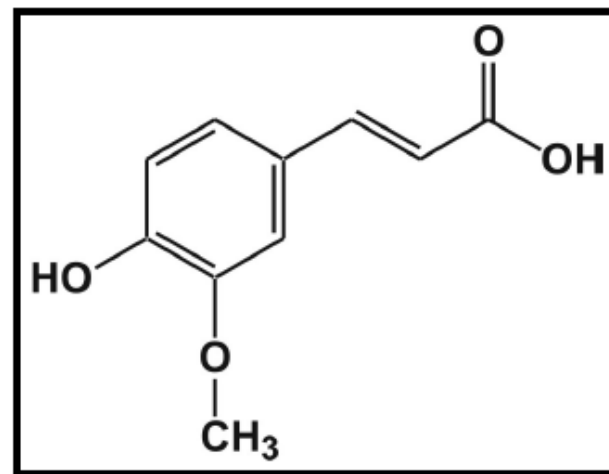
kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)



kys. α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)



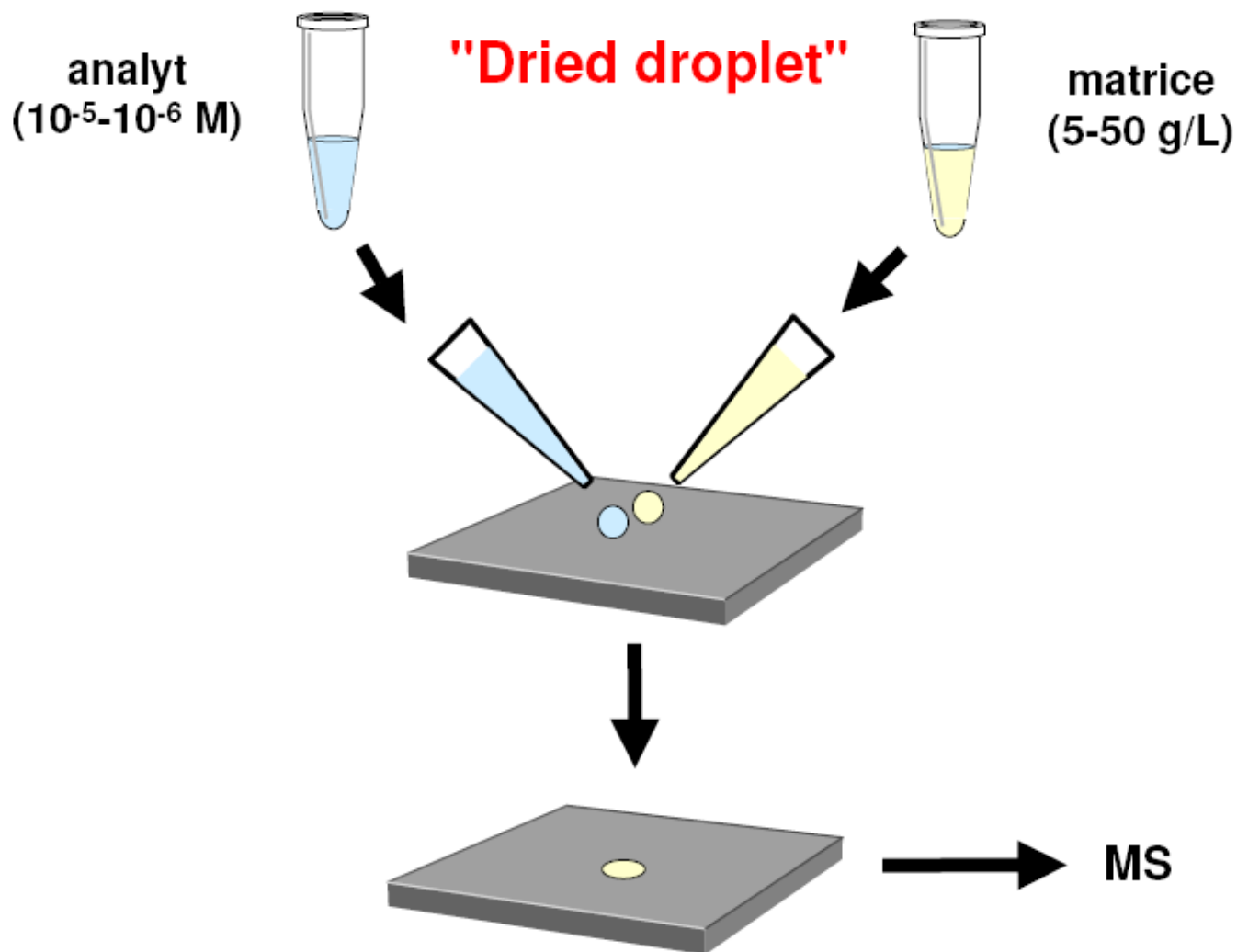
kys. sinapová (SA)
(kys. 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová)



kys. ferulová (FA)
(kys. 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)

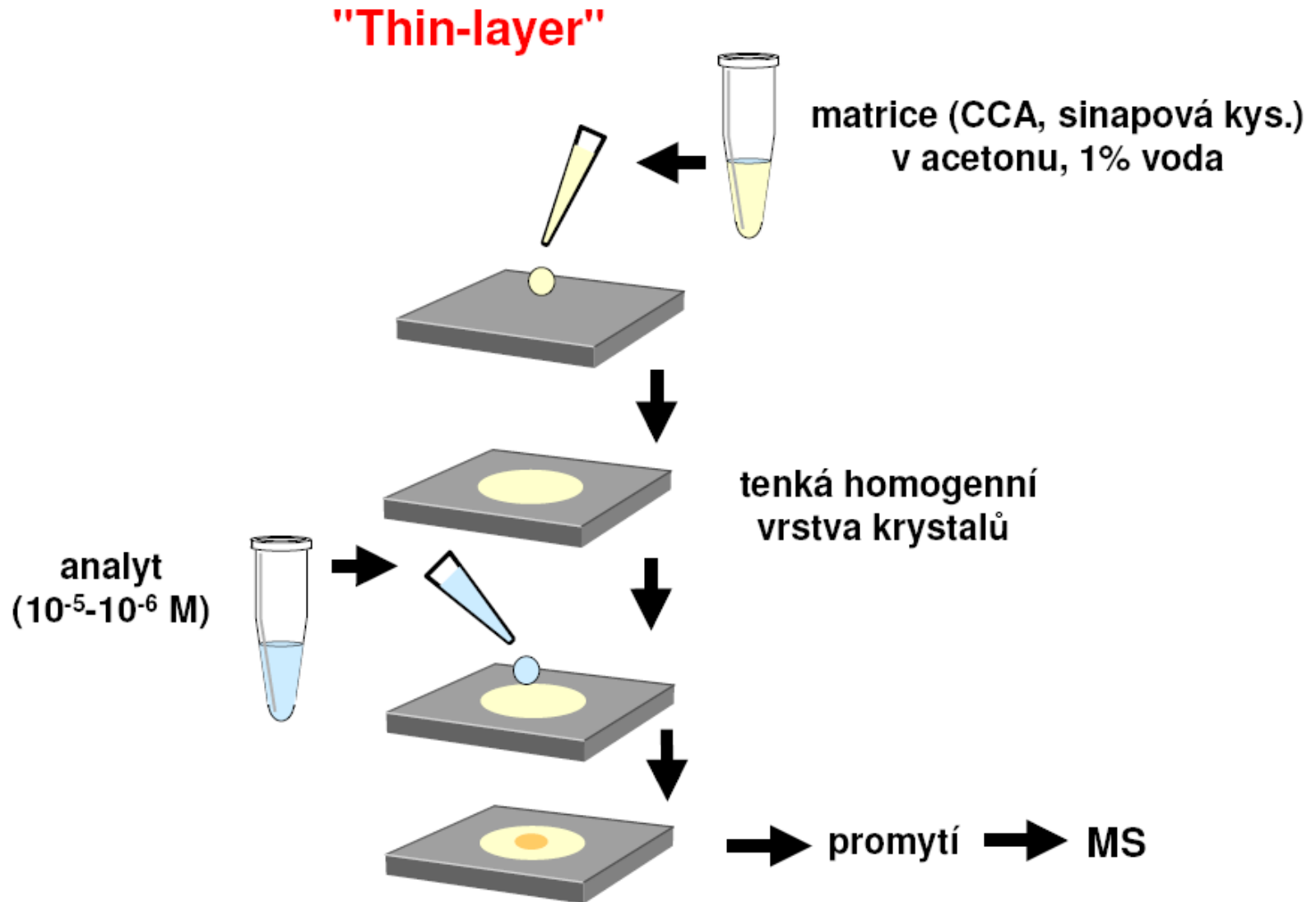
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Nanesení vzorku na MALDI destičku



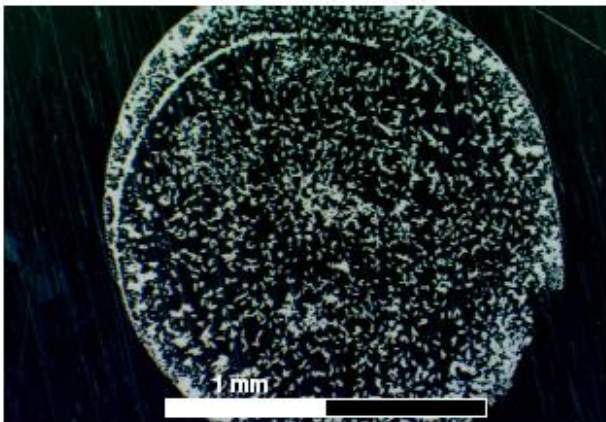
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Nanesení vzorku na MALDI destičku

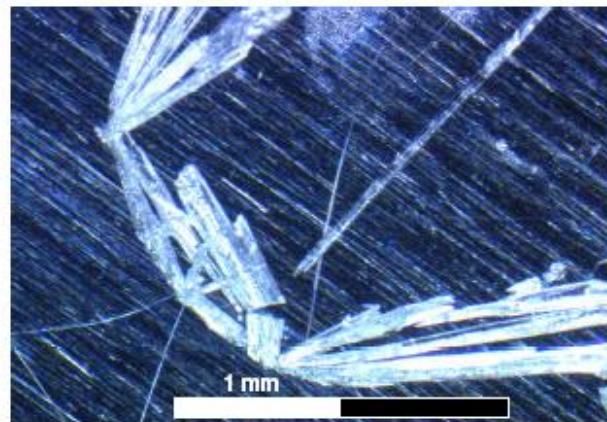


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

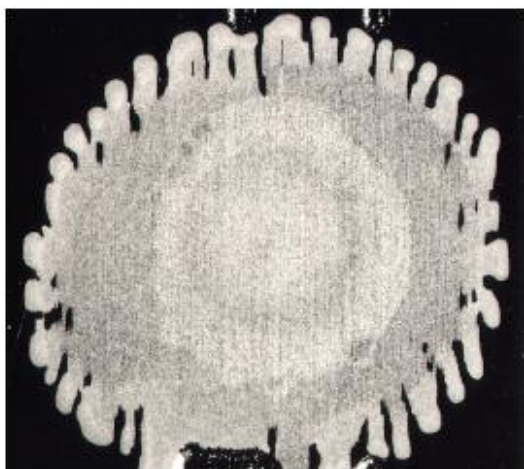
MALDI matrice



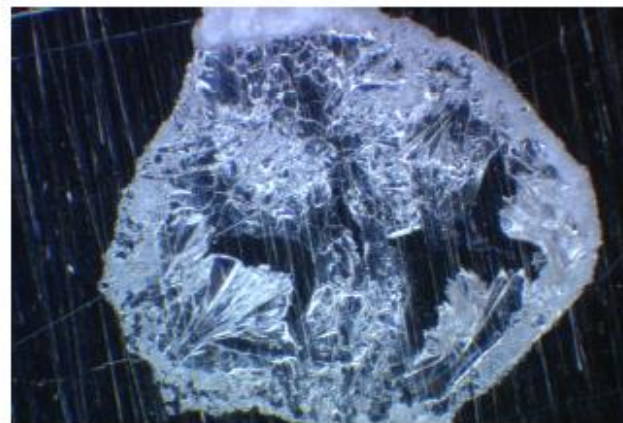
CCA - dried droplet



DHB - dried droplet



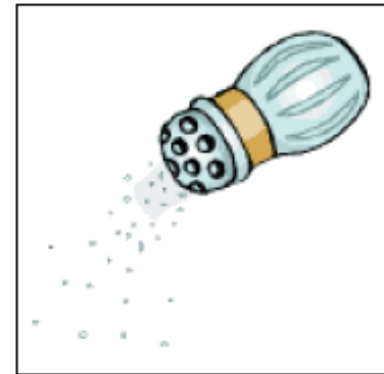
CCA - thin layer



DHB - dried droplet
špatná příprava

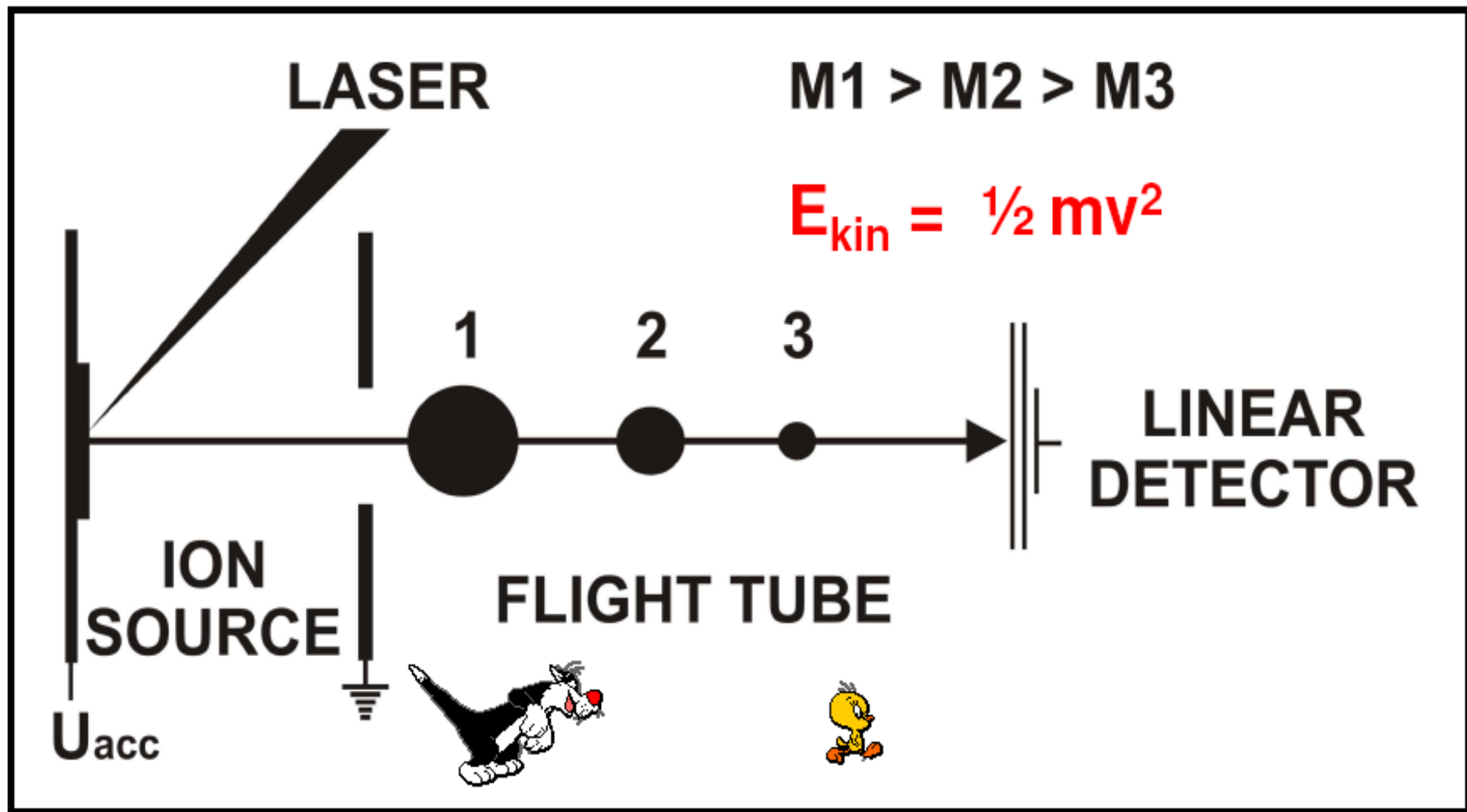
MALDI ionizační proces

- Měkká ionizace
- Malá nebo žádná fragmentace, jednoduchá interpretace
- Jednonásobně nabitě ionty $[M+H]^+$; $[M-H]^-$
- Analýza komplexních směsí
- Rychlá a jednoduchá příprava a analýza
- Proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy
syntetické polymery ...
- Tolerantní k detergentům, solím... **ALE...**
- Krátké laserové pulsy; $t \sim ns$
- Spojeno s TOF analyzátořem



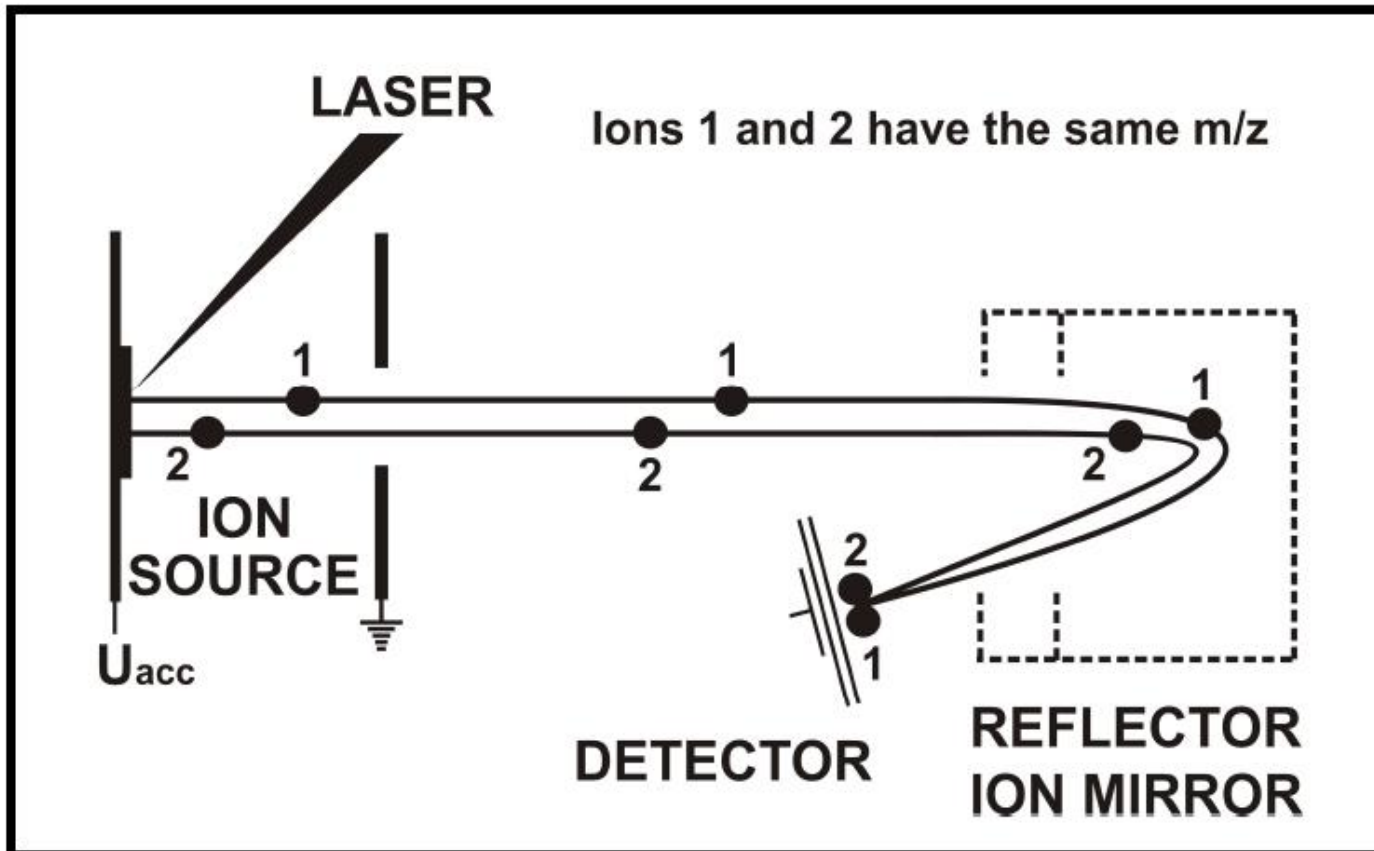
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Lineární Time Of Flight (TOF) analyzátor



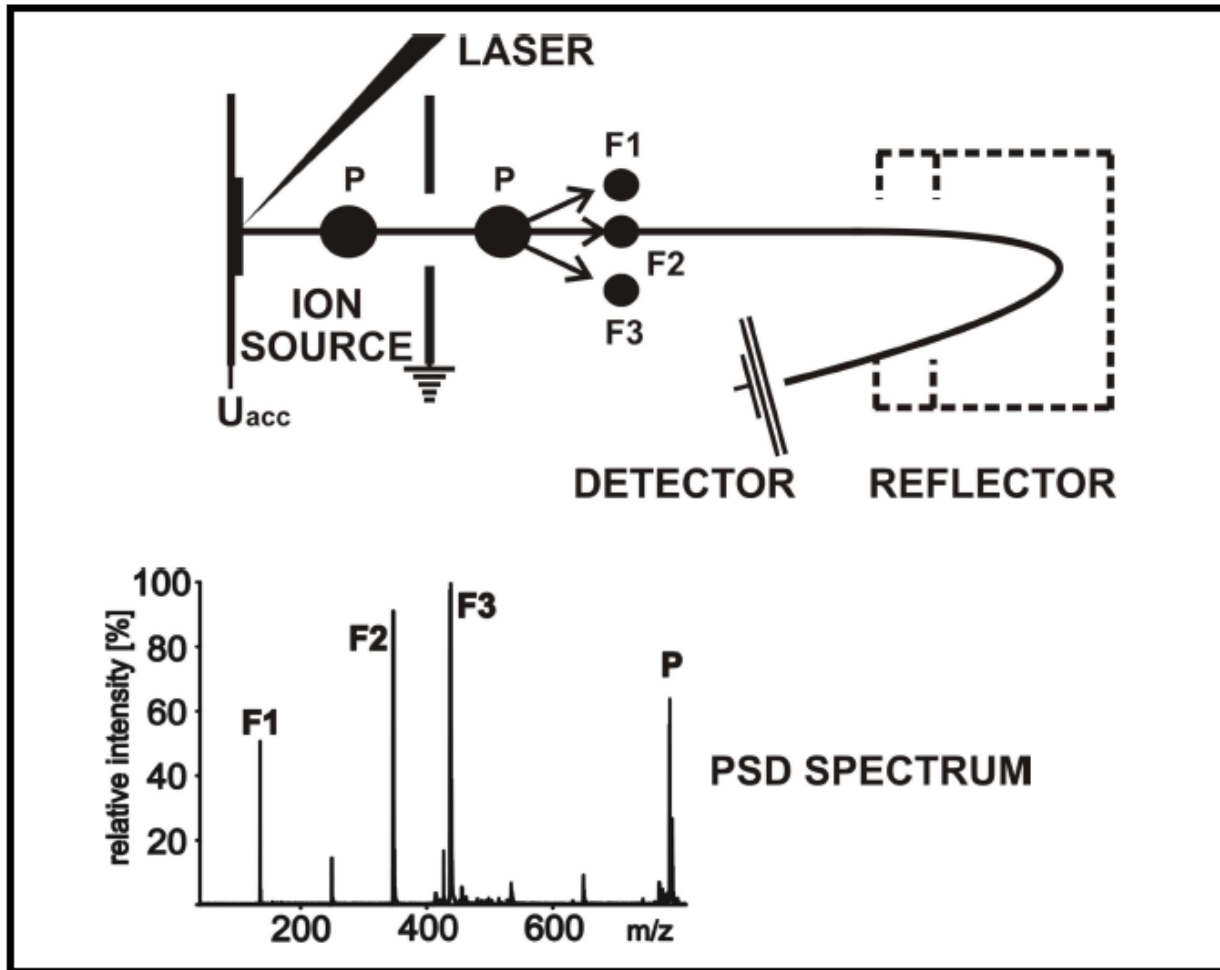
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Time Of Flight (TOF) Analyzátor s reflektroem



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

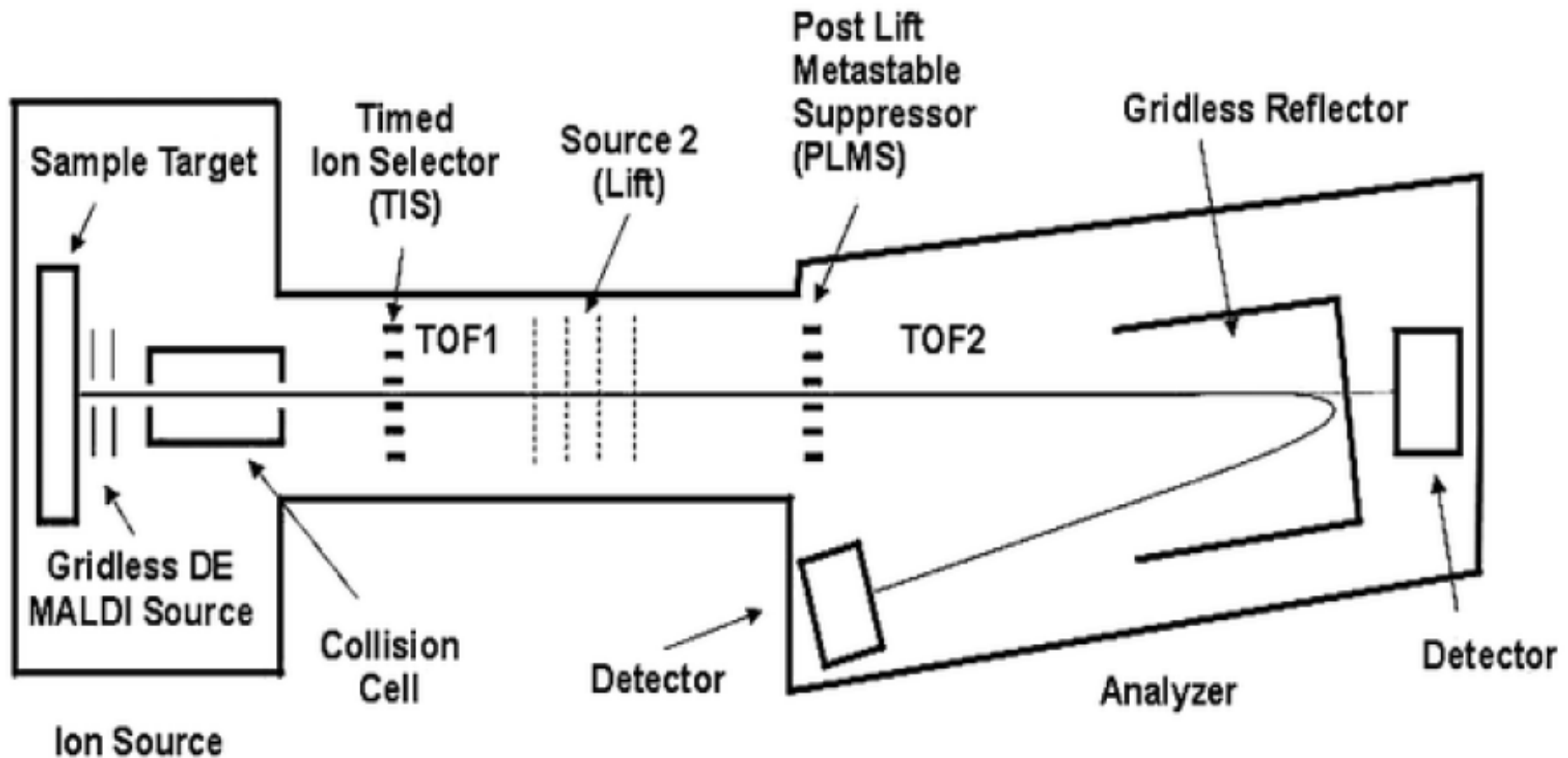
Post-Source Decay (PSD)



získání PSD spektra - postupné snižování U reflektoru
záznam segmentů \Rightarrow velmi pracné a zdlouhavé

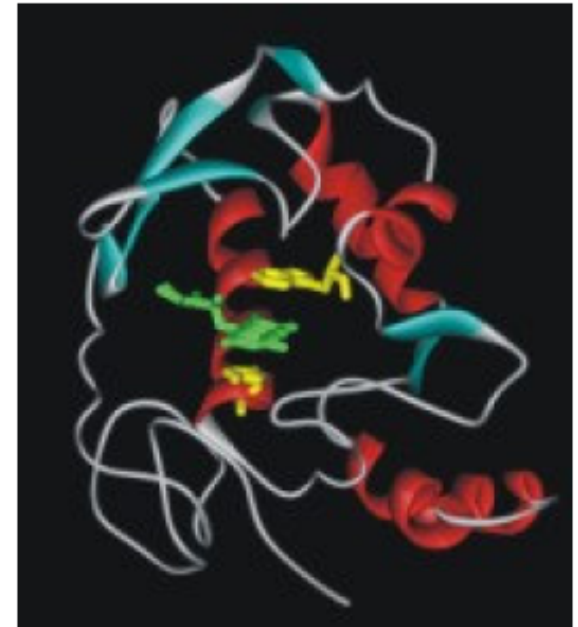
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

TOF/TOF - LIFT metoda



Hmotnostní spektrometrie v analýze biomolekul

- Kontrola kvality/čistoty
- Určení MW
- Identifikace
- Sekvenování
- Charakterizace modifikací
- Studium nekovalentních komplexů
- Analýza směsí
- Relativní/absolutní kvantifikace
- Studium 3D struktury s nízkým rozlišením

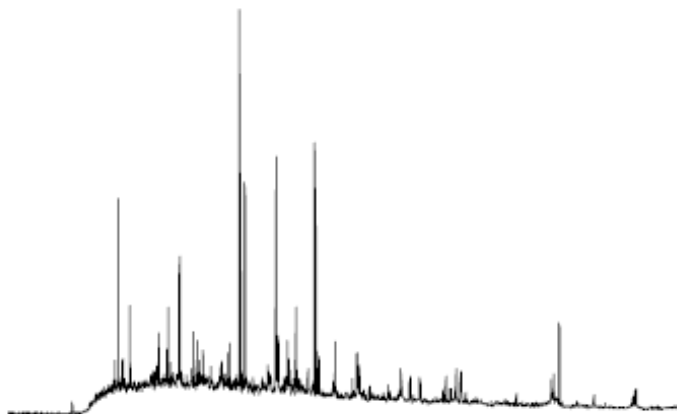


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Identifikace proteinů



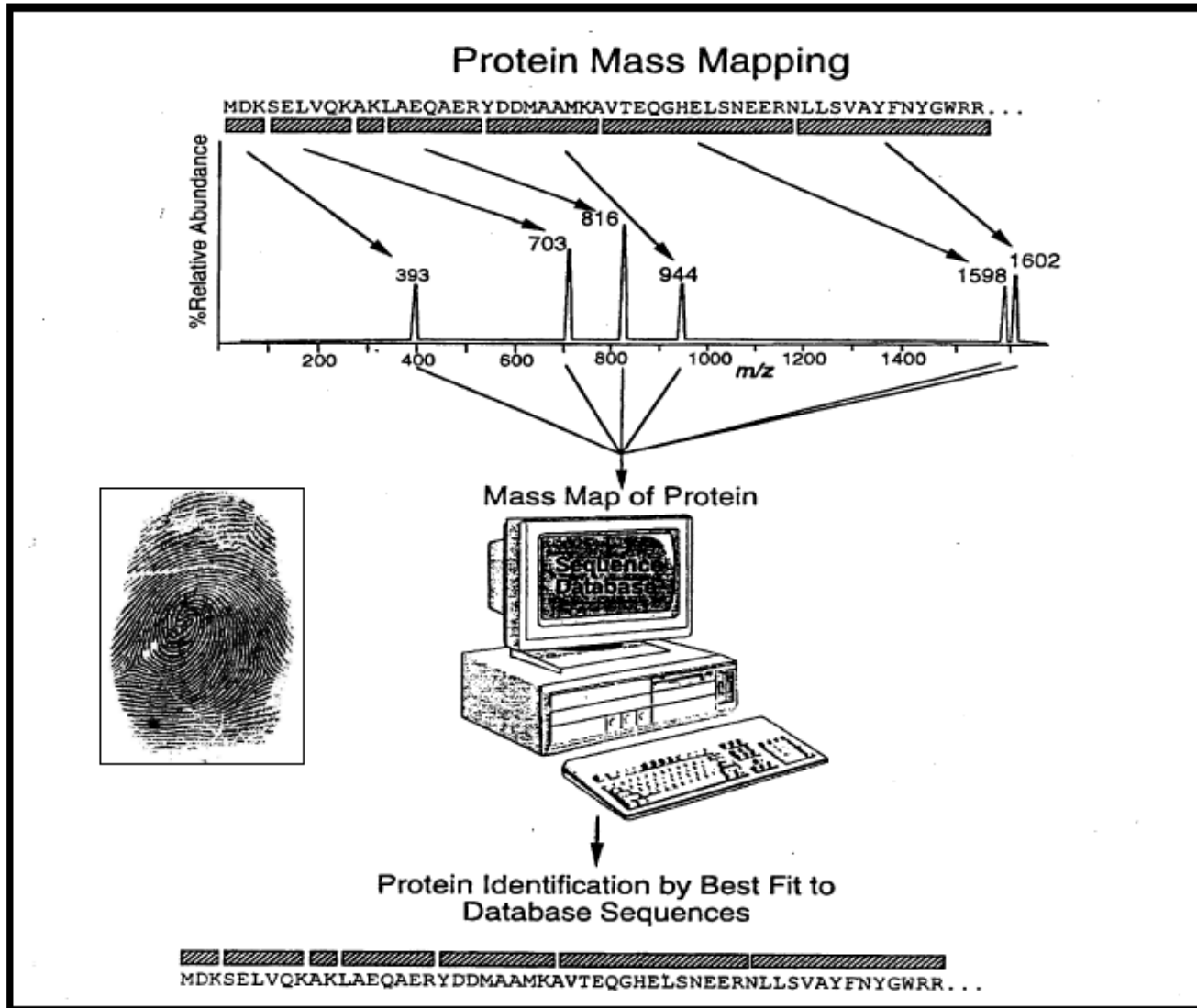
= otisk prstu člověka
"fingerprint"



= fingerprint proteinu/ů

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Identifikace proteinu - princip



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE



Štěpení proteinů

• Trypsin	K/R-	\-P
• Chymotrypsin	Y/W/K/F-	\-P
• AspN	-D	
• GluC	E-, E/D-	\-P
• ArgC	R-	\-P
• LysC	K-	\-P
• CNBr	M-	

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

ProFound - Search Result Summary

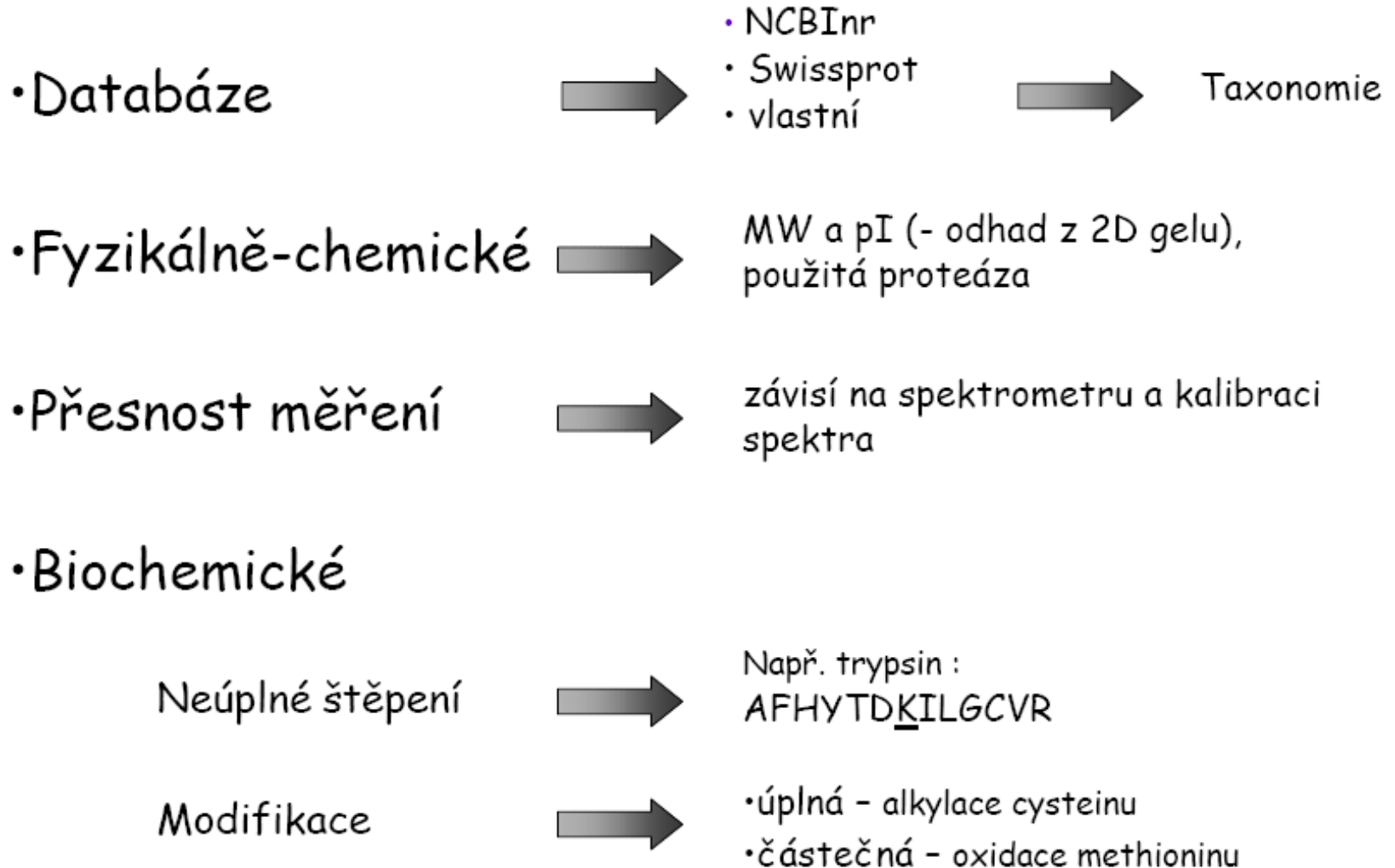
Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search BAD9361D-058C-666CD112 [1473572 sequences searched]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	®
1	1.0e+000	1.55	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 6225128 sp P94798 CH60_FRATU 60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	<u>37</u>	5.0	57.53	
2	1.4e-004	0.29	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 9229904 dbj BAB00625.1 cdc45 [Ciona intestinalis]	<u>12</u>	5.5	66.29	
3	4.2e-007	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 27676754 ref XP_228318.1 similar to autophagy 5-like (S. cerevisiae); autophagy 5-like [Mus musculus] [Rattus norvegicus]	<u>18</u>	9.9	55.54	
4	3.6e-007	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 15599716 ref NP_253210.1 probable chemotaxis transducer [Pseudomonas aeruginosa PA01]	<u>11</u>	5.1	72.35	
5	9.3e-008	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 25989105 gb AAG01897.1 hyaluronan binding protein [Homo sapiens]	<u>12</u>	4.4	56.32	
6	3.2e-008	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 15643365 ref NP_228409.1 hypothetical protein [Thermotoga maritima]	<u>17</u>	5.2	62.09	
7	1.9e-008	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 15669827 ref NP_248641.1 glycogen phosphorylase (glgP) [Methanococcus jannaschii]	<u>16</u>	7.3	61.02	
8	7.0e-009	-	T_gi 23272966 gb AAH37127.1 Atp5b protein [Mus musculus]	<u>41</u>	5.2	56.65	®
			T_gi 29367646 gb AAO72667.1 centromere protein-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	<u>21</u>	5.2	59.28	

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Parametry ovlivňující ID proteinu



Identifikace proteinu

Protein na gelu nebo v roztoku



Štěpení proteinu



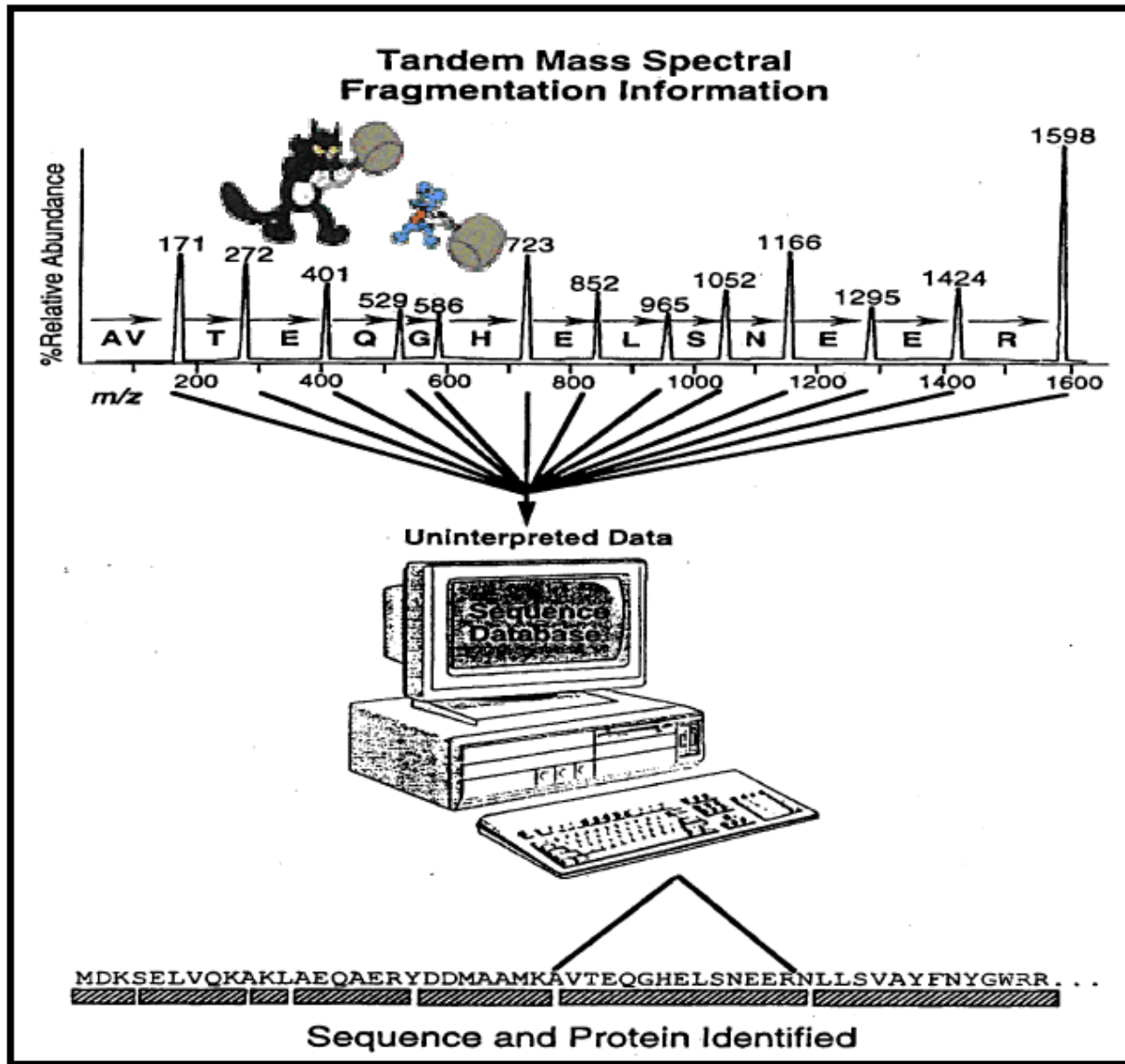
Bez výsledku

Peptidové mikrosekvenování
(PSD, MS/MS)

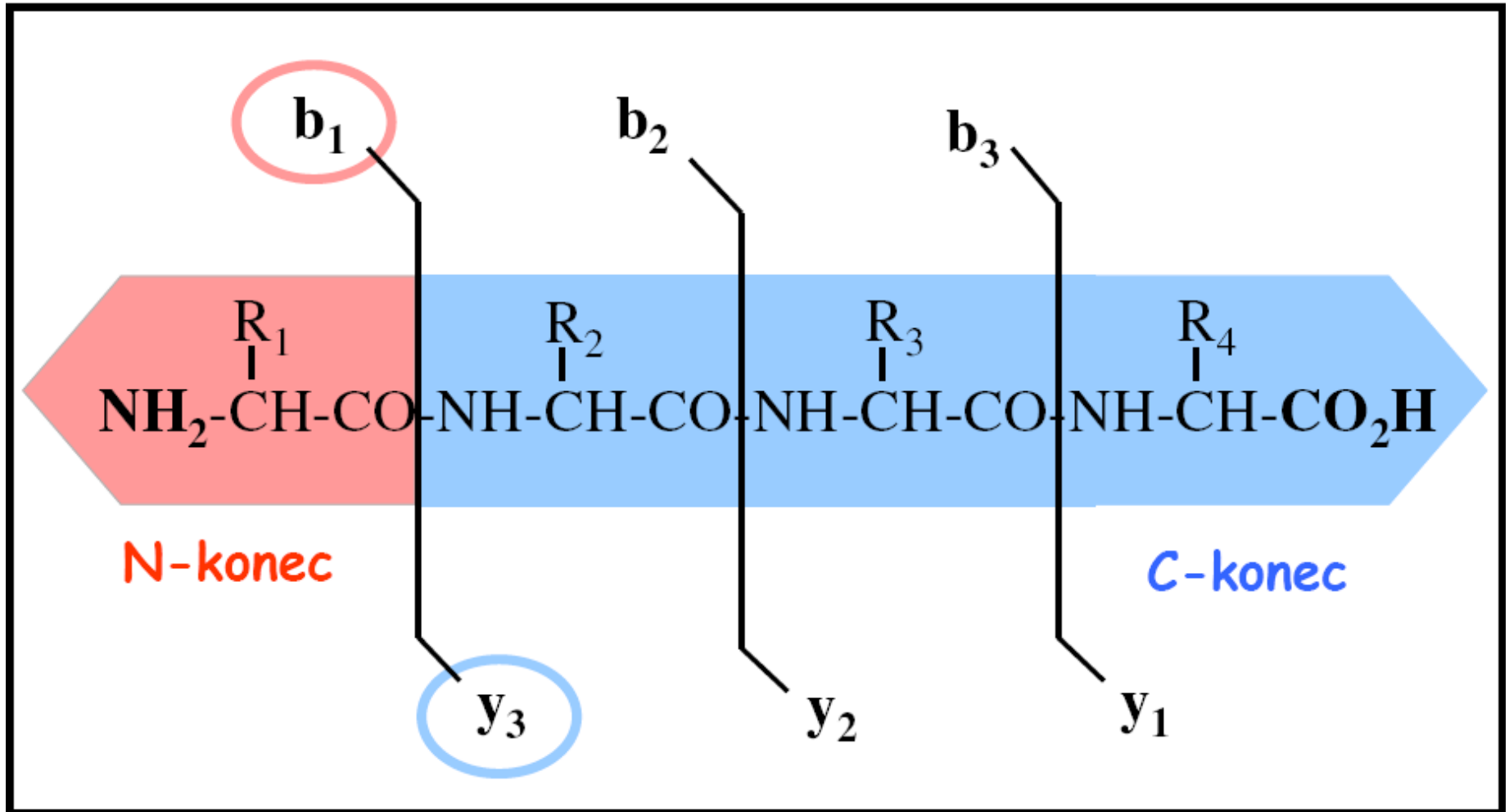


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Peptidové sekvenování



Fragmentace peptidu



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Fragmentace peptidu

S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K $MH^+ = 1410.6$

<u>b-ions⁺</u>		<u>y-ions⁺</u>
88.1	S ————— PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP ————— AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA ————— FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF ————— DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD ————— SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS ————— IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI ————— MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM ————— AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA ————— ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE ————— TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET ————— LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL ————— K	147.2

Bottom up vs. Top down



identifikace proteinů



- Štěpení proteinu/směsi
- MS, MS/MS (na úrovni peptidů)
- LC-MS(/MS)
- DTB prohledávání na bázi PMF, MS/MS
- Pre-frafracionace
- Purifikace v plynné fázi
- Určení přesné MW
- MS/MS proteinu
- DTB prohledávání pomocí MW proteinu a sekvenčního „tagu“
- Zachována informace o PTM
- Vyžaduje FT-ICR MS

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Čichám
Čichám
PTMs



PostTranslační Modifikace změna MW

- Disulfidické můstky (Cys-Cys)
- Glykosylace
- Fosforylace
- Acylace
- Oxidace
- Acetylace
- Zkrácení proteinu
- Ztráta N-konc. Met
- Glu -> pyro-Glu

Miniaturizace

Klinické aplikace

„Mass spec never lies“

Děkuji Vám za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu