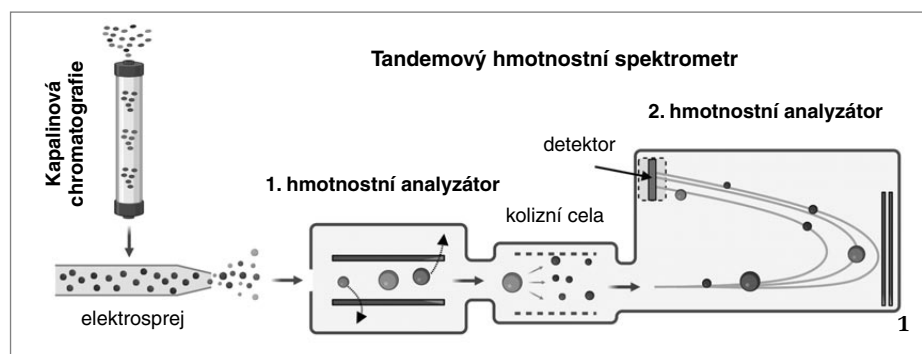


Hmotnostní spektrometrie – co to je a k čemu je to dobré?

V článku na str. 262–264 této Živy jsme se zaměřili na úvod do proteomiky a základní principy proteomických metod. V navazujícím příspěvku se blíže podíváme na hmotnostní spektrometr a jeho využití v proteomice i mimo ni. Pro uspokojení nároků biologického, biomedicínského a farmakologického výzkumu už často nestačí analyzovat jeden protein nebo jednu buněčnou dráhu. Je třeba jev pochopit v kontextu celých sítí molekul, celých buněk, tkání, i dokonce organismu a současná hmotnostní spektrometrie je jedním z analytických nástrojů, který nám studium takto složitých směsí umožňuje.



Jak funguje hmotnostní spektrometr?

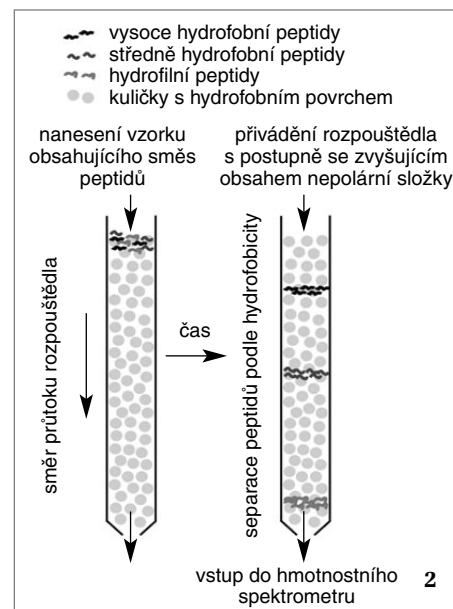
Jak jsme již zmínili, hmotnostní spektrometr jsou v principu vysoce přesné váhy. Tento analytický přístroj však umožňuje stanovit přesnou molekulovou hmotnost pouze nabitých částic. Kladně nebo záporně nabitě částice (ionty) vstupují do hmotnostního spektrometru, kde na ně v části zvané analyzátor působí magnetické, elektrické či radiofrekvenční pole, případně jejich kombinace. Pohyb iontů (rychlost a trajektorie) v analyzátoru je závislý na molekulové hmotnosti a náboji analyzovaných částic. Analyzátor pak poskytuje pro každou částici údaj o poměru její hmotnosti a náboje, vyjádřený jako hodnota m/z (anglicky mass to charge). V praxi se často v rámci jednoho přístroje využívají dva hmotnostní analyzátoři (tandemová hmotnostní spektrometrie, podle Mass Spectrometry označovaná MS/MS) – první umožňuje vybrat určité částice, které lze poté rozbit na menší fragmenty a ty pak měřit ve druhém hmotnostním analyzátoru (obr. 1).

Příklady využití

První hmotnostní spektrometr sestrojil v r. 1912 anglický fyzik Joseph John Thomson, objevitel elektronu, který s jeho pomocí prokázal existenci izotopů prvků. V počátcích byly hmotnostní spektrometry využívány hlavně pro izotopové analýzy prvků, např. olova ^{206}Pb a ^{207}Pb k určování geologického stáří hornin, případně pro získávání určitého izotopu, např. uhlíku ^{13}C .

Ve 40. letech 20. století začaly být hmotnostní spektrometry komerčně dostupné, jejich využití se však omezovalo hlavně na fyzikální a chemické laboratoře. Nečekaně významnou úlohu sehrály za druhé světové války. Díky schopnosti rozdělit izotopy určitého prvku procesem elektromagnetické separace byly hmotnostní spektrometry (kalutrony) ve velkých počtech využity pro obohacování uranu ^{235}U . Tento uran byl použit pro výrobu atomové bomby shozené na japonskou Hirošimu 6. srpna 1945. Dnes jsou již známy účinnější metody pro obohacování uranu, přesto je kvůli možnosti takového využití dodávání hmotnostních spektrometrů do některých států (např. Íránu) omezené.

Oproti původnímu využití pro výrobu zbraní se v současnosti tyto přístroje používají pro jejich odhalení. Na letištích a při kontrolách na hranicích států se můžeme setkat s tím, že bezpečnostní technik provádí stěry z povrchu zavazadel, rukou nebo oblečení. Takto sebrané vzorky se analyzují přímo na místě pomocí přenosného hmotnostního spektrometru o velikosti příručního kufříku. Na některých letištích využívají ještě i malé průchozí kabiny, ve kterých silný proud vzduchu uvolní případné zbytkové částice zakázaných látek z těla i oblečení a odnese je do hmotnostního spektrometru k analýze. Naměřená spektra se porovnávají s databází spekter výbušnin, nebezpečných chemikálií nebo drog. Výsledky vidí obsluha přístroje v reálném

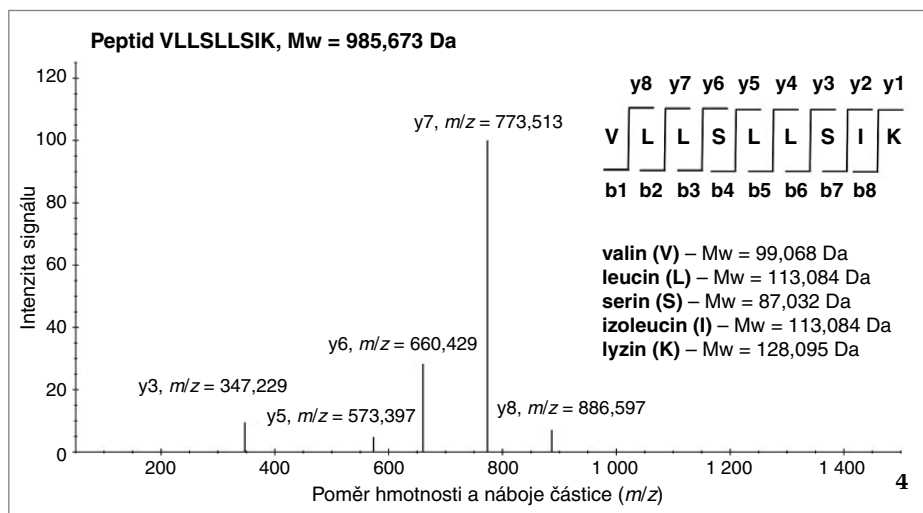
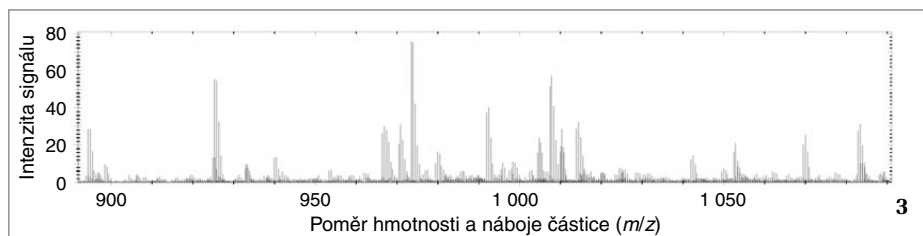


1 Schéma fungování hmotnostního spektrometru. Částice (např. peptidy) jsou nejprve separovány pomocí kapalinové chromatografie v roztoku vody s kyselinou mravenčí (zdroj protonů pro ionizaci peptidů) s narůstajícím podílem organického rozpouštědla. Elektrosprej (drobná skleněná špička na konci chromatografické kolony, na kterou je přiváděno vysoké napětí) rozstříkává kapalinu s peptidy do drobných kapek, ze kterých se rozpouštědla rychle odpaří a zůstanou jen nabitě peptidy. Tyto ionty vstupují do hmotnostního spektrometru a je zaznamenáno MS1 spektrum (MS – Mass Spectrometry). Díky specifickým vlastnostem iontů daných poměrem jejich hmotnosti a náboje (hodnota m/z) je možné s ionty cíleně manipulovat změnou elektromagnetického pole v analyzátoru. Vybrané prekurzorové ionty jsou filtrovány v prvním hmotnostním analyzátoru a odeslány do kolizní cely. Zde dochází k jejich srážkám s plynem a vzniklé fragmentové ionty jsou posílány do druhého hmotnostního analyzátoru a zaznamenány detektorem (MS2 spektrum). Vytvořeno v programu BioRender, orig. J. Červenka (odkaz na webu Živy)

2 Separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s reverzní fází. Peptidy ve vodném roztoku se vážou na hydrofobní povrch kuliček, a to tím pevněji, čím více jsou peptidy hydrofobní. Postupným protékáním rozpouštědla s přibývajícím organickým (nepolárním) složkou se postupně interakce peptidů s kuličkami narušují a peptidy jsou unášeny do hmotnostního spektrometru.

3 Záznam MS1 spektra. Intenzity prekurzorových iontů (peptidů) v části MS1 spektra v rozsahu 890 až 1 090 m/z z měření peptidů lidských fibroblastů. Prekurzorové ionty jsou vybírány k fragmentaci v kolizní celi na základě jejich intenzity v MS1 (osa y) od nejvyšší intenzity signálu po nejnižší.

4 Záznam MS2 spektra. Intenzity fragmentových iontů v MS2 spektru vzniklé z prekurzorového iontu $m/z = 493,3364$, $z = 2$ (peptid s aminokyselinovou sekvencí VLLSLLSIK, molekulová hmotnost $M_w = 985,673$ Da, jednotka Da – dalton). Peptidy se mohou fragmentovat v oblasti



peptidové vazby, čímž vznikají ionty typu *b* (N-koncová část peptidu) a *y* (C-koncová část peptidu). Čísla *b* a *y* iontů ukazují počet aminokyselinových zbytků v iontu. Jak je patrné z MS2 spektra, rozdíly hodnot m/z mezi jednotlivými *y* ionty jsou rovny Mw odpovídajícího aminokyselinového zbytku. Mw uvedené v obr. patří aminokyselinovým zbytkům bez H_2O , uvolněné při vzniku peptidové vazby. Orig. autoři článku (obr. 2–4)

čase (sekundy) a pro detekci látky stačí její stopové množství (jednotky nanogramů).

Výsledky analýz hmotnostní spektrometrie ovlivňují i náš každodenní život. Tyto přístroje se používají pro kontrolu pitné vody (zjišťování přítomnosti anorganických i organických látek) a potravin, včetně doplňků stravy. Umožňují určit kontaminanci vzorku (např. ovoce) zakázanými hnojivy a pesticidy, zjistit přítomnost toxinů plísní (třeba aflatoxinů) produkovaných rodem *Aspergillus* nebo ověřit deklarované složení a pravost výrobku.

V klinické medicíně se hmotnostní spektrometrie rutinně používá pro analýzy vzorků krve nebo moči. Můžeme sledovat hladiny léčiv v těle a ověřit, zda pacient bere léky pravidelně, případně jestli není nutné upravit dávkování kvůli odlišné rychlosti metabolismu léčiva u konkrétního člověka. Můžeme stanovit přítomnost či hladiny látek, jako jsou drogy, jedy, vitamíny atd., a metabolitů spojených např. s otravou nebo metabolickou poruchou (kyselina mravenčí apod.). Ve větších nemocnicích je používán hmotnostní spektrometr pro rychlou (v řádu desítek minut) identifikaci původců mikrobiálních onemocnění způsobovaných bakteriemi, kvasinkami a plísněmi, včetně důležité informace o rezistenci identifikovaného bakteriálního kmene vůči antibiotikům. Zajímavou, avšak zatím nerozšířenou metodou je elektrický skalpel, který při provádění řezu během chirurgické operace odpařuje část tkáně a tyto výpa-

ry jsou ihned analyzovány hmotnostním spektrometrem. Chirurg má tak okamžitou informaci, zda např. ještě odstraňuje nádorovou tkáň, nebo již zasahuje do zdravé tkáně, což by mělo významně pomoci přesnému operování nádorů.

Nejrozmantější uplatnění nachází hmotnostní spektrometrie v základním i aplikovaném výzkumu. Archeologové mohou provádět radiokarbonovou metodu datování artefaktů, založenou na stanovení množství izotopu uhlíku ^{14}C v organických materiálech. Hmotnostní spektrometry jsou obvyklou součástí vesmírných sond i planetárních modulů a poskytují astrobiologům informace o složení atmosféry i pevné hmoty vesmírných těles. Malý přístroj je umístěn také na Mezinárodní vesmírné stanici (ISS), kde monitoruje kvalitu vzduchu dýchaného posádkou. Chemie, fyzika, biologie – analýzy DNA, RNA, proteinů, lipidů, metabolitů, organických i anorganických látek – všude tam se dnes využívá hmotnostní spektrometrie. Poskytuje informaci o hmotě iontů, ze které můžeme odvodit nejen přítomnost a množství určitého atomu nebo molekuly, ale také přesné chemické (izotopové) složení a strukturu. Jedinou nutností zůstává, aby byla studovaná látka ionizovatelná a odpověď na otázku mohla poskytnout její hmotnost či náboj.

Hmotnostní spektrometrie v proteomických experimentech

Pro každý proteomický experiment je klíčová extrakce proteinů ze vzorku. Podle typu vzorku se využívají různé metody uvolnění proteinů – např. mechanická homogenizace tkáně, rozpuštění buněčných membrán detergenty, povaroení vzorku apod. Přidává se též redukční činidlo, které zajistí rozrušení disulfidických můstků – kovalentních vazeb mezi postranními řetězci cysteinů, které často propojují různé části řetězce proteinu nebo i proteiny mezi sebou. Následuje alkylace redukovaných postranních řetězců cysteinů, aby se disulfidické můst-

ky nemohly znovu vytvořit. Denaturované proteiny jsou poté rozštěpeny specifickou proteázou (např. trypsinem), čímž vznikne složitá směs menších peptidů, které jsou pro analýzy vhodnější než celé velké molekuly proteinů. Tuto složitou směs peptidů je nutné rozdělit, k čemuž se využívá kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC) s reverzní fází, ve které se peptidy postupně uvolňují ve směsi organického rozpouštědla a vody, tedy látek, které se dají snadno odpařit (obr. 2). Při vstupu peptidů do hmotnostního spektrometru se peptidům udělí náboj, nejčastěji pomocí ionizace elektrosprejem. Uvnitř spektrometru je vakuum, aby se předešlo srážkám iontů peptidů s molekulami vzduchu, které by mohly narušit ionizaci nebo peptidy rozbít (obr. 1). V hmotnostním analyzátoru jsou změřeny všechny peptidy (prekursorové ionty), které vstupují do spektrometru v daný okamžik, a výsledkem je MS1 spektrum (obr. 3). První analyzátor následně vybírá jednotlivé peptidy podle intenzity signálu a postupně je posílá do kolizní cely. Zde vlivem vysokého napětí a srážek s molekulami inertního plynu (dusíku) dochází k rozpadu prekursorových iontů na ionty menších peptidů a aminokyselin – fragmentové ionty. Ty vstupují do druhého analyzátoru, kde jsou změřeny, a poté poslány na detektor, který zaznamená intenzity signálů jednotlivých iontů – výsledkem je MS2 spektrum.

Jak ale ze seznamu hodnot m/z prekursorových a fragmentových iontů zjistíme, které proteiny byly ve vzorku? Protože jsme pro přípravu peptidů z původních proteinů použili specifickou proteázu trypsin, která štěpí proteiny vedle aminokyseliny lyzinu a argininu, každý vzniklý peptid by měl být ukončen lyzinem nebo argininem. Z MS1 spektra víme, jaké hodnoty m/z patří jednotlivým peptidům, a známe i hodnoty m/z fragmentových iontů (menších peptidů) patřící prekursorovým iontům vybraným z MS1 spektra. Protože k fragmentaci prekursorových iontů dochází přednostně v místě peptidové vazby, můžeme z MS2 spektra „přečíst“ aminokyselinovou sekvenci původního peptidu (obr. 4). Pro identifikaci všech peptidů, resp. proteinů, ve vzorku se využívají proteinové databáze a počítačové programy. Pokud známe sekvenci genomu studovaného organismu, můžeme z ní odvodit sekvence proteinů, které tento genom kóduje. Pomocí počítačových programů tyto proteiny *in silico* rozštěpíme stejnou proteázou (trypsinem) a získáme teoretické molekulové hmotnosti peptidů. Porovnáním naměřené molekulové hmotnosti peptidu s teoretickou hodnotou a ověřením sekvence na základě fragmentových iontů lze určit, který peptid, resp. protein, jsme identifikovali. Porovnáním signálů jednotlivých peptidů mezi vzorky pak můžeme kvantifikovat zastoupení jednotlivých proteinů v různých vzorcích.

S významným vývojem hmotnostních spektrometrů v posledních letech lze očekávat, že aplikací bude jen přibývat.

Práce byla podpořena projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny spolufinancovaným Evropskou unií (LX22NPO5102).

Použitá literatura uvedena na webu Živý.