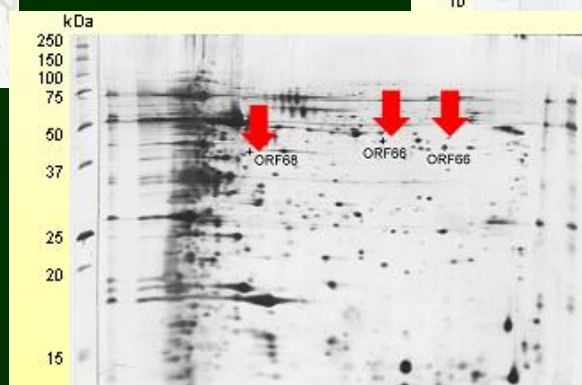
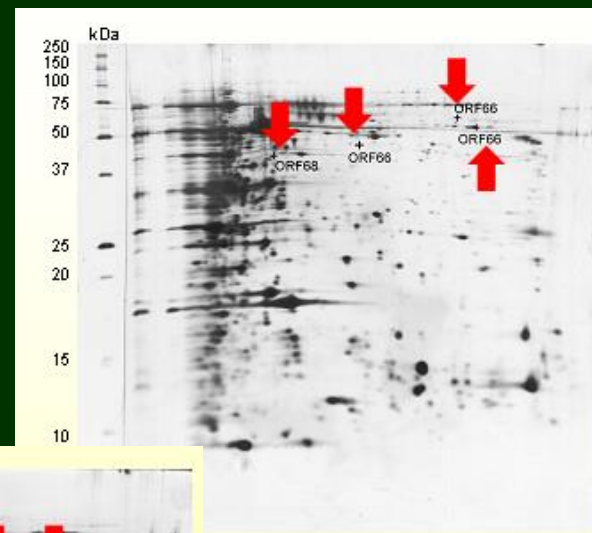
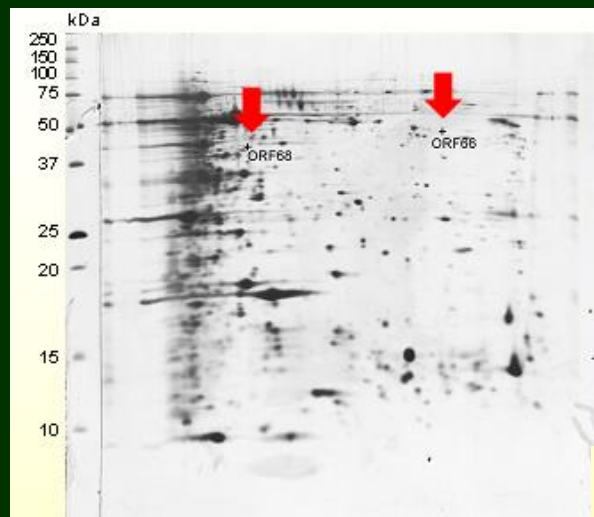


# Téma 08\_Elektroforéza proteinů a western blot



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU



NÁRODNÍ  
PLÁN OBNOVY

MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

# Elektroforéza

Dělení nabitých částic na základě rozdílných mobilit

**Volná**

**Separace probíhá  
volně v elektrolytu**

**Zónová**

**Stabilizující prostředí**

- rotace
- gradienty hustoty
- porézní médium
- kapilára

# Porézní média

homogenita

inertnost

reprodukovatelnost

snadná příprava

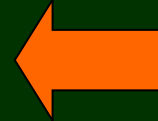
mechanická pevnost

transparentnost

# Porézní média

chromatografický papír

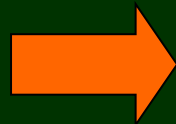
agar, agaróza



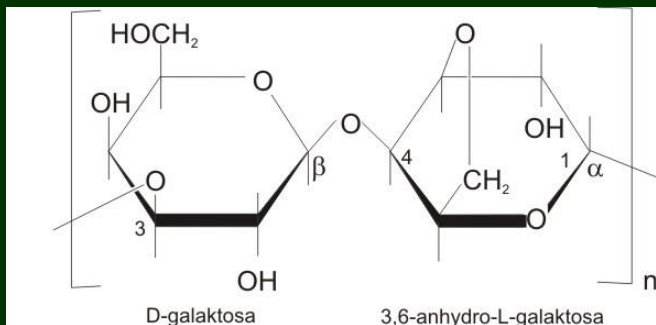
acetát celulózy

škrob (hydrolyzovaný)

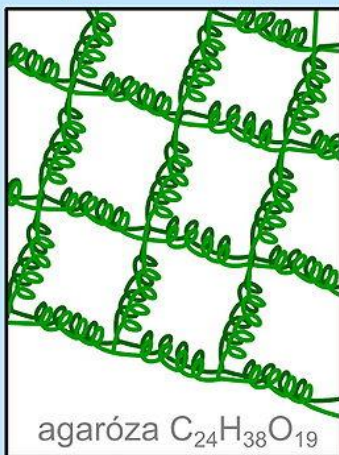
sypané (nalévané) vrstvy (Sephadex)



polyakrylamid

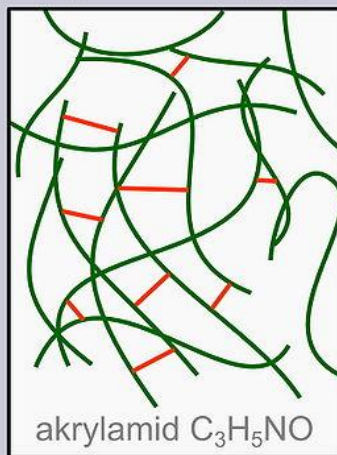


### agarózový gel

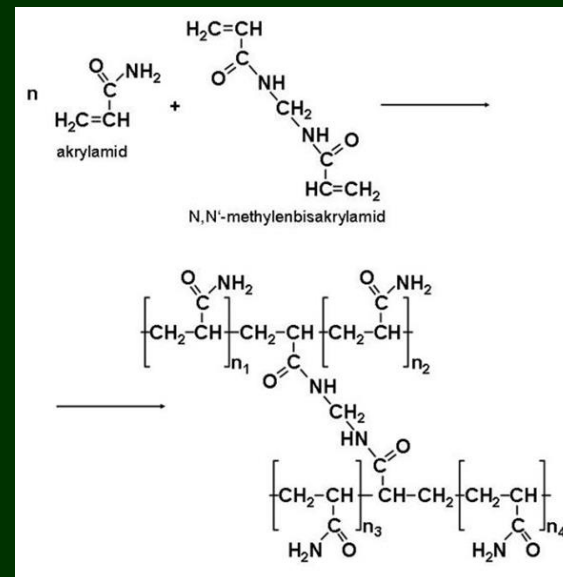


Agarózový gel tvoří **nekovalentní** vodíkové můstky a hydrofóbní vazby mezi dlouhými cukernými řetězci.

### akrylamidový gel



Akrylamidový gel tvoří kovalentní **příčné** vazby mezi dlouhými řetězci.



# Polyakrylamid

kopolymer akrylamidu a N,N-bisakrylamidu

polymerace katalyzovaná TEMED

iniciátor persíran amonný

síťovaný gel

**!!!! monomery jsou silné neurotoxiny !!!!**

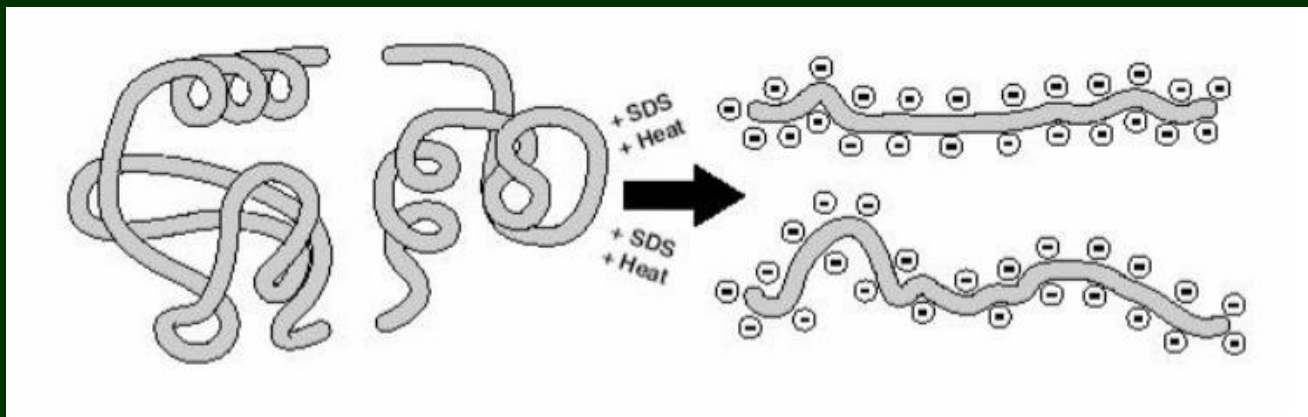
# Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

trubicová x desková x kapilární

homogenní x gradientová

# Denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

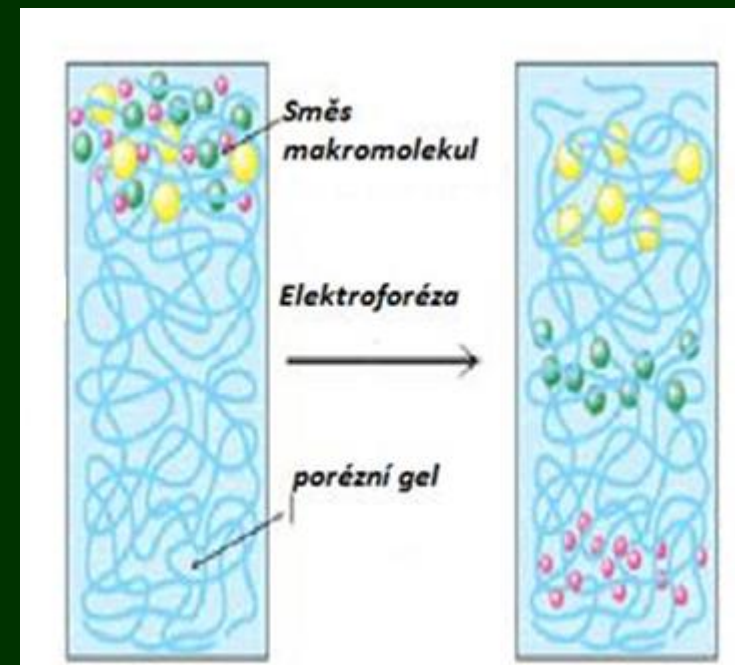
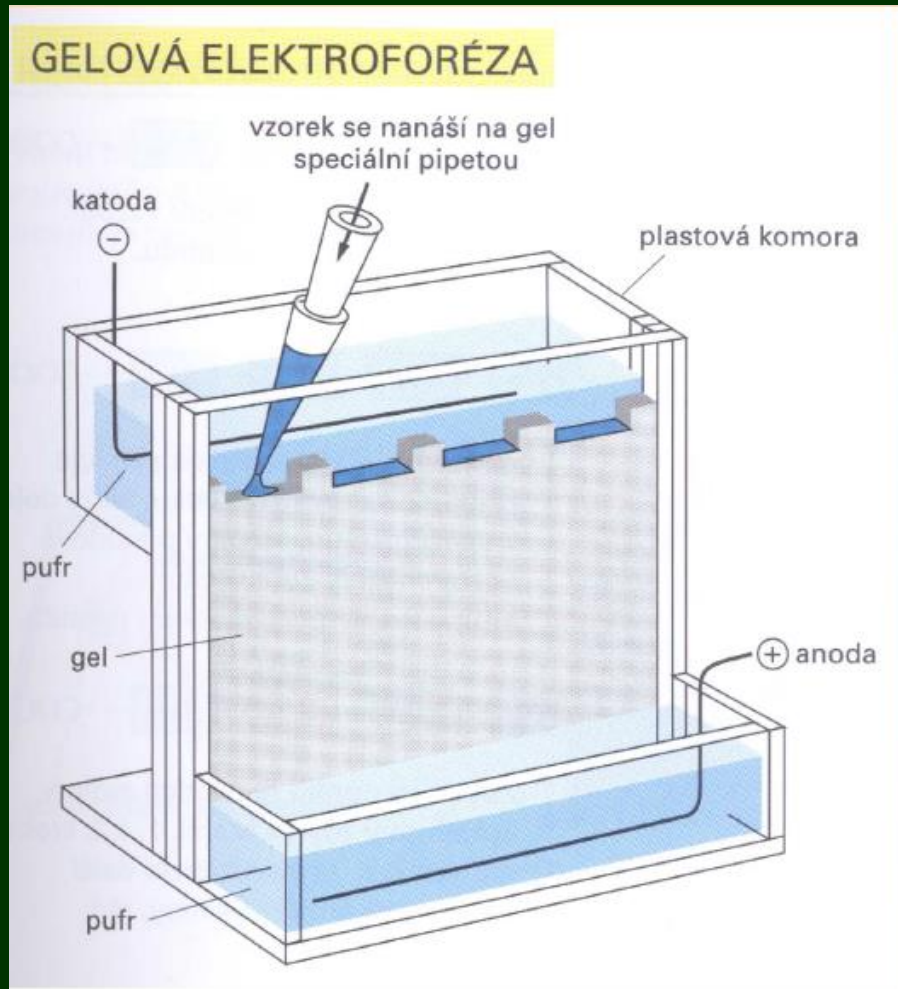
polyakrylamidový gel + aniontový detergent (SDS, dodecylsulfát sodný)



na 1 g bílkoviny se váže 1,4 g SDS – uniformní náboj bílkoviny na jednotku Mr



# Denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)



Mr1

Mr2

Mr3

$Mr1 > Mr2 > Mr3$

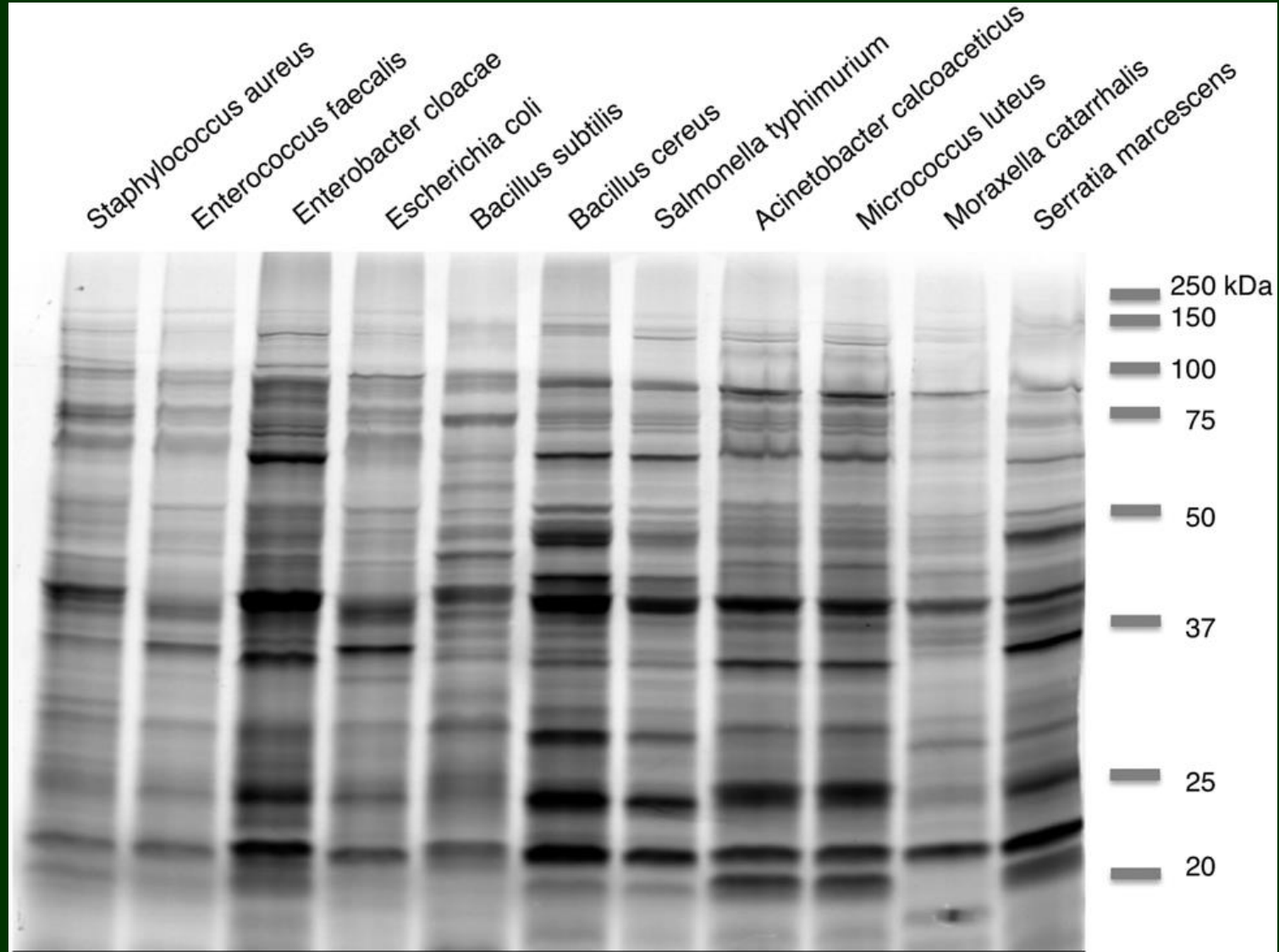
# Proteinové hmotnostní standardy

<u>Protein</u>	<u>Kalibrované MW v Tris-HCl gelu</u>
■ Myosin	201,179
■ $\beta$ -galactosidáza	120,284
■ Bovinní sérový albumin	100,236
■ Ovalbumin	55,925
■ Anhydráza	38,289
■ Soyben trypsin inhibitor	29,678
■ Lysozym	20,669
■ Aprotinin	6,969

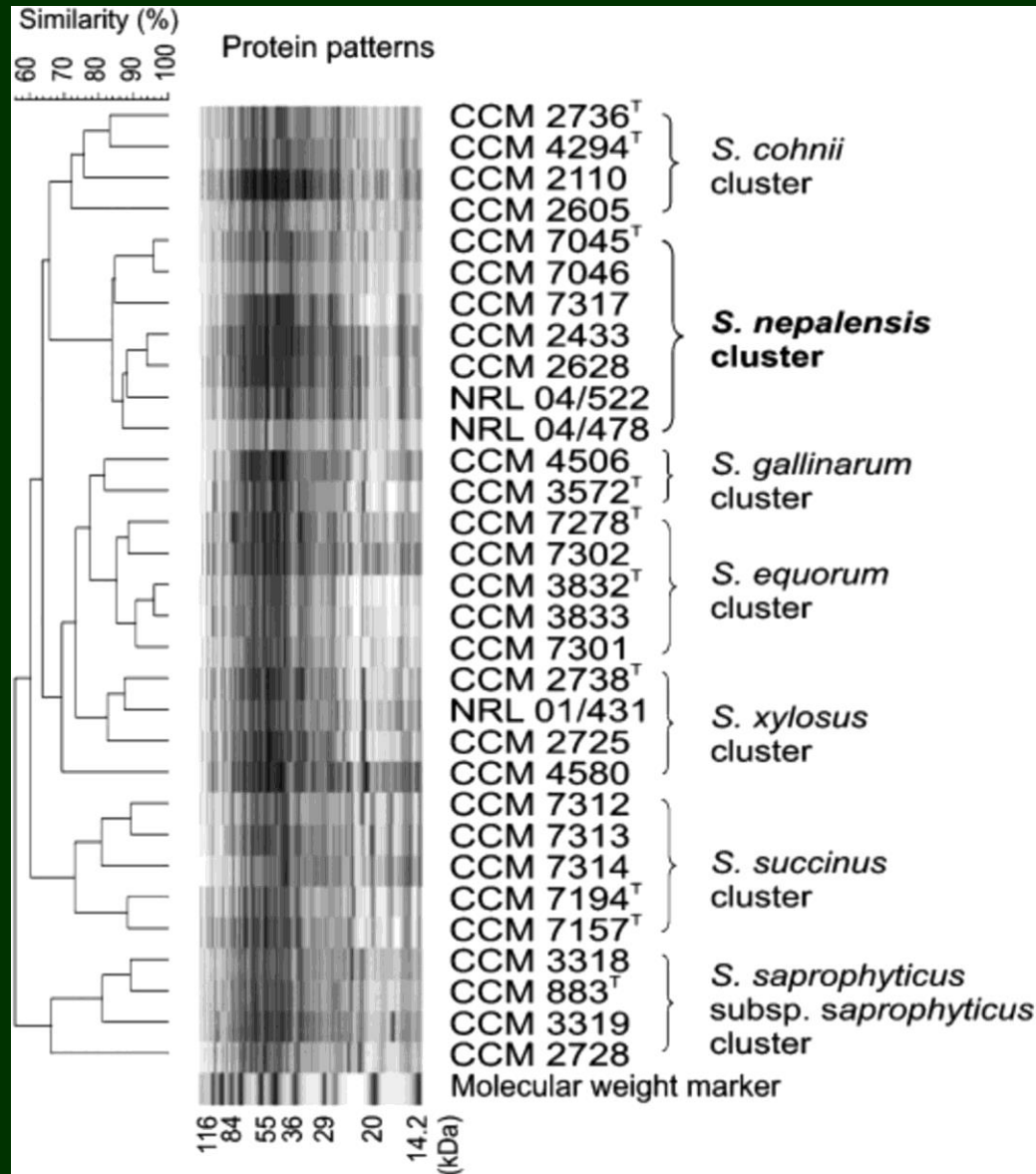
# K molekulové hmotnosti proteinů

- velikost měřena v daltonech (Da) či kilodaltonech (kDa)
- Dalton = jednotka atomové hmotnosti  
= přibližně se rovná hmotnosti atomu  
vodíku ( $1,66 \times 10^{-24}$  g)  
= definován také jako 1/16 hmotnosti atomu kyslíku
- Průměrná aminokyselina = 110 Da
- Průměrný nukleotidový pár = 649 Da

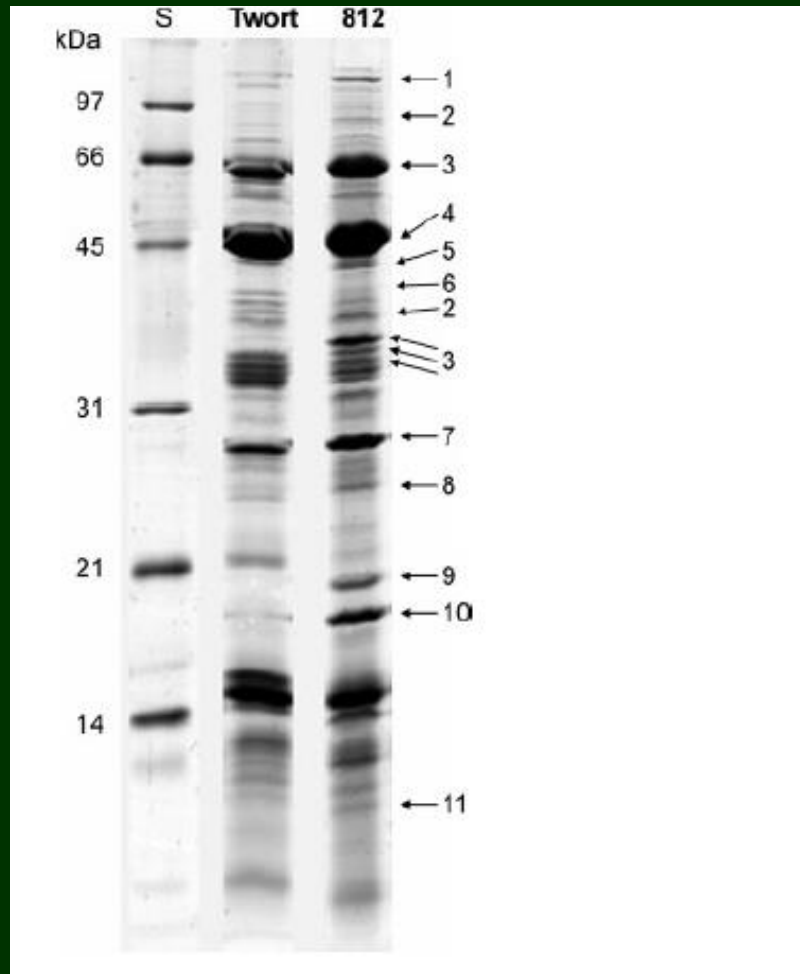
# Identifikace bakteriálních druhů na základě rozdílů v proteinovém profilu



# Identifikace stafylokokových kmenů na základě proteinových profilů jednotlivých klinických izolátů

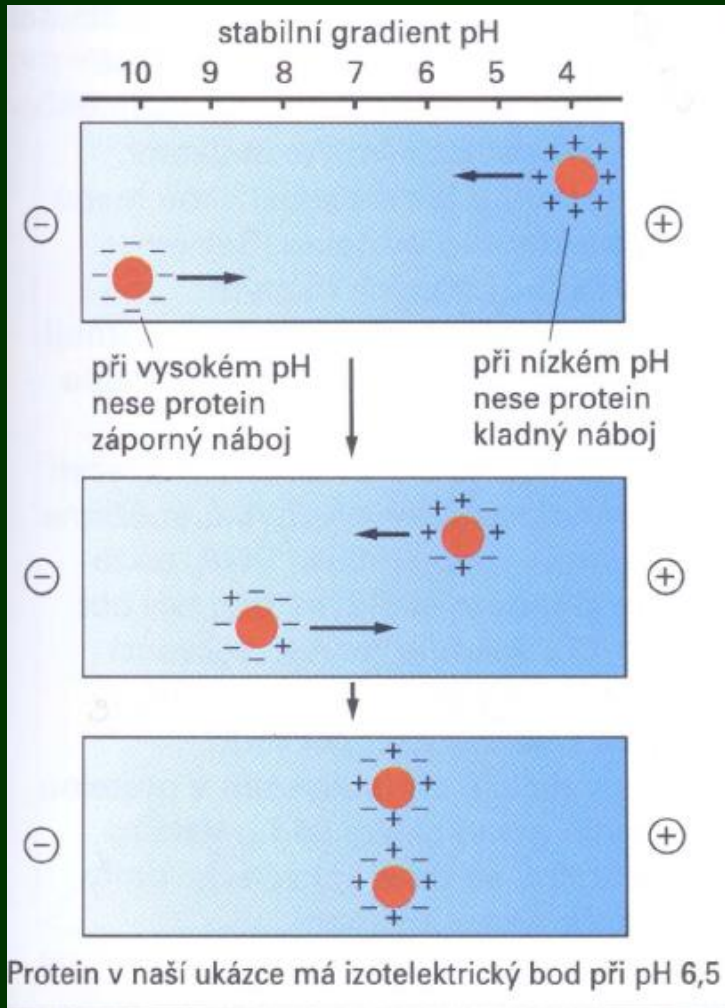


# Studium proteomu a identifikace strukturních proteinů polyvalentního stafylokokového bakteriofága



**Figure 2.** Coomassie G-250 stained 1-DE pattern of proteins from phages 812 and Twort; S = SDS-PAGE Standards Low Range (BioRad). Arrows and numbers indicate bands containing the identified proteins of the phage 812.

# Izoelektrická fokusace



Elektroforéza v prostředí gradientu pH. Látky se rozdělují podle izoelektrických bodů ( $pI$ ).

Proteiny se v elektrickém poli pohybují podle náboje až na místo, kde  $pH = pI$ .

Náboj má nulovou hodnotu a tam zůstávají stát.

IEF fokusace patří mezi metody s největší rozlišovací schopností. Gradient pH se tvoří pomocí amfolytů (komerčně dostupné)

Nosič - polyakrylamid

# 2-D SDS-PAGE

studium proteomu

vysoká rozlišovací schopnost

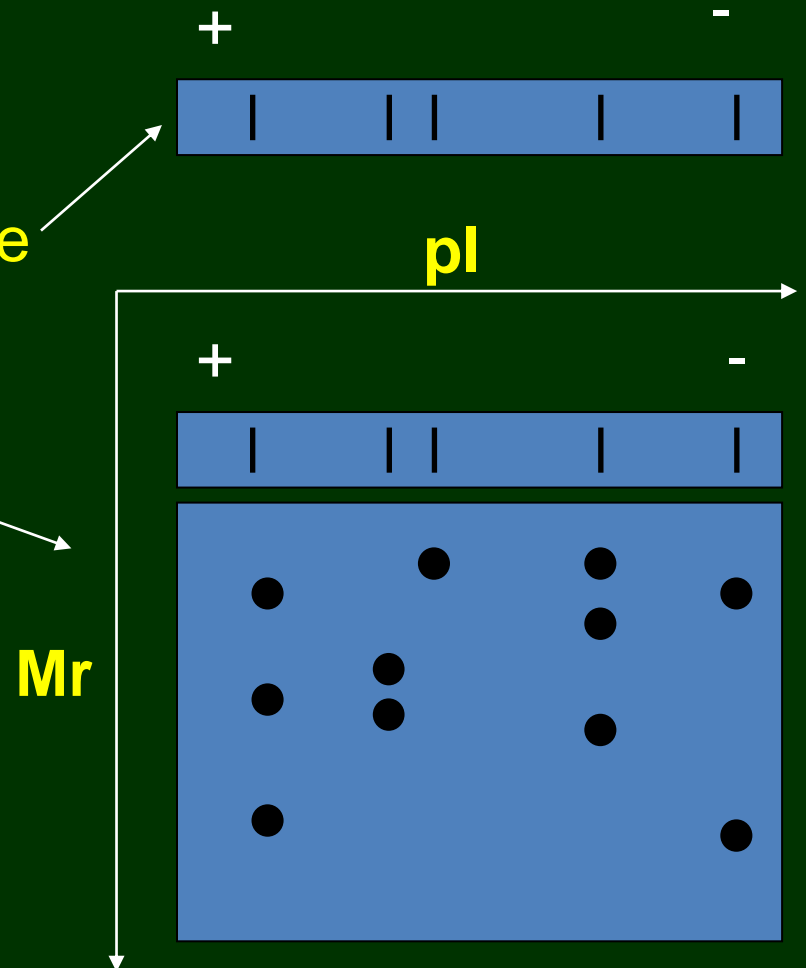
I. klasická isoelektrická fokusace

II. SDS-PAGE

detekce stříbrem

srovnání jednotlivých gelů

densitometry

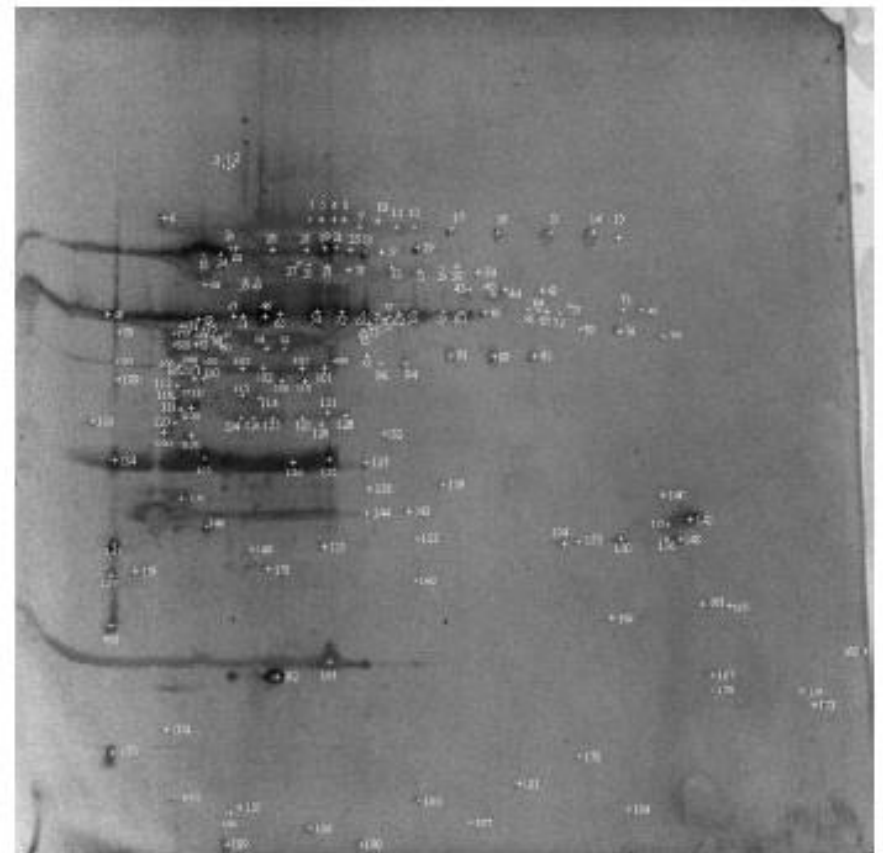




# Proteinové profily polyvalentního stafylokokového bakteriofága získané pomocí 2-D SDS-PAGE



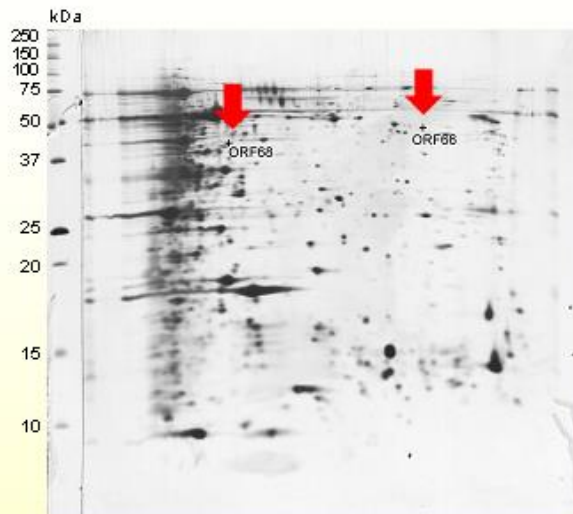
**Figure 3.** 2-DE spot pattern of proteins from phage 812; pH gradient 3–10; MS-incompatible silver staining.



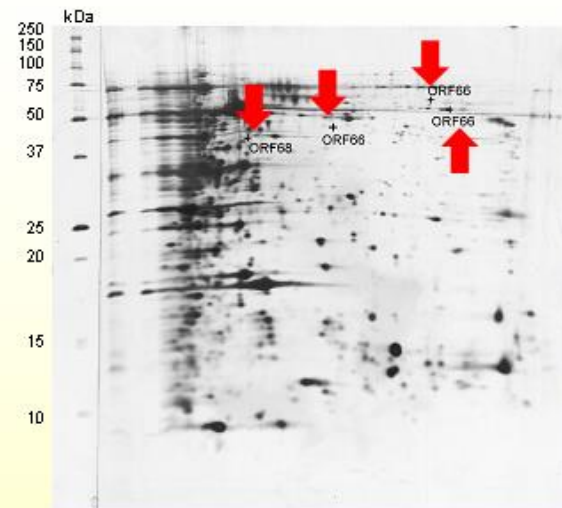
**Figure 4.** 2-DE spot pattern of proteins from phage 812; pH gradient 3–10; MS-compatible silver staining. Analyzed spots are marked. Spot numbers are given in Table 1.

## 2-DE PROTEINOVÉ PROFILY FÁGŮ 812, 812b, 812p a SK311

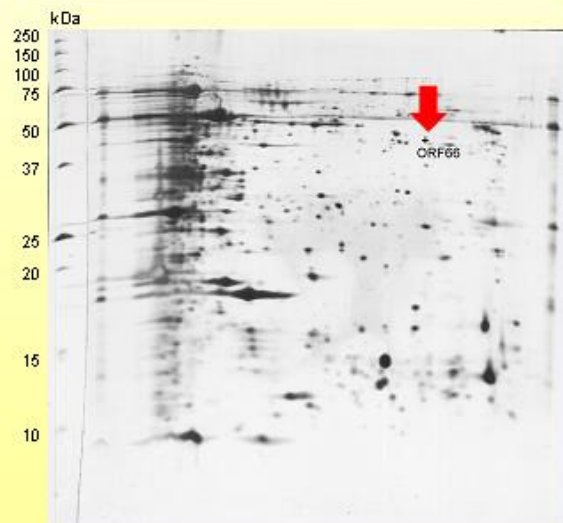
812



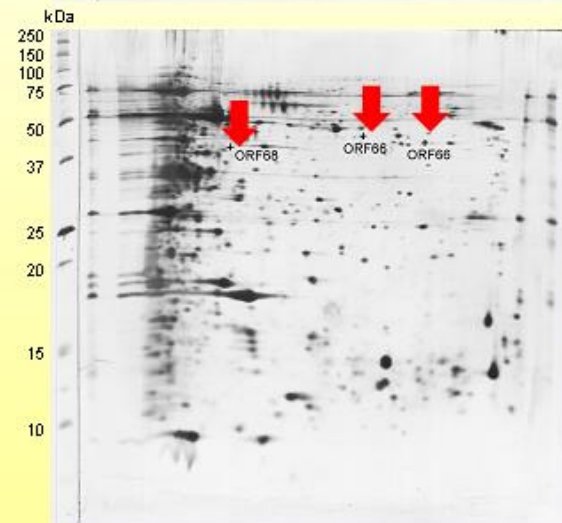
812b



812p



SK311



Studované fágy vykazují rozdíly v proteinech **ORF 66** a **ORF 68** – struktury bičíku  
**Budoucí výzkum:** detailní analýza genomové oblasti zahrnující *orf 66* – *orf 68*

# Detekční metody pro rozlišení elektroforeticky rozdělených proteinů

v gelu

po přenosu

otisk

blotting

# Nespecifická detekce

1) Fixace

2) Barvení

3) Odbarvení

## Barviva

Coomassie Brilliant Blue

Fast Green

Amoniakální stříbro

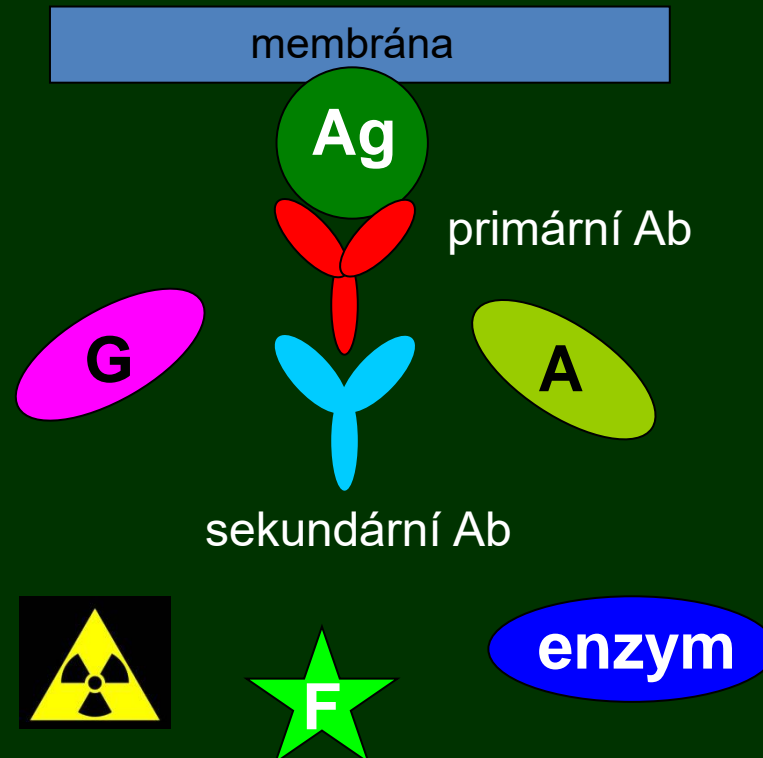
Dusičnan stříbrný

# Specifická detekce

Radioaktivní značení

Detekce biologické aktivity (zymogram)

Imunodetekce (blotting)



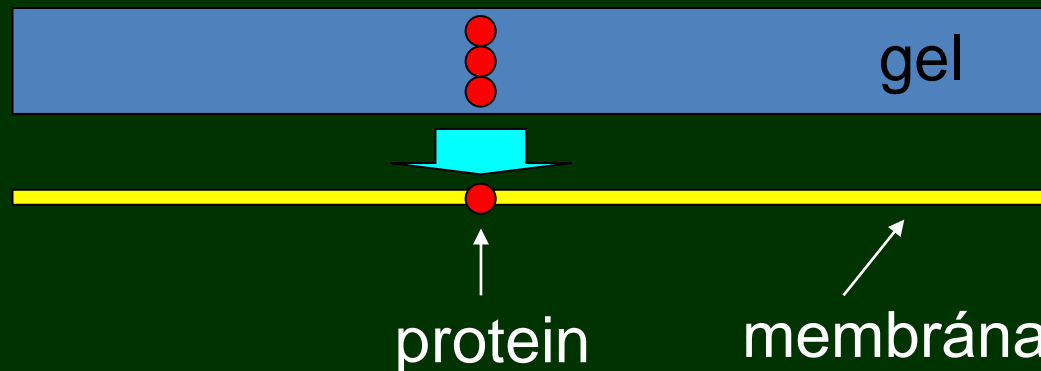
# Blotting (přesávka)

Přenesení biomolekuly na membránu

**Southern blotting** – přenos DNA

**Northern blotting** – přenos RNA

**Western blotting** – přenos proteinu



# Blotting (přesávka)

difuzní

kapilární

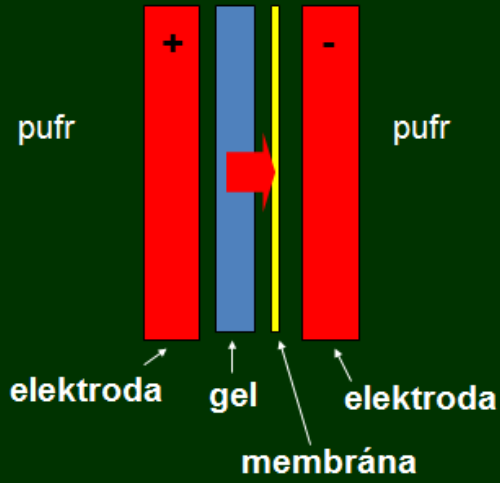
vakuový

elektroblotting

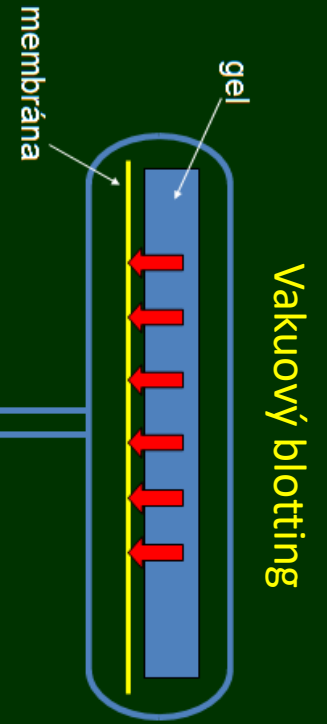
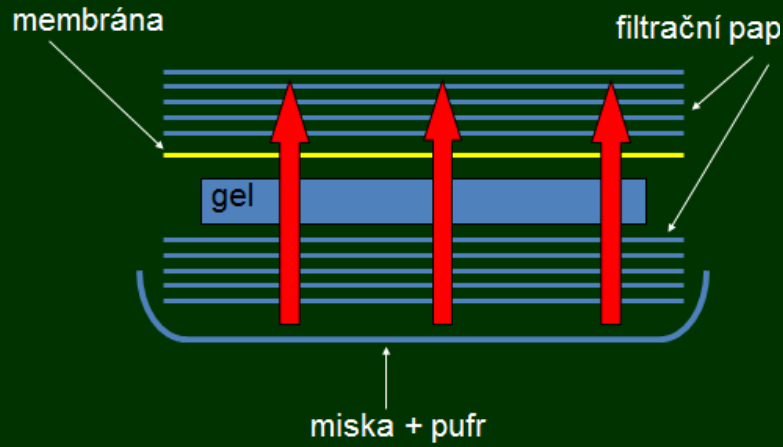
polosuchý (semidry blot)

kapkovací (dot blot)

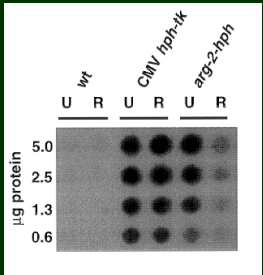
# Elektroblotting



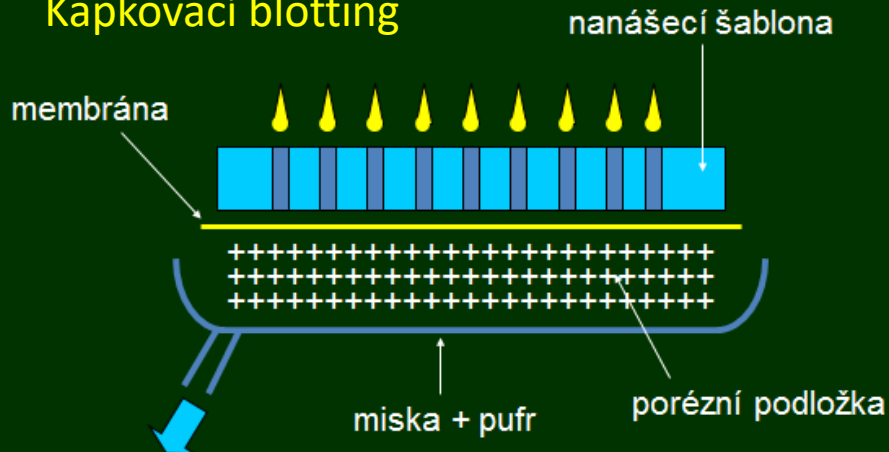
# Kapilární blotting



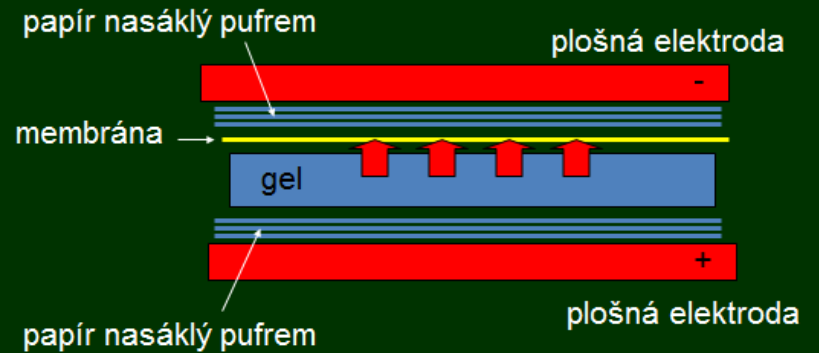
# Vakuový blotting



# Kapkovací blotting



# Polosuchý blotting





# Membrány pro blotting

**PVDF** (polyvinyldendifluoridová) –  
hydrofobní interakce

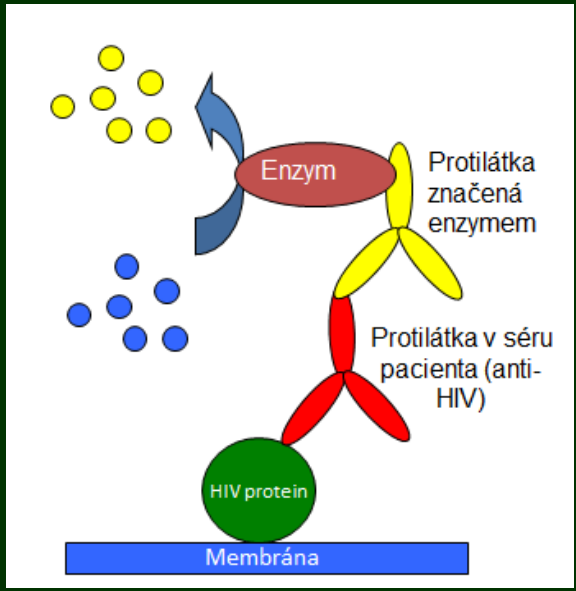
**nitrocelulosová** – hydrofobní interakce

**nylonová** (+polymer) – elstat interakce

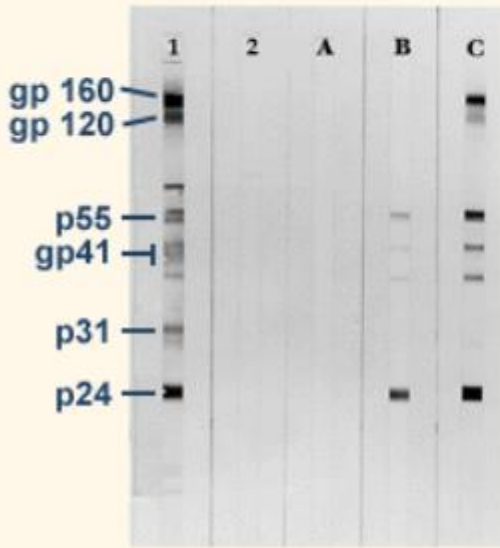
**membrána s NH<sub>2</sub> skupinami** –  
kovalentní reakce

gp160	viral envelope precursor ( <i>env</i> )
gp120	viral envelope protein ( <i>env</i> ) binds to CD4
p24	viral core protein ( <i>gag</i> )
p31	reverse transcriptase ( <i>pol</i> )

# Komerčně dostupné western blot testy pro detekci protilátek proti HIV



No bands present	Negative
Bands at either p31 OR p24 AND bands present at either gp160 OR gp120	Positive
Bands present, but pattern does not meet criteria for positivity	Indeterminate

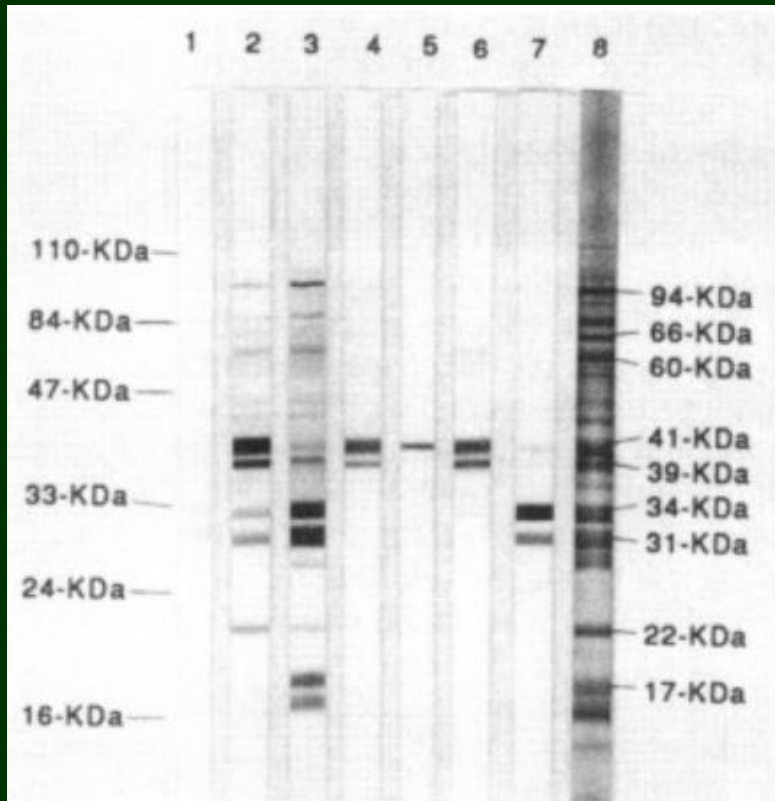


Band pattern Interpretation

1. Lane 1, HIV+ serum (positive control)
2. Lane 2, HIV- serum (negative control)
3. Lane A, Patient A
4. Lane B, Patient B
5. Lane C, Patient C

# Lymeská borelióza: western blot test

dle CDC: 5 z 10 pruhů indikuje pozitivní test



Interpretation of the Western blot—More is not necessarily better.

Band kDa	Band importance	IgG	IgG	IgM	IgM
		Ma et al. 2 of 6	CDC 5 of 10	Ma et al 2 of 5	CDC 2 of 3
18	Thought to be specific				
22	Thought to be specific				
23-25	OSP-C highly specific				
28	Not specific				
30	Thought to be specific				
31	OSP-A highly specific				
34	OSP-B highly specific				
37	Thought to be specific				
39	Thought to be specific				
41	Non-specific flagella				
45	Non-specific				
58	Non-specific				
66	Non-specific				
73	Non-specific				
88	Thought to be specific				
93	Thought to be specific				

Negativní na IgM i IgG

Pacient ID: vz.1  
 Vytvořit: 12/13/2023  
 Datum inkubace: 12/13/2023

Test: EUROLINE Borrelia IgM  
 jamka: 5

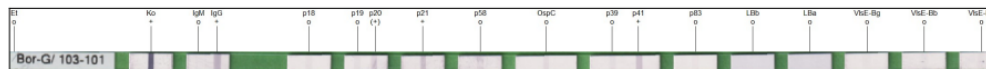


Antigen	Intenzita	Třída	o (+)
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	2	o	
Flagellin (p41)	6	o	
BmpA (p39)	2	o	
OspC Borrelia afzelii (OspC Ba)	1	o	
OspC Borrelia burgdorferi (OspC Bb)	1	o	
OspC Borrelia garinii (OspC Bg)	2	o	

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgM	negativní

Pacient ID: vz.1  
 Vytvořit: 12/13/2023  
 Datum inkubace: 12/13/2023

Test: EUROLINE Borrelia IgG  
 jamka: 2



Antigen	Intenzita	Třída	o (+)
VisE Borrelia afzelii (VisE-Ba)	7	o	
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	5	o	
VisE Borrelia garinii (VisE-Bg)	4	o	
Lipid Borrelia afzelii (LBa)	0	o	
Lipid Borrelia burgdorferi (LBb)	0	o	
pB3 (pB3)	3	o	
Flagellin (p41)	29	+	
BmpA (p39)	6	o	
OspC (OspC)	10	o	
BB_A34 (p58)	6	o	
BB_K53 (p21)	29	+	
BB_Q03 (p20)	15	(+)	
BB_N38 (p19)	7	o	
BB_P38 (p18)	6	o	

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgG	negativní

Pozitivní na IgM i IgG

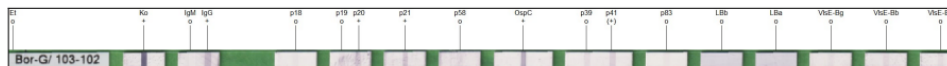
Pacient ID: vz.2 Test: EUROLINE Borrelia IgM  
Vytvořít: 12/13/2023 jamka: 6  
Datum inkubace: 12/13/2023



Antigen	Intenzita	Třída	o (+)	+
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	3	o		
Flagellin (p41)	10	o		
BmpA (p39)	6	o		
OspC Borrelia afzelii (OspC Ba)	74	+		
OspC Borrelia burgdorferi (OspC Bb)	66	+		
OspC Borrelia garinii (OspC Bg)	71	+		

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgM	pozitivní

Pacient ID: vz.2 Test: EUROLINE Borrelia IgG  
Vytvořít: 12/13/2023 jamka: 3  
Datum inkubace: 12/13/2023



Antigen	Intenzita	Třída	o (+)	+
VisE Borrelia afzelii (VisE-Ba)	10	o		
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	9	o		
VisE Borrelia garinii (VisE-Bg)	7	o		
Lipid Borrelia afzelii (LBa)	0	o		
Lipid Borrelia burgdorferi (LBb)	0	o		
p83 (p83)	5	o		
Flagellin (p41)	18	(+)		
BmpA (p39)	10	o		
OspC (OspC)	52	+		
BB_A34 (p58)	6	o		
BB_K53 (p21)	30	+		
BB_Q03 (p20)	27	+		
BB_N38 (p19)	6	o		
BB_P38 (p18)	5	o		

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgG	pozitivní

Negativní na IgM, pozitivní na IgG

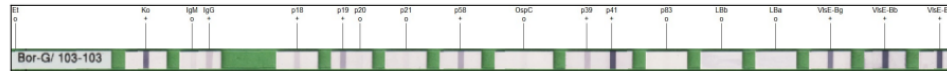
Pacient ID: vz.3                                  Test: EUROLINE Borrelia IgM  
 Vytvořit: 12/13/2023                             jamka: 7  
 Datum inkubace: 12/13/2023



Antigen	Intenzita	Třída	o (+)
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	4	o	
Flagellin (p41)	6	o	
BmpA (p39)	3	o	
OspC Borrelia afzelii (OspC Ba)	1	o	
OspC Borrelia burgdorferi (OspC Bb)	2	o	
OspC Borrelia garinii (OspC Bg)	2	o	

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgM	negativní

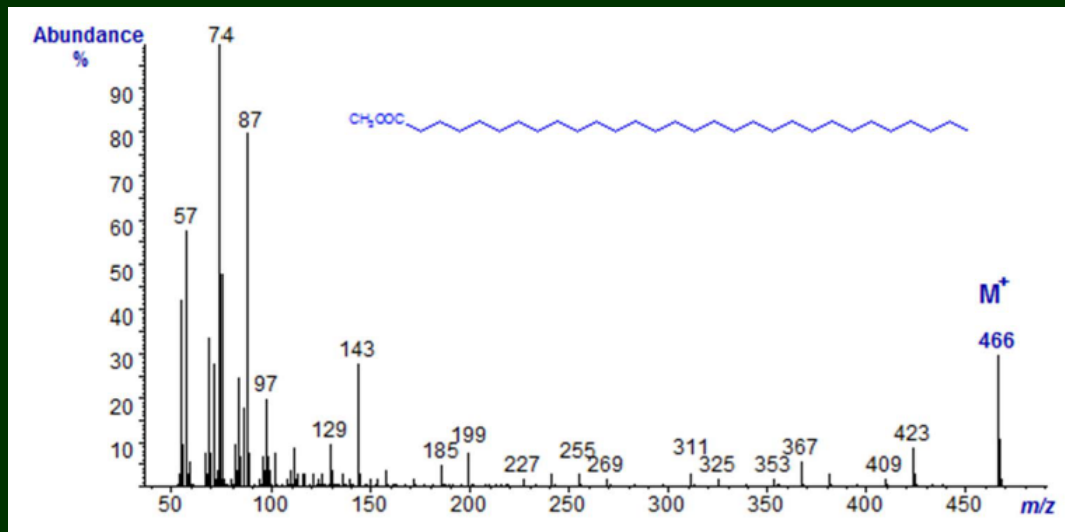
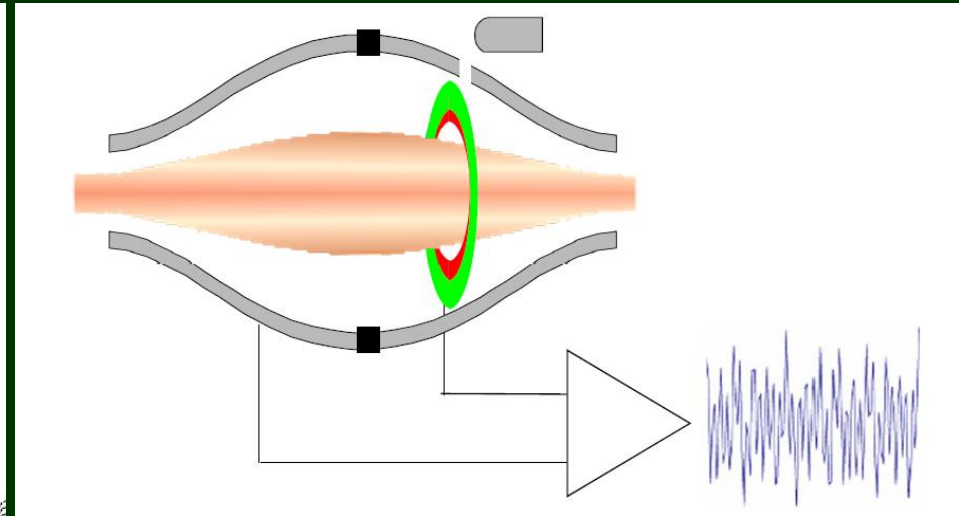
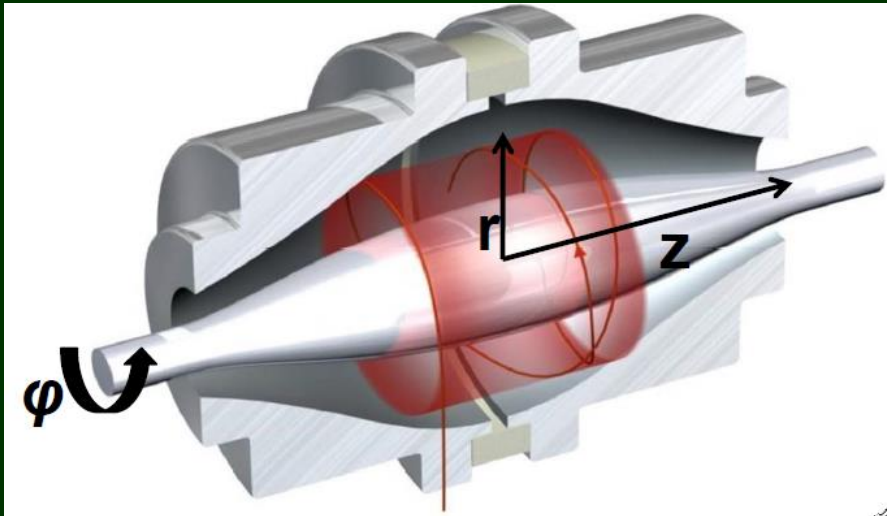
Pacient ID: vz.3                                  Test: EUROLINE Borrelia IgG  
 Vytvořit: 12/13/2023                             jamka: 4  
 Datum inkubace: 12/13/2023



Antigen	Intenzita	Třída	o (+)
VisE Borrelia afzelii (VisE-Ba)	126	+	
VisE Borrelia burgdorferi (VisE-Bb)	125	+	
VisE Borrelia garinii (VisE-Bg)	95	+	
Lipid Borrelia afzelii (LBa)	0	o	
Lipid Borrelia burgdorferi (LBb)	0	o	
p83 (p83)	2	o	
Flagellin (p41)	130	+	
BmpA (p39)	32	+	
OspC (OspC)	4	o	
BB_A34 (p58)	50	+	
BB_K53 (p21)	5	o	
BB_Q03 (p20)	4	o	
BB_N38 (p19)	51	+	
BB_P38 (p18)	20	+	

Test	Výsledek
EUROLINE Borrelia IgG	pozitivní

# Téma 09\_Základy hmotnostní spektrometrie



# Hmotnostní spektrometrie

- Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů
- Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich  $m/z$
- Výhody: vysoká citlivost, kvalitativní analýza (určení M.W. a dalších strukturních informací), kvantitativní analýza (odezva závislá na koncentraci), minimální spotřeba vzorku
- Nevýhody: destruktivní metoda, vysoké provozní náklady
- Využití: analytická chemie (látkové složení hmoty), diagnostika (identifikace mikroorganismů), zobrazování



# Základní termíny

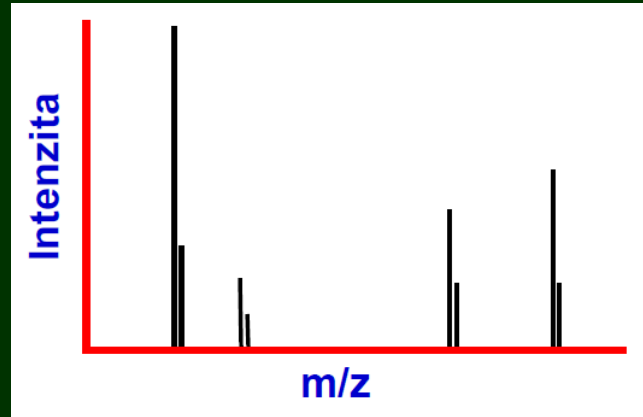
- Hmotnostní spektrum: graf závislosti intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich  $m/z$
- $m/z$ : bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
- Základní pík spektra: pík s nejvyšší intenzitou
- **Ion prekurzoru**: ion, který reaguje za vzniku konkrétních produktových iontů
- **Produktový ion**: vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekurzoru (disociace (fragmentový ion), reakce ion/molekula, změna počtu nábojů)
- **Fragmentový ion**: produktový ion vzniklý disociací iontu prekurzoru
- **Aduktový ion**: tvořený interakcí iontu s jedním a více atomy nebo molekulami  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Cl]^-$
- **Molekulární ion**: ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu

# Základní termíny

- **Protonovaná molekula:** ion vzniklý interakcí molekuly s protonem,  $[M+H]^+$
- **Deprotonovaná molekula:** ion vzniklý odštěpením protonu,  $[M-H]^-$
- Celkový iontový chromatogram – závislost sumy iontových proudů všech  $m/z$  ve spektru na čase
- Extrahovaný iontový chromatogram: závislost vybrané  $m/z$  na čase
- Záznam vybraného iontu: měření vybrané  $m/z$  v závislosti na čase

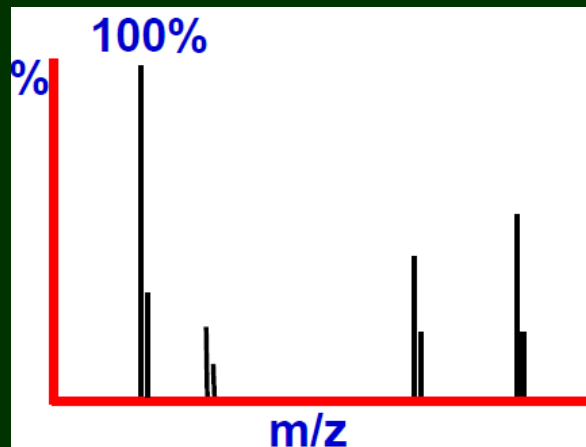
# Hmotnostní spektrum

Základní veličiny – intenzita (absolutní, relativní), poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ )



Normalizace spekter:

- převedení absolutních intenzit na relativní
- intenzita osy y v rozsahu 0-100%
- intenzita základní píku spektra je 100% a intenzity ostatních píku jsou k ní vztaženy

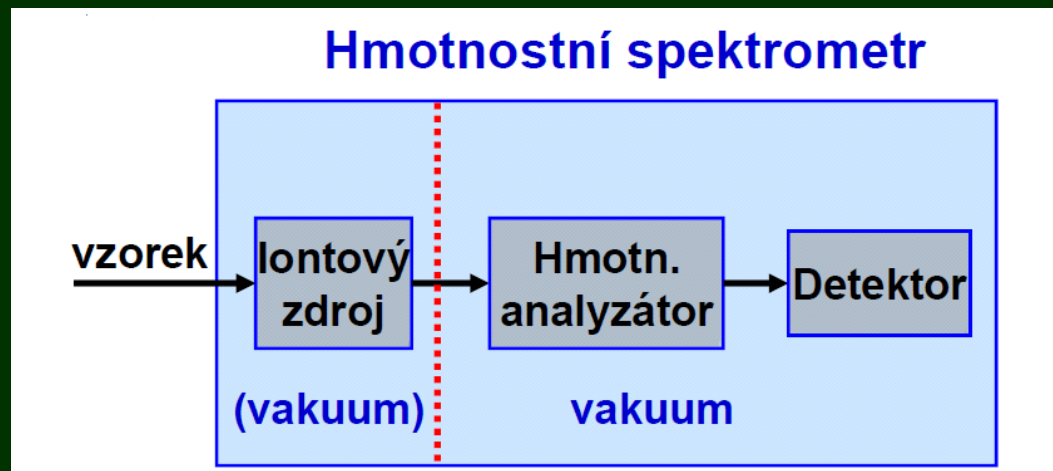


# Základní části hmotnostního spektrometru

1. iontový zdroj – slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky
2. hmotnostní analyzátor – slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle jejich  $m/z$
3. detektor – slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

Další důležité části přístroje:

- vakuový systém
- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů
- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou





## Ionizační techniky (= tvorba iontů)

- iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k **převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice** (ionty)
- **tvrdé** ionizační techniky (např. elektroionizace) – ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)
- **měkké** ionizační techniky (šetrné) ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti EI, proto ve spektrech pozorujeme zejména (de)protonované molekuly a minimum fragmentových iontů

# Ionizační techniky

- podle množství vnitřní energie po ionzaci lze dělit na „tvrdé“ a „měkké“
- mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku

## Ionizační techniky:

- **Elektronová ionizace (EI)**
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- **Ionizace elektrosprejem (ESI)**
- Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)
- **Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)**
- Desorpční ionizace elektrosprejem (DESI)

## Aplikace:

- ESI, APCI, APPI – pro spojení s HPLC/MS
- **ESI, MALDI – analýza biomolekul, nejšetrnější ionizační techniky**
- EI – GC/MS, možnost porovnání s knihovny spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace
- MALDI, DESI, SIMS – pro MS zobrazování
- DESI, DART – desorpční ambientní techniky

# Ionty v hmotnostních spektrech

- Závislé na použité ionizační technice
- Ionty s lichým počtem elektronů –  $M^+$ . (radikalkationty), hlavně elektronová ionizace
- Ionty se sudým počtem elektronů – měkké ionizační techniky
- Ionty (de)protonovaných molekul –  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ , určení MW
- Aduktý molekul –  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , s mobilní fází, atd., ověření MW
- Fragmentové (produktové) ionty – strukturní informace, fragmentace funkčních skupin, částí molekuly atd.
- Ionty izotopů



# Elektronová ionizace

- nejtvrďší ionizační technika, molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu, někdy v takovém rozsahu, že molekulární ion zcela chybí ve spektru)
- vznikají ionty s lichým počtem elektronů ( $M^+$ .)
- pracuje za vakua ( $10^{-3} - 10^{-5}$  Pa), hmotnostní rozsah ca do  $m/z = 1000$
- pro těkavé a termostabilní látky, ionizace v plynné fázi při  $150 - 400$  °C
- nejstarší ionizační technika
- podrobně popsána pravidla fragmentace, rozsáhlé knihovny EI spekter

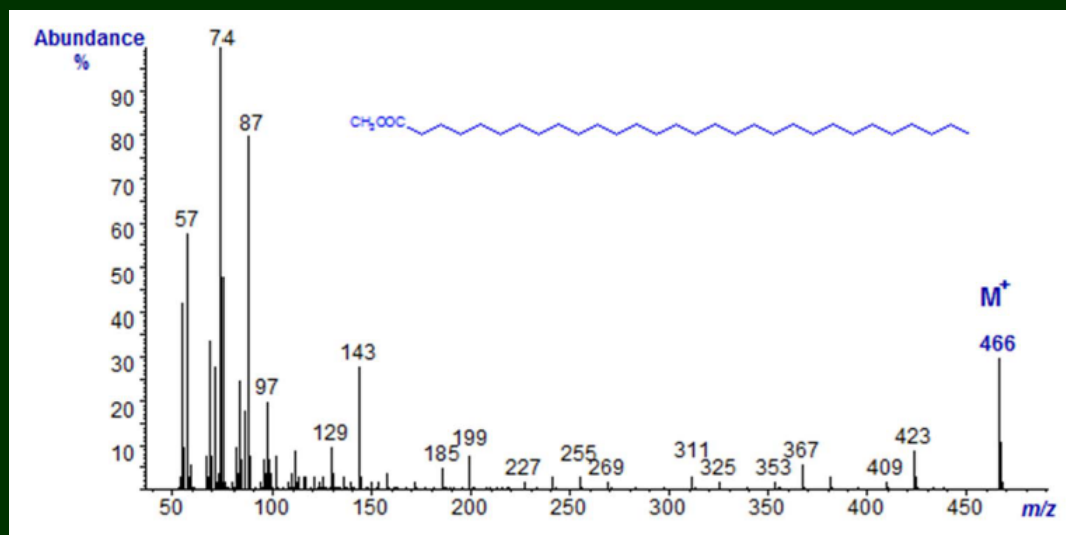
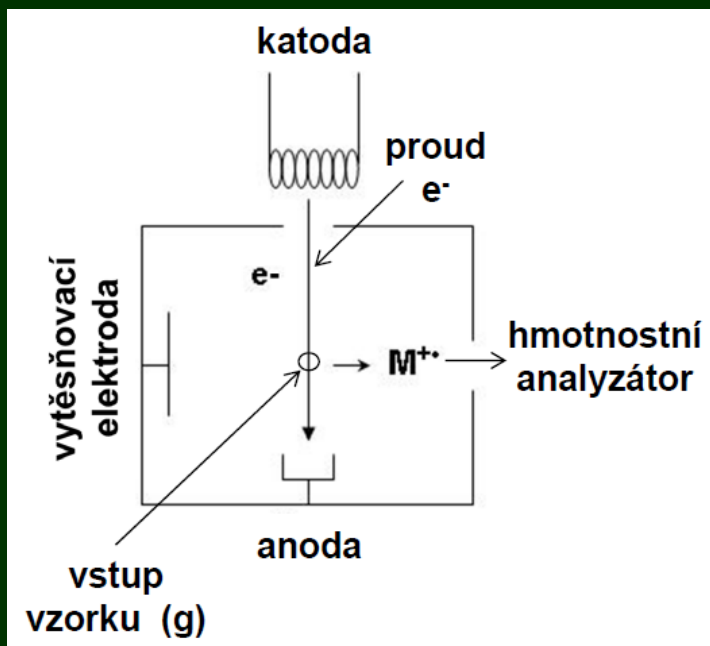
**elektronová ionizace video**

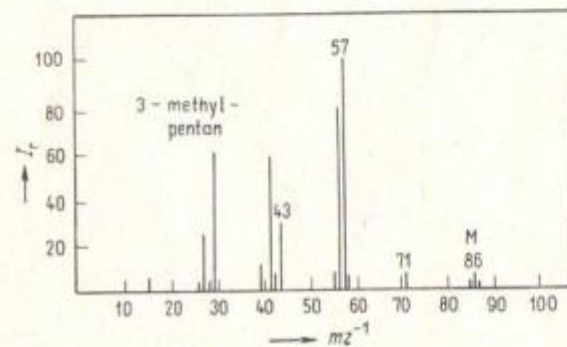
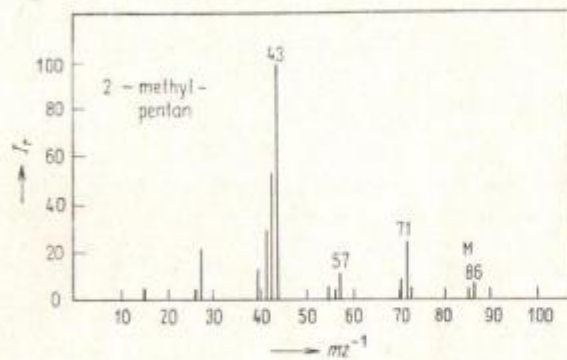
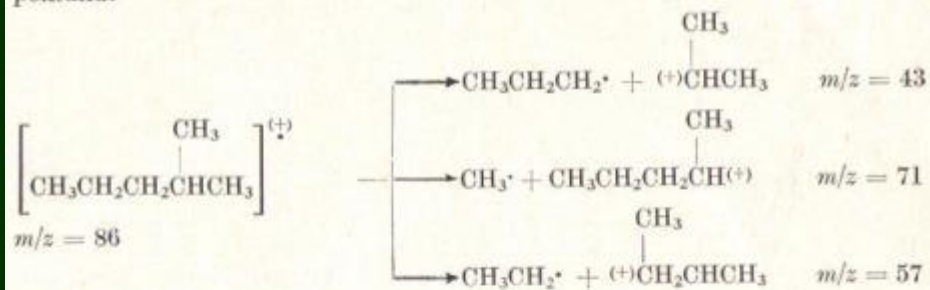
<https://www.youtube.com/watch?v=22dr-3XDNmQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=stlwRio9FeM>

## Princip EI:

- žhavená katoda (W nebo Re) emituje  $e^-$ , které jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě (lapač  $e^-$ )
- urychlující potenciál v eV mezi katodou a anodou určuje energii  $e^-$
- přiblížením emitovaného  $e^-$  k valenčním  $e^-$  molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí, což vede k uvolnění valenčního  $e^-$  a tím vzniku radikalkationtu  $M^+$ .
- vzniklé ionty jsou vytěsněny vytěšňovací elektrodou z iontového zdroje, dále fokusovány do analyzátoru
- jestliže molekula získá při ionizaci příliš velký přebytek vnitřní energie, projeví se to její fragmentací (rozpadem na menší nabitě a nenabitě části), při rozsáhlé fragmentaci může chybět molekulární ion

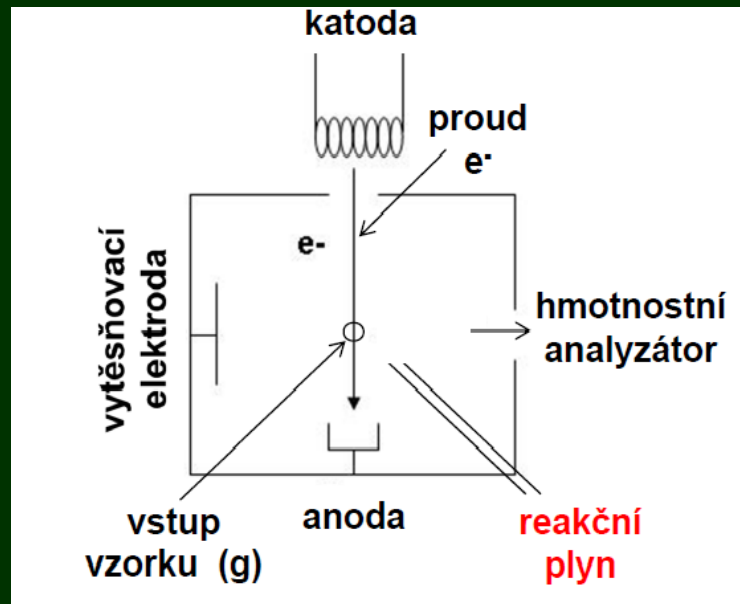




Obr. 8.6 Hmotnostní spektrum 2-methylpentanu a 3-methylpentanu

# Chemická ionizace

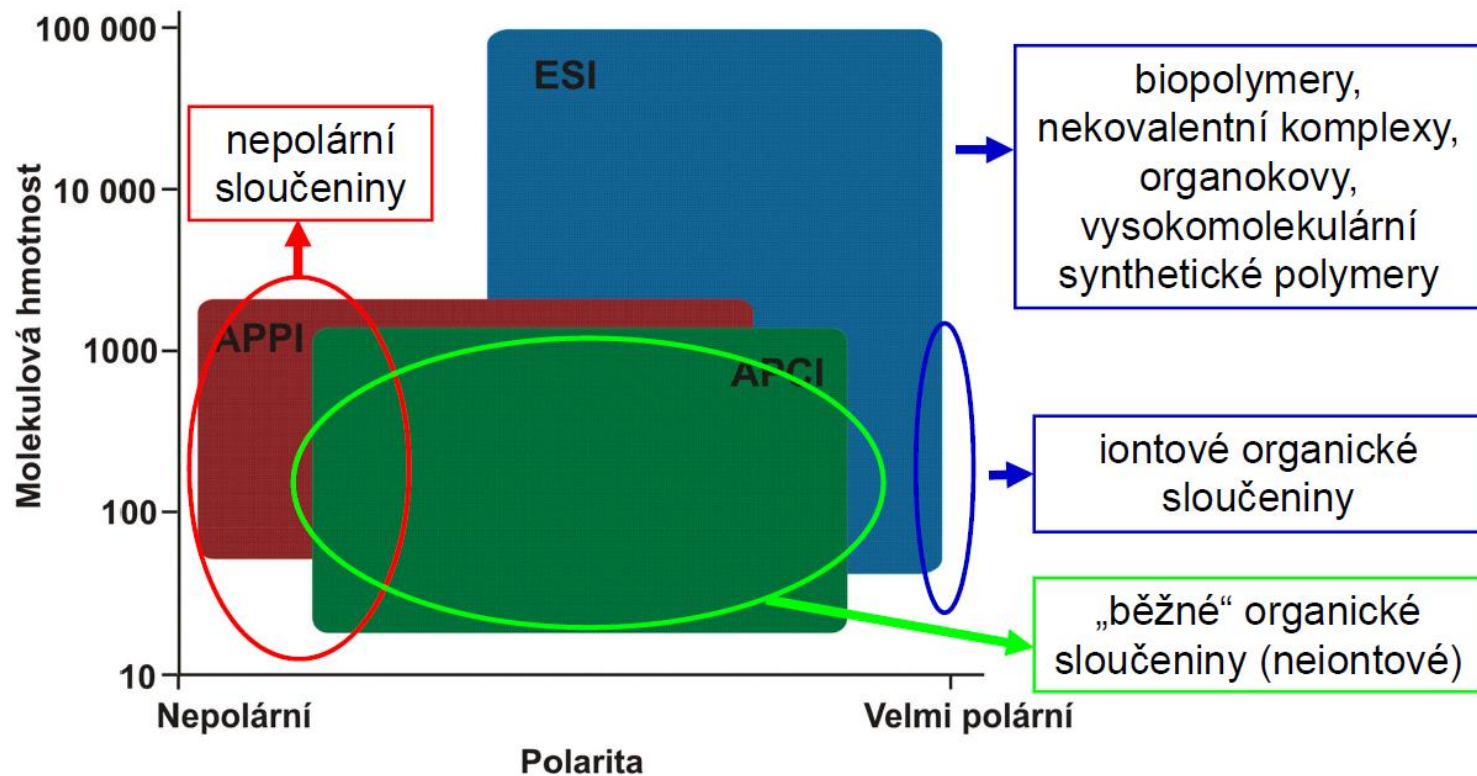
- analogie EI, ale ve zdroji je přítomen tzv. reakční plyn o tlaku 50 -100 Pa, nadbytek plynu vůči vzorku 10 000 : 1
- nejdříve jsou ionizujícími  $e^-$  ionizovány molekuly reakčního plynu, které následně ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu (použitý tlak zaručuje, že dojde k dostatečnému počtu interakcí molekul analytu s ionty reakčního plynu)
- měkká ionizační technika, vznik  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$  nebo jiných aduktových iontů podle použitého reakčního plynu, nejčastěji metan
- vzniklé ionty mají sudý počet  $e^-$  (narozdíl od  $M^+$  při EI)
- ca do  $m/z = 1000$



# Ionizace za atmosférického tlaku

- ESI, APCI, APPI
- spojení HPLC/MS
- vznik převážně iontů se sudým počtem e-

- **záznam kladných iontů** – většina sloučenin, poměrně univerzální
- **záznam záporných iontů** – sloučeniny obsahující sulfo-, karboxy-, (poly)hydroxy- nebo nitro- skupiny, halogenované sloučeniny, organokovy, atd.

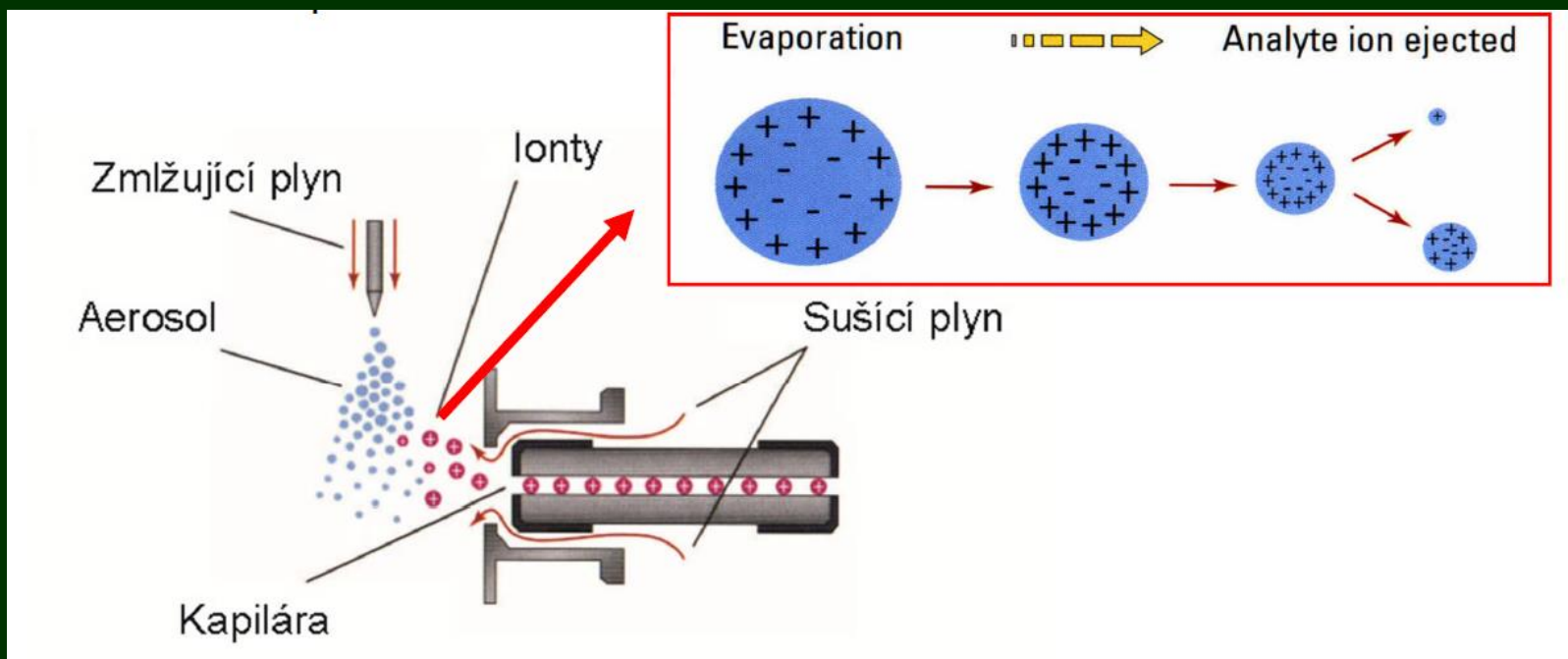


# Ionizace elektrosprejem

- ESI je nejčastěji používaná ionizační technika pro spojení HPLC/MS
- pro látky středně polární až iontové
- nelze použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny
- průtok HPLC eluentu ca. 0,1 – 1,0 mL/min, přímá infúze jednotky až desítky  $\mu\text{L}$
- tvorba vícenásobně nabitých iontů – lze ionizovat molekuly s M.W. v řádech 100 tisíc, vhodný pro ionizaci biomakromolekul, proteomická analýza
- měkká ionizační technika, velmi šetrná
- vznikají hlavně  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^-$ , aduktové ionty
- fragmentované ionty nejsou pozorovány, nebo jen ve velmi nízké intenzitě
- peptidy, proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny, organometalické i anorganické sloučeniny

# Ionizace elektrosprejem

- rozpuštěný analyt je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3-5 kV)
- vznikající kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci zmlžujícího plynu nesou na povrchu velké množství nábojů
- odpařováním rozpouštědla dojde k zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů
- opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů



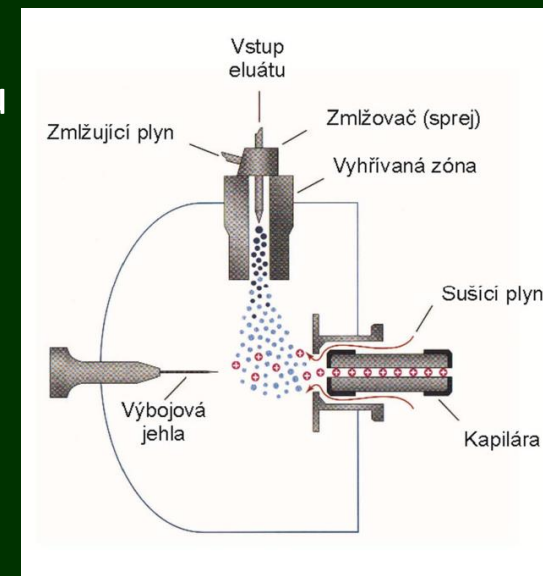
ESI video

<https://www.youtube.com/watch?v=9AWBAI-Owzk>



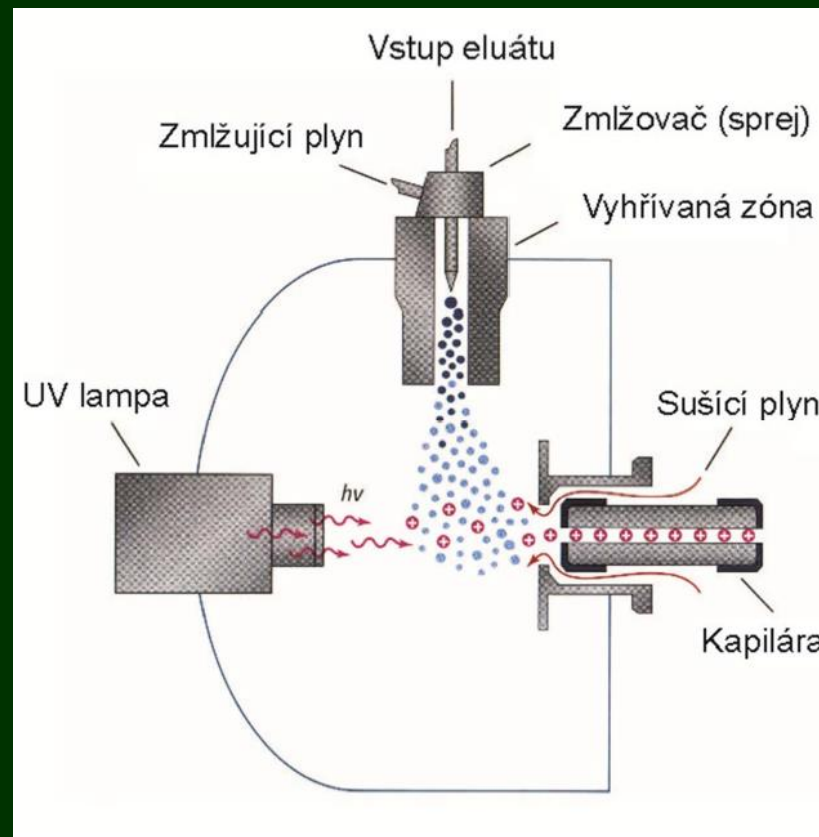
# Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI

- nejčastěji použitá technika pro spojení s HPLC
- pro látky nepolární až středně polární
- měkká ionizační technika – mírně tvrdší než ESI
- $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ , běžné jsou také fragmentové ionty
- Princip je podobný jako u klasické chemické ionizace, ale probíhá za atm. tlaku
- eluát je na konci kapiláry zmlžen do vyhřívané zóny
- na výbojovou elektrodu (jehlu) vloženo vysoké napětí (3-4kV), vzniká koronový výboj
- výbojem jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze (ve velkém přebytku) a následně ion-molekulárními reakcemi reakčního plynu (tj. ionizovaných molekul mobilní fáze) jsou ionizovány molekuly analytu
- vzniké ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru



# Fotoionizace za atmosférického tlaku APPI

- stejné uspořádání zdroje jako pro APCI, jen se pro ionizaci molekul místo jehly s vloženým napětím používá zdroj UV záření
- vhodné pro velmi nepolární až středně polární látky
- měkká technika:  $(M+H)^+$ ,  $[M-H]^-$ , běžně ionty s lichým počtem  $e^-$ :  $M^+$ ,  $M^-$ .
- Princip: zdroj UV je kryptonová výbojka s energií fotonů  $10\text{eV}$



# Porovnání EI a měkkých ionizačních technik

- EI primárně vznikají radikalkationty  $M^+$ . (ion s lichým počtem  $e^-$ ), které vlivem velkého přebytku vnitřní energie molekuly získané při ionizaci podléhají další fragmentaci (molekulární ion ve spektru chybí pro ca 10% organických sloučenin)
- měkké techniky: v důsledku ion-molekulárních reakcí vznikají převážně ionty se sudým počtem  $e^-$ , např.  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+H]^-$  a řada dalších iontů, např. adukty s kovovými ionty atd.
- ve většině případů ve spektrech převládají tyto molekulární adukty, relativní intenzita fragmentových iontů bývá nízká až mizivá
- ionizační techniky lze seřadit dle přebytku vnitřní energie vedoucí k fragmentaci ionizované molekuly, podle tvrdosti:

ESI (nejměkčí) < MALDI ~ APPI < APCI < CI < EI (nejtvrdší)

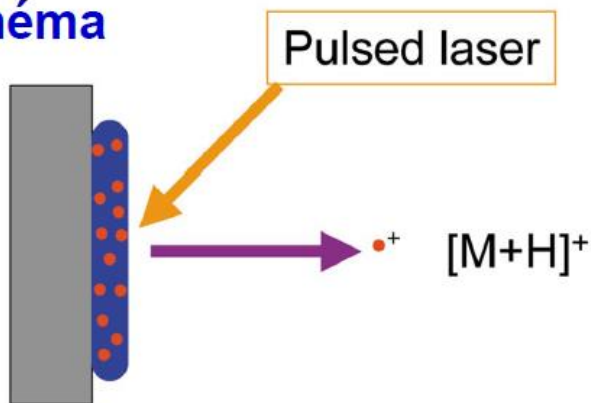
# Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

- ionizace molekul s velkou molekulovou hmotností – biopolymery a syntetické polymery (desítky až stovky tisíc Da, existují aplikace i přes milion Da)
- proteiny, oligonukleotidy, lipidy, polymery
- pro látky nepolární až polární
- ionizace může probíhat za různých tlaků
- měkká ionizační technika, většinou jednou či dvakrát nabité ionty
- vznikají  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M-H]^-$ , adukty s alkalickými kovy
- spojení s HPLC v off-line uspořádání – nanášení spojitě stopy na terčích nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- ionty matrice ve spektrech
- matrice: aromatické karboxylové kyseliny (absorpce záření laseru, např. kyselina dihydroxybenzoová, skořicová)

# Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu
- ionty jsou nábojově urychleny do hmotnostního analyzátoru

Schéma



MALDI terčik

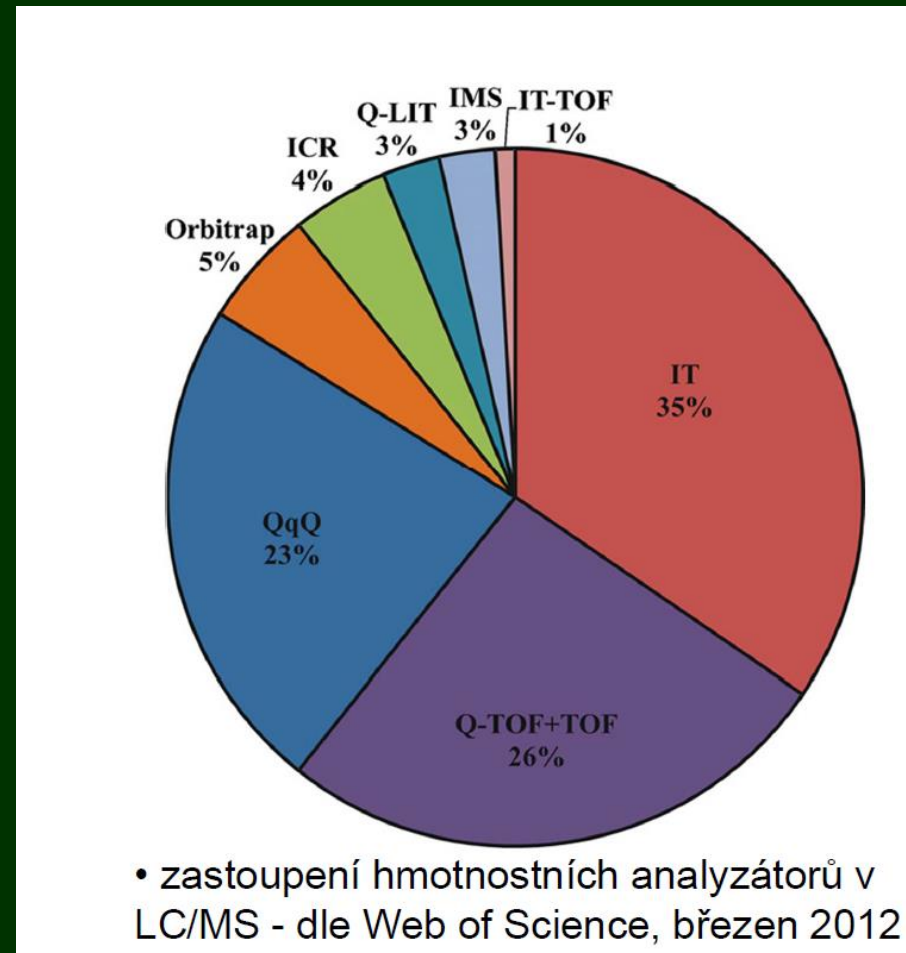


# Hmotnostní analyzátoři (=dělení iontů)

- hmotnostní analyzátoři slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ )
- analyzátoři jsou umístěni za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle  $m/z$ )
- dělení iontů v analyzátoři probíhá za vysokého vakua ( $10^{-3} - 10^{-11}$  Pa)
- dělení iontů podle  $m/z$  lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
  1. zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoři)
  2. různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
  3. různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoři doby letu – TOF)
  4. různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
  5. různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance –ICR)

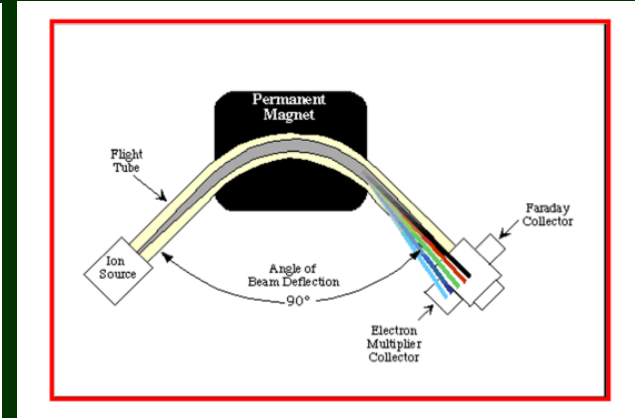
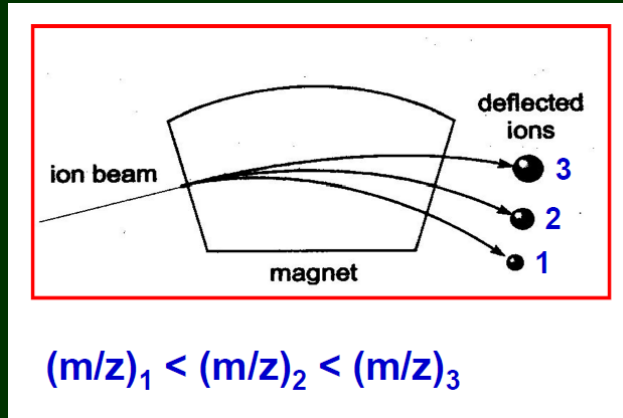
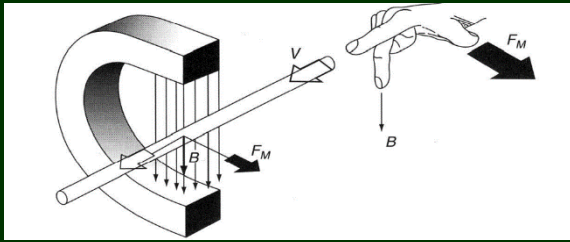
# Základní typy hmotnostních analyzátorů

- Magnetický sektorový analyzátor
- Kvadrupólový analyzátor
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátor
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance



# Magnetický sektorový analyzátor

- Při průchodu iontu magnetickým polem dojde k zakřivení dráhy letu iontu, větší zakřivení pro ionty s nižší hodnotou  $m/z$  (dráhy těžších iontů se tolik nezakříví kvůli větší odstředivé síle těžšího iontu).

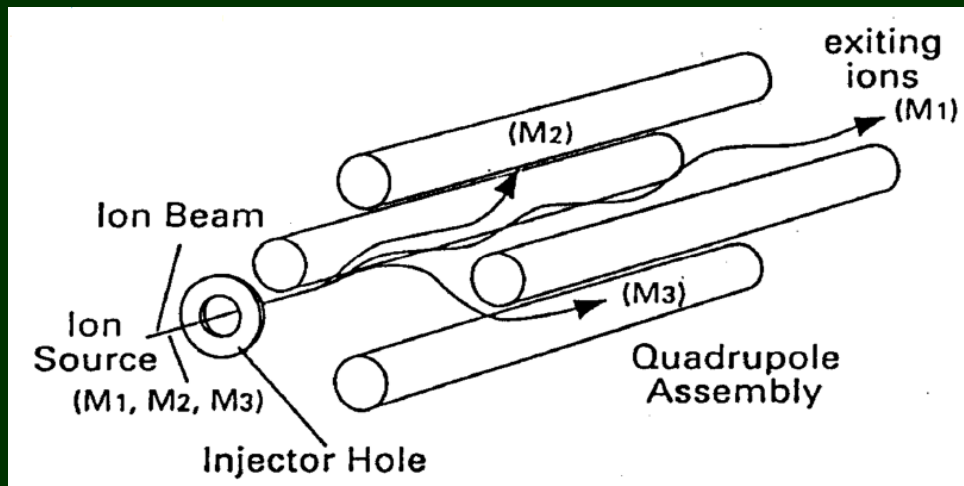


- kladné ionty s určitou hodnotou  $m/z$  urychlené záporným potenciálem  $V$  vstupují do magnetického pole s magnetickou indukcí  $B$ , čímž dojde k zakřivení pohybu iontů na trajektorii o poloměru  $r$
- $m/z = B^2 \cdot r^2 / 2V$ , poloměr dráhy iontů tedy závisí na  $m/z$ ,  $B$  a  $V$ .
- polynulou změnou (skenováním)  $B$  (magnetické skenování) nebo  $V$  (potenciálové skenování) při konstantním poloměru  $r$  daným pro použitý přístroj projdou výstupní štěrbinou na detektor postupně všechny ionty a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé  $m/z$ , čímž získáme hmotnostní spektrum.



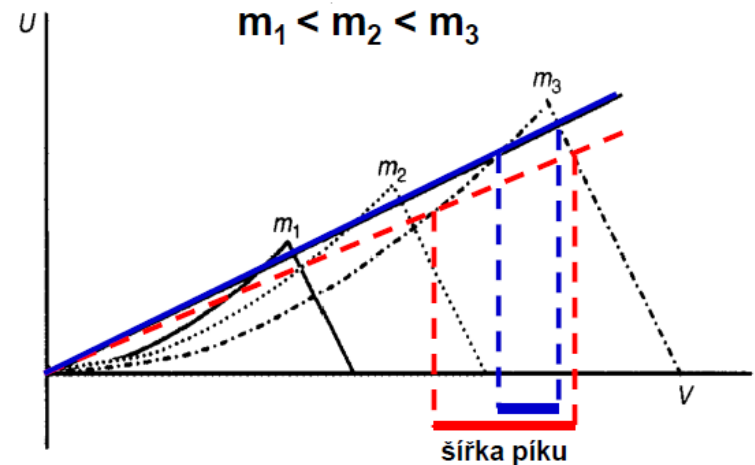
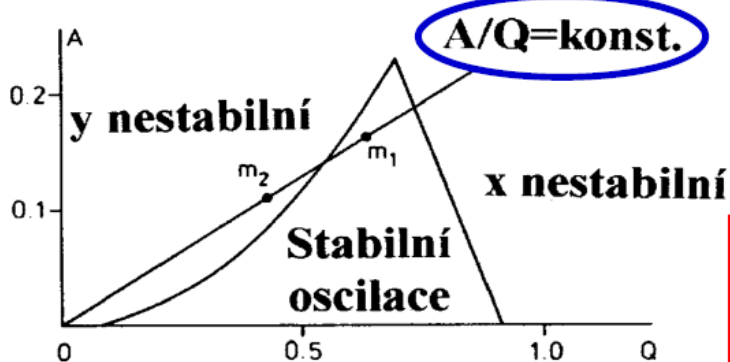
# Kvadrupólový analyzátor

- čtyři stejné kovové tyče kruhového průřezu délky 20-30 cm, na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí, na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí.
- ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat
- v daný okamžik, pro určitý poměr  $U/V$ , jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu
- plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí  $U$  a amplitudy  $V$  (jejich poměr zůstává konstantní) jsou postupně připuštěny na detektor všechny ionty (jedná se vlastně o hmotnostní filtr)
- často součástí hybridních hmotnostních spektrometrů, kde slouží jako filtr (výběr požadovaného iontu) nebo jako kolizní cela



# Stabilní diagram pro kvadrupólový analyzátor

- parametr  $a$  závisí na stejnosměrném napětí ( $U$ ), parametr  $q$  závisí na amplitudě střídavého napětí ( $V$ )
- při skenování se mění parametry  $a$  a  $q$  tak, aby jejich poměr byl stále konstantní, postupně jsou propuštěny kvadrupólem všechny ionty a zaznamenáno spektrum
- snížením poměru  $a/q$  lze zvýšit oblast  $m/z$  (iontů), které projdou analyzátozem, ale zároveň se sníží rozlišení



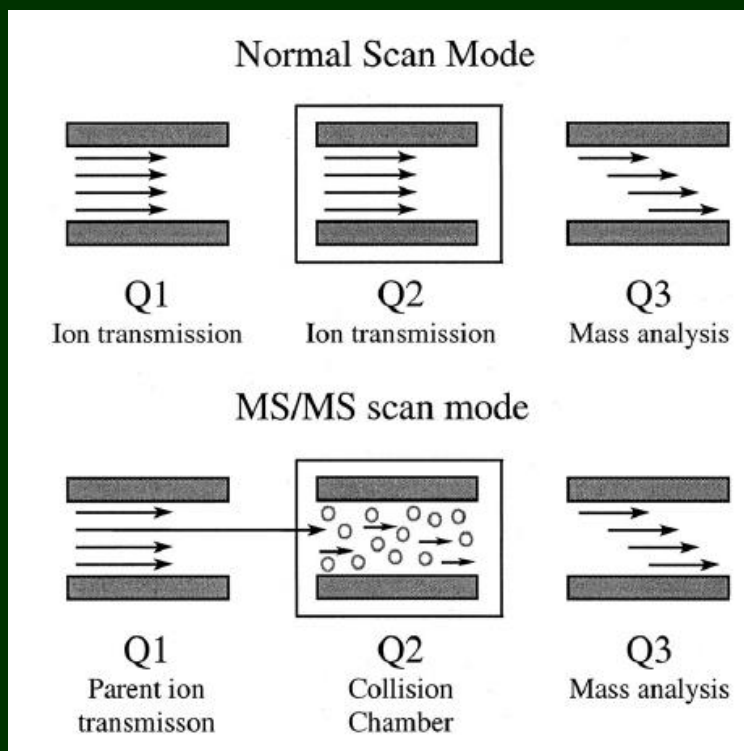
Quadrupole video

[https://www.youtube.com/watch?v=6\\_mavZ](https://www.youtube.com/watch?v=6_mavZ)

[WKoU](#)

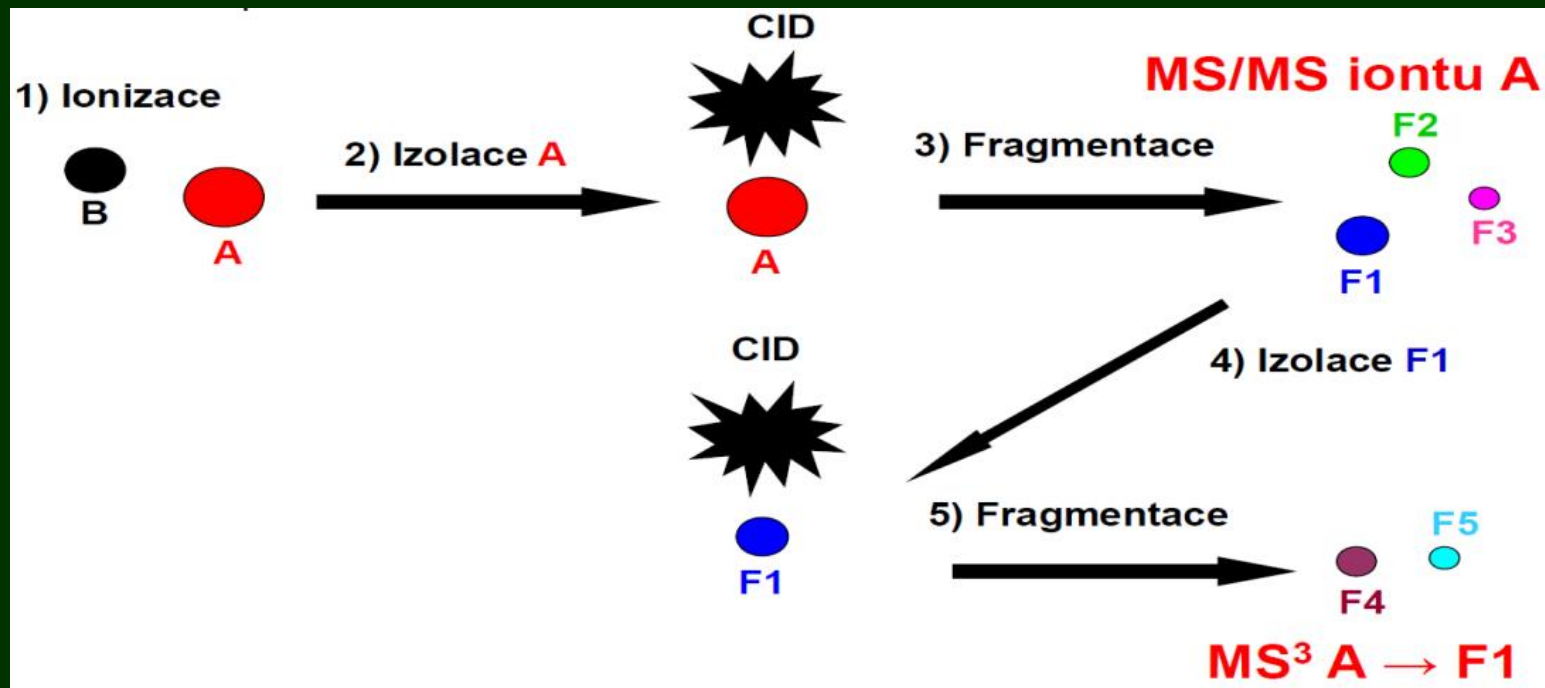
# Trojité kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole, QpQ)

- 3 kvadrupóly řazené za sebou a prostřední z nich (Q2) slouží jako **kolizní cela** se zavedeným **kolizním plynem**, který způsobuje **kolizní excitaci** vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q1 a jejich **následnou fragmentaci**, vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q3.
- na rozdíl od pastí může docházet k opakovaným kolizním excitacím díky opakovaným srážkám iontů (jak prekuzoru, tak i produktového iontu) a kolizního plynu, tzn. pozorujeme více fragmentových iontů než u MS/MS měření s iontovou pastí



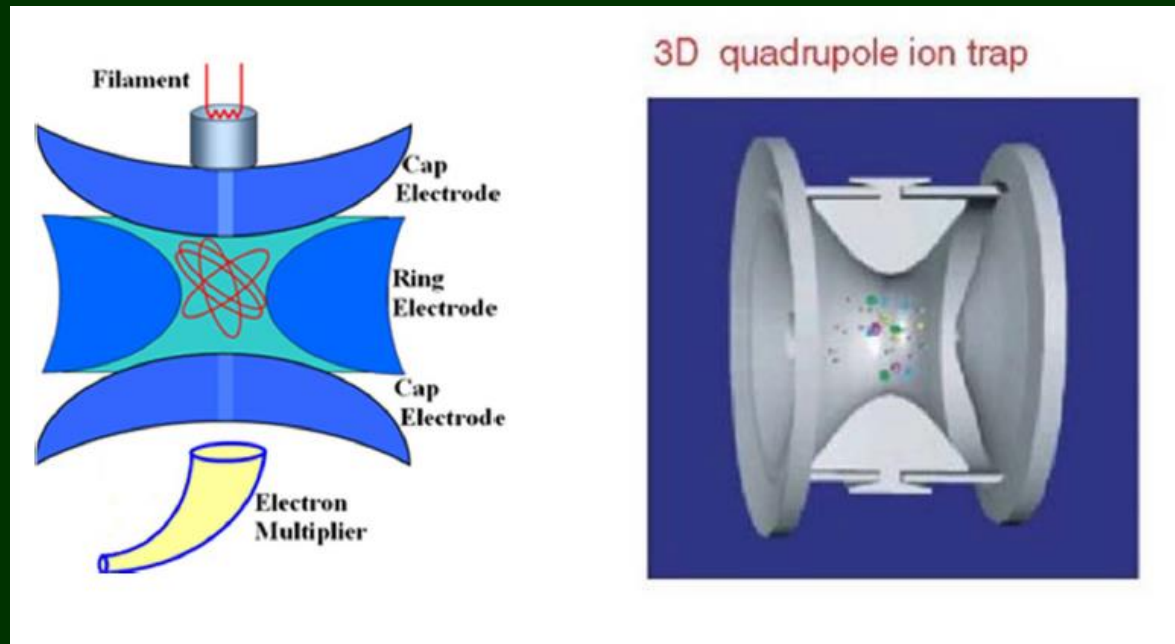
# Tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS za využití Triple Quadropole

- kolizně indukovaná disociace – disociace iontu po kolizní excitaci
- MS/MS: vybraný ion podrobíme excitaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem – tzv. kolizní plyn), čímž může dojít k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty, jejich hmotnostní spektrum změříme (MS/MS spektrum bude obsahovat pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekursoru a žádné nečistoty)



## 3-D iontová past

- iontová past je tvořena prstencovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami, na elektrody je vloženo napětí (3D kvadrupól)
- ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pastí vstupním otvorem koncové elektrody
- vhodnými poměry napětí vloženého na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti (účinnost záchytu přibližně 5%)
- postupnou změnou napětí jsou podle jejich  $m/z$  vypuzovány na detektor výstupním otvorem

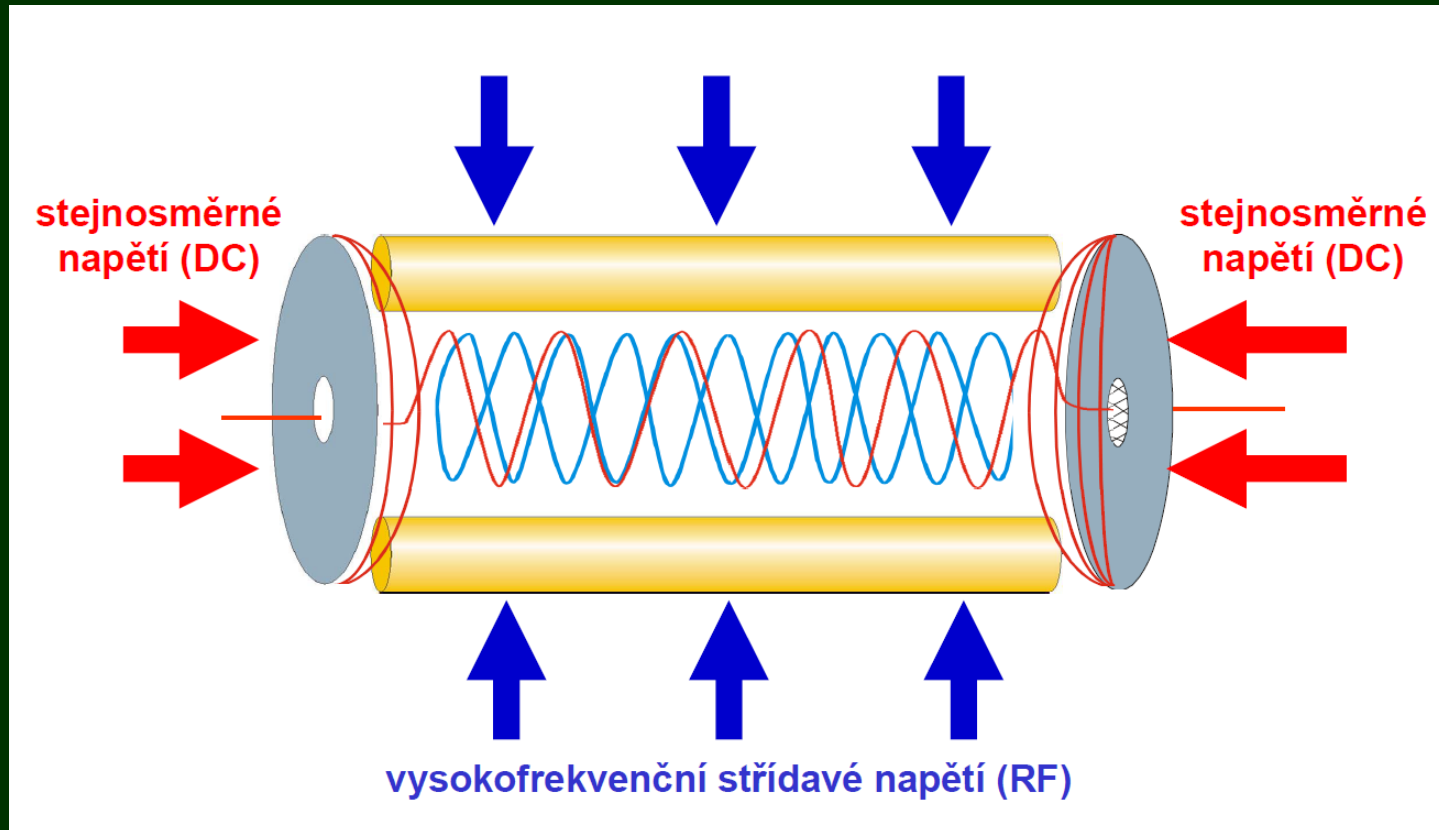


3D ion trap

<https://www.youtube.com/watch?v=3uUwa1DDoHQ>

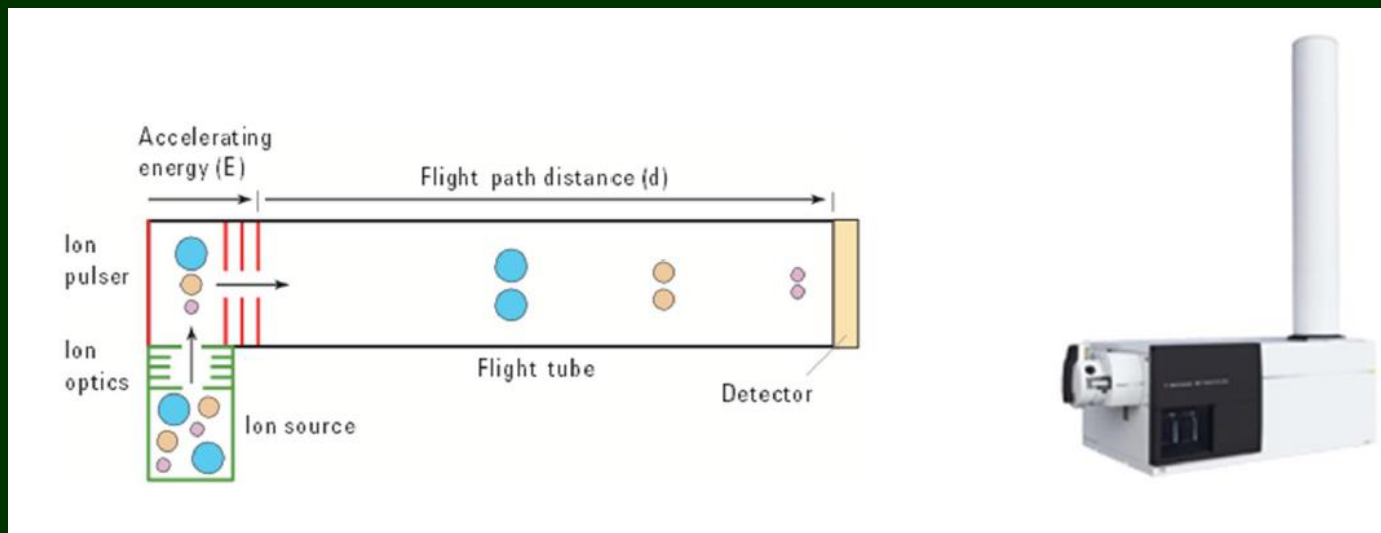
## Lineární iontová past

- jedná se o kvadrupól na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, který umožňuje uchovávání iontů
- vyšší účinnost plnění a detekce iontů
- mohou být přítomny i dva detektory
- ionty mohou být vypuzovány radiálně nebo axiálně



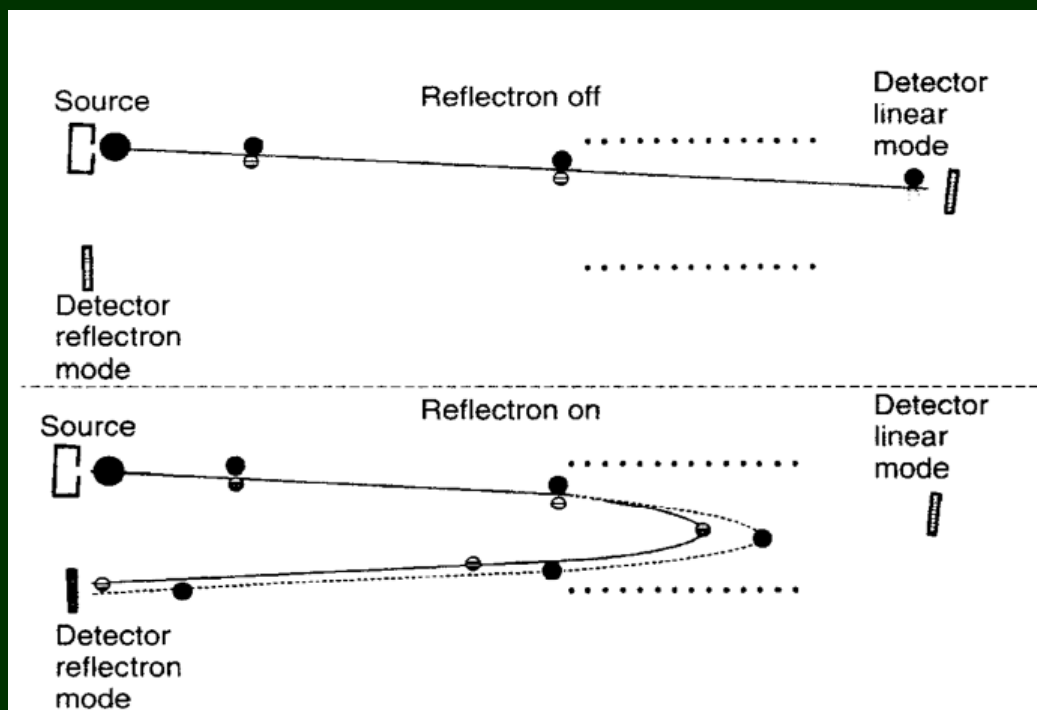
# Analyzátor doby letu

- hmotnostní analyzátor s teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem
- pulzní analyzátor, často s MALDI ionizací
- měří dobu letu iontů potřebnou pro překonání určité dráhy
- ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do letové trubice (oblast bez pole), kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich  $m/z$  a dopadají na detektor v různém čase
- ionty s menší hodnotou  $m/z$  o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor („malé ionty letí rychleji“)
- měření spekter je velice rychlé a hmotnostní rozsah  $m/z$  není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontů (lze  $m/z > 10^6$ )
- typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas (řádově ns-us), za který ionty dolétnou k detektoru, podle čehož se určí jejich  $m/z$ .



## Zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru

- použití např. iontového zrcadla (reflektronu)
- slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou  $m/z$  (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení rozlišovací schopnosti)
- ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole iontového zrcadla před jejich odrazem (oproti iontům s nižší  $E_k$ ), čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší  $E_k$  a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou  $E_k$
- hloubka průniku iontů do elektrického pole zrcadla je úměrná jejich  $E_k$  a nezávisí na  $m/z$



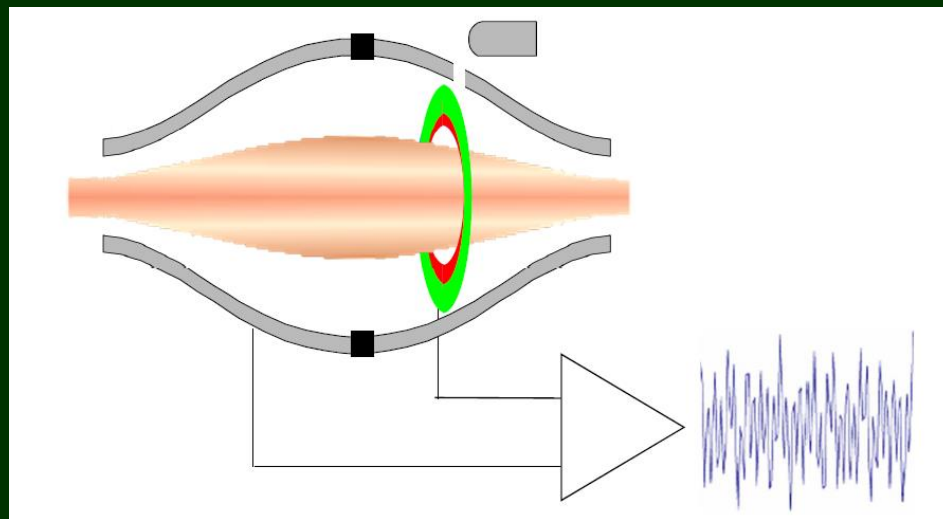
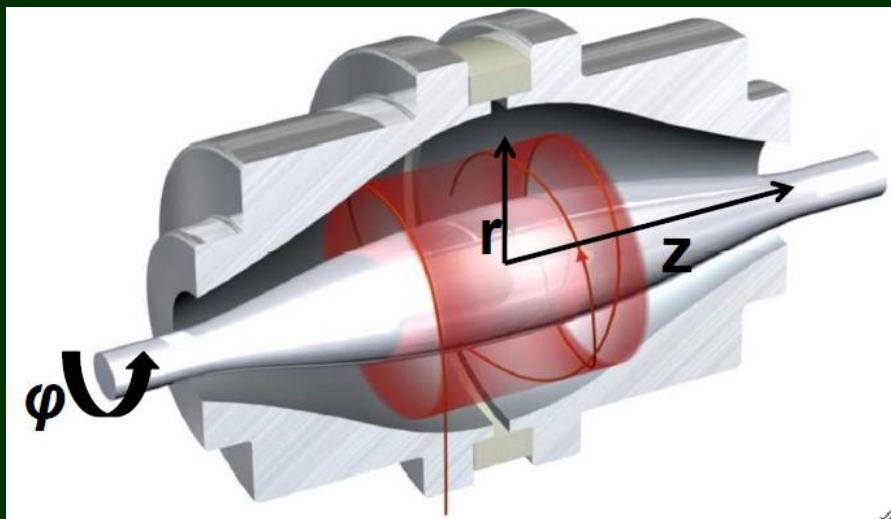


**MALDI-TOF video**

<https://www.youtube.com/watch?v=0jeFpXHZ8W0>

## Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- nejnovější typ hmotnostního analyzátoru popsán ruským fyzikem Makarovem v r. 2005
- skládá se z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je vloženo napětí
- ionty se pohybují okolo a podél středové elektrody
- frekvence v ose z je nepřímo úměrná odmocnině z  $m/z$
- úzký svazek iontů s určitou hodnotou  $m/z$  vstupuje do elektrického pole
- zvyšující se napětí stlačuje ionty
- stabilizuje se napětí a následně se stabilizují i trajektorie iontů
- úhlové rozšíření vytvoří rotující prsteneček iontů podobně jako prstence u planet



Q-Exactive

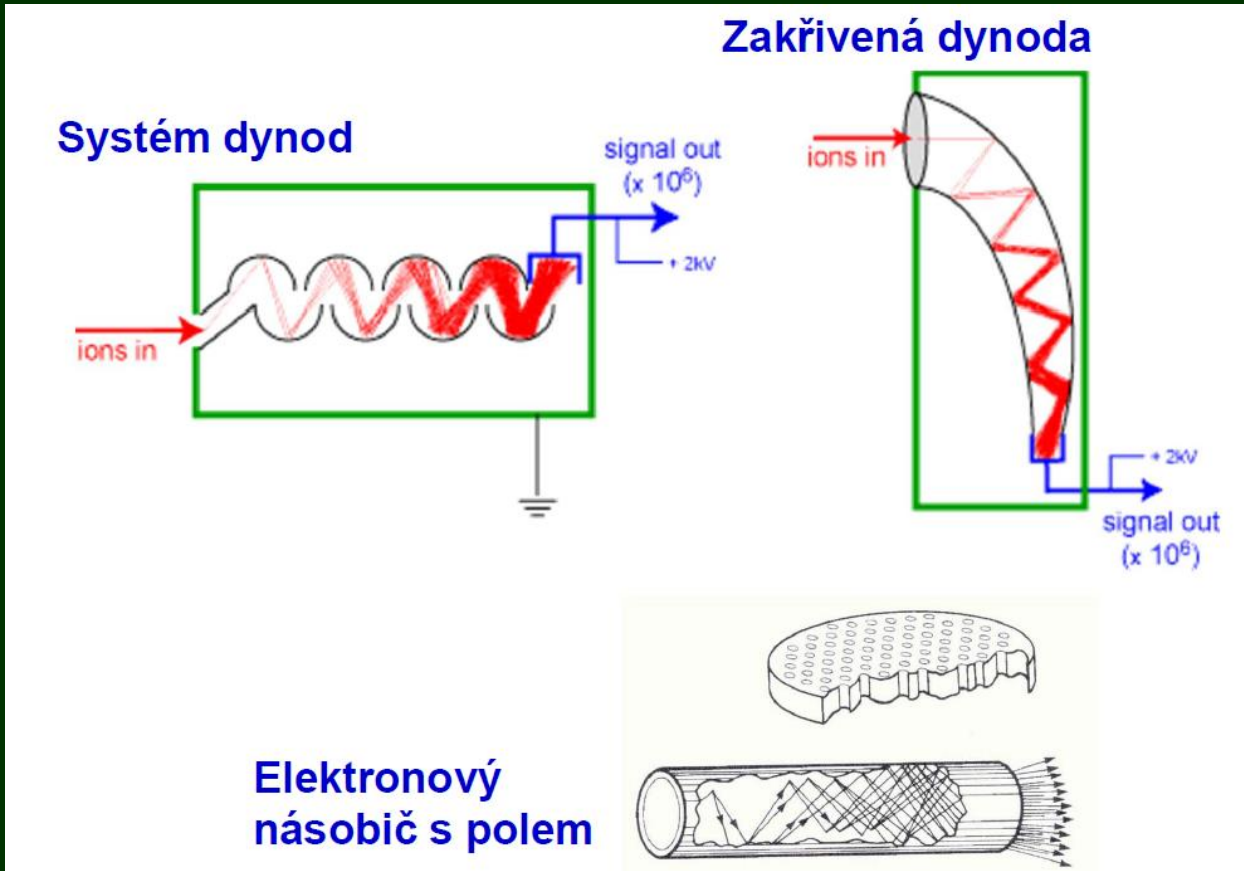
<https://www.youtube.com/watch?v=K1VSYjuw6os>

## Detekce iontů

- detektory iontů používají všechny analyzátory kromě FTICR a Orbitrap, kde je v analyzátoru prováděna zároveň detekce
- ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů
- tvorba sekundárních elektronů, které se následně zesilují
- indukce proudu po dopadu iontů

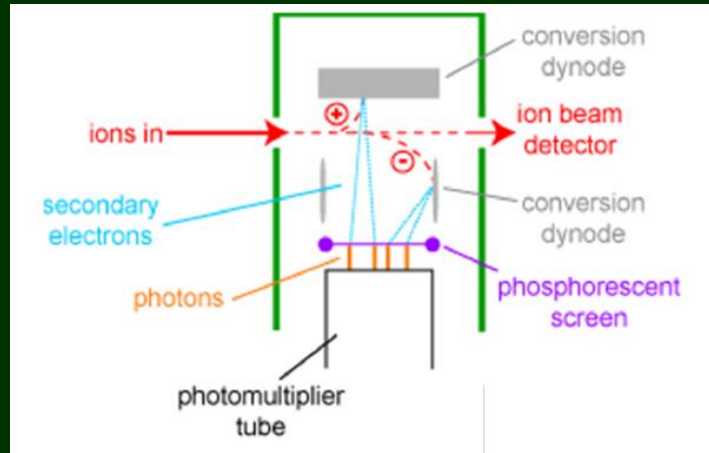
# Detekce iontů

1. elektronový násobič – nejběžnější, ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektrony, ty jsou dále zesíleny systémem dynod nebo opakovanými kolizemi na průběžně zakřivené dynodě, zesílení až  $10^8$  krát

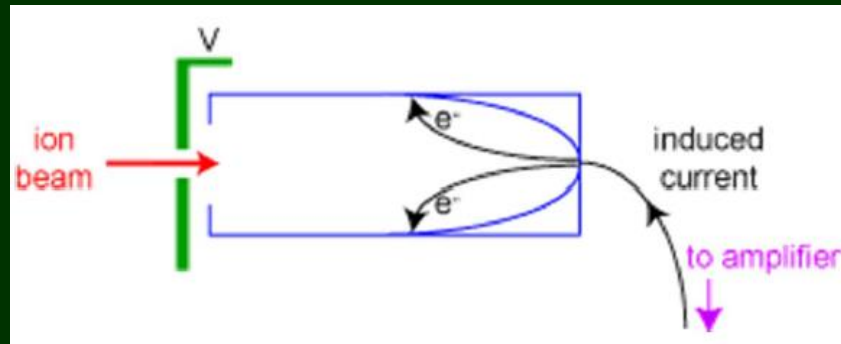


# Detekce iontů

Fotonásobič – ionty dopadají na konverzní dynodu, uvolní se elektrony, dopadem na fosforovou destičku uvolní fotony, které se zesílí ve fotonásobiči, zesílení až  $10^5 - 10^7$  krát, delší životnost



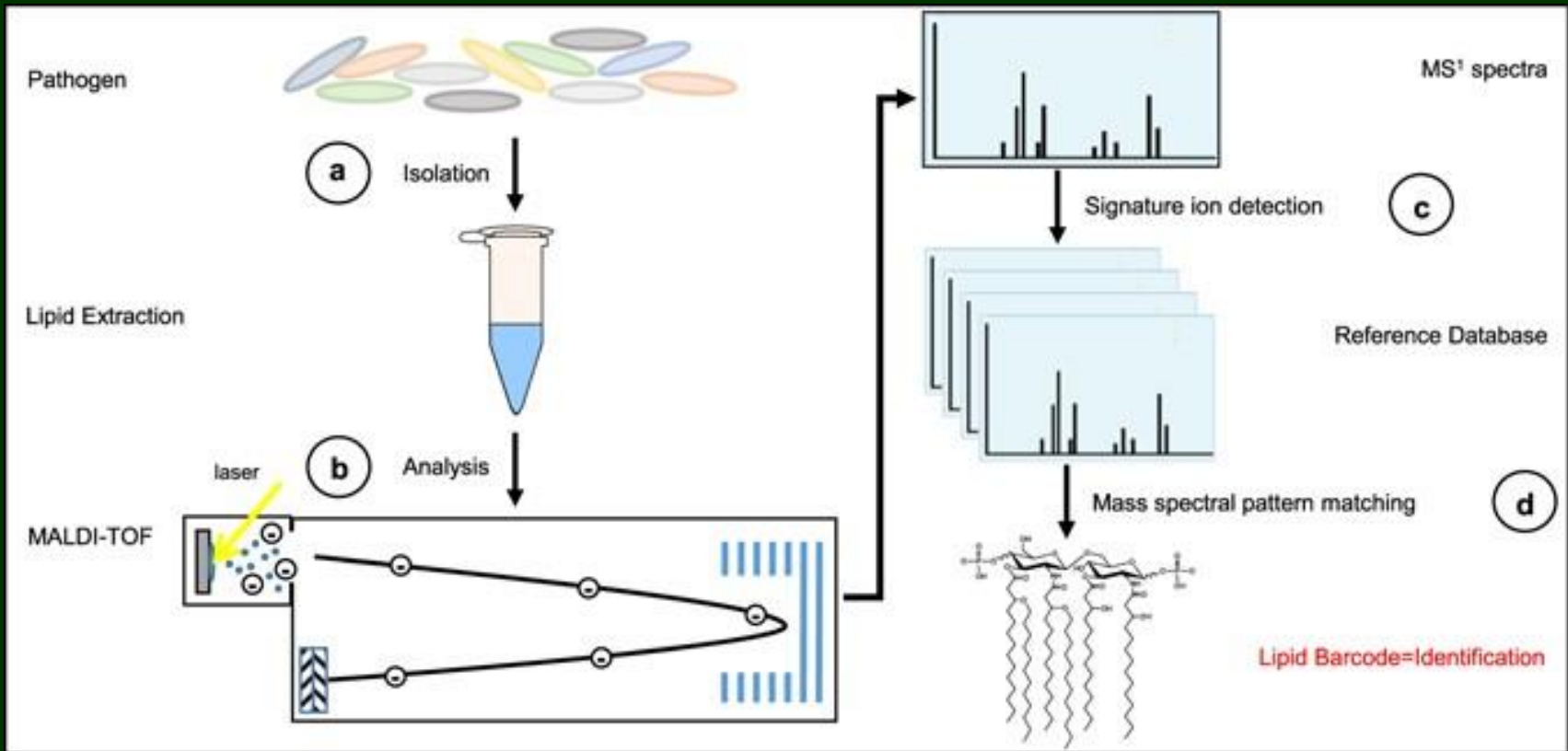
Faradayova klec – dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje elektrony a indukuje se proud, který je následně zesílen a zaznamenán, málo citlivý, ale robustní, velmi přesné na izotopická měření



## Spojení MS a separačních technik

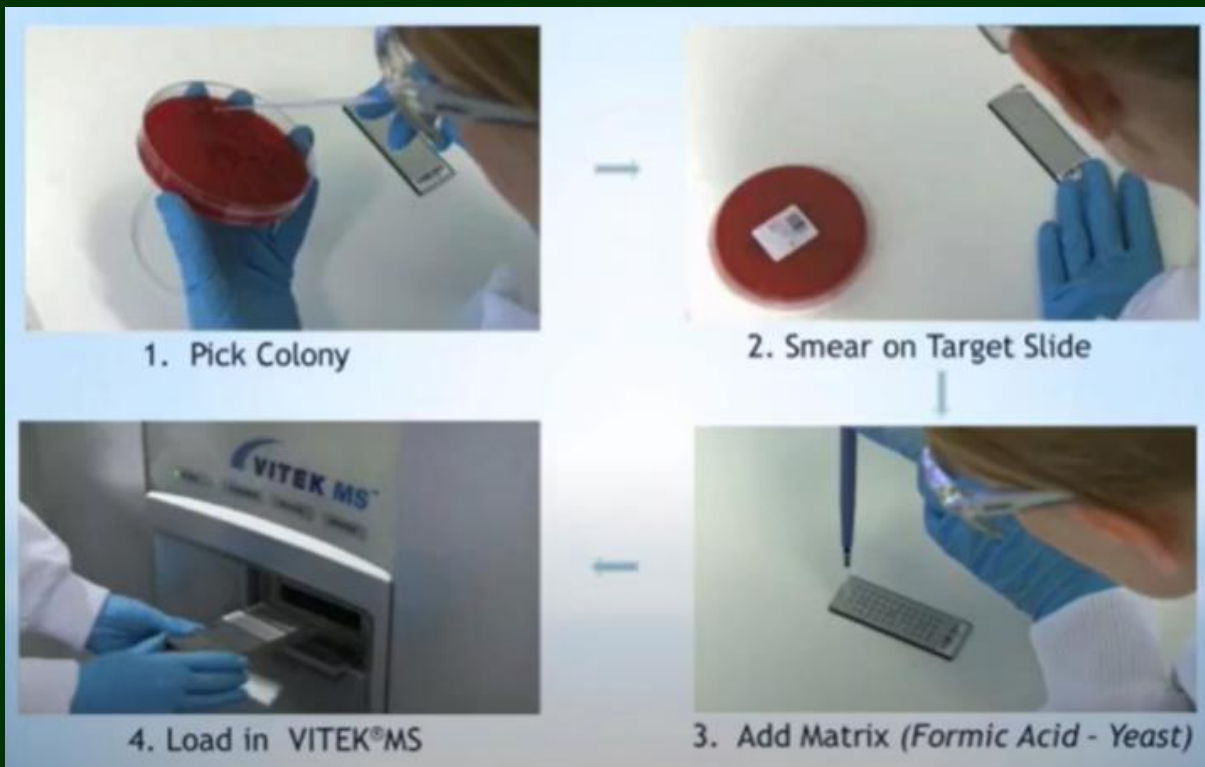
- Proč spojení? Můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek, kombinace výhod obou technik
- Nejčastější spojení s plynovou chromatografií (GC-MS) a kapalinovou chromatografií (HPLC-MS)
- Hlavně pro analytickou chemii

# Identifikace bakteriálních patogenů pomocí MALDI-TOF MS



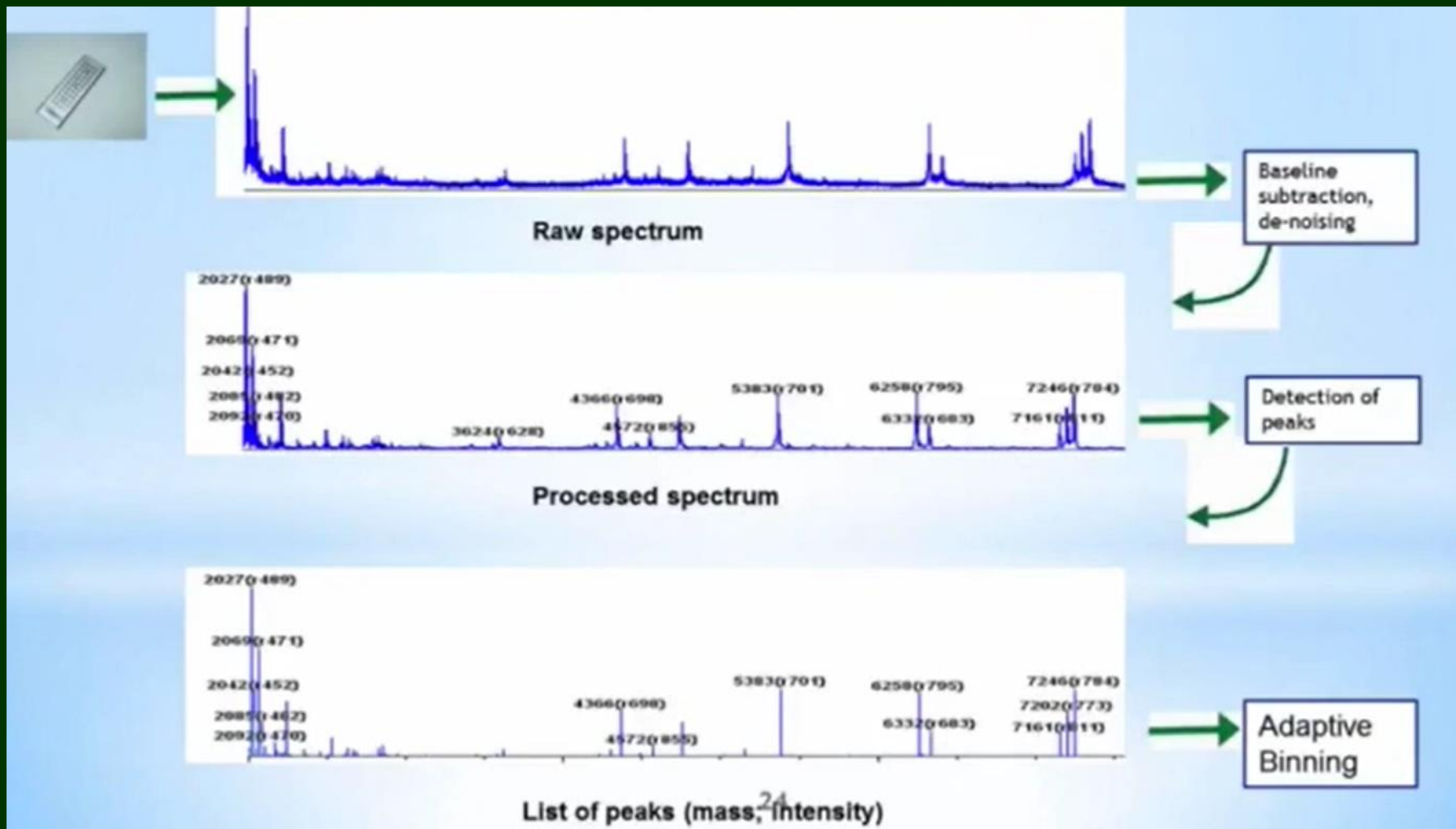
# Využití MALDI-TOF MS pro identifikaci/diagnostiku bakteriálních patogenů

- identifikace se provádí z kolonií získaných kultivací na agarovém médiu
- přenesení kolonií na MALDI terčik
- zakápnutí rozetřené kolonie kapkou matrice (bakterie: alfa-cyanohydroxyskořicová kyselina, kvasinky: kyselina mravenčí)
- nanést na terčik pozitivní kontrolu (ref. bakterie, E.coli...) a negativní kontrolu (matrix)
- zaschnout, vznik směsného krystalu
- vložení do přístroje, změření MS spektra

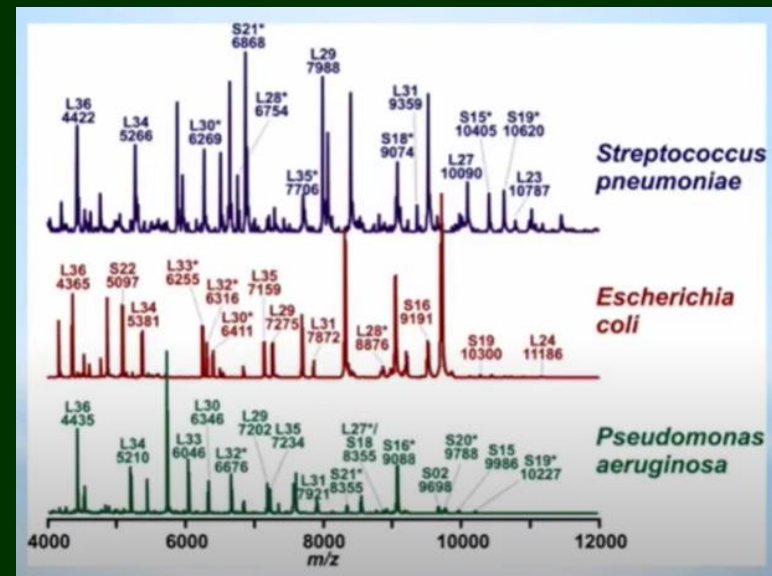
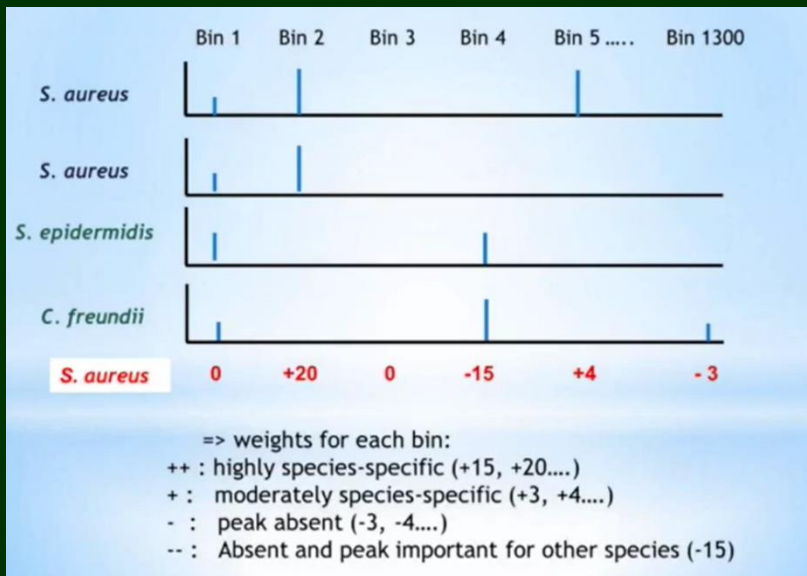




- MS poskytné raw spektrum, které je třeba normalizovat a zbavit šumu (= denoising)
- takto zpracované spektrum poskytuje přehled klíčových píků potřebných k další analýze

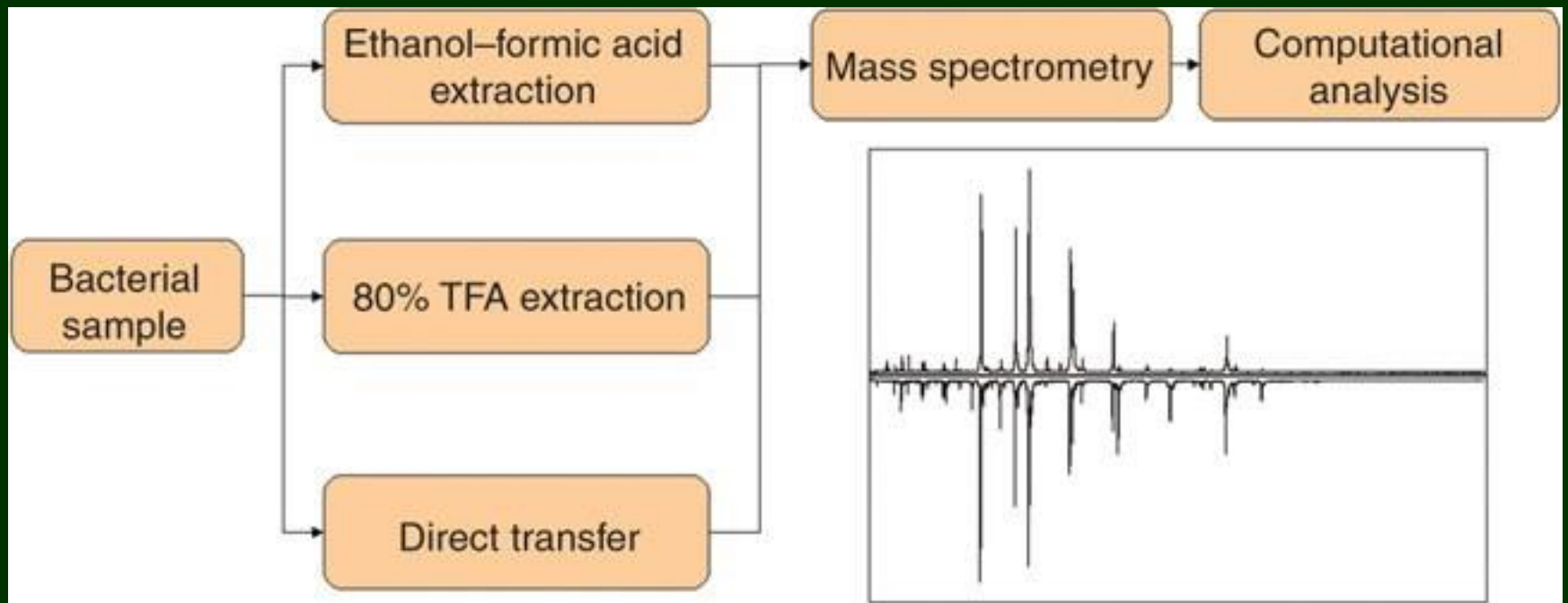


- při identifikaci jsou získaná spektra srovnávána se spektry jednotlivých druhů v db
- každý bakteirální druh je charakterizován jedinečným MS spektrem
- většina MS píků pochází z ribozomálních proteinů, nevíce abundatní
- pro rutinní diagnostiku není třeba jednotlivé peptidy/proteiny identifikovat, nutno je získat jedinečné MS spektrum analogické molekulárnímu paternu/fingerprintu

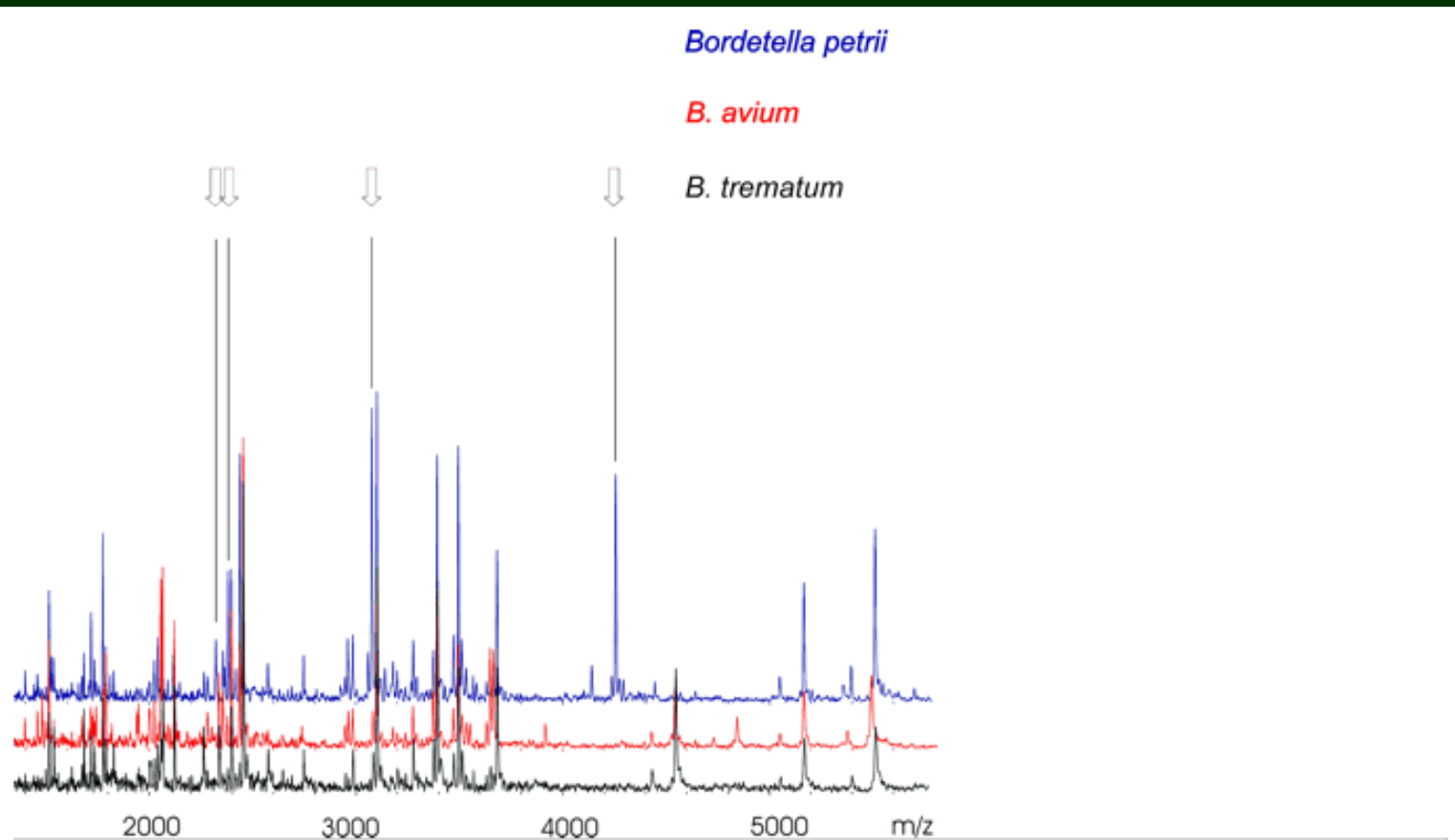


- Biotyper library – 3740 reference spectra
  - $\geq 2.0$  = species identification
    - 10% difference between species from next most closely related spectrum required
  - 1.7–1.999 = genus identification
  - $< 1.7$  = no identification
- Comparator: Phoenix
- Discrepant analysis: Conventional biochemicals +/- 16S rRNA gene & *gyrB* sequencing

# Identifikace bakteriálních patogenů pomocí MALDI-TOF MS



# Identifikace různých druhů v rámci rodu *Bordetella* pomocí hmotnostní spektrometrie



**Figure 6**

Overlay of mass spectra of *B. petrii* (blue), *B. avium* (red), and *B. trematum* (black). Peaks specific for *B. petrii* are marked by the arrows. For display, mass spectra were smoothed by a five-point average (Savitzky–Golay method) and baseline-subtracted.

# Využití hmotnostní spektrometrie k identifikaci bakteriálních druhů

MS spektrum E. coli  
NBRC 3972

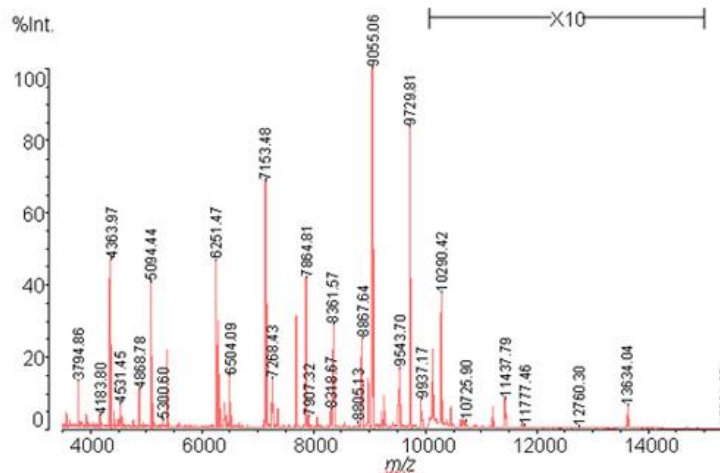


Fig. 1 MS Spectrum of Escherichia coli NBRC 3972

Fig. 2 shows the MS spectra of various bacteria. As the mass spectrum differs according to the bacteria, this method can be used to differentiate between bacteria.

Srovnání spekter  
různých bakteriálních  
druhů

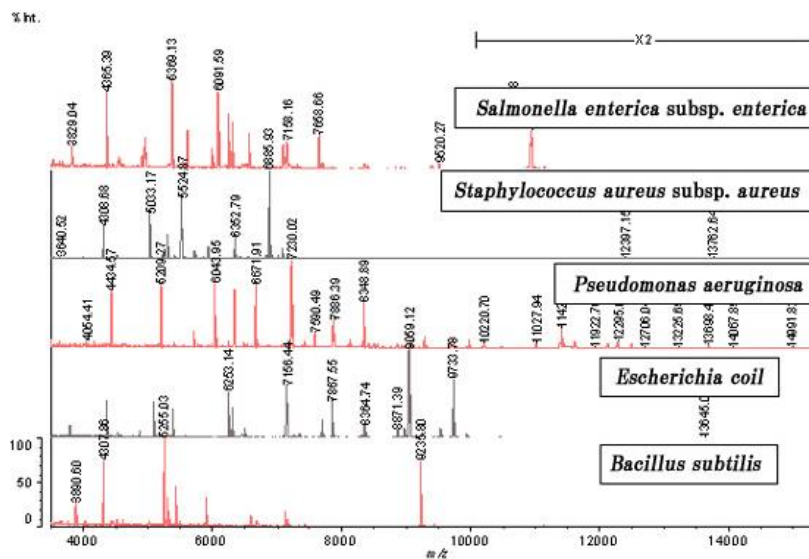
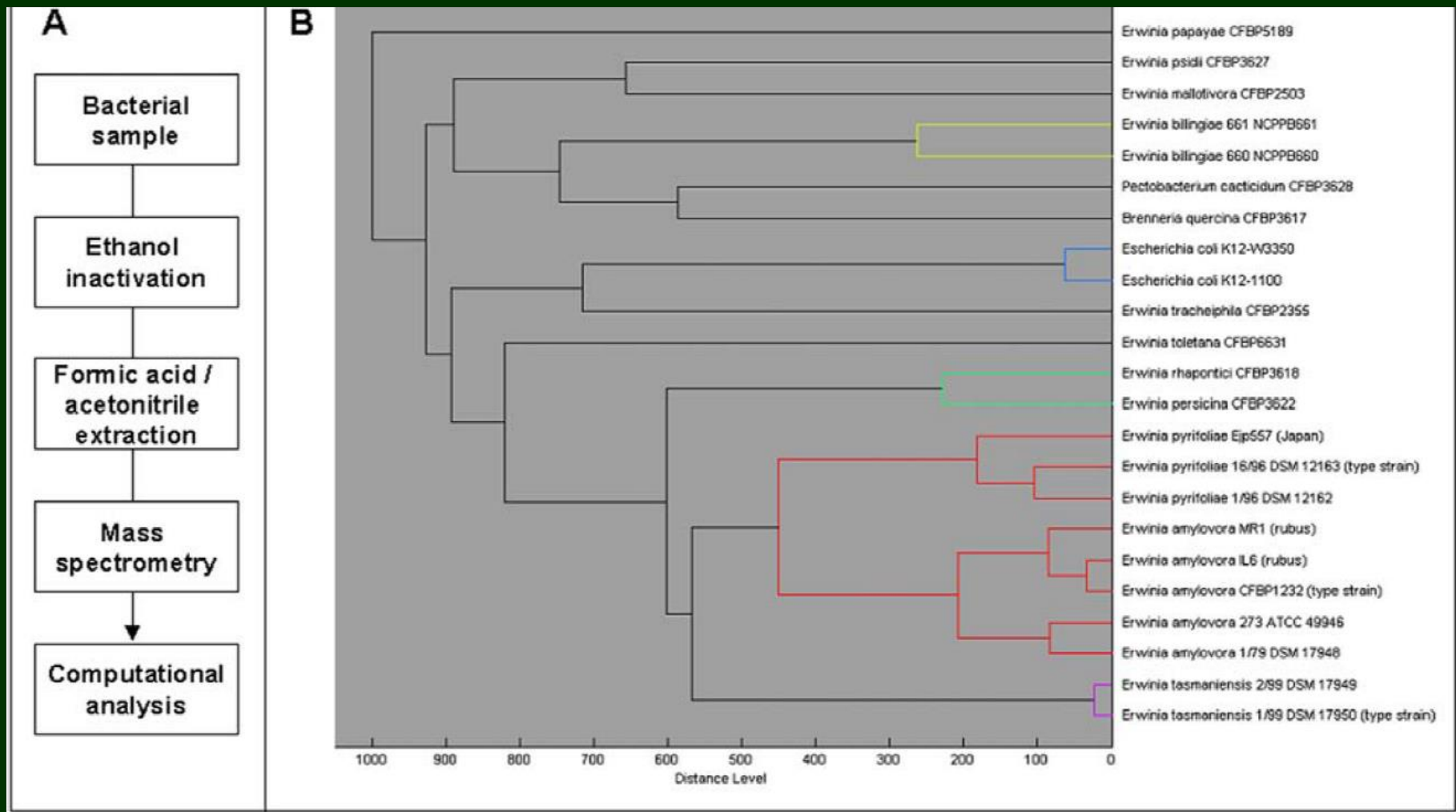


Fig. 2 Comparison of MS Spectra for Bacteria Species



**Figure 1. A: A general scheme of the procedure. Bacterial colonies are subjected to chemical treatment. Samples can be analyzed within a few minutes by MALDI mass spectrometry and mass spectra are transferred to analysis and identification software. B: Classification of bacteria. Based on the protein mass patterns, bacterial strains can be clustered hierarchically. A dendrogram generated by this approach including a comprehensive set of *Erwinia* type strains was displayed. Species with distance levels over 500 had completely different mass signal patterns. Comparison of spectra of these species for a distance measure was thus uninformative. Strains clustering with distance levels lower than 500 could be classified up to the species and partially to subspecies level. The limit of resolution was set by the distances derived from measurement variability.**



# Conclusions

- ✓ MALDI-TOF identification of bacteria/yeasts represents a low reagent cost, high specificity, reduced turn-around time method for bacterial identification
- ✓ The clinical trial for the VITEK<sup>®</sup>MS showed a high level of species identification accuracy for multiple clinically relevant species of bacteria and yeast
- ✓ Integrating MALDI-TOF into the Anaerobic Bacteriology bench can have a dramatic effect on patient care while saving valuable bench time
- ✓ Its important to develop a well thought out plan for MALDI on each bench to maximize efficiency
- ✓ This technology does not supersede the expertise of trained microbiologists
- ✓ Gram staining, colony morphology, and limited biochemical testing need to be used to identify errors