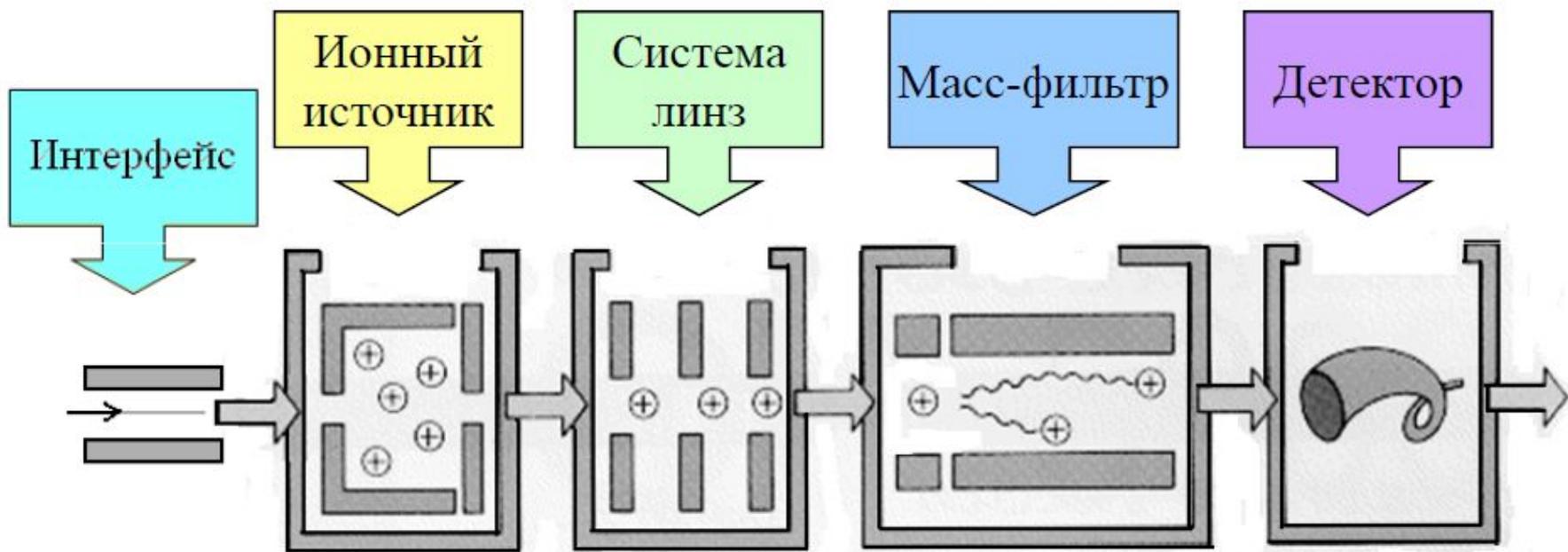


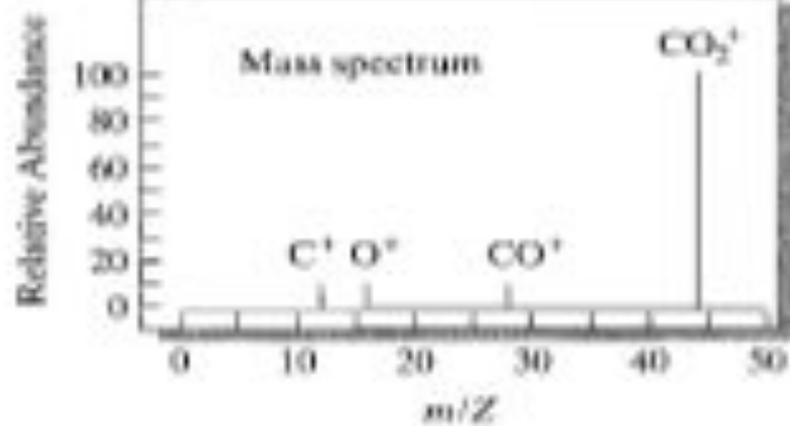
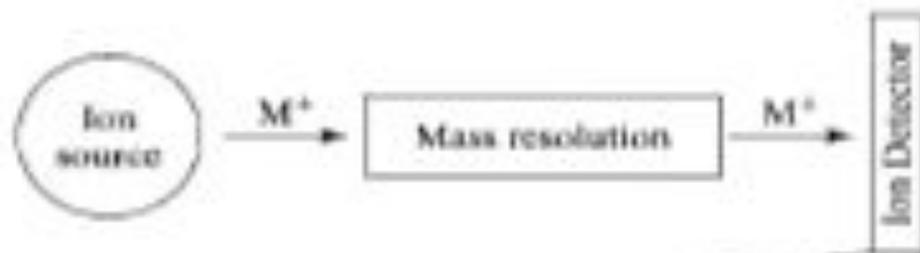
Масс-

спектрометрия

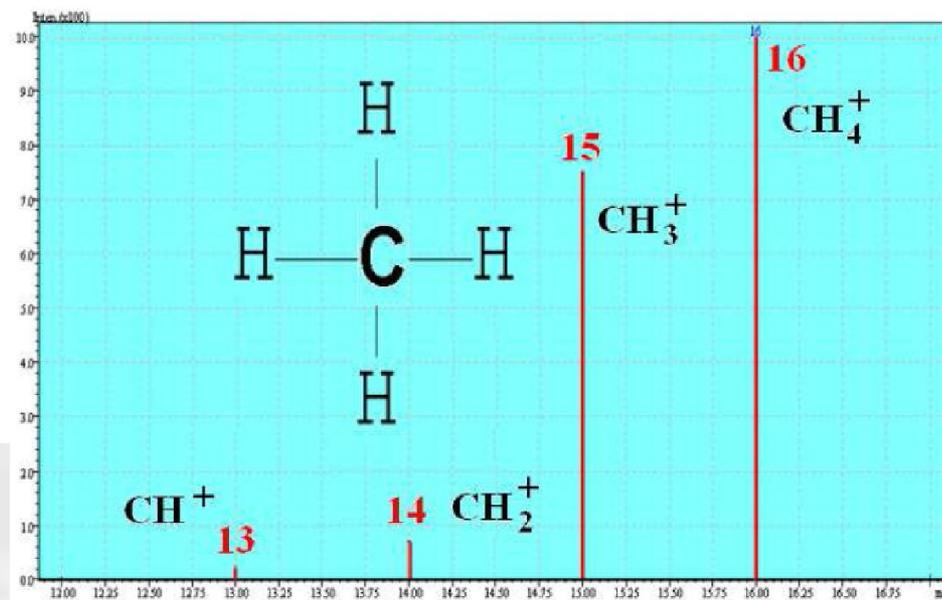
Физический метод детекции и идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду (m/z) в ионизированном состоянии. Для этого используются законы движения заряженных частиц в магнитном и электрическом полях.

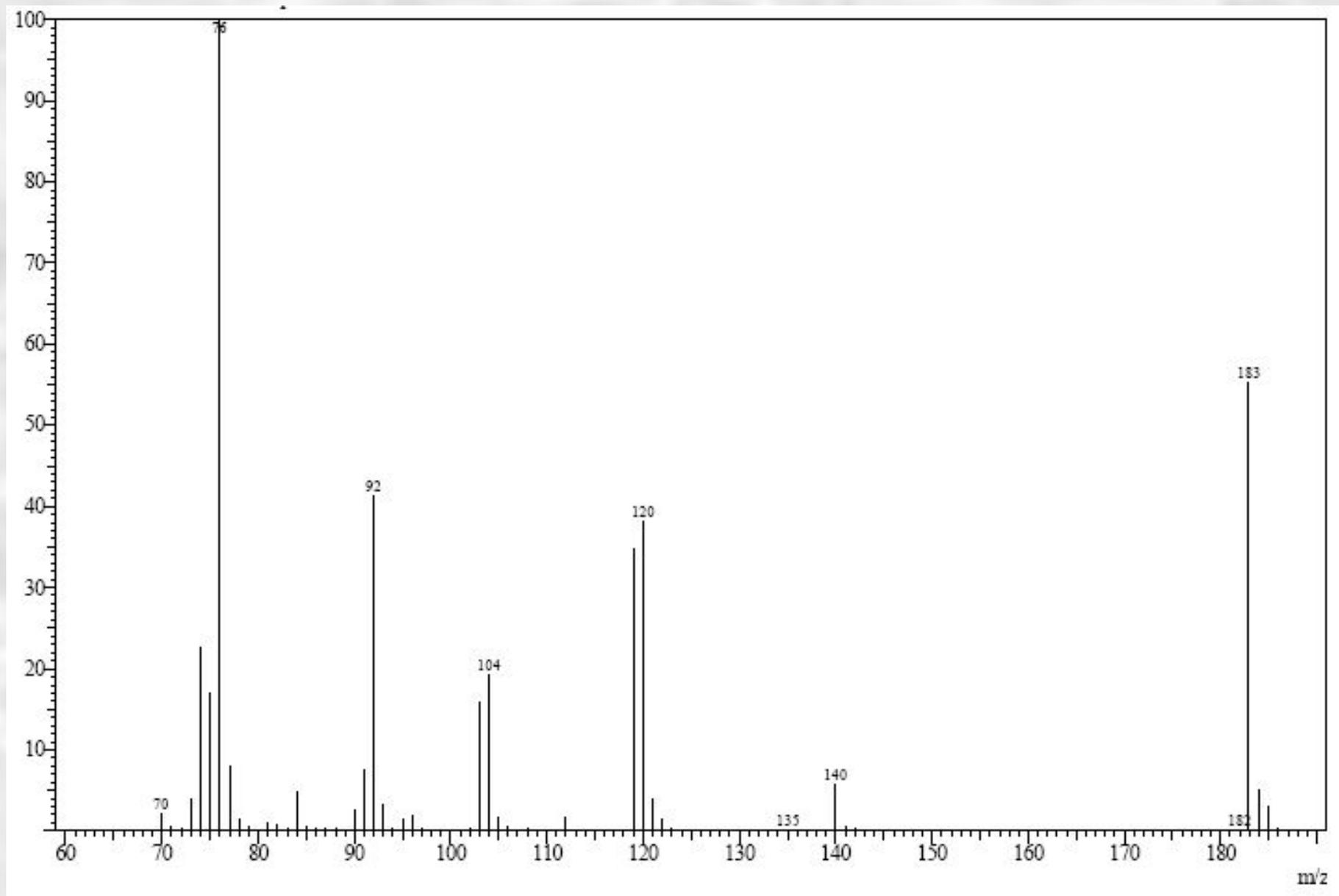
Непосредственно детектирует сами частицы вещества





Метан (м.в. 16)





Масс-спектр имида 2-сульфобензойной кислоты

Методы ионизации

В газовой фазе

- электронная ионизация (EI)
- химическая ионизация (CI)

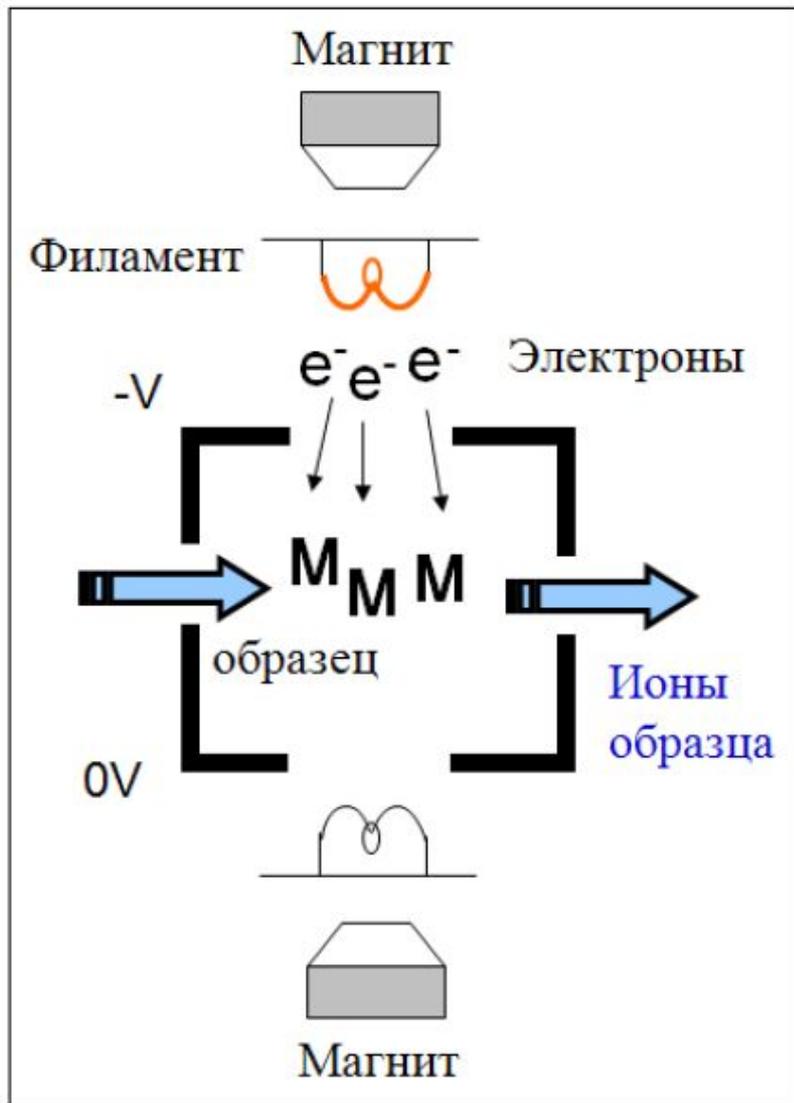
В жидкой фазе

- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
- ионизация электрораспылением (ESI)

В твердой фазе

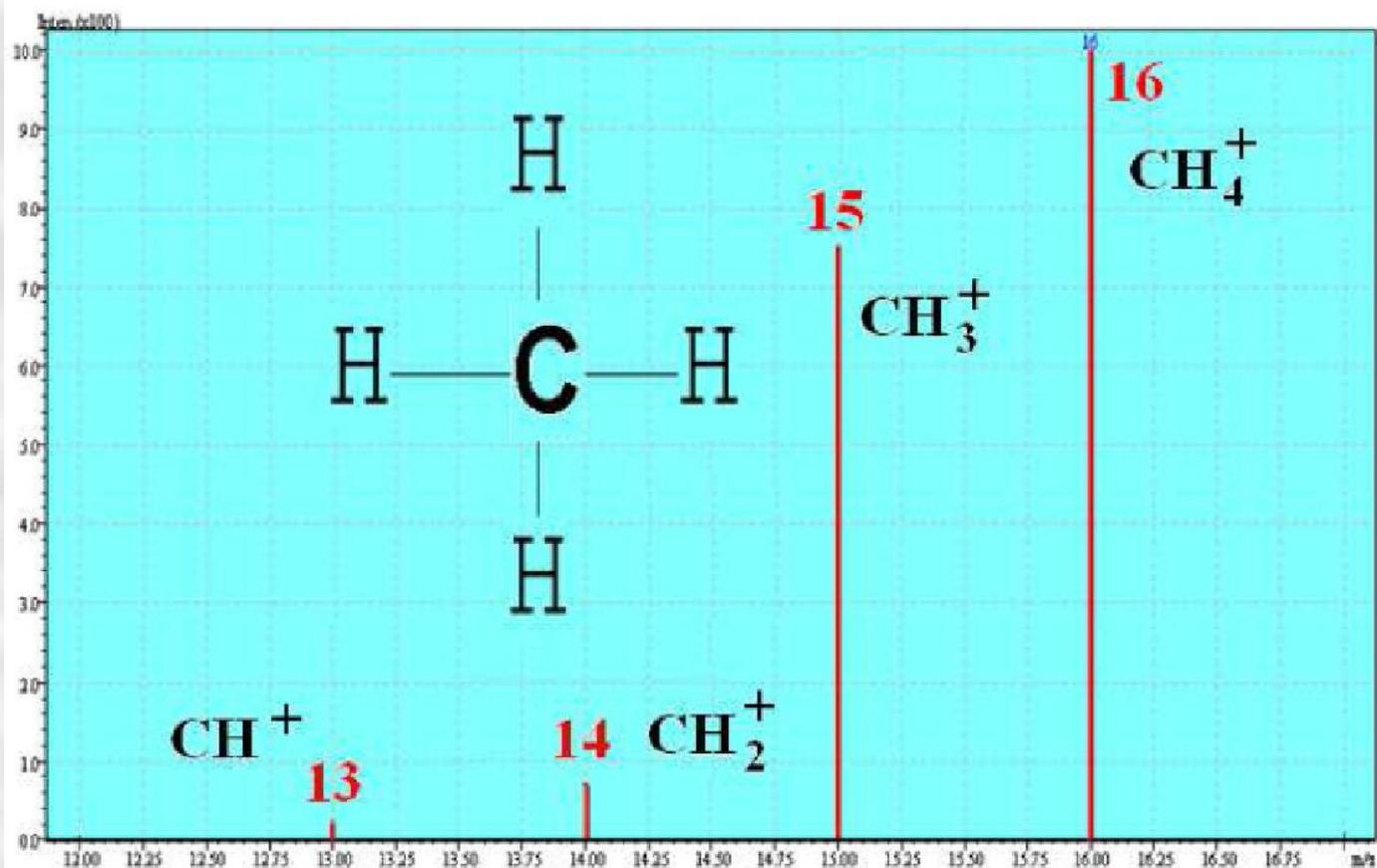
- лазерная десорбция-ионизация из матрицы (MALDI)

Ионизация электронным ударом (электронная ионизация - EI)



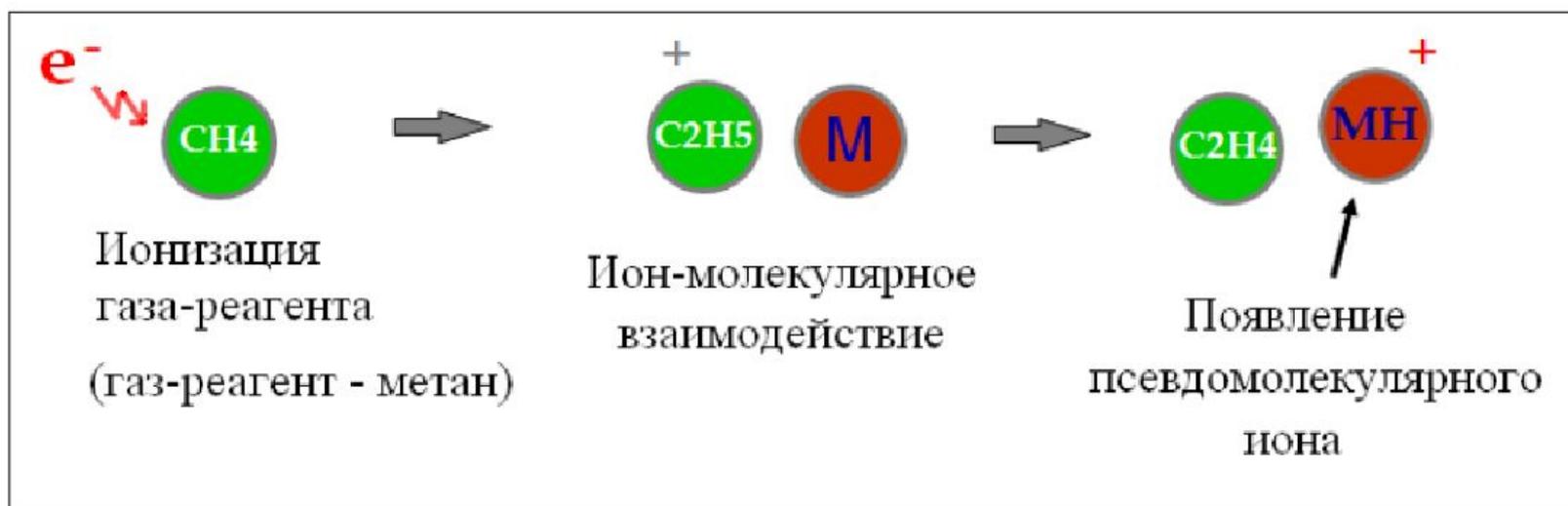
- Основной процесс при EI:
 $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
- Является **наиболее часто** используемым способом ионизации
- Открытый ионный источник
- В источнике генерируются молекулярные и фрагментарные ионы
- $V - 0V = 70эВ$ напряжение ускорения, которое определяет кинетическую энергию электронов

Метан (м.в. 16)



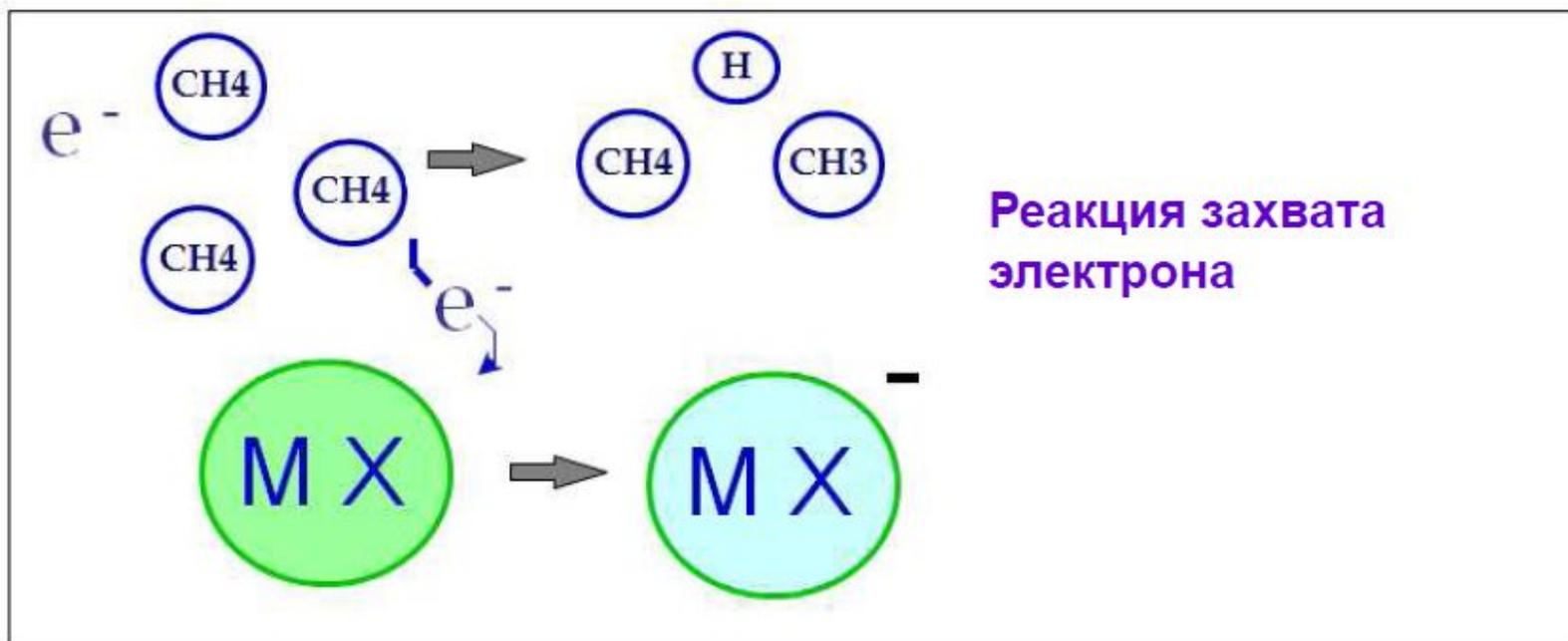
Химическая ионизация (CI)

- Используется газ-реагент (метан)
- Закрытый ионный источник (давление примерно 10 Па)
- Низкая фрагментация (мягкая ионизация)
- Главная задача получить псевдомолекулярный ион (например MH^+)
- Метод эффективен для определения молекулярной массы

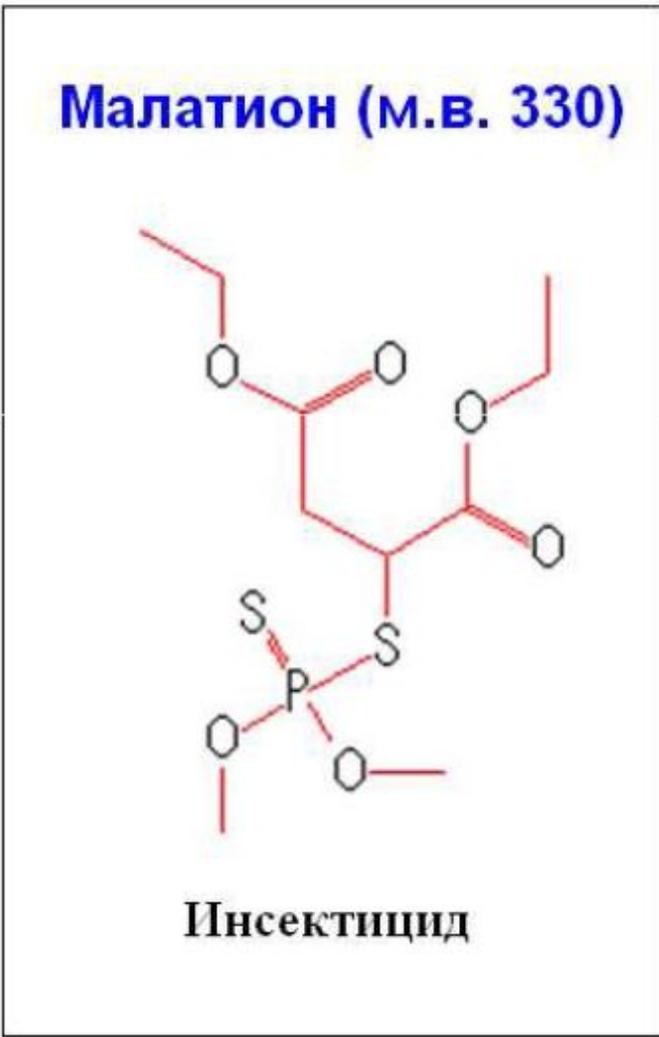
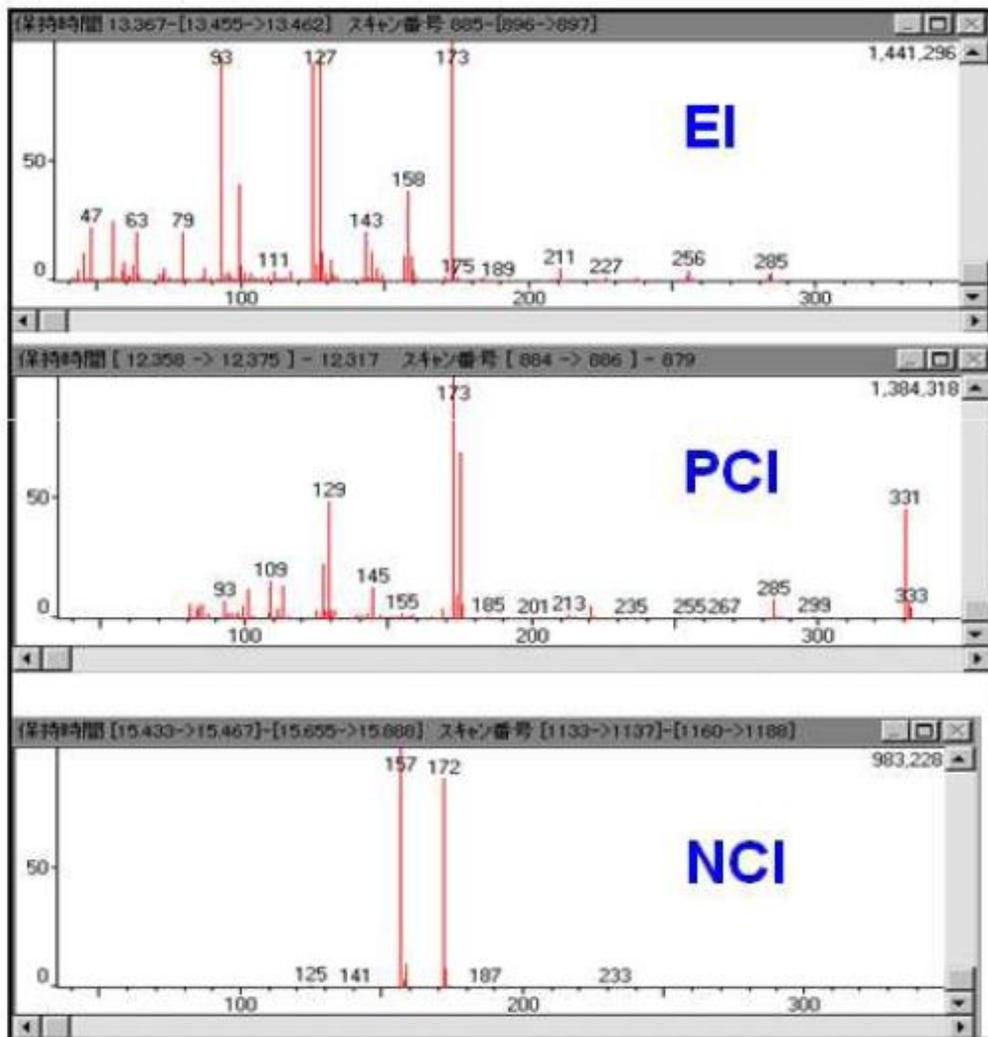


Отрицательная химическая ионизация (NCI)

- Требуется газ-реагент
- Полузакрытый источник ионов (давление примерно 1 Па)
- Невысокая фрагментация (мягкая ионизация)
- Высокая чувствительность для соединений, имеющих высокое сродство к электрону (галогенорганика)



Сравнение масс-спектров, полученных при различных способах ионизации



Библиотеки масс-спектров веществ

- **NIST**
- **WILEY**
- **PFLEGER-MAURER-WEBER**

Режимы получения данных

SCAN

Детектирование всех ионов в заданном диапазоне масс

(регистрация масс-спектров)

Режим используется для идентификации соединений

SIM

Детектирование ионов только выбранных масс

Для повышения чувствительности и количественных определений

Методы ионизации веществ в жидкой фазе

Электроспрей (ESI)

- Вещества от средне- до сильнополярных (лекарственные препараты, наркотики, пептиды, протеины).
Распыление элюента с пробой из иглы. Электроионизация (0.001-1 мл/мин).

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

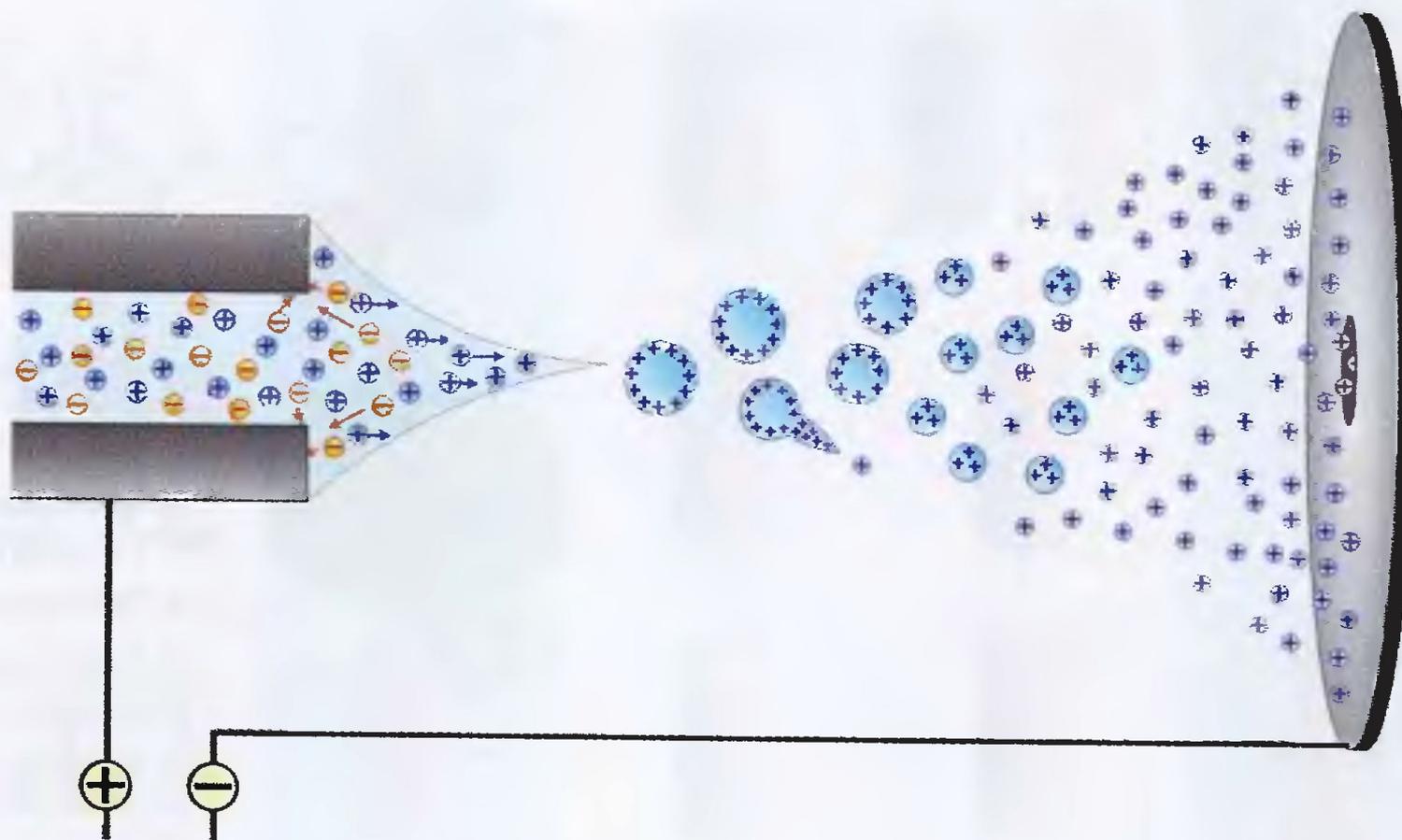
- Вещества от низкой до средней полярности (пестициды, стероиды).
Распыление нагретого элюента с пробой из иглы. Коронный разряд. Ионы растворителя, как реагент химической ионизации.
Вторичная ионизация (0.05-2 мл/мин).

Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

Метод ионизации электрораспылением позволяет вводить образец непосредственно в ионный источник или с предварительным разделением его при прохождении через колонку жидкостного хроматографа. Поток жидкости (см. рис. 1.4 на цветной вставке) направляется в иглу диаметром 0.1 мм, на которую подается высокое напряжение порядка 3–7 кВ. На выходе из

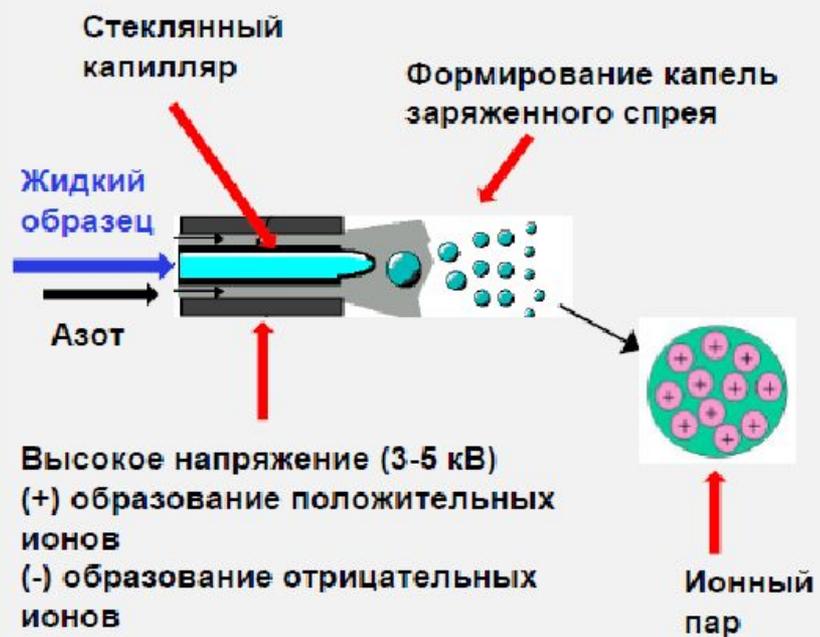
иглы в источнике ионов образуется аэрозоль из заряженных капель с высоким поверхностным зарядом. Эти капли движутся к противоэлектроду, имеющему потенциал Земли. В том же направлении уменьшается и давление, хотя в этой части ионного источника (до противоэлектрода) давление поддерживается на уровне атмосферного. По мере движения к входному отверстию первого сепаратора капли уменьшаются в размере за счет испарения растворителя. Достигая критического размера, при котором силы поверхностного натяжения далее не могут противостоять силам кулоновского отталкивания (предел Релея), капля «взрывается» с образованием более мелких капелек. Этот процесс повторяется. В итоге возникают микрокапли, содержащие всего одну заряженную частицу, которая может оказаться в газовой фазе после испарения остаточных молекул растворителя (*J.F. Mora et al., 2000*).

Ионизация электрораспылением

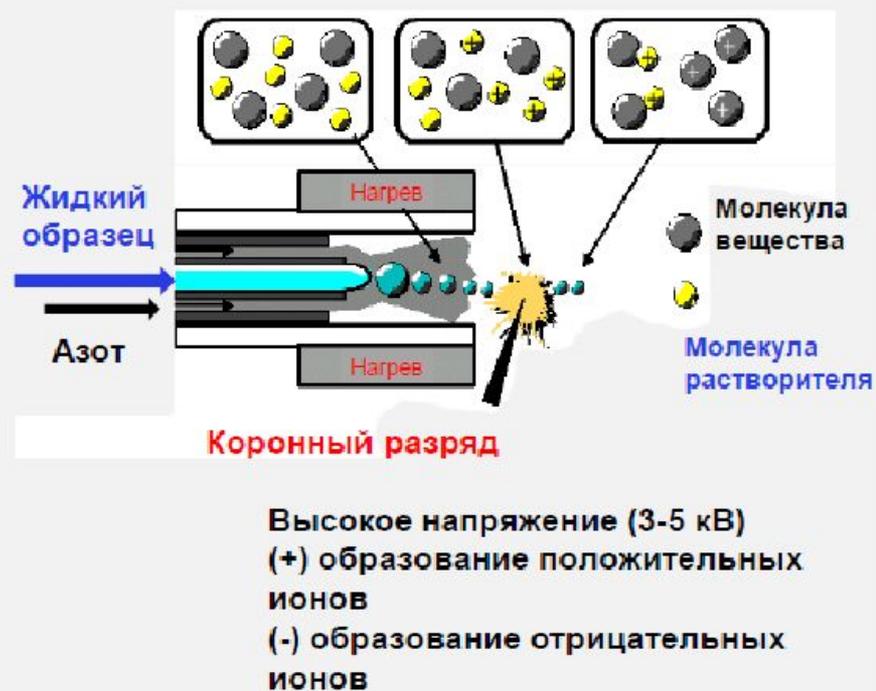


Точки приложения
напряжения

ESI (электроспрей)



APSI



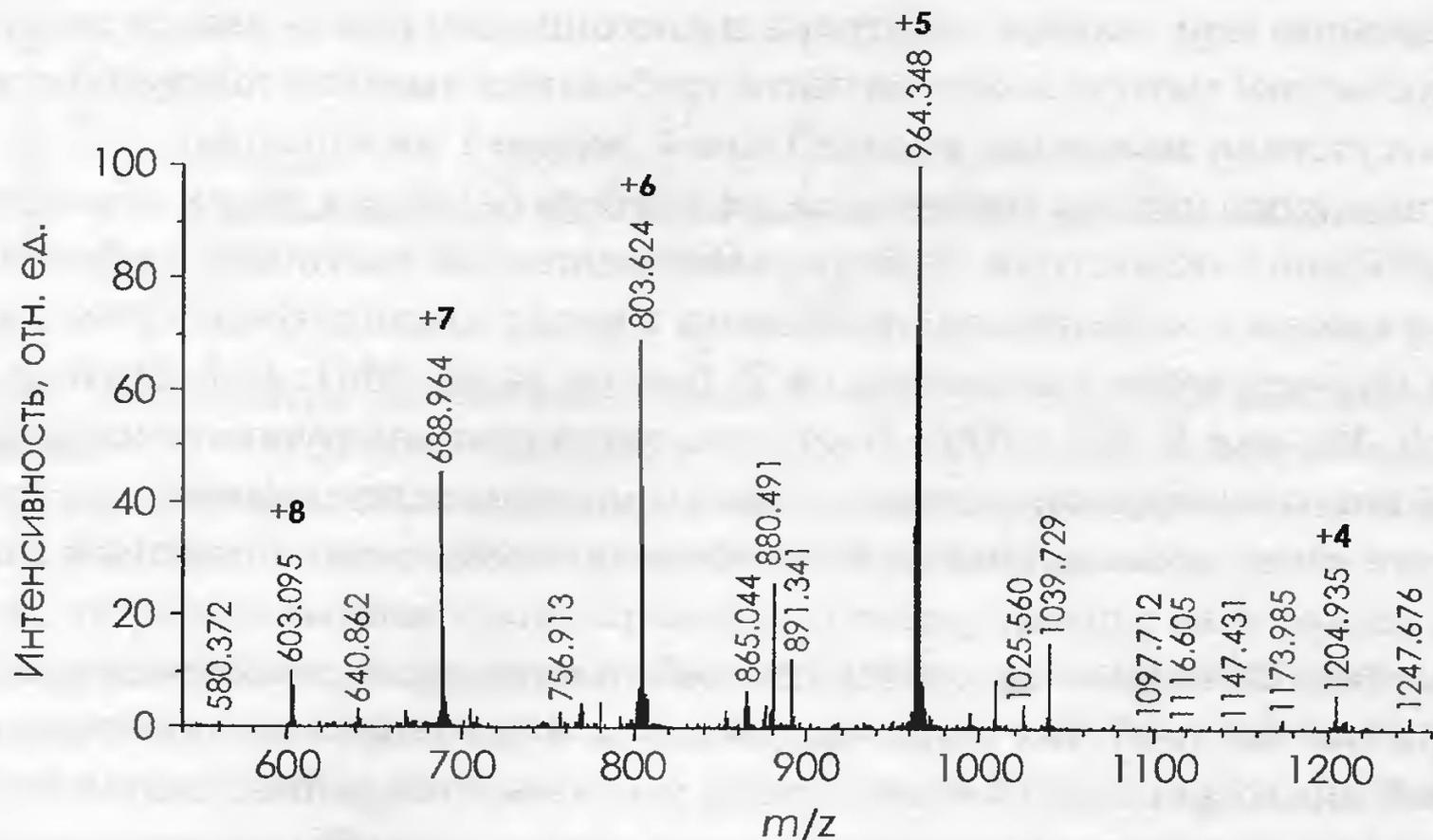


Рис. 1.5. Многозарядные ионы, образующиеся при электрораспылении в ионной ловушке пептида эскулентина **1a** с молекулярной массой 4813.6896 Да.

Существуют методы увеличения зарядности белковых ионов, образующихся в условиях ионизации электрораспылением. В частности эффективный подход связан с небольшими добавками в пробу низколетучих суперзаряжающих (supercharging) реагентов (A.T. Ivarone et al., 2001; H.J. Sterling et al., 2010; S. Yin and R. Loo, 2011). Наиболее популярными являются нитробензиловый спирт, сульфолан, диметилацетамид, диметилсульфоксид и т.д. В результате таких добавок возрастает степень протонирования пептидов и становится возможным зарегистрировать полипротонированные молекулы высокомолекулярных белков на приборах с небольшим диапазоном масс (рис. 1.6).

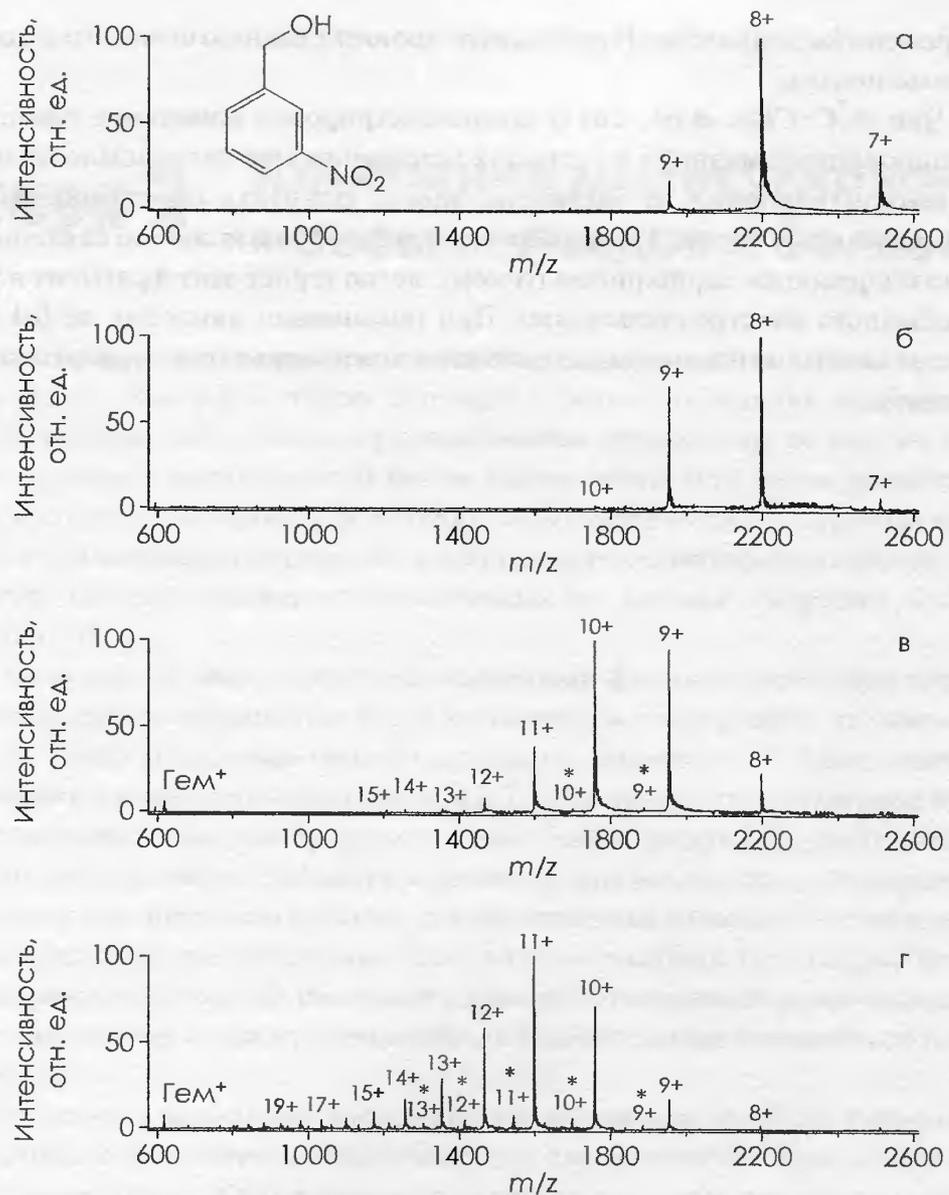
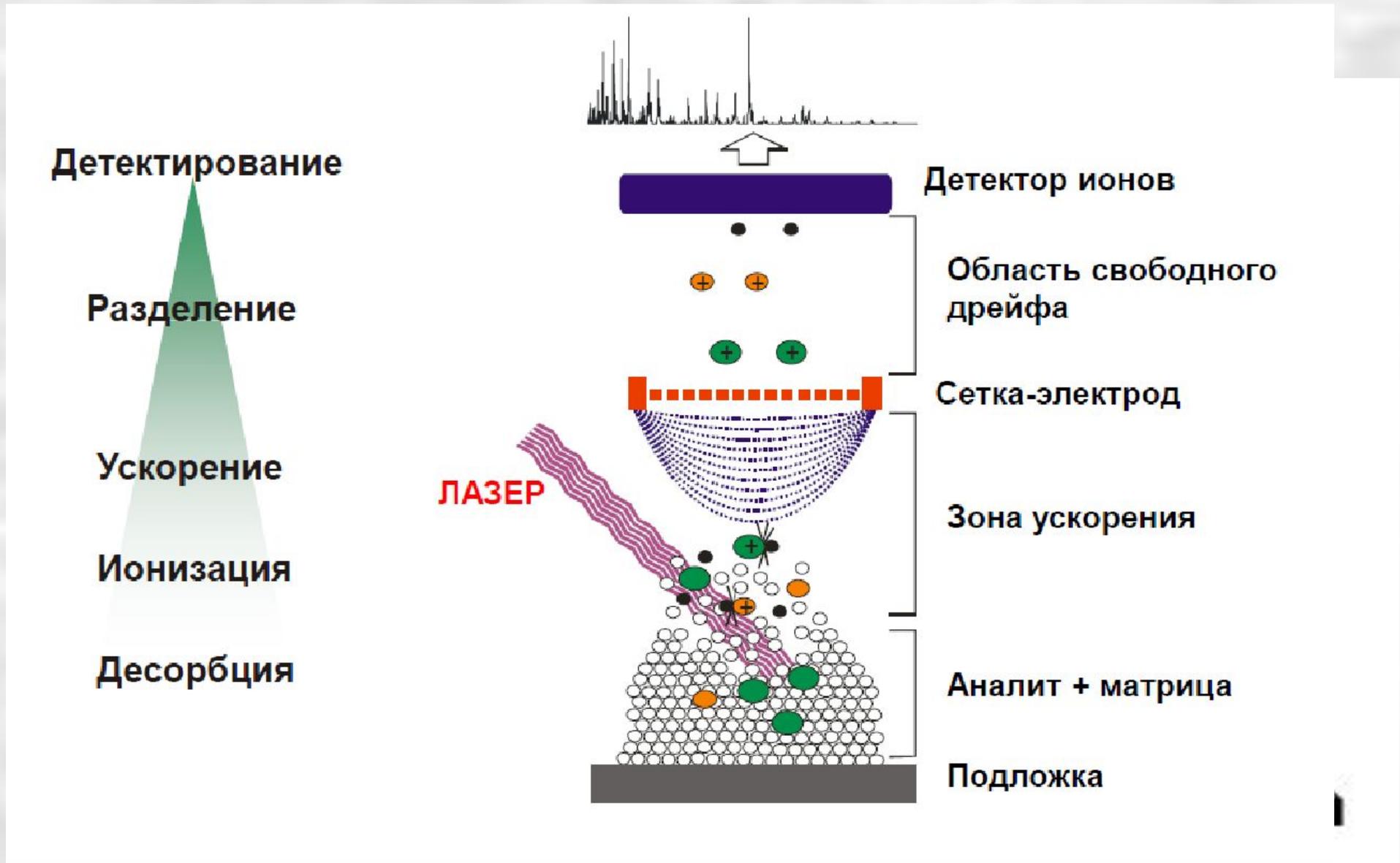
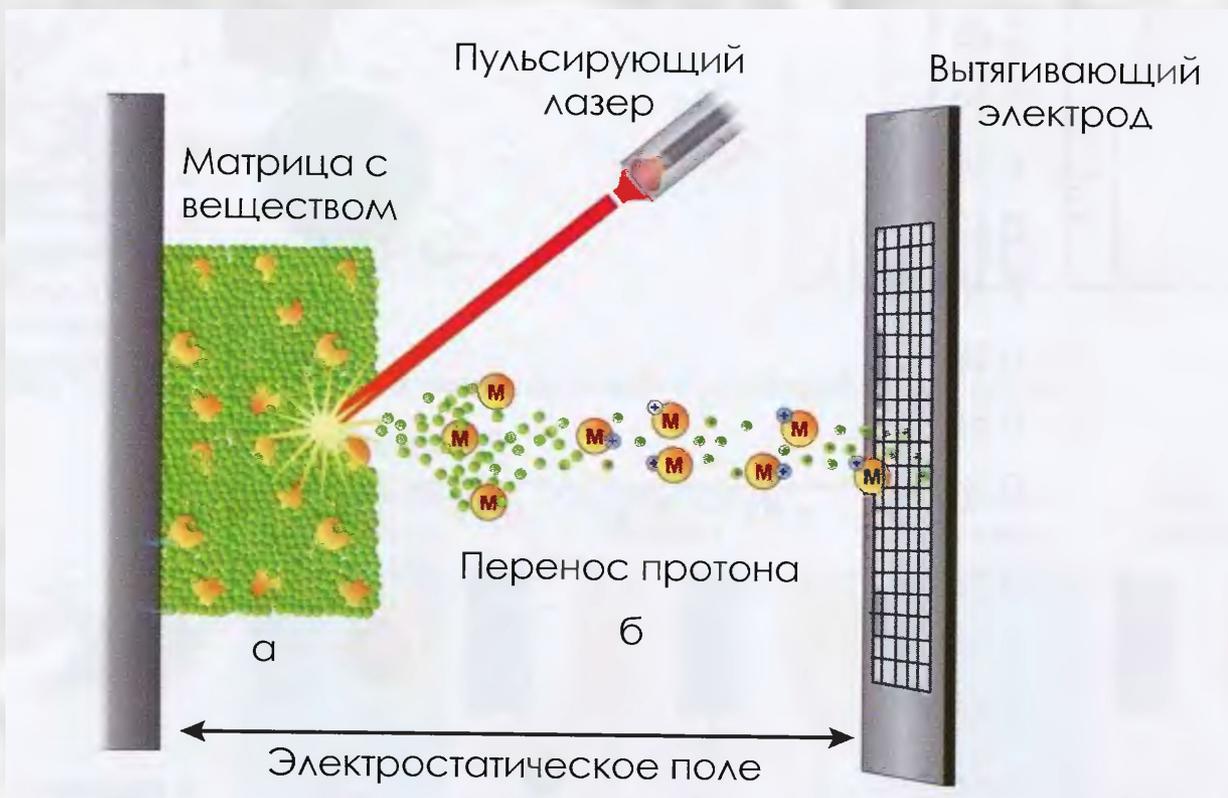


Рис. 1.6. Масс-спектры водного ацетатно-аммонийного раствора 20 мкМ миоглобина с добавками: а — 0.00%; б — 0.03%; в — 0.10%; г — 0.40% *m*-нитробензилового спирта (формула представлена на рис. 1.6а). * — зарядовые состояния ионов апомиоглобина (H.J. Sterling et al., 2010, с разрешения Springer).

матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация (MALDI)



Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Матрица выбирается таким образом, чтобы ее молекулы активно поглощали фотоны, эмиттируемые УФ- или ИК-лазером. В качестве матриц наиболее часто используют 2,5-дигидроксибензойную и α -циано-4-гидроксикоричную кислоты, хотя в опубликованных на сегодняшний день работах описаны уже сотни разнообразных матриц. 2,5-Дигидроксибензойная кислота, характеризующаяся незначительными фоновыми пиками в области низких масс, особенно эффективна для получения спектров легких соединений с молекулярной массой до 1000 Да. Молярное соотношение матрица/анализируемое вещество обычно составляет от 10:1 до 50000:1 и оптимизируется для каждого нового образца. Важно, чтобы во время высушивания нанесенного на подложку образца, произошла сокристаллизация вещества матрицы и анализируемого соединения.



матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация (MALDI)

Метод МАЛДИ обладает высочайшей чувствительностью (уровень атто- (10^{-18}) и зепто- (10^{-21}) молей), не требует сложной пробоподготовки и позволяет работать с гетерогенными образцами. Одной из разновидностей МАЛДИ, методом десорбционной ионизации с кремния (Desorption/Ionization on Silicon, DIOS), установлен абсолютный рекорд чувствительности любого аналитического метода. Пик молекулярного иона дез-Arg⁹-брадикинина с изотопным расщеплением зарегистрирован для 800 йоктомолей (480 молекул) этого пептида (*S.A. Trauger et al., 2004*). Повторить этот результат пока никому не удалось, но регистрация аналитов в зептомолярных (10^{-21}) количествах описана многими исследователями.

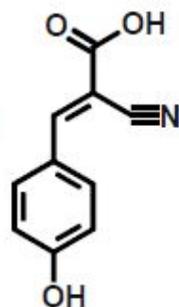
Короткий световой импульс лазера поглощается молекулами матрицы и разрушает ее кристаллическую структуру. Часть молекул отрывается от поверхности и образует высокотемпературный суперплотный газ (зона шлейфа), в котором помимо молекул, ионов и ассоциатов матрицы присутствуют молекулы анализируемого соединения (см. рис. 1.3 на цветной вставке). В зоне шлейфа образуется газовая плазма, в которой протекают процессы вторичной ионизации. Механизмы этих реакций включают протонирование и депротонирование, перезарядку и присоединение аниона или катиона.

Матрицы в технологии MALDI-масс-спектрометрии

Положительная ионизация

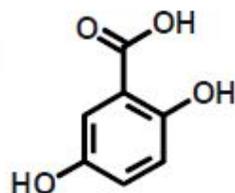
α-Циано-4-окси
коричная кислота (HCCA)

$m = 189.07$ а.е.м.



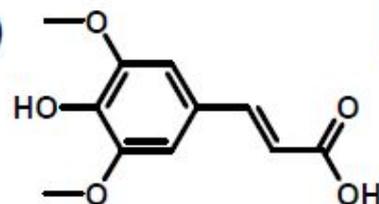
2,5-Диоксибензойная
кислота (DHB)

$m = 154.03$ а.е.м.

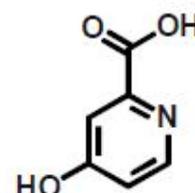


Синаповая кислота (SIA)

$m = 224.07$ а.е.м.

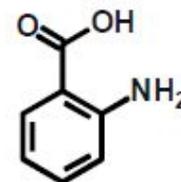


Отрицательная ионизация



4-Оксихиколиновая
кислота

$m = 139.05$ а.е.м.



Антраниловая кислота

$m = 137.05$ а.е.м.

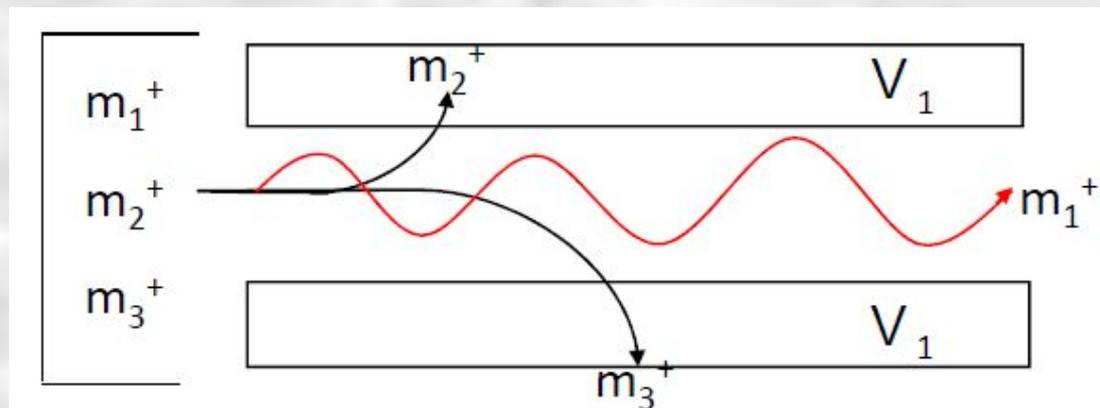
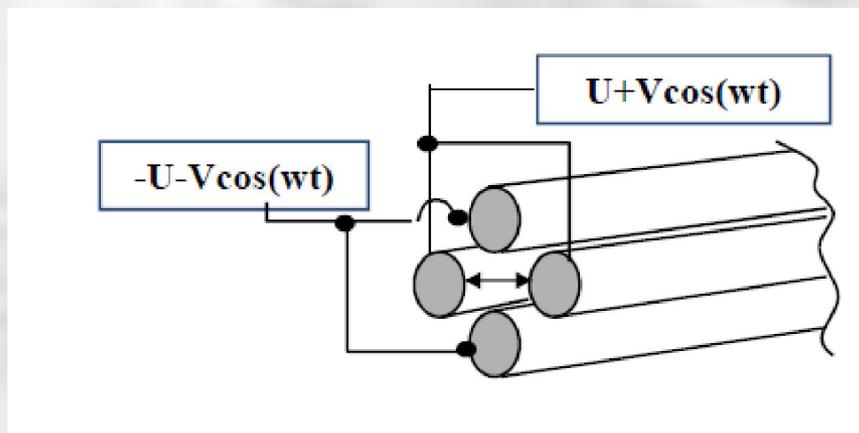
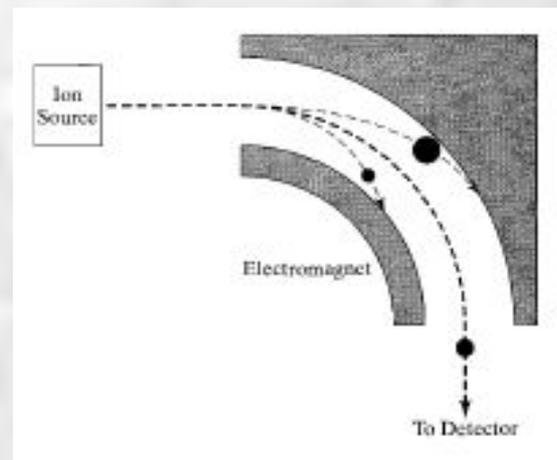
Низкомолекулярные, ароматические,
органические кислоты: УФ-абсорберы,
доноры протонов.

Масс-анализаторы

Непрерывные масс-анализаторы

- секторные анализаторы

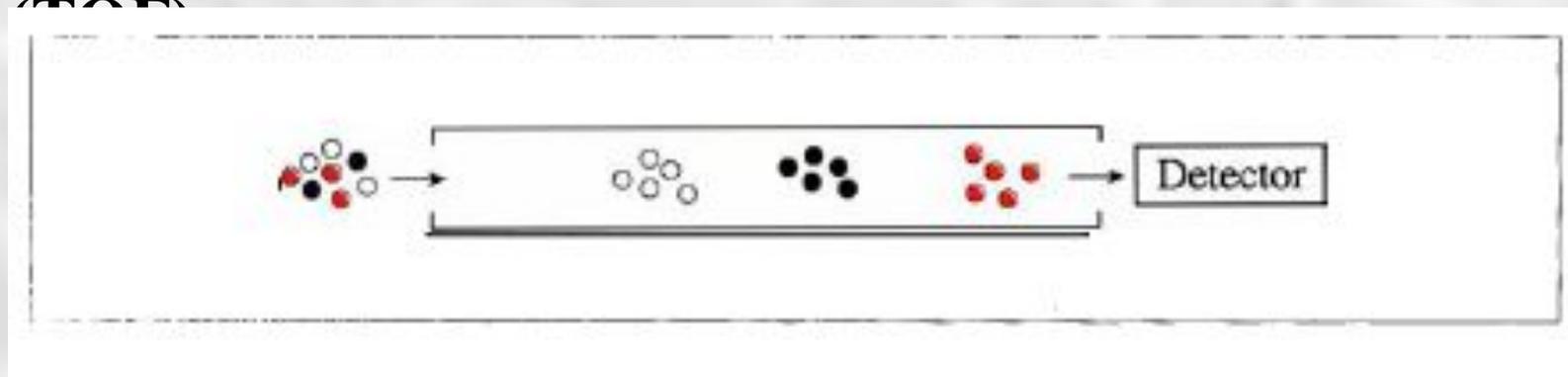
- квадрупольные анализаторы



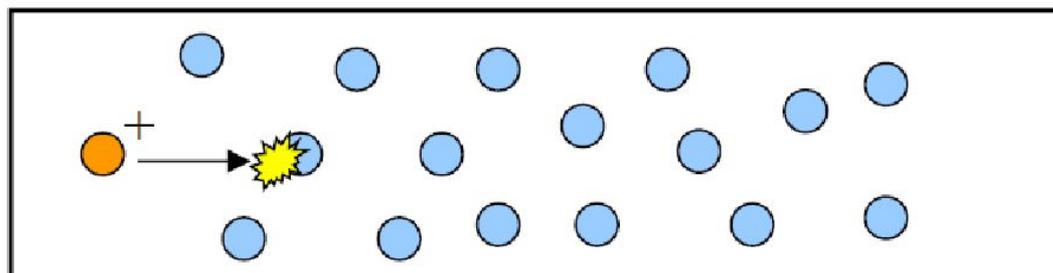
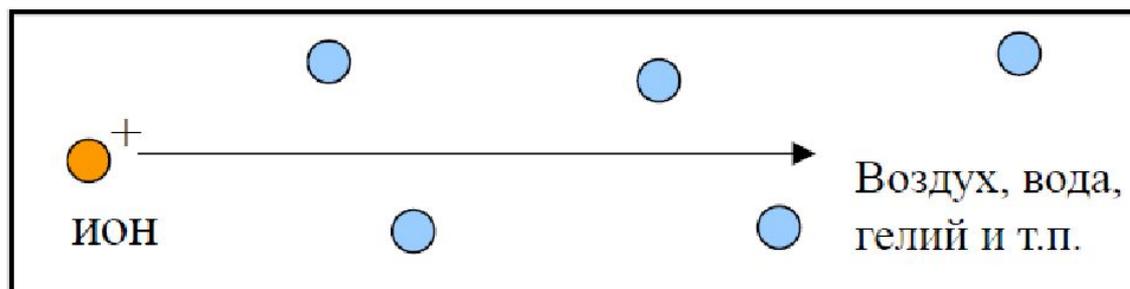
Импульсные масс-анализаторы

- времяпролетные анализаторы

(TOF)



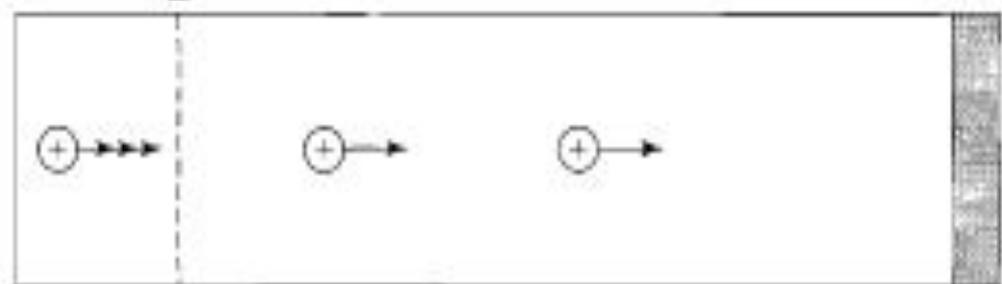
- Только в высоком вакууме (10^{-3} - 10^{-4} Pa) длина свободного пробега частиц такова, что полученный в источнике ион может достичь детектора



Potential drop
ions accelerate

$\leftarrow E \rightarrow$

No potential
ions "drift"



$\leftarrow s \rightarrow$

Source
region

$\leftarrow D \rightarrow$

Drift
region

Detector

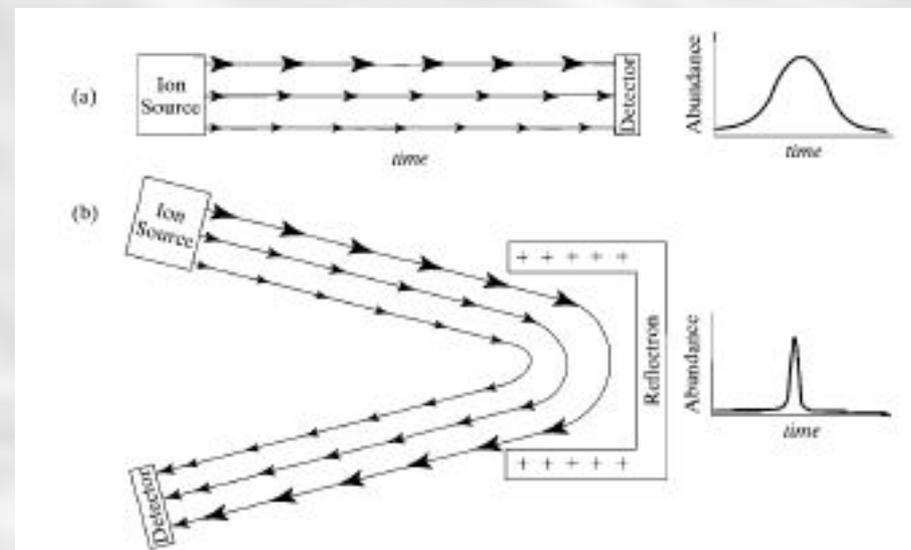
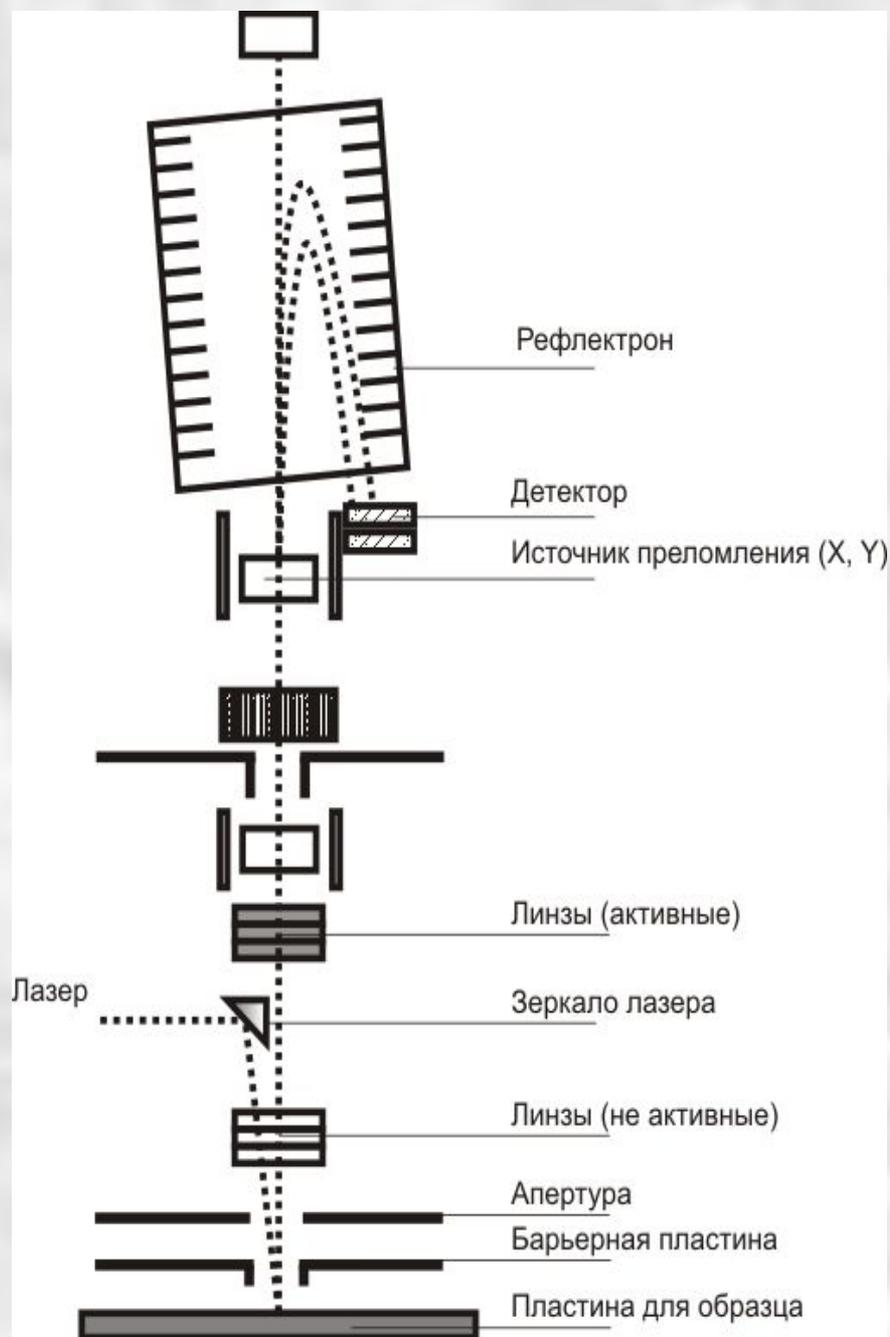
$$\frac{1}{2}mv^2 = ZeEs$$

$$v = \left(\frac{2ZeEs}{m} \right)^{1/2}$$

$$t = \frac{D}{v} = \left(\frac{m}{2ZeEs} \right)^{1/2} D$$

$$\frac{m}{Z} = 2eEs \left(\frac{t}{D} \right)^2$$

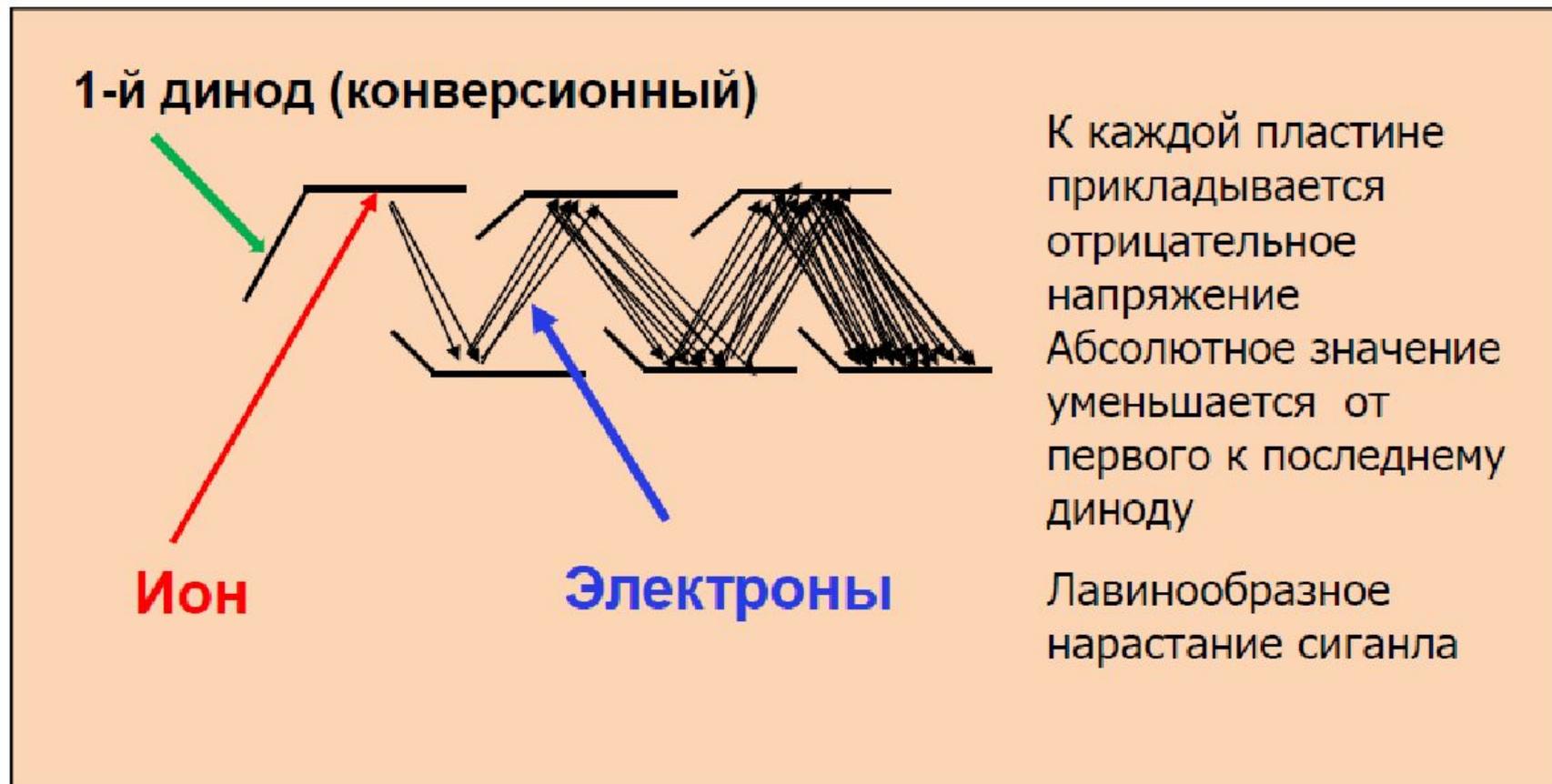
MALDI-TOF-масс-спектрометрия



Времяпролетный MALDI-масс-спектрометр

Детектор – преобразует поток ионов в электрический сигнал

Преобразует поток ионов в электрический сигнал

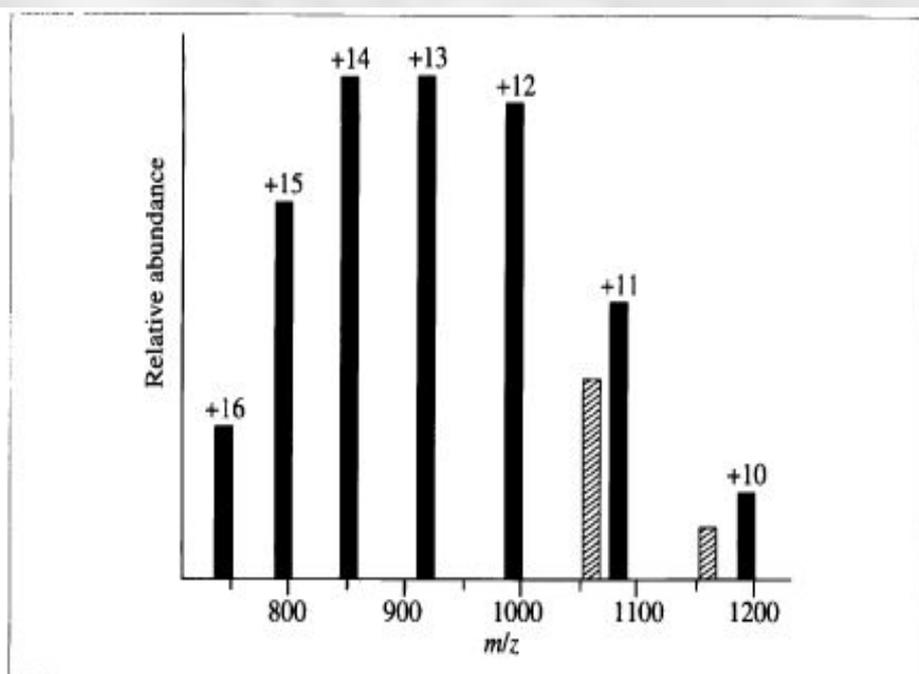




Определение молекулярной массы белков

Молекулярная масса является важнейшей физико-химической характеристикой любого соединения. В случае пептидов она отражает его аминокислотный состав и наличие модифицирующих заместителей. Масс-спектры и ионизации электрораспылением, и МАЛДИ зачастую представлены исключительно кластером молекулярного иона. Любой анализатор, включая квадруполь и ионные ловушки, дает возможность определить среднюю молекулярную массу (см. ниже) соединения, а разрешающая способность современных времяпролетных анализаторов, орбитальных ловушек и приборов ионного циклотронного резонанса позволяет надежно установить моноизотопную массу, что во многих случаях достаточно для определения элементного состава пептидов.

Определение молекулярной массы белков



$$(m + 1)/(z + 1)$$

$$\Delta = (m/z) - (m + 1)/(z + 1) = (m/z - 1)/(z + 1)$$

$$z = (m/z - 1)/\Delta - 1$$

$$m/Z = \frac{(MW + H)}{1} = MW + 1.008$$

Table 3.1 Data for Figure 3.5

Measured m/z	Δ	Calculated z	m	$M = m - z$
1193.417	108.381	10.0021	11936.66	11926.66
1085.036	90.353	10.9978	11932.99	11922.00
994.683	76.437	12.0000	11936.22	11924.22
918.246	65.517	13.0001	11937.31	11924.31
852.729	56.782	14.0000	11938.19	11924.19
795.947	49.685	14.9997	11939.00	11924.00
746.262	-			
			Mean	11924.23
			s.d.	1.48

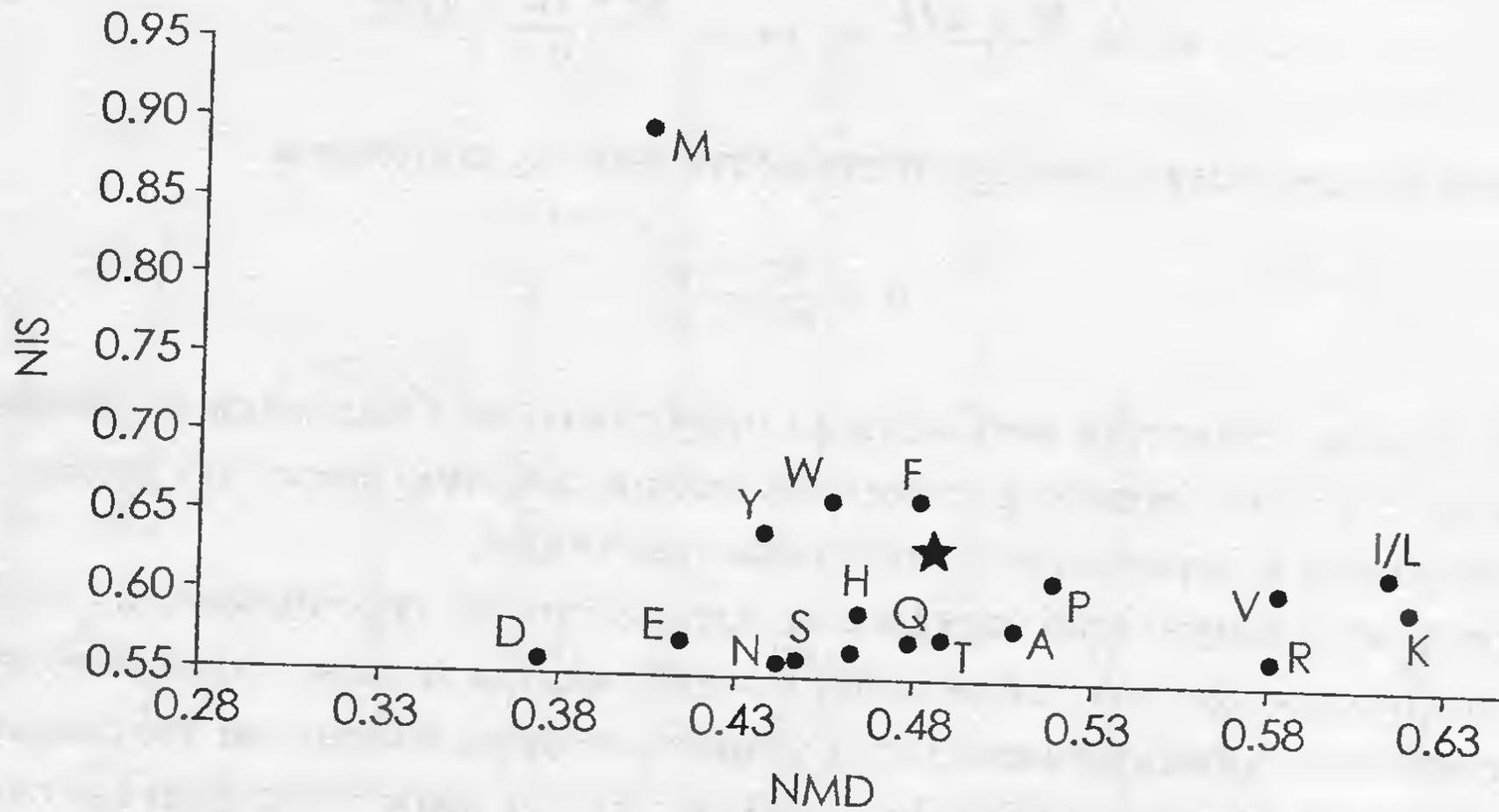
$$m = \frac{M + nH}{n}.$$

$$M = n(m - H).$$

$$m_2 = \frac{M + nH}{n} \quad \text{и} \quad m_1 = \frac{M + (n + 1)H}{n + 1}.$$

$$n = \frac{m_1 - H}{m_2 - m_1}.$$

Приблизительную оценку аминокислотного состава пептидов, включая посттрансляционные модификации, можно сделать с использованием двумерных карт. По осям координат в этом случае откладываются нормализованный дефект масс (NMD) и нормализованный изотопный сдвиг (NIS). Первый параметр отражает энергию связывания ядер элементов, составляющих молекулу, а второй определяется числом и распространенностью элементов, составляющих молекулу. Если в качестве стандарта (★ на рис. 2.5) использовать авераджин (Av), гипотетическую аминокислоту состава $C_{4.9384}H_{7.7583}N_{1.3577}O_{1.4773}S_{0.0417}$, предложенную М. Сенко с коллегами (*M.W. Senko et al., 1995*) на основании определения среднего состава триптических пептидов, введение в молекулу любого аминокислотного остатка или модификации приведет к сдвигу положения соответствующей точки на двумерной карте.



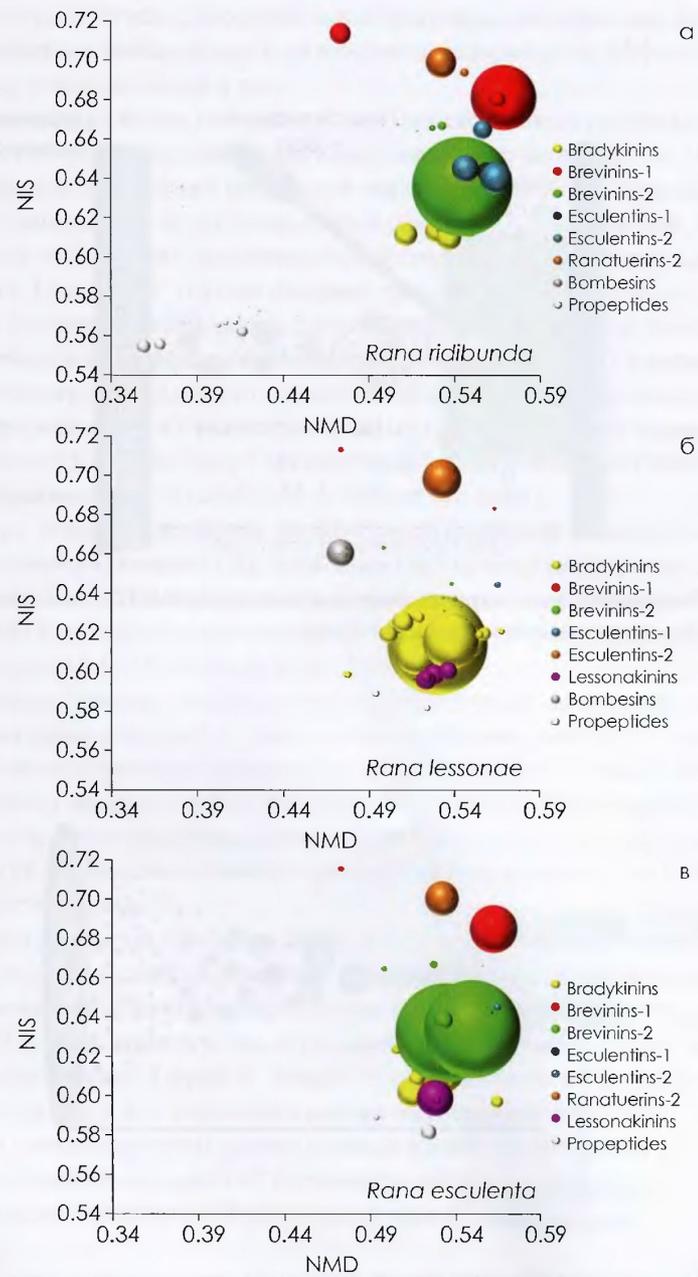
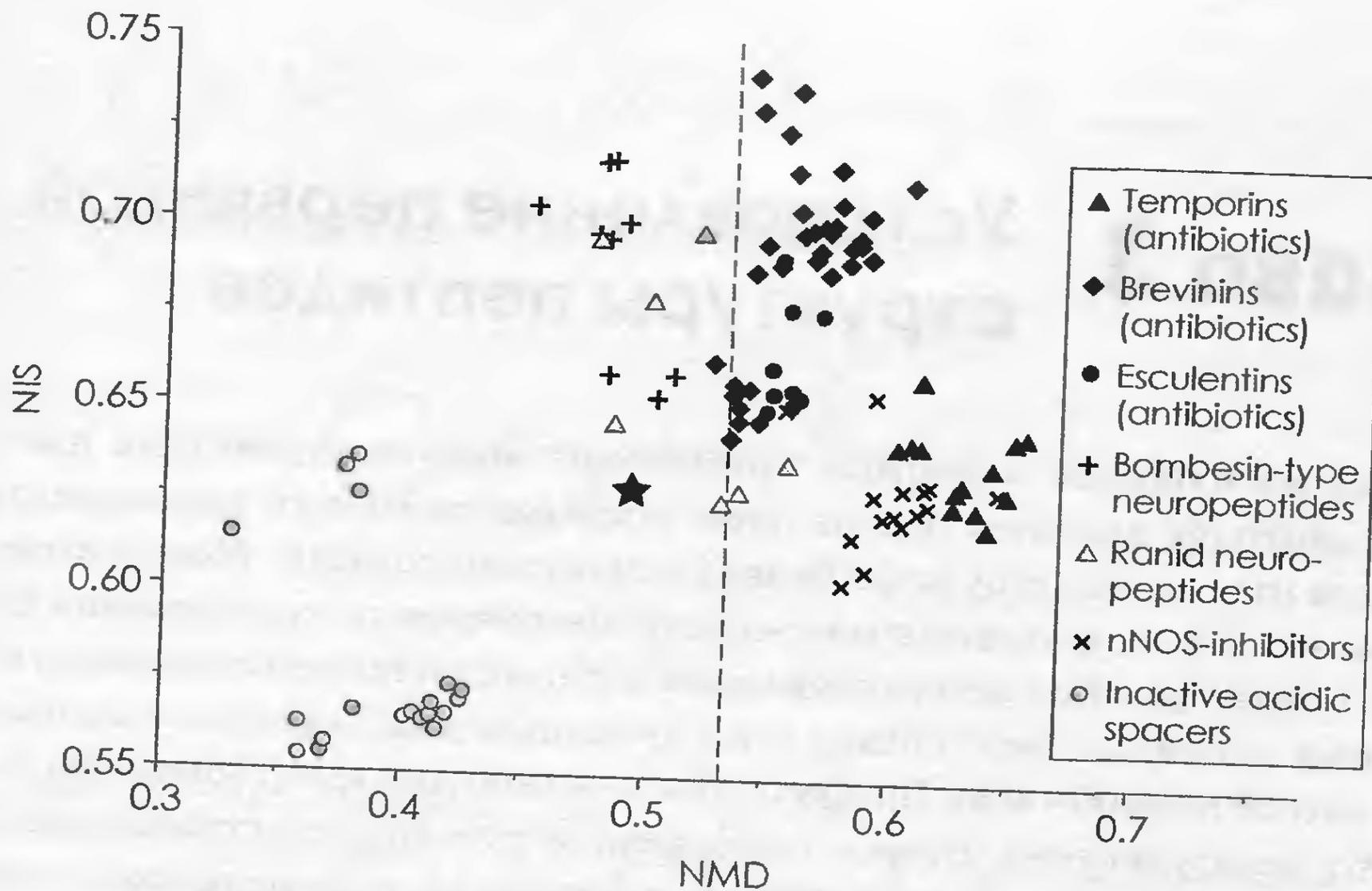
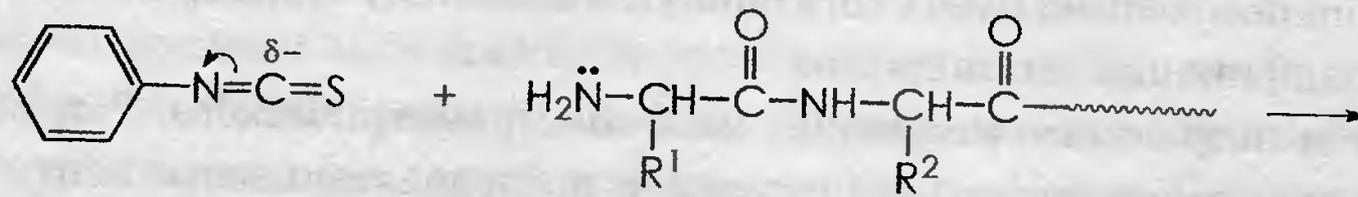


Рис. 2.6. Пептидные карты в координатах NMD–NIS для пептидов, секретируемых лягушками трех видов комплекса зеленых лягушек: а — *Rana ridibunda*; б — *Rana lessonae*, в — *Rana esculenta*.

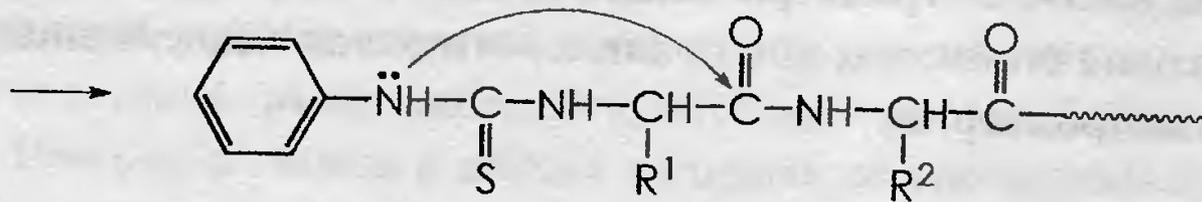


Секвенирование



Фенилизотиоцианат

Полипептид



Фенилтиогидантоиновое
(ФТГ) производное
аминокислоты

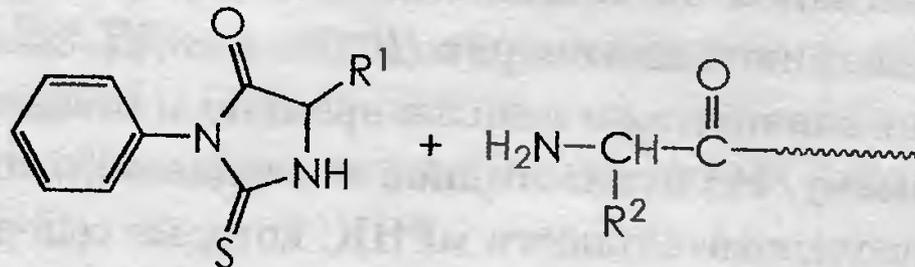


Схема 3.1. Химические реакции, лежащие в основе секвенирования пептидов по Эдману.

Леддерное секвенирование

На стыке биохимии и масс-спектрометрии находится метод леддерного (от англ. ladder – лестница) секвенирования. Он представляет собой энзиматический гидролиз амидных связей исходного пептида с С- или N-конца с масс-спектрометрическим определением всей совокупности продуктов реакции. Детектируются леддеры (усеченные пептиды), содержащие на одну, две, три и т. д. концевых аминокислоты меньше, чем исходный пептид. По разнице в массах леддеров устанавливается последовательность звеньев в исходном пептиде. Отщепление аминокислоты происходит за счет ферментативного гидролиза. Поэтому разница в массах леддеров всегда соответствует массе аминокислоты за вычетом массы молекулы воды или аммиака (в случае амидированного С-конца пептида).

В качестве ферментов для отщепления концевых аминокислот используют карбоксипептидазу Y (CPY), карбоксипептидазу P (CPP) или смесь этих неспецифических энзимов CPY/PP, дающих комплементарные разрывы с С-конца пептида (*D.N. Nguyen et al., 1995; B. Thiede et al., 1995; A.S. Woods et al., 1995*). Для отрыва N-концевых аминокислот используется аминопептидаза M (*M. Hisada et al., 2000*).

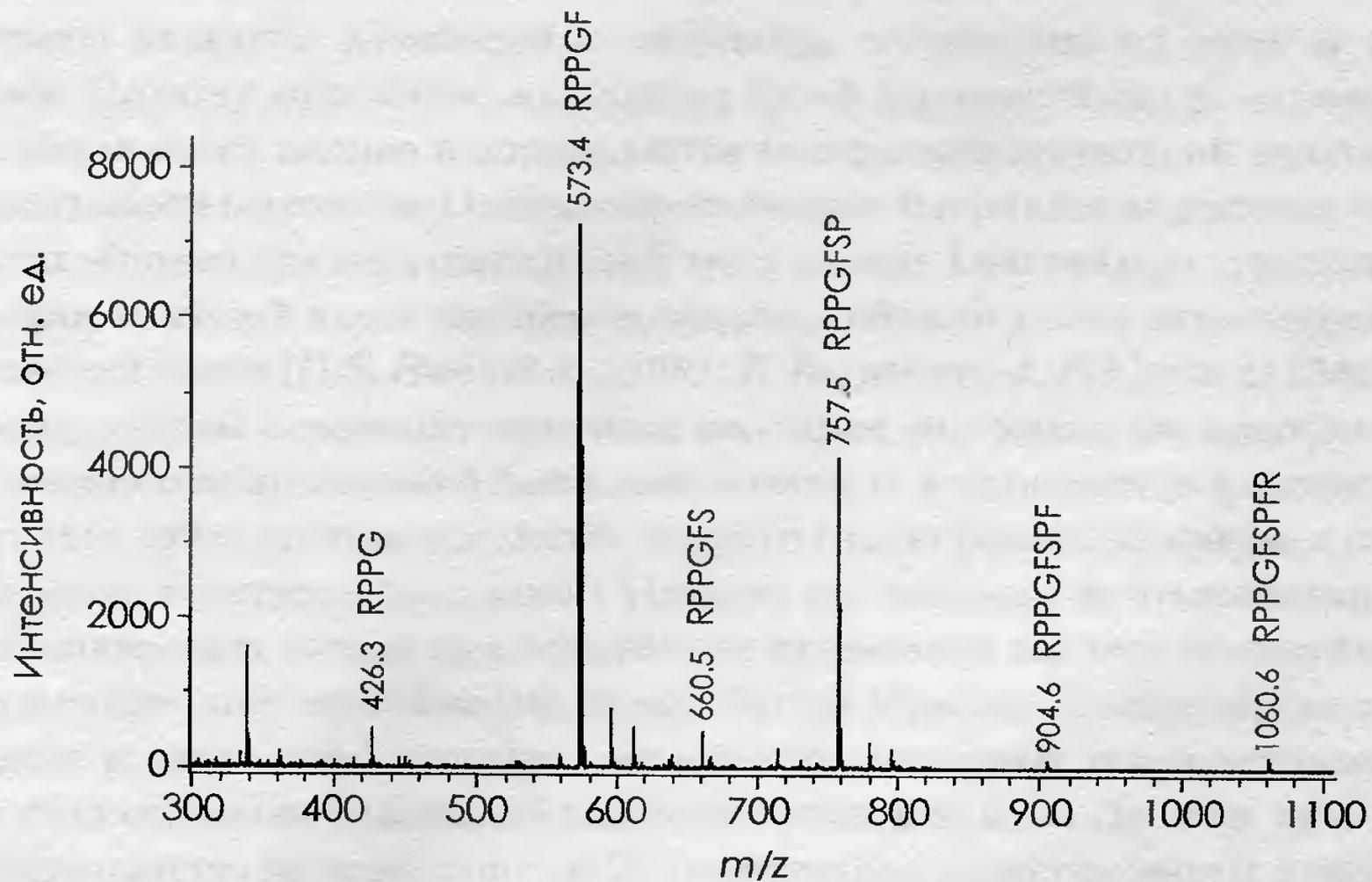


Рис. 3.1. Леддерное секвенирование брадикинина в присутствии карбоксипептидазы Y. Спектр МАЛДИ. Прибор Autoflex II (Bruker).

Секвенирование

Таблица 4.1. Массы аминокислотных остатков 20 распространенных аминокислот.

Аминокислота	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Масса аминокислотного остатка, Да	Иммониевый ион, <i>m/z</i>
Глицин	G	Gly	57.02147	30
Аланин	A	Ala	71.03712	44
Серин	S	Ser	87.03203	60
Пролин	P	Pro	97.05277	70
Валин	V	Val	99.06842	72
Треонин	T	Thr	101.04768	74
Цистеин	C	Cys	103.00919	76
Лейцин	L	Leu	113.08407	86
Изолейцин	I	Ile	113.84070	86
Аспарагин	N	Asn	114.04293	87
Аспарагиновая кислота	D	Asp	115.02695	88
Глутамин	Q	Gln	128.05858	101
Лизин	K	Lys	128.09497	101
Глутаминовая кислота	E	Glu	129.04260	102
Метионин	M	Met	131.04049	104
Гистидин	H	His	137.05891	110
Фенилаланин	F	Phe	147.06842	120
Аргинин	R	Arg	156.10112	129
Тирозин	Y	Tyr	163.06333	136
Триптофан	W	Trp	186.07932	159

Table 15.2 Residue Masses (Within a Polypeptide Chain) of the 20 Common Amino Acids

Name	Abbreviation	Residue Mass (Da)
Glycine	G	57.02
Alanine	A	71.04
Serine	S	71.04
Proline	P	97.05
Valine	V	99.07
Threonine	T	101.05
Cysteine	C	103.01
Isoleucine	I	113.08
Leucine	L	113.08
Asparagine	N	114.04
Aspartic acid	D	115.03
Glutamine	Q	128.06
Lysine	K	128.09
Glutamic acid	E	129.04
Methionine	M	131.04
Histidine	H	137.06
Phenylalanine	F	147.07
Arginine	R	156.10
Tyrosine	Y	163.06
Tryptophan	W	186.08

Note: The masses of the isolated amino acids are the residue masses plus 18 Da.

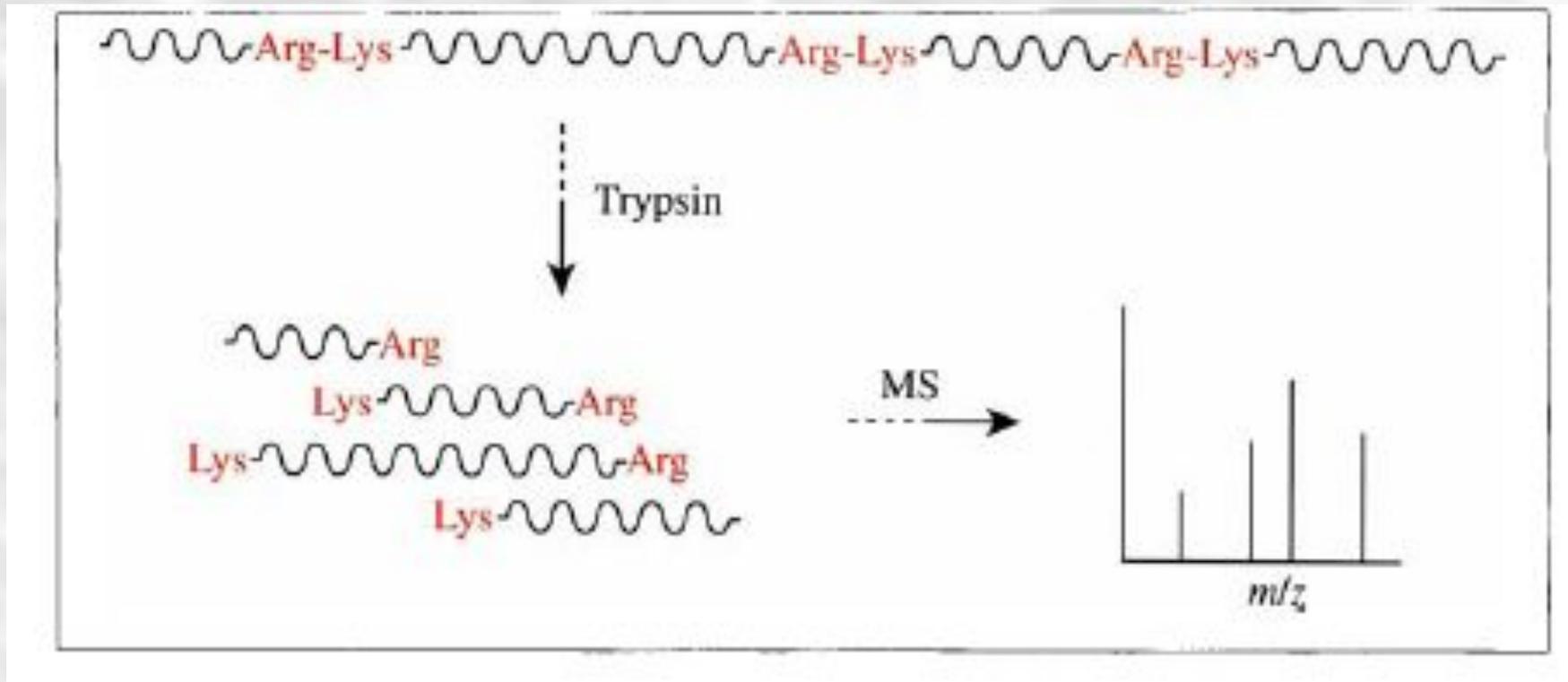
Идентификация пептидов и белков

Наиболее широко распространенным вариантом анализа белков является подход «снизу-вверх» («bottom-up»). Он представляет собой предварительное энзиматическое расщепление белка (или крупного пептида) на более мелкие фрагменты, быструю очистку полученного образца от низкомолекулярных примесей и масс-спектрометрический анализ смеси протеолитических пептидов. Введение полученного массива данных в компьютерную библиотеку белкового поиска (например, Mascot) позволяет идентифицировать исходный белок и оценить надежность его определения по доле полной последовательности белка, охарактеризованной идентифицированными фрагментами (score). Последовательность процедур представлена на рис. 5.1, 5.2, 5.4. Протеолиз нескольких белков может быть проведен и без их предварительного разделения. Это, безусловно, значительно увеличивает сложность пептидного набора, но одновременно существенно ускоряет процесс идентификации белков с незначительным уменьшением покрытия сиквенса, т.е. надежности идентификации.

В качестве протеолитического фермента наиболее часто используется трипсин, расщепляющий белковую цепь по С-концу лизина или аргинина (если за ними не стоит пролин). Производство трипсина дешево, он имеет высокую протеолитическую активность. Препараты трипсина высокой очистки не обладают значимыми протеолитическими активностями других типов. Кроме того, продажные препаративные формы защищены от саморазложения (автопротолиза). Поскольку частота встречаемости лизина и аргинина в белках млекопитающих составляет 5 и 6 % соответственно, на 100 пептидных связей в среднем приходится 11, расщепляющихся трипсином. Это создает очень удобную ситуацию для последующего использования масс-спектрометрии, так как образуются триптические пептиды с длиной цепи в 6–15 аминокислот и молекулярной массой в диапазоне 1000–2000 Да. Это удобный диапазон для масс-спектрометрического секвенирования и для записи масс-спектров в условиях МАЛДИ и ионизации электрораспылением.

Протеомика

Идентификация пептидов и белков



Использование пептидного картирования для идентификации белков. Этот наиболее простой вариант идентификации белков связан с установлением только молекулярной массы пептидов (*J.R. Yates III et al., 1993; P. James et al., 1994*), полученных при энзиматическом расщеплении анализируемого белка. Для его осуществления нет необходимости использовать тандемную масс-спектрометрию. Обычные масс-спектры ионизации электро-распылением или МАЛДИ предоставляют достаточно информации для применения поисковых систем.

Идея метода заключается в том, что каждый белок при ферментативном гидролизе может быть охарактеризован практически уникальным набором пептидов. Продукты энзиматического расщепления данного белка конкретной протеазой имеют определенную первичную структуру, и, как следствие, молекулярную массу. Теоретически, масс-спектр анализируемого белкового гидролизата должен предоставлять молекулярные массы всех протеолитических пептидов, а набор этих масс (по сути, чисел) является «отпечатком пальцев» данного белка (рис. 5.1, см. цветную вкладку).

Экспериментально полученная таблица молекулярных масс триптических пептидов загружается далее в поисковик для нахождения соответствующих белковых последовательностей в базах данных (например, Uniprot). Для проведения этого поиска существует несколько вариантов поисковиков, наиболее популярными из которых являются MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) и Mascot (Peptide Mass Fingerprint) (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Существуют также сайты для проведения поиска по белковым профилям конкретных организмов. Примером может служить база данных по пептидным последовательностям нематод (http://www.nematodes.org/Lumbribase/lumbribase_php/search_pmf.php).

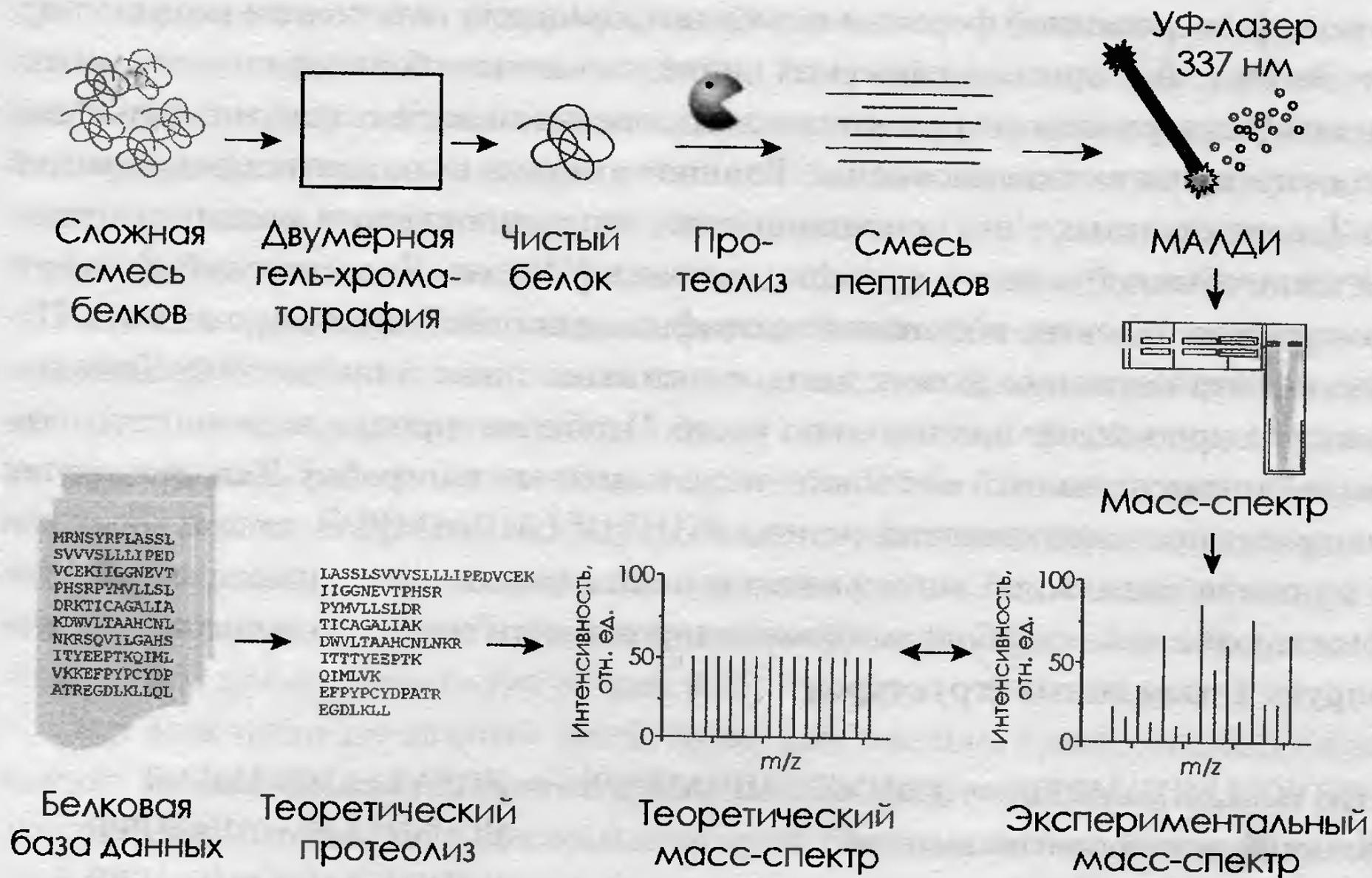
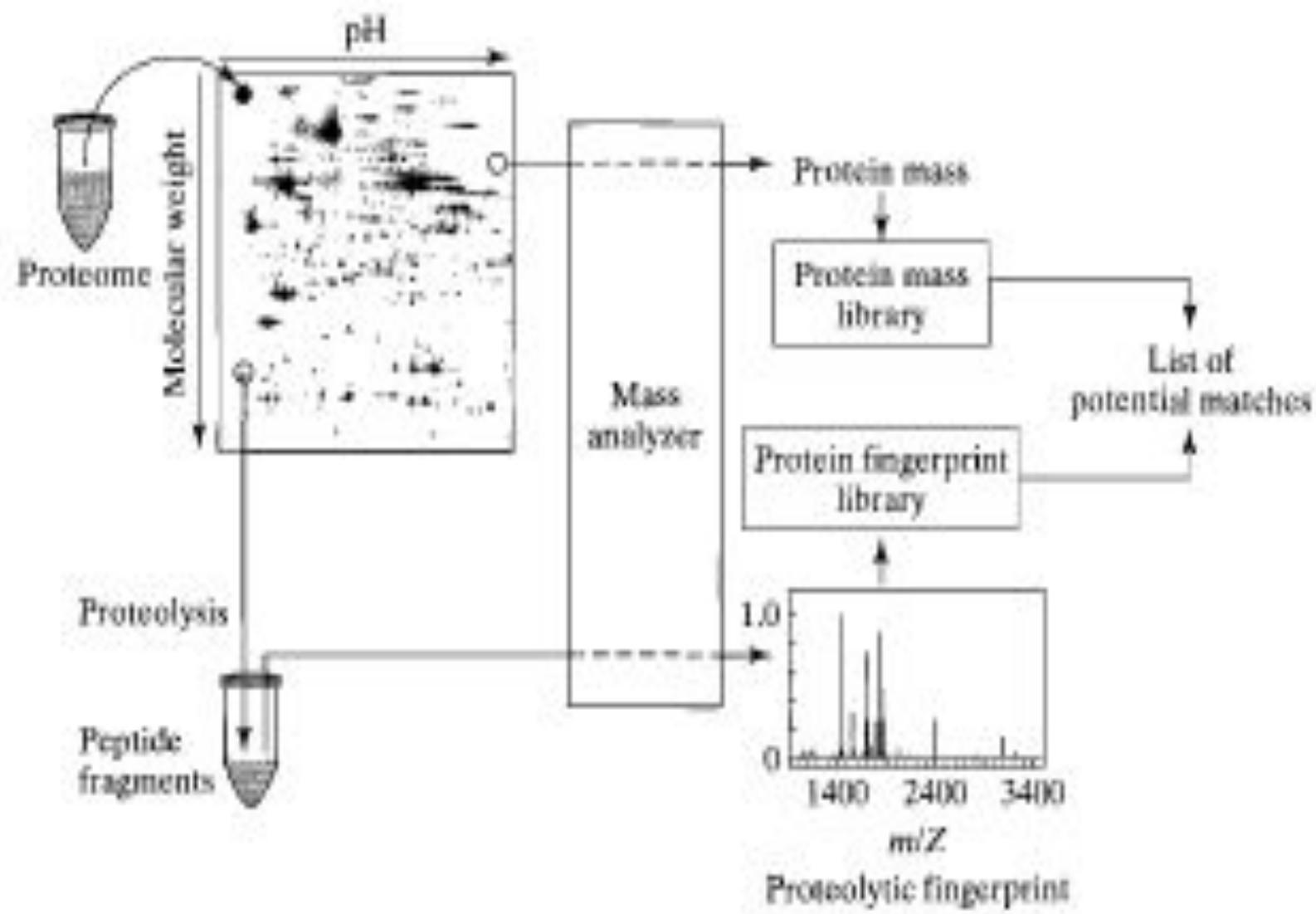
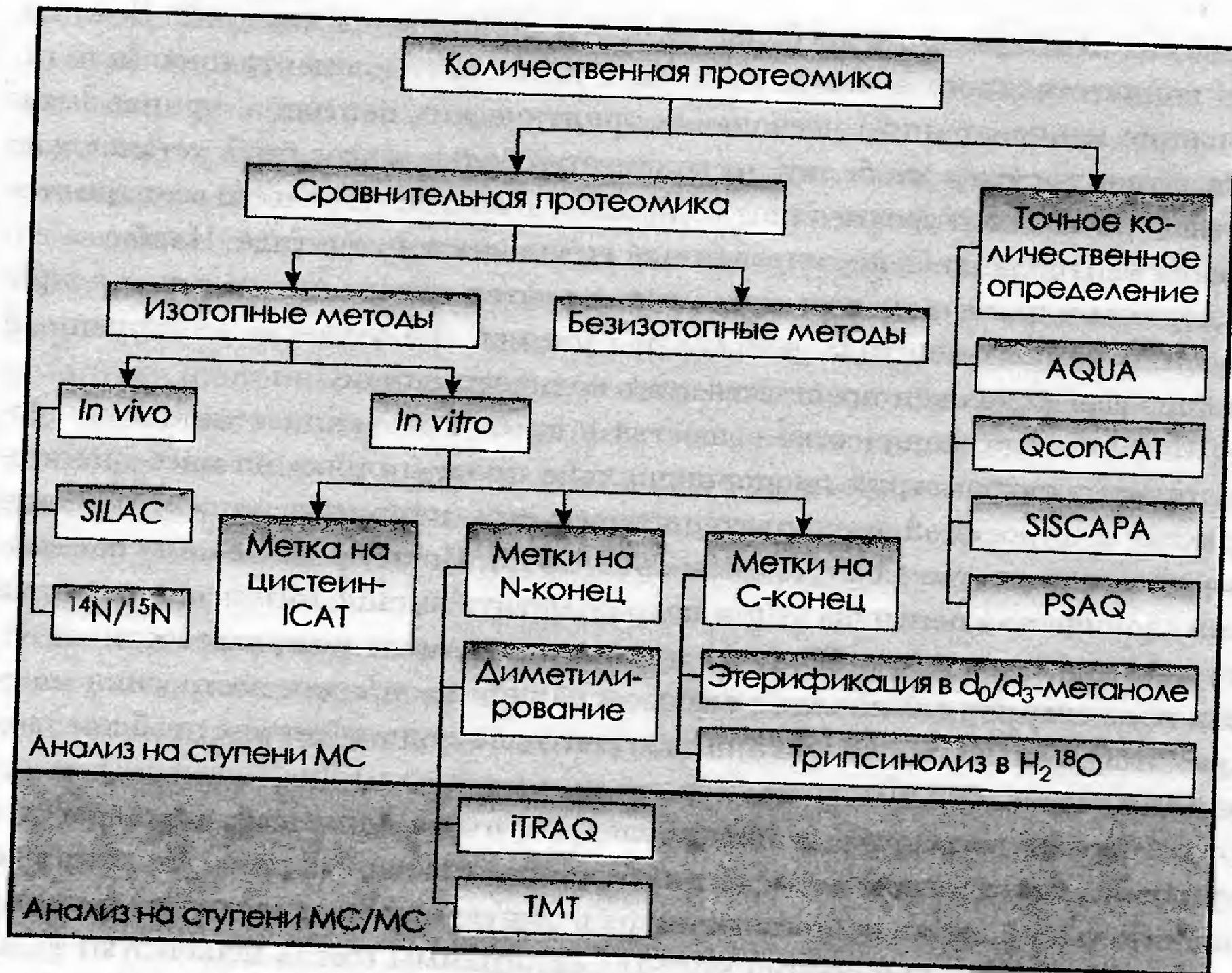


Рис. 5.2. Определение структуры белка методом пептидного картирования.





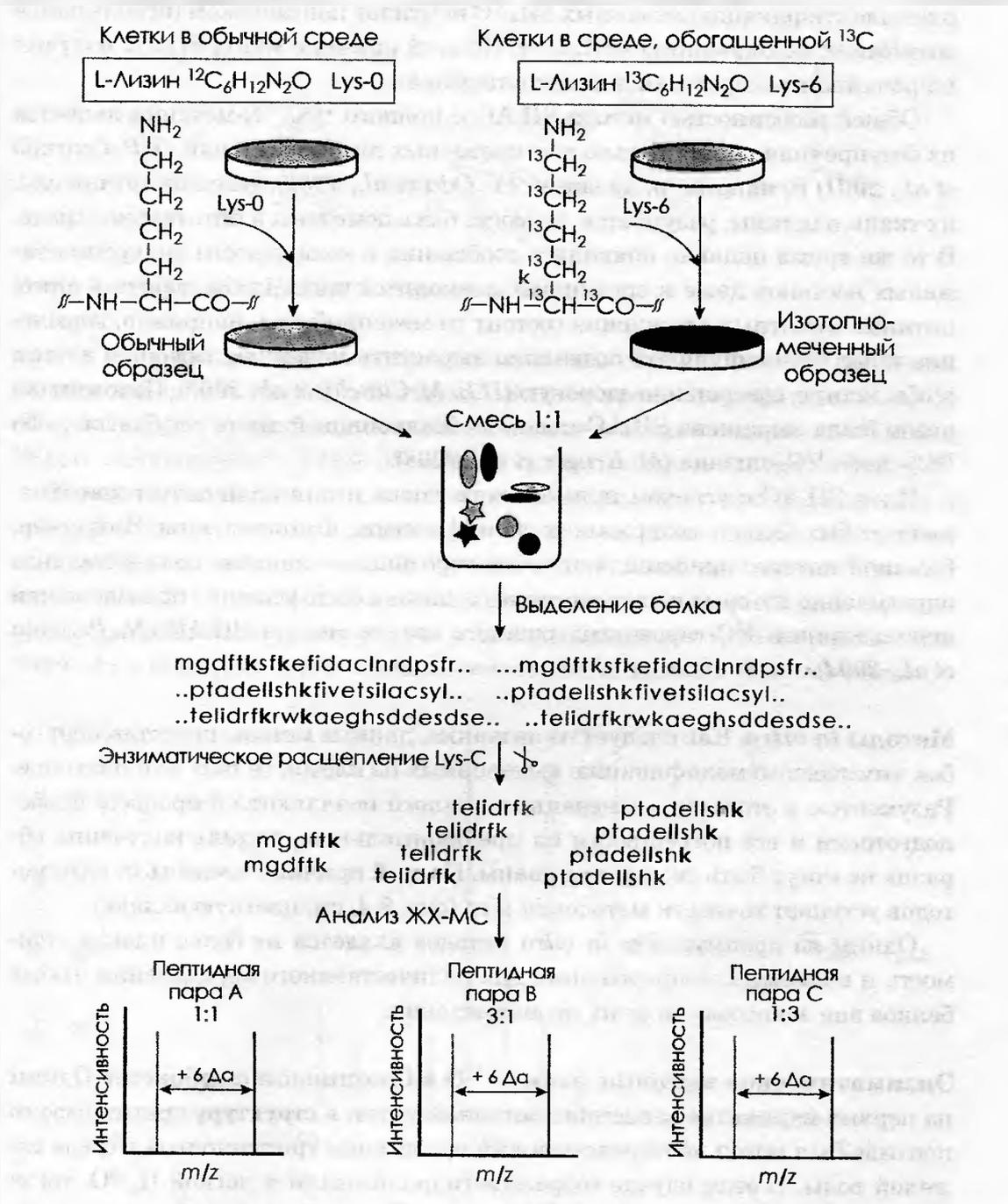
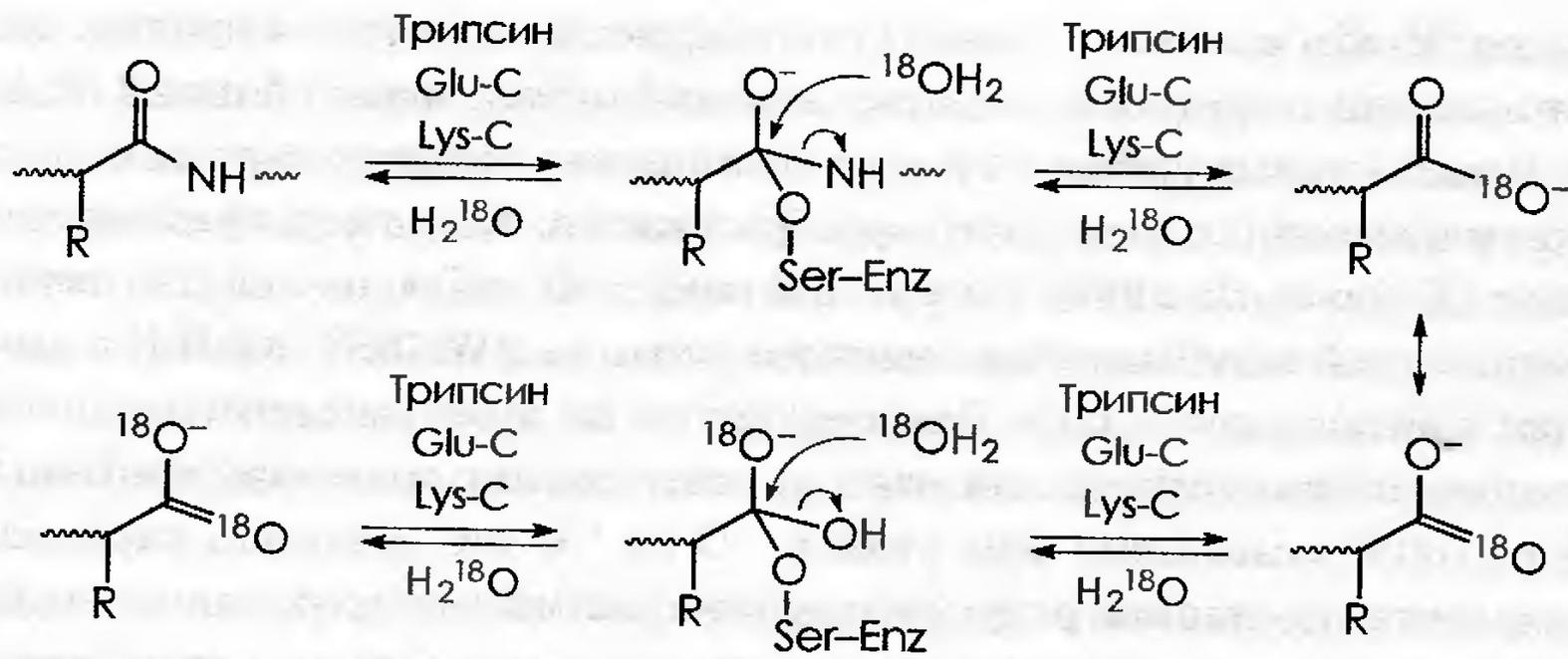


Рис. 8.3. Сравнительный количественный анализ с использованием метода SILAC (S.-E. Ong et al., 2002, с разрешения American Society for Biochemistry and Molecular Biology).



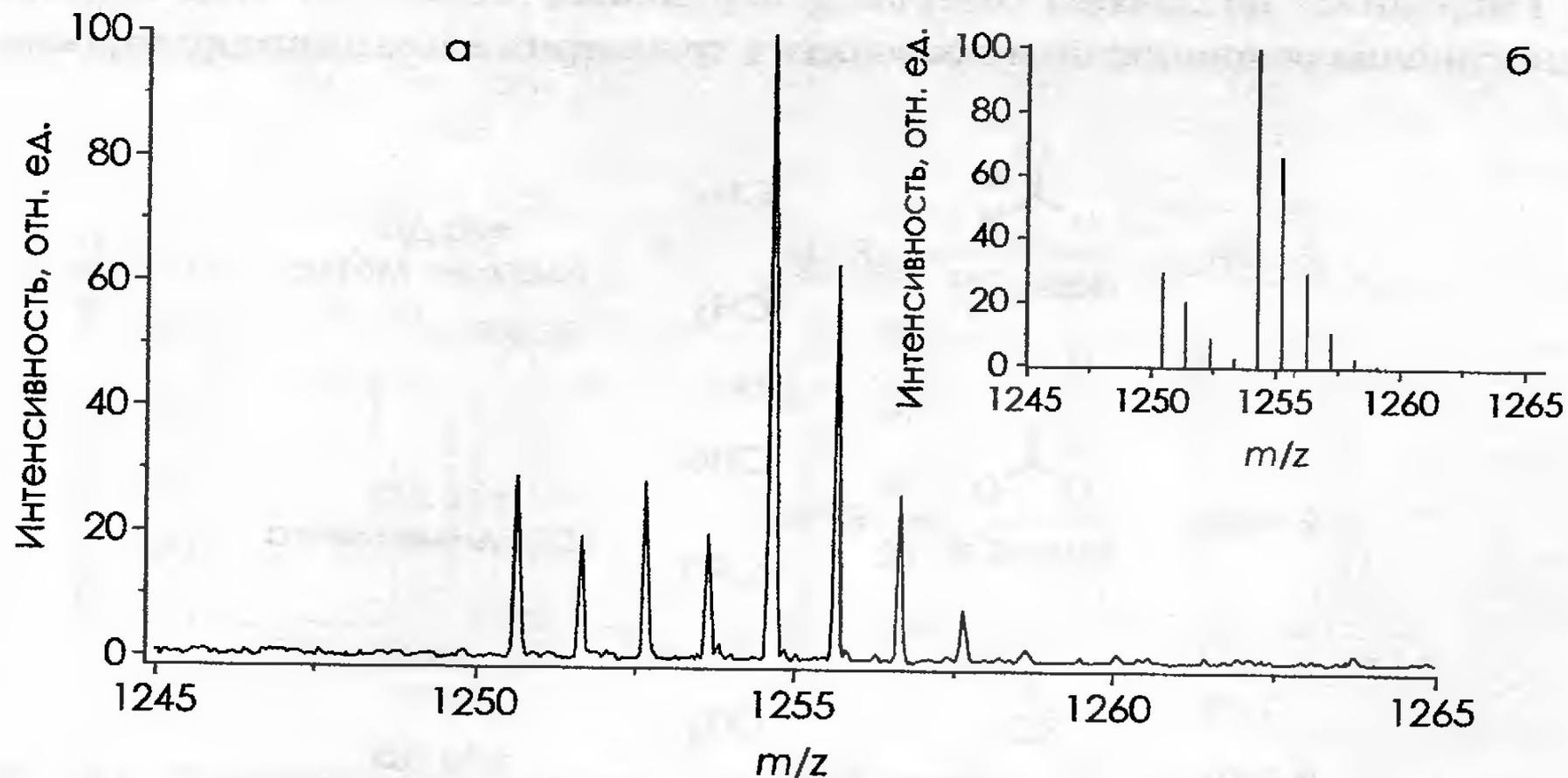


Рис. 8.6. Сравнение наблюдаемого (а) и теоретического (б) соотношений интенсивностей меченого/немеченого ^{18}O пептида AWNSSTGQMLR с вычисленным соотношением 3:10 (X Yao *et al.*, 2001, Copyright 2001, с разрешения American Chemical Society).

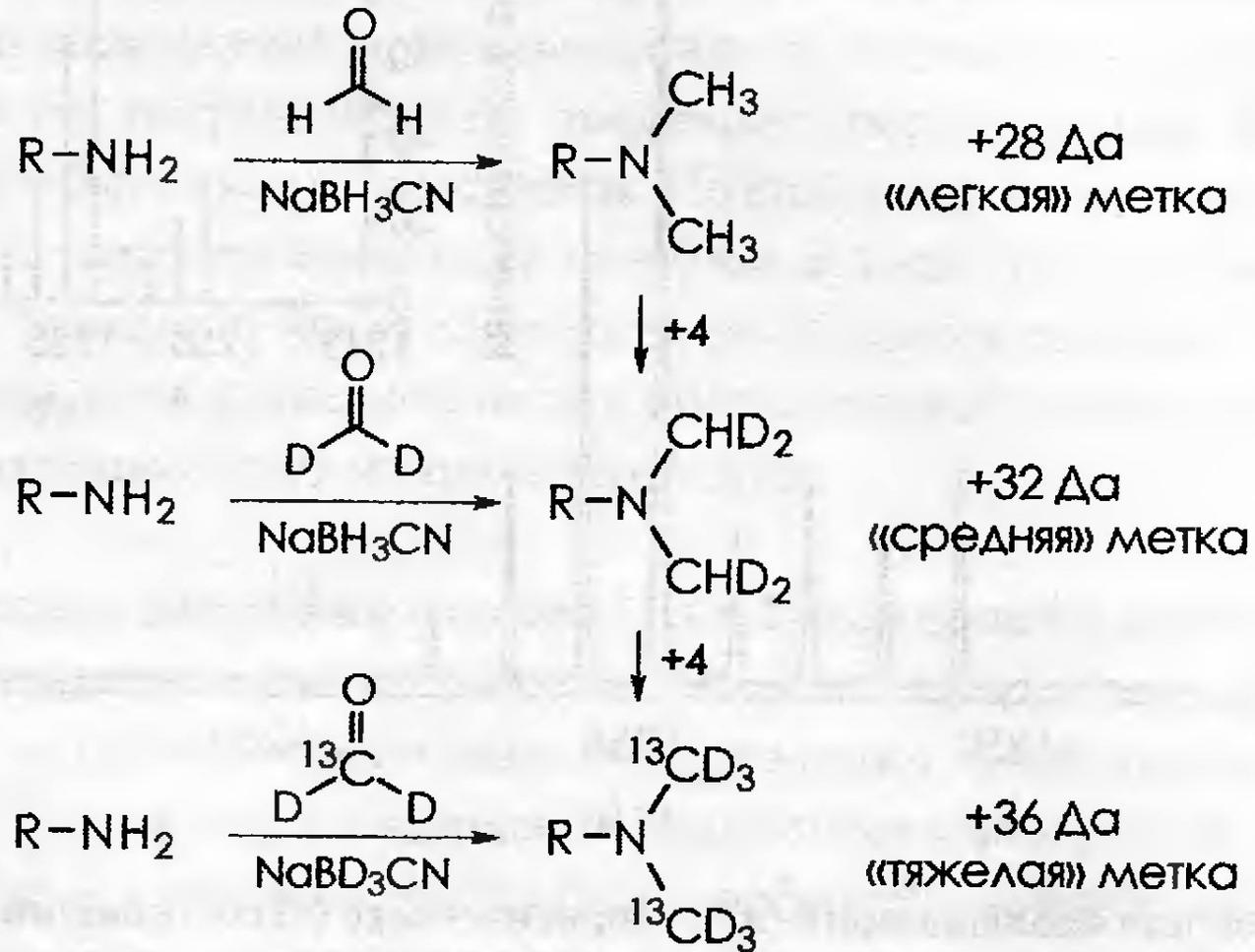


Рис. 8.7. Схема изотопного мечения аминогрупп методом диметилирования.

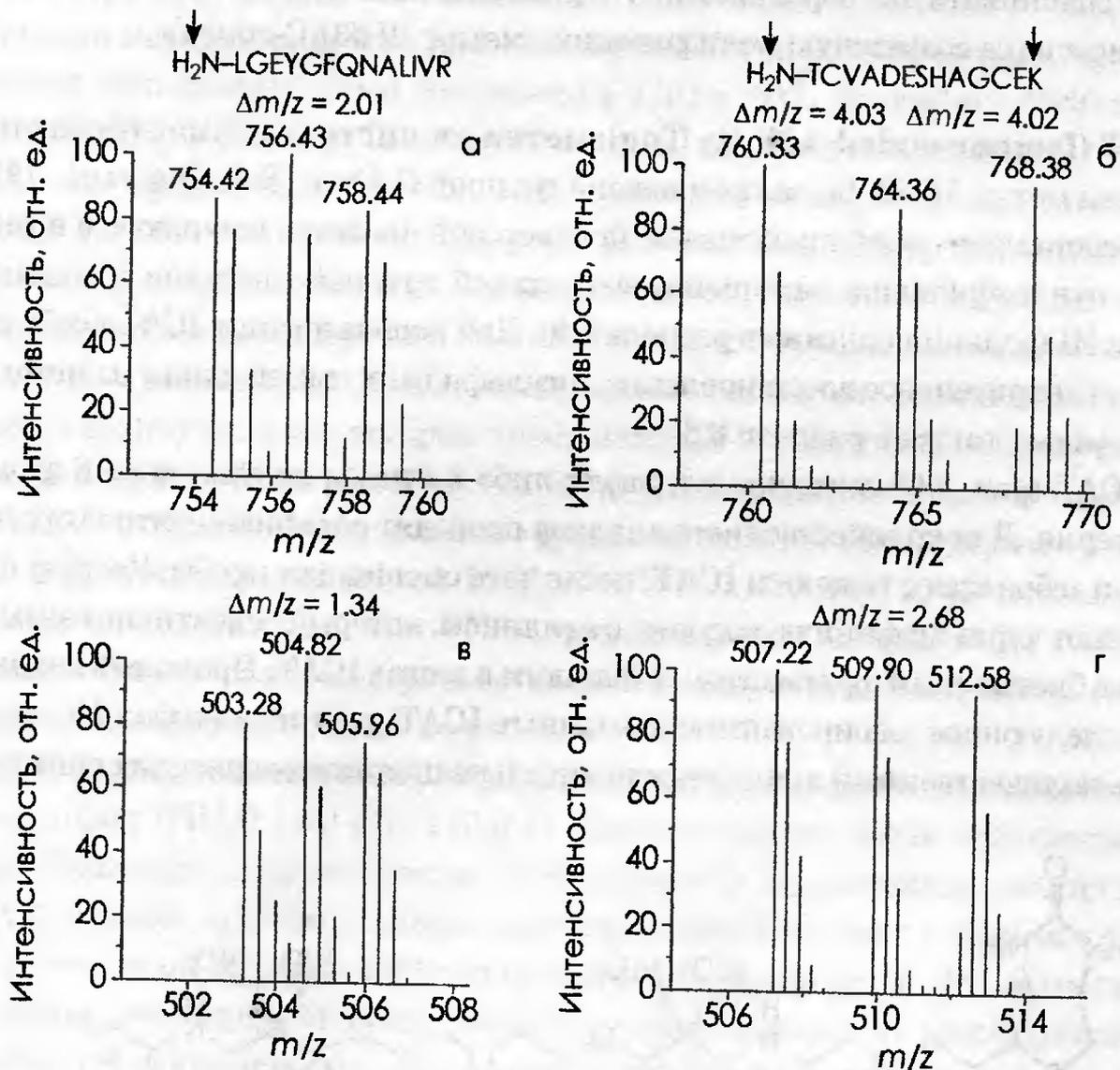
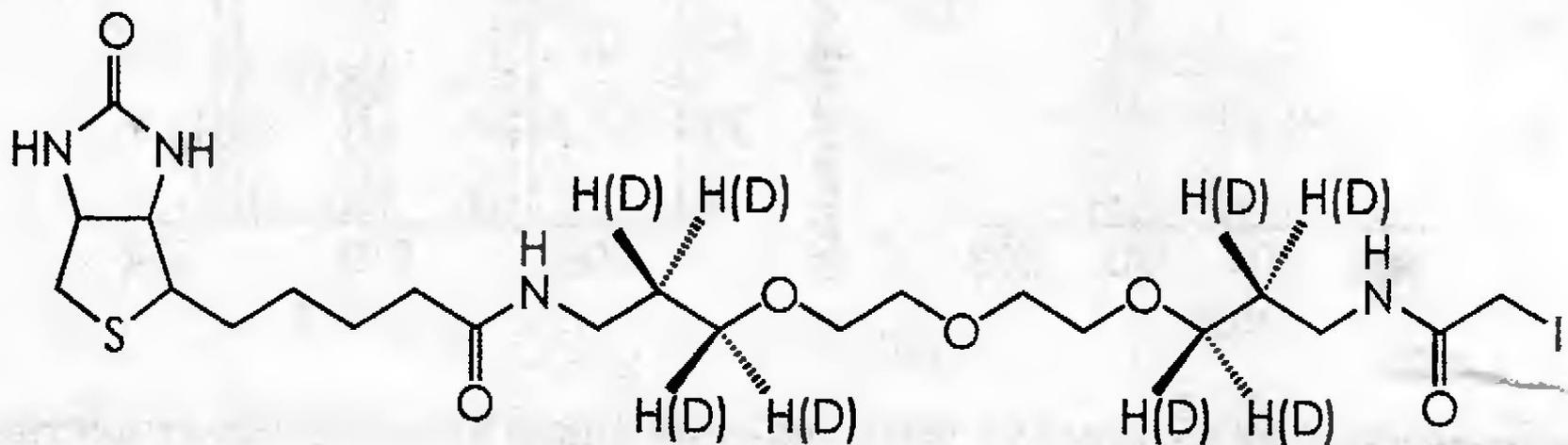


Рис. 8.8. Демонстрация облегчения деконволюции пиков в масс-спектрах пептидов, диметилированных только по N-концу (а и б для $z = 2$ и $z = 3$ соответственно), либо по лизину и N-концу одновременно (в и г для $z = 2$ и $z = 3$ соответственно) (P.J. Boersema et al., 2009, Copyright 2009, с разрешения Macmillan Publishers Ltd.).



Биотин

Линкер, несущий метку

Йодацетамид

Рис. 8.9. Структура ICAT.

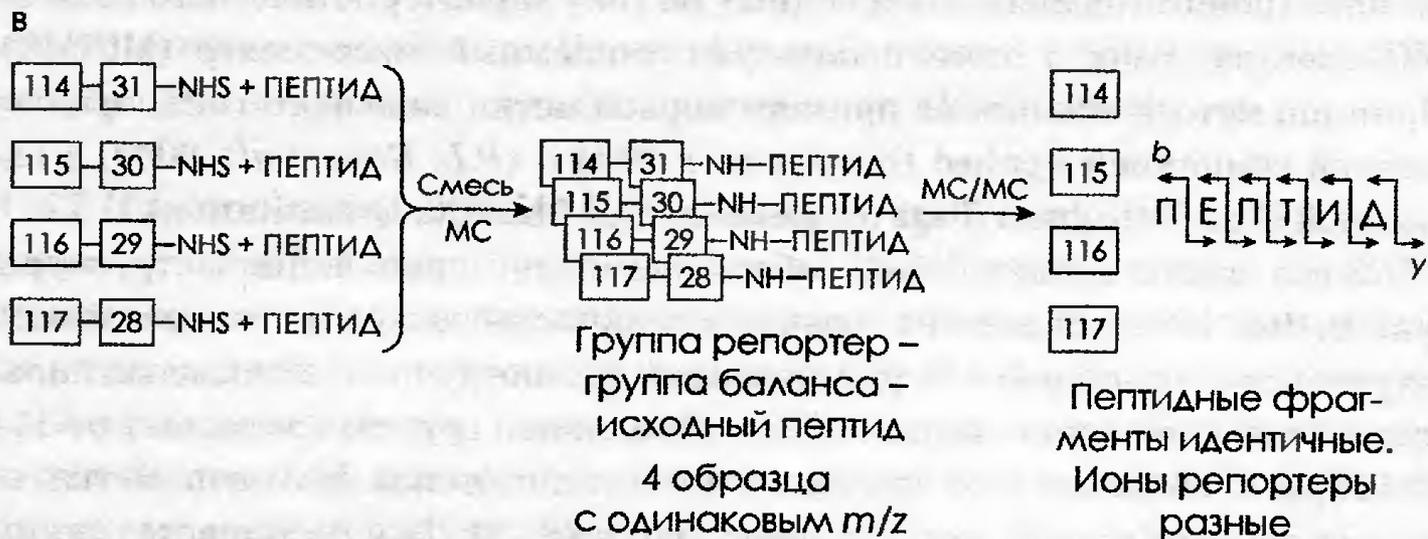
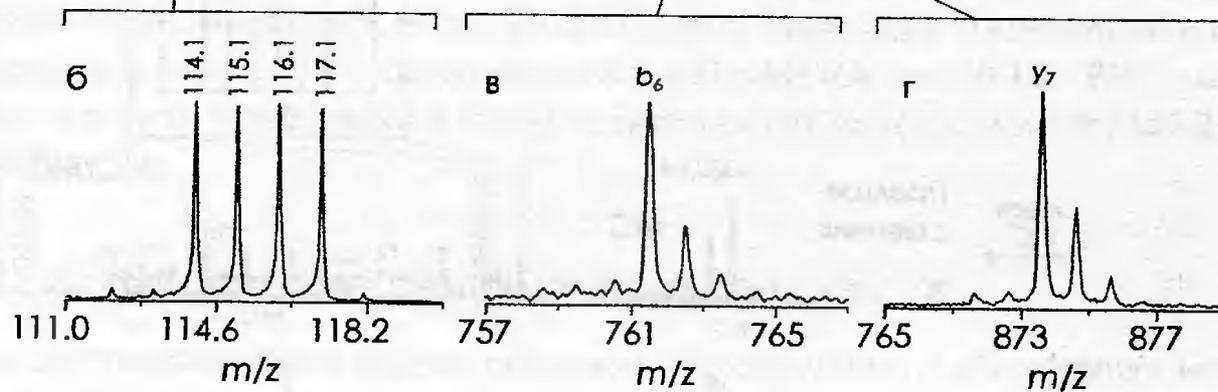
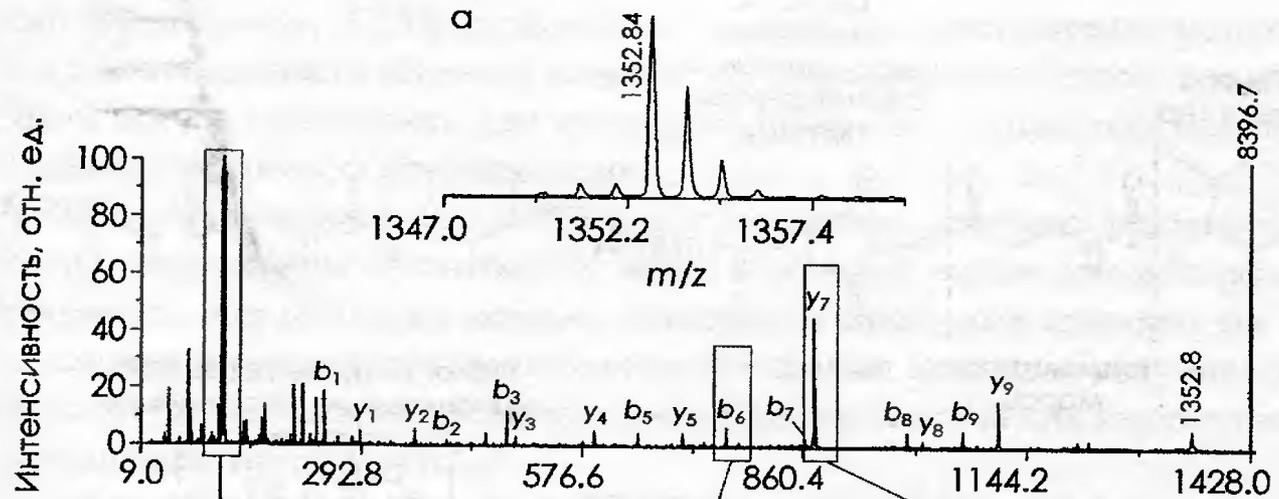
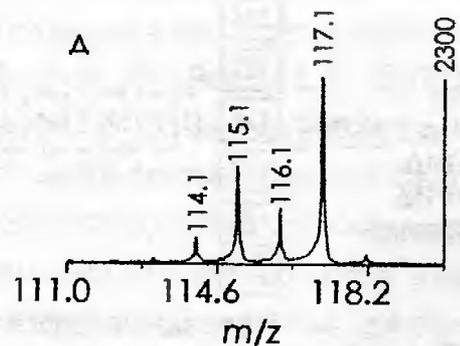


Рис. 8.10. Принцип работы тетраплекса iTRAQ (R.L. Ross et al., 2004, Copyright 2004, с разрешения American Chemical Society).



Смесь 1:5:2:10



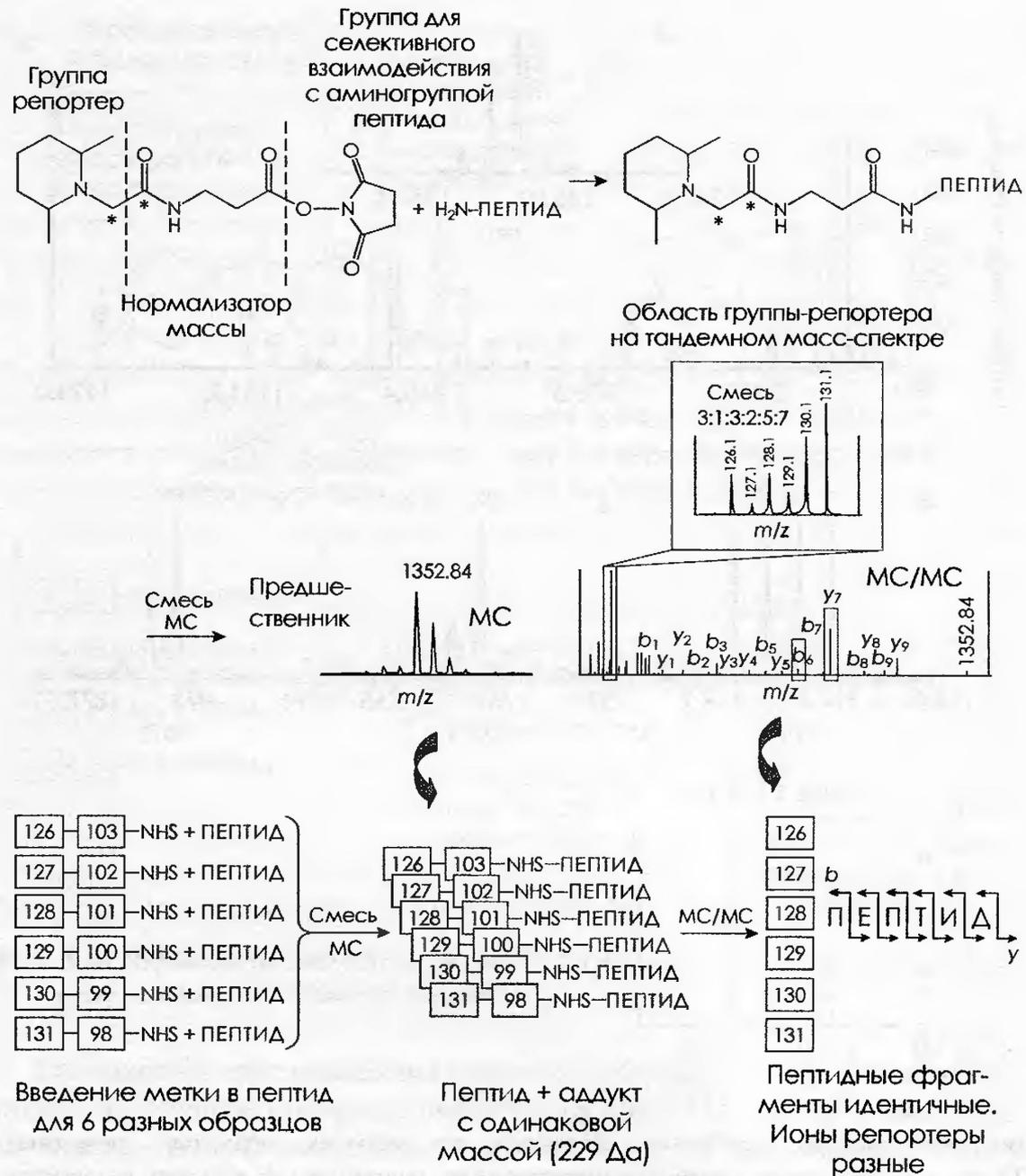


Рис. 8.11. Принцип работы гексаплекса ТМТ.

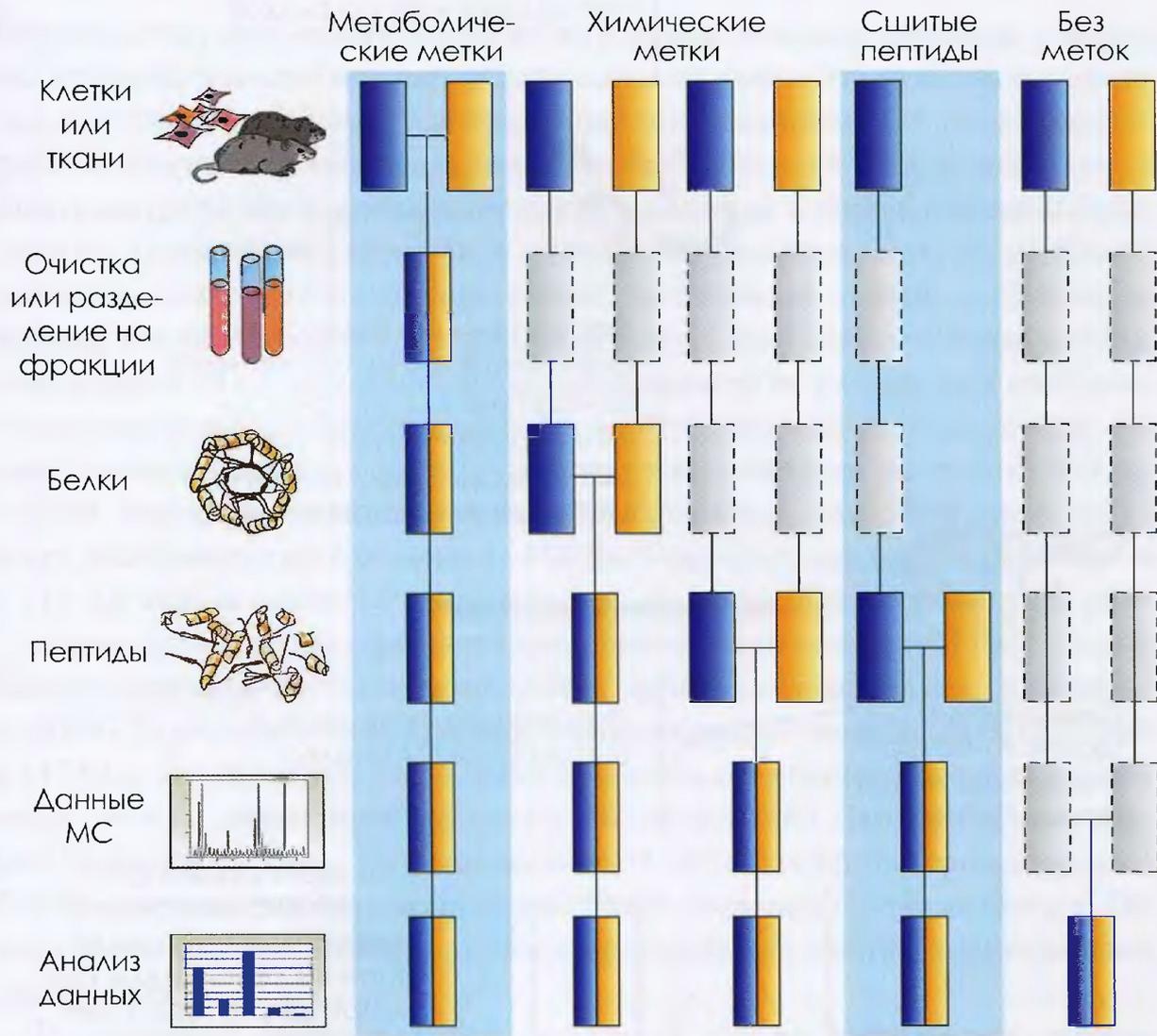


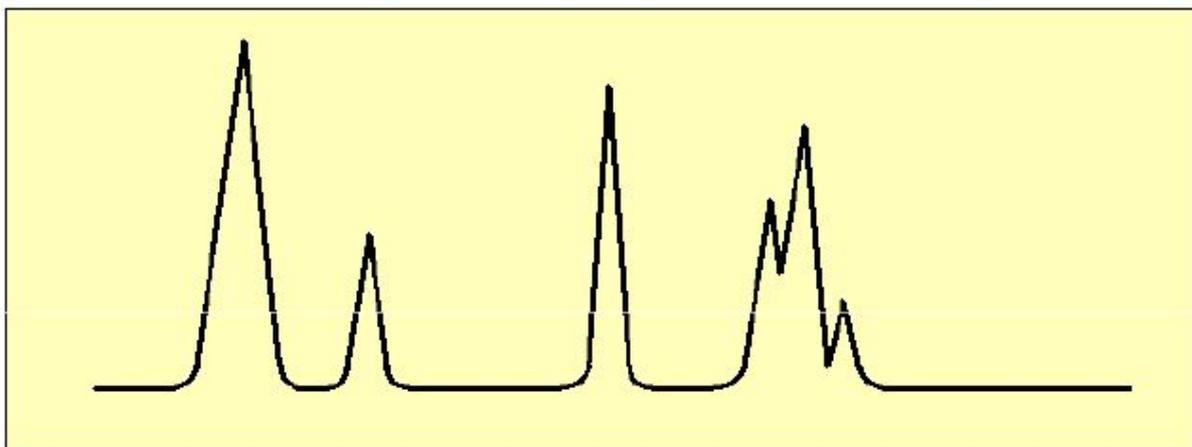
Рис. 8.4. Используемые подходы количественной протеомики. Желтые и синие прямоугольники символизируют образец и контроль соответственно. Горизонтальные линии означают этап, на котором образец и контроль смешиваются. Пунктирные линии символизируют те этапы пробоподготовки, на которых возможно дополнительное привлечение ошибок за счет того, что образец и контроль обрабатываются в неидентичных условиях (S.-E. Ong, M. Mann, 2005, с разрешения Nature Publishing Group).

Набор белков для количественного анализа

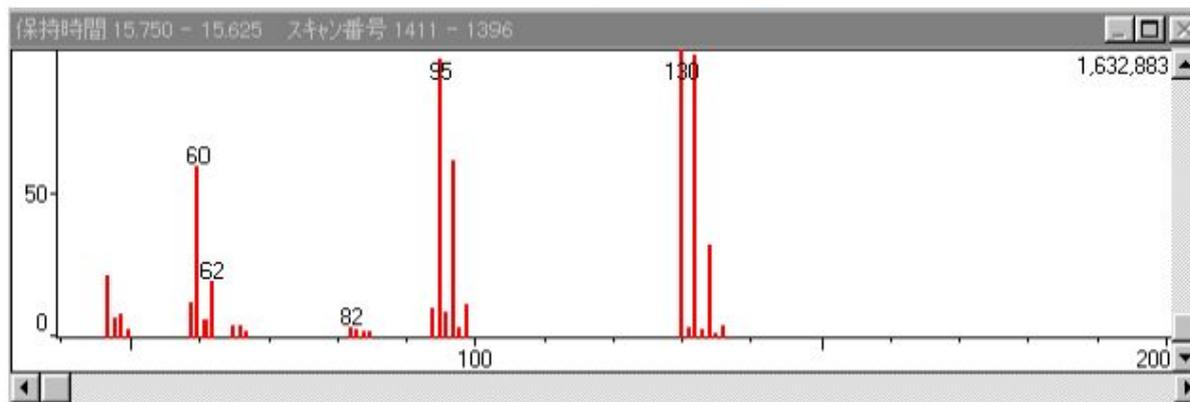


Хромато-масс-спектрометрия

Данные хроматографа - хроматограмма



Данные масс-спектрометра – масс-спектр



- Биологические исследования
- Метаболизм и фармакокинетика лекарств
- Изучение потенциальных лекарств
- Анализ дериватов лекарств
- Скрининг потенциальных лек. препаратов
- Идентификация известных препаратов
- Исследование биологических образцов
- Изучение биомолекул
 - Протеины и пептиды
 - Олигонуклеотиды
- Исследования объектов окружающей среды
 - Пестициды в пищевых продуктах
 - Загрязнения почвы, воздуха и грунтовых вод
- Судебная экспертиза
- Анализ пищевых продуктов
- Исследования различных технических образцов



Фармацевтика



Наука о жизни



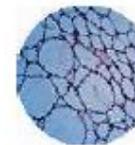
Окружающая среда



Химия

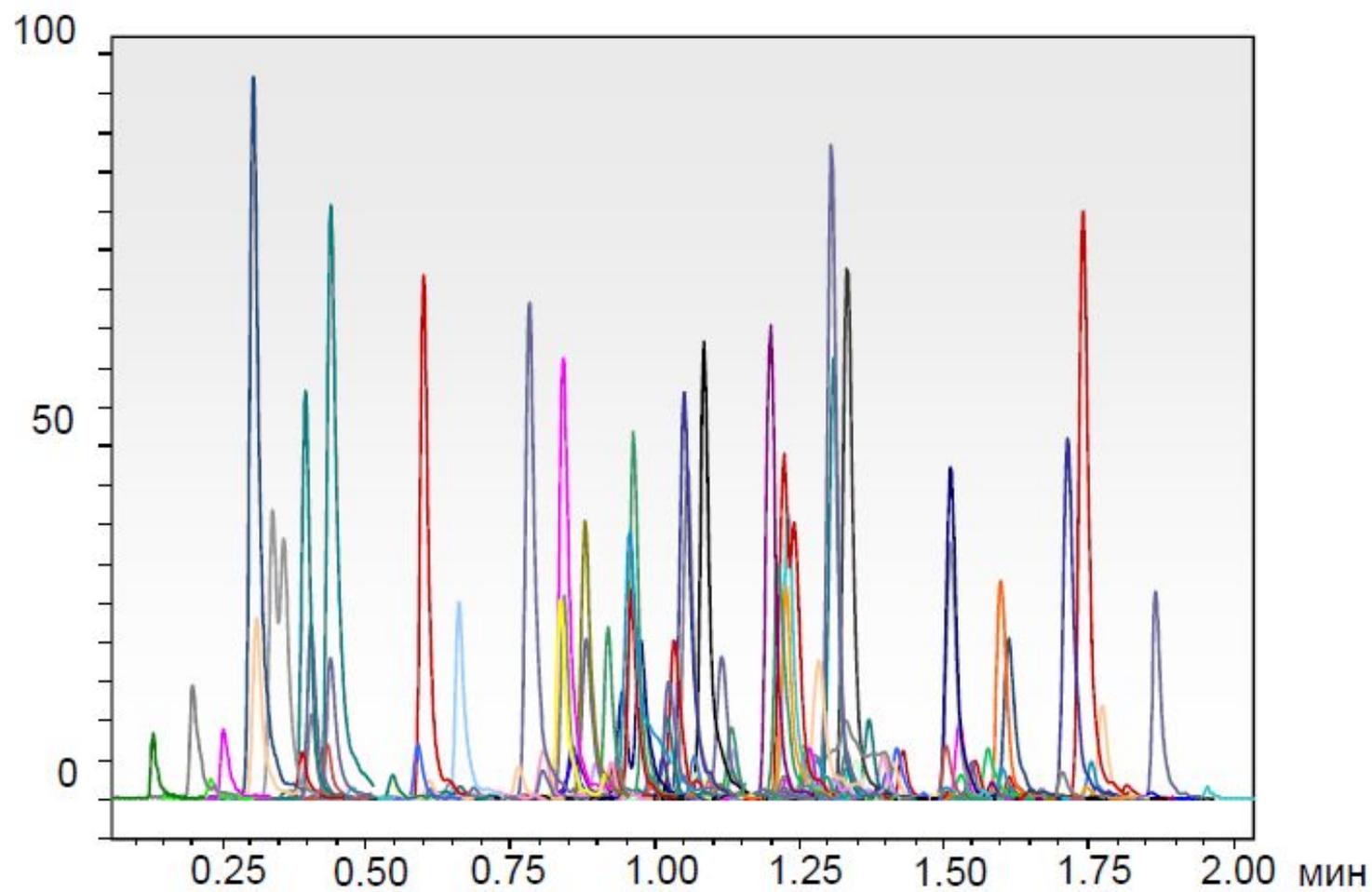


Пищевые продукты



Судебная экспертиза

Определение 316 пестицидов



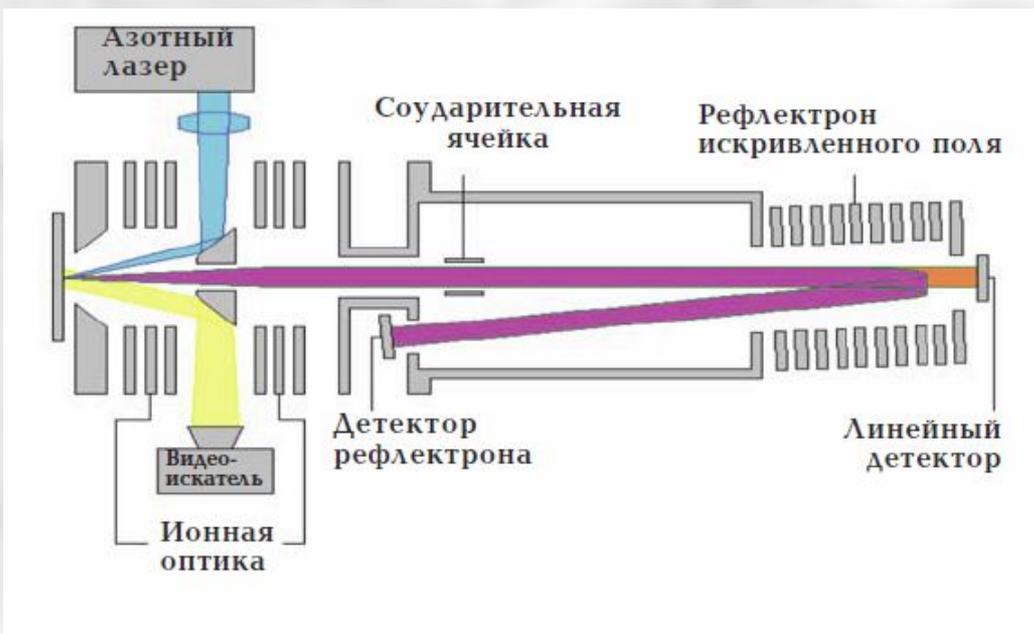
AXIMA@SARAMIS™



НОВАЯ СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ



- Заменяет стандартные биохимические методы
- Достоверный результат за две минуты
- Высокая воспроизводимость анализа
- Значительная экономия средств



ПРИНЦИП РАБОТЫ СИСТЕМЫ

AXIMA@SARAMIS™

Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксибензойная кислота). После этого образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд.

Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектры анализируются экспертной системой SARAMIS™, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов.

Для идентификации используются белки, присутствующие в клетке в неизменной концентрации независимо от внешних обстоятельств (температуры и времени инкубации, типа питательной среды).

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОПЕРАЦИЙ



Шаг 1

Выбираем одну колонию и наносим на подложку масс-спектрометра

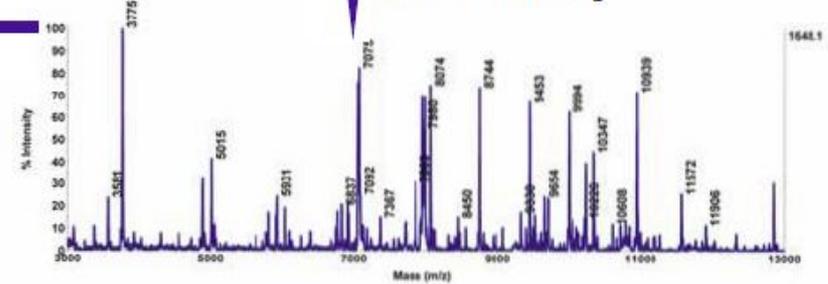


Добавляем 0,3 мкл матрицы

Подложка MALDI

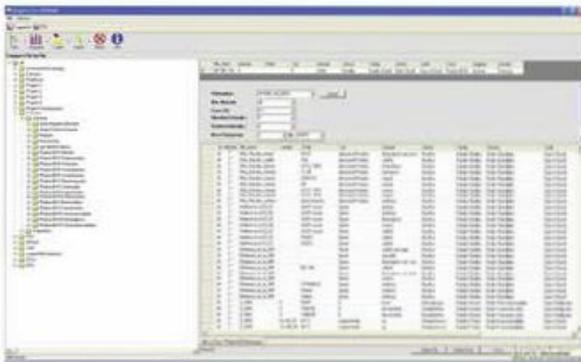
Шаг 2

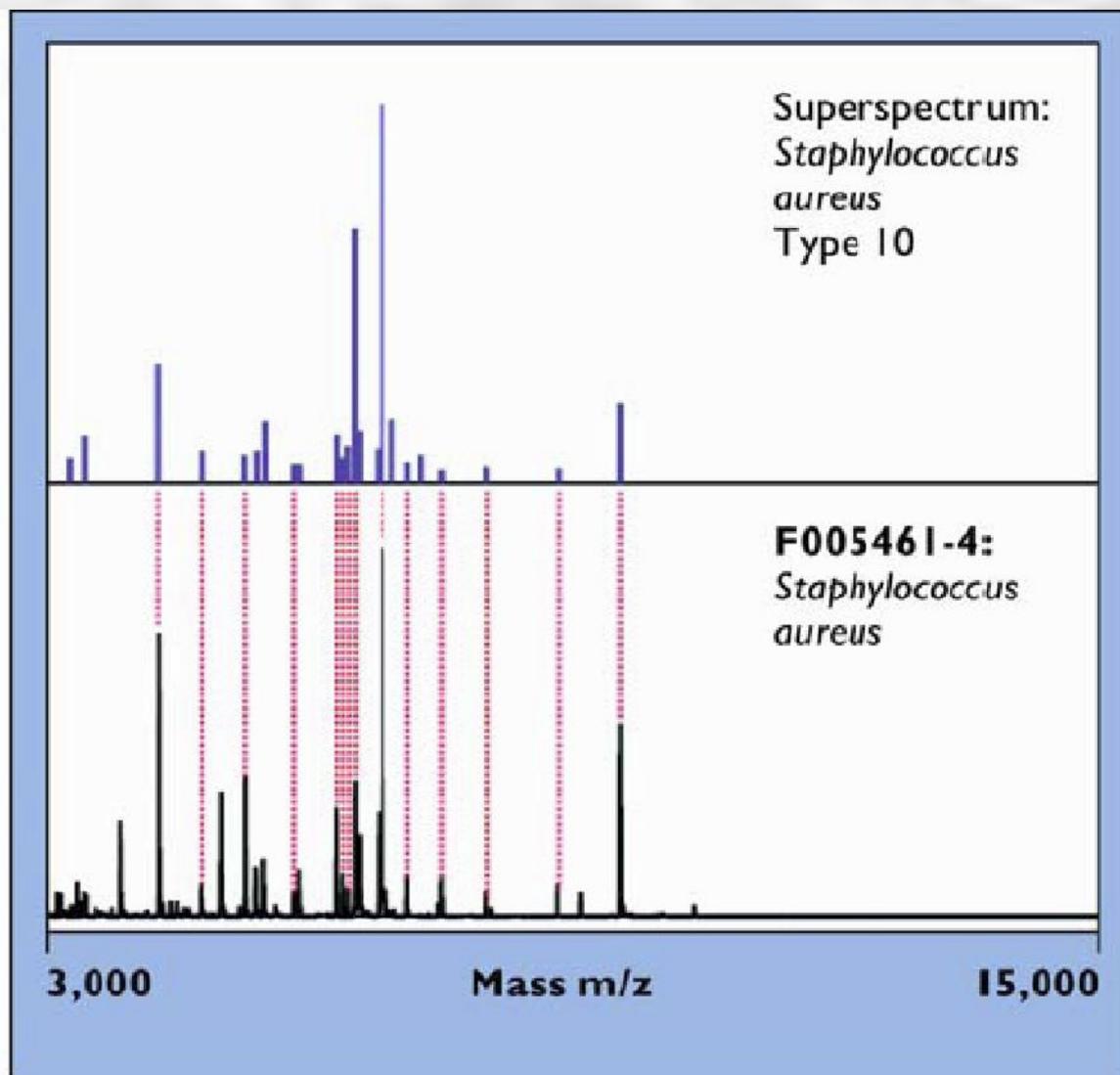
Получаем масс-спектр



Шаг 3

Идентифицируем бактерии, грибки, дрожжи по базе данных SARAMIS

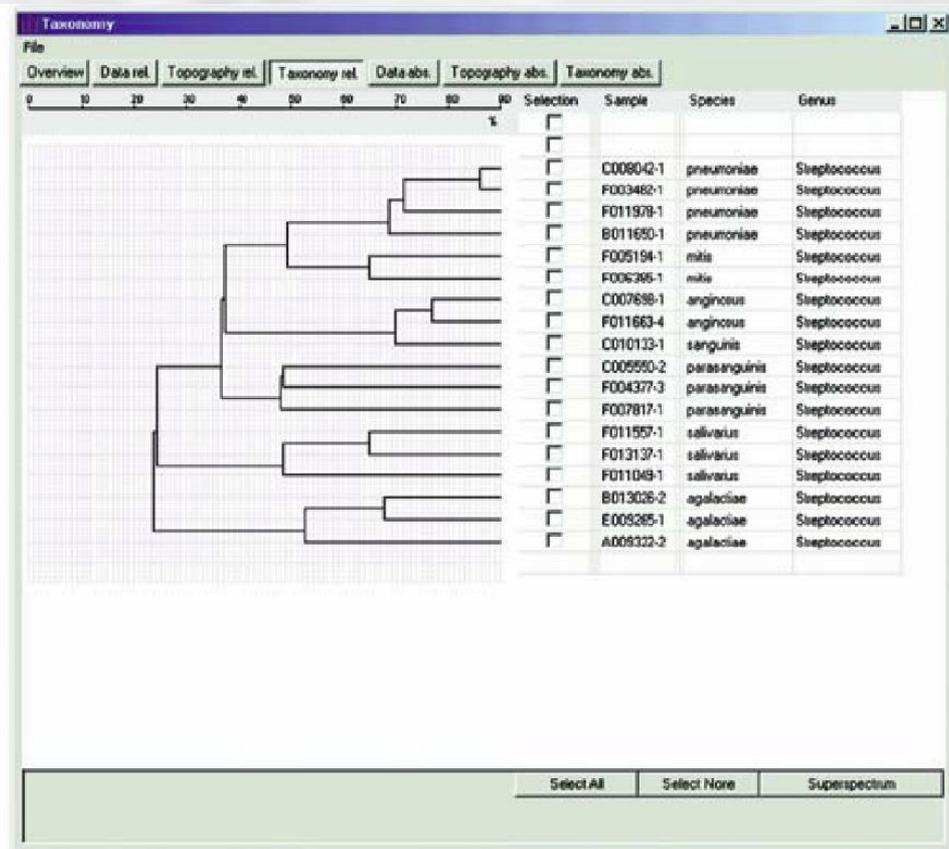




Суперспектр *Staphylococcus aureus* (верхняя панель) и первичный масс-спектр клинического изолята (нижняя панель). Пунктирные линии обозначают соответствие масс первичного и эталонного спектров.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРТНОЙ СИСТЕМЫ SARAMIS

Информация в базе данных (БД) SARAMIS организована в виде так называемых СуперСпектров (Superspectra™). Под этим термином подразумевается, что для каждого вида микроорганизмов сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 20 масс-спектров этого вида. При этом образцы получены из различных источников (больниц, лабораторий, микробиологических коллекций). Каждый образец тщательно идентифицирован с помощью сиквенса 16s РНК или других сертифицированных методов анализа. Для родов и семейств охарактеризованных микроорганизмов сформированы наборы присущих только им биомаркеров. Структурированная таким образом база данных позволяет быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы, а при невозможности — примерно определять место микроорганизма в таксономической иерархии. По состоянию на начало 2009 года накоплены суперспектры более чем для 1600 видов и 230 родов.



Пример кластеризации клинических образцов Streptococcus на основе MALDI-TOF масс-спектров. С помощью анализа и обработки всех спектров одного вида можно сгенерировать СуперСпектр, который будет являться эталоном для клинических изолятов.