

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 017342

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2012.11.30

(51) Int. Cl. B01D 59/44 (2006.01)

(21) Номер заявки

201070855

(22) Дата подачи заявки

2009.01.14

(54) СПОСОБ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

(31) 12/014,671

(56) WO-A2-99/05319

(32) 2008.01.15

WO-A2-97/27325

(33) US

US-B2-6723564

(43) 2011.02.28

US-B1-6468748

(86) PCT/US2009/031020

(87) WO 2009/091841 2009.07.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

СЕКВЕНОМ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Беккер Томас (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

017342
B1

(57) В изобретении предлагается новая добавка для улучшения анализа посредством масс-спектрометрии. Более конкретно, оказалось, что аскорбиновая кислота уменьшает или исключает присутствие аддуктов, обычно присутствующих в спектрах масс. Улучшенные процессы и композиции в соответствии с изобретением позволяют повысить точность, чувствительность и производительность при анализе проб посредством масс-спектрометрии.

B1

017342

Родственная патентная заявка

Заявка на данный патент претендует на приоритет не являющейся предварительной патентной заявки США № 12/014671, зарегистрированной 15 января 2008 г., на имя заявителя Thomas Becker и под названием "Композиции и процессы для улучшенного масс-спектрометрического анализа", обозначенной номером патентного поверенного SEQ-6015-UT. Данная патентная заявка включена сюда в своей полноте, включая весь текст и чертежи в юрисдикции, разрешающей такую практику.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение в целом относится к композициям и способам для использования при масс-спектрометрии.

Уровень техники по изобретению

Масс-спектрометрия является мощным аналитическим инструментом для измерения молекулярной массы аналита в пробе. При использовании времяпролетного масс-спектрометра скорость пролета ионов приблизительно в 10^7 раз больше скорости миграции молекул в электрофоретическом геле, поэтому масс-спектрометрия дает очень быстрый способ анализа, даже когда измерение спектра повторяются от 10 до 100 раз, чтобы достигнуть хорошего отношения сигнала к шуму.

Анализ посредством масс-спектрометрии обычно начинается с ионизации проб различными средствами, например MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) - ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы или ES (Electrospray Ionization) - электрораспылительной ионизацией. Процедуры подготовки и измерения при MALDI состоят прежде всего из ввода молекул аналита в носитель пробы в виде твердой или жидкой, ИК- или УФ-поглощающей матрицы, которая обычно является органической кислотой. Носитель пробы, включающий в себя матрицу и анализ, помещают в источник ионов масс-спектрометра.

Матрицу испаряют короткими лазерными импульсами, и молекула аналита тем самым переносится в газовую fazу в нефрагментированном состоянии. Молекула аналита ионизируется путем соударения и реакции с ионами матрицы, образующимися в то же самое время. Прикладываемое напряжение ускоряет ионы, направляя их в пролетную трубку, в которой отсутствует поле. Из-за своей разницы в массах ионы в источнике ионов ускоряются до различных скоростей, при этом ионы меньшего размера достигают детектора раньше более крупных ионов. Различные времена пролета преобразуются в различные массы ионов.

Альтернативным способом ионизации аналита является электрораспыление (или ES). Как и MALDI, электрораспыление обеспечивает ионизацию/испарение полярных молекул.

Первоначально пробу, представляющую интерес, растворяют в растворителе, где она до некоторой степени существует в ионизированной форме. При обычном электрораспылении (ES) раствор прокачивают через тонкий капилляр, который повышается до высокого потенциала. Маленькие заряженные капли распыляются из ES-капилляра в газ ванны при атмосферном давлении и перемещаются в сторону уменьшения давления и градиента потенциала к отверстию в высоковакуумной системе масс-спектрометра. Когда капельки проходят по этому пути, они становятся десольватированными и уменьшаются в размерах, так что поверхностные кулоновские силы могут преодолеть силы поверхностного натяжения. В результате капельки разбиваются на капельки меньшего размера, пока из капельки не десорбируется ион, или полностью не будет удален растворитель. Точный механизм образования иона не совсем ясен, но результатом является пучок ионов, которые отбираются масс-спектрометром. Более подробное описание ES процесса дано в Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Application edited by Cole (John Wiley and Sons, New York).

Какой бы способ ионизации ни был использован, образование нежелательных аддуктов во время ионизации может ухудшить качество и разрешающую способность спектров, образованных масс-спектрометрией. Более конкретно, присутствие нежелательных аддуктов может затруднить обнаружение и анализ аналита, особенно анализов с малым количеством и малой массой.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает процессы и композиции для улучшенного анализа методом масс-спектрометрии. Здесь предлагаются масс-спектрометрические способы приготовления проб, которые уменьшают или минимизируют образование аддуктов экономически эффективным и легким для реализации образом, который не нарушает ионизацию и анализ масс или детектирования ионов проб. Улучшенные способы и композиции в соответствии с изобретением позволяют более легко идентифицировать и количественно определять пики аналита, тем самым, увеличивая число правильных откликов. Эти улучшения оказались особенно полезными для проб, загрязненных солями натрия или аммония, а также для проб с малой концентрацией аналита. В некоторых воплощениях, описанных здесь, предусмотрено использование аскорбиновой кислоты или ее соли, таутомера или аналога в качестве уменьшающей содержание аддуктов добавки, которая снижает присутствие аддуктов в масс-спектрах и увеличивает отношение сигнала к шуму (s/n). Хотя воплощения изобретения относятся в дальнейшем к использованию "аскорбиновой кислоты", следует понимать, что специалист средней квалификации в этой области техники может использовать аскорбиновую кислоту, аскорбат, ее соль, таутомер или аналог (описаны ниже) в описанных здесь способах и композициях.

В одном аспекте изобретения предлагается способ уменьшения образования аддуктов в пробе, содержащей аналит для анализа методом масс-спектрометрии, который включает в себя этап добавления уменьшающей содержание аддукта добавки, содержащей аскорбиновую кислоту, к пробе перед анализом аналита масс-спектрометрией. В родственном воплощении уменьшающая содержание аддукта добавка может также содержать оксалат аммония. В некоторых воплощениях уменьшающая содержание аддукта добавка используется в комбинации с другими уменьшающими содержание аддуктов добавками (известными или еще не открытыми уменьшающими содержание аддуктов добавками). В определенных воплощениях уменьшающая содержание аддукта добавка используется в комбинации с одной или больше смолами.

В определенных воплощениях аналитом является нуклеиновая кислота, такая как дезоксирибонуклеиновая кислота или рибонуклеиновая кислота. Описанные здесь воплощения могут быть применены к различным форматам масс-спектрометрии, так как процедуры обращения с пробами перед масс-анализом, могут вызвать образование нежелательных аддуктов. Примеры форматов масс-спектрометрии включают, но не только, масс-спектрометрию с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF MS), лазерную десорбционную масс-спектрометрию (LDMS), электрораспылительную масс-спектрометрию (ESMS), ионную циклотрон-резонансную масс-спектрометрию (ICRMS) и масс-спектрометрию с преобразованием Фурье (FTMS). Описанные здесь улучшения легко применимы к форматам масс-спектрометрии, в которых аналит переводится в летучее состояние и ионизируется ("ионизация MS", например, MALDI-TOF MS, LDMS, ESMS).

Изобретение также предлагает способ уменьшения образования аддуктов в пробе, содержащей аналит для анализа масс-спектрометрией, включающий в себя этап добавления уменьшающей содержание аддукта добавки, содержащей аскорбиновую кислоту, в матрицу перед анализом аналита масс-спектрометрией. Способ может также включать в себя дополнительный этап добавления уменьшающей содержание аддукта добавки в аналит (а также в матрицу) перед анализом аналита масс-спектрометрией. В родственном воплощении уменьшающая содержание аддукта добавка может также содержать оксалат аммония. В некоторых воплощениях матричная композиция содержит 3-гидроксипиколиновую кислоту (3-ГПК), диаммонийцитрат (ДАЦ) или их комбинацию. В определенных воплощениях аналитом является нуклеиновая кислота, такая как дезоксирибонуклеиновая кислота или рибонуклеиновая кислота. В некоторых воплощениях уменьшающая содержание аддукта добавка также добавляется к аналиту.

В некоторых воплощениях изобретения предлагаются способы подготовки подложки, подходящей для использования в масс-спектрометрии, включающие в себя этап осаждения матричного материала, содержащего уменьшающую содержание аддукта добавку, на подложку, при этом уменьшающая содержание аддукта добавка содержит аскорбиновую кислоту. В родственном воплощении уменьшающая содержание аддукта добавка может также содержать оксалат аммония. В другом родственном воплощении способ также включает в себя этап герметизации подложки. Способы герметизации подложки включают в себя, но не только, условия для осуществления процессов упаковки, например, таких как вакуумная герметизация, тепловая герметизация. В некоторых воплощениях способ также включает в себя этап обработки подложки агентом или газом для минимизации оксидирования. В определенных воплощениях подложку пропускают инертным газом, например аргоном, перед ее герметизацией. В определенных воплощениях подложку герметизируют и/или упаковывают для ограничения или исключения воздействия на нее светового или УФ-излучения перед анализом посредством масс-спектрометрии. В некоторых воплощениях подложку герметизируют и/или упаковывают в контейнер, включающий без ограничения полимерный контейнер (например, полиэтиленовый, полипропиленовый, полистироловый контейнер). В определенных воплощениях подложка включает в себя кремнезем или диоксид кремния.

Изобретение также предлагает композиции для анализа масс-спектрометрией, включающие в себя аналит и уменьшающую содержание аддукта добавку. В определенных воплощениях уменьшающая содержание аддукта добавка содержит аскорбиновую кислоту. В родственном воплощении уменьшающая содержание аддукта добавка может также содержать оксалат аммония.

В некоторых воплощениях изобретения предлагается композиция, подходящая для анализа масс-спектрометрией, включающая в себя аналит и уменьшающую содержание аддукта добавку, при этом добавка содержит аскорбиновую кислоту. Композиция может также содержать оксалат аммония.

В определенных воплощениях изобретения предлагается целевой участок (участок-мишень) для масс-спектрометрии, включающий в себя подложку и уменьшающую содержание аддукта добавку, содержащую аскорбиновую кислоту. Целевой участок может также включать в себя оксалат аммония. В некоторых воплощениях целевой участок может также включать в себя матричный материал. В родственном воплощении матричный материал предварительно осаждается на подложку. В определенных воплощениях целевой участок может также включать в себя аналит. В некоторых воплощениях композиция герметизируется. Способы герметизации подложек включают в себя, но не только, вакуумную герметизацию и тепловую герметизацию. В определенных воплощениях композиция обрабатывается агентом или газом для минимизации оксидирования. В некоторых воплощениях композиция пропускается инертным газом, например аргоном, перед ее герметизацией. В некоторых воплощениях композиция герметизируется и/или упаковывается для ограничения или исключения воздействия на нее светового или УФ-

излучения. В определенных воплощениях композиция герметизируется и/или упаковывается для поддержания заданной величины рН.

Также согласно изобретению предлагается способ подготовки аналита для масс-спектрометрического анализа, который включает в себя: (а) контактирование раствора, включающего в себя анализ, с композицией, содержащей аскорбиновую кислоту, или ее соль, таутомер или аналог, чтобы тем самым подготовить пробу для масс-спектрометрического анализа; и (б) введение пробы в масс-спектрометр. В определенных воплощениях композиция содержит также оксалат аммония. Анализ иногда является нуклеиновой кислотой, включающей, но не только, дезоксирибонуклеиновую кислоту, рибонуклеиновую кислоту и т.п. или их комбинацию. В некоторых воплощениях анализ посредством масс-спектрометрии (МС) выбирается из группы, состоящей из MALDI-TOF MS (время пролетная МС с ионизацией лазерной десорбции с использованием матрицы), LDMS (лазерная десорбционная МС), ESMS (электрораспылительная МС), ICR MS (ионная циклотронно-резонансная МС) и FTMS (МС с преобразованием Фурье). В некоторых воплощениях композиция содержит аскорбиновую кислоту и в определенных воплощениях композиция не содержит аналого аскорбиновой кислоты.

Также согласно изобретению предлагается способ анализа аналита посредством масс-спектрометрии, который включает в себя (а) введение пробы в масс-спектрометр, при этом проба содержит анализ и аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог; и (б) анализ пробы посредством масс-спектрометрии. В некоторых воплощениях проба также содержит оксалат аммония. Анализом иногда является нуклеиновая кислота, включая, но не только, дезоксирибонуклеиновую кислоту, рибонуклеиновую кислоту и т.п. или их комбинацию. В некоторых воплощениях проба содержит анализ и аскорбиновую кислоту, и в определенных воплощениях проба не содержит аналого аскорбиновой кислоты.

Также согласно изобретению предлагается подложка, включающая регулярную структуру из зон (ячеек), при этом каждая зона включает в себя (i) матрицу для масс-спектрометрии MALDI и (ii) аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог. В некоторых воплощениях каждая зона также включает в себя оксалат аммония, и в определенных воплощениях одна или больше зон также включают в себя анализ. Анализ иногда является нуклеиновой кислотой, включая, но не только, дезоксирибонуклеиновую кислоту, рибонуклеиновую кислоту и т.п. или их комбинацию. В некоторых воплощениях матрица включает в себя 3-гидроксипиколиновую кислоту (3-ГПК), или другую матрицу, подходящую для анализа нуклеиновой кислоты посредством масс-спектрометрии MALDI. В определенных воплощениях композиция зон, которая включает в себя аскорбиновую кислоту и матрицу (например, 3-ГПК), поглощает ультрафиолетовый свет (например, поглощает УФ-свет с длиной волны от около 220 до около 300 нм (например, от около 260 до около 270 нм; 266 нм)). В некоторых воплощениях матрица включает в себя компонент, подходящий для анализа белка или пептида посредством MALDI масс-спектрометрии, включая, но не только, феруловую кислоту, синапиновую кислоту, альфа-циано-3-гидроксикоричную кислоту и альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту. В определенных воплощениях подложка является чипом (например, кремниевым чипом). В некоторых воплощениях каждая зона содержит аскорбиновую кислоту, в некоторых воплощениях каждая зона не содержит аналого аскорбиновой кислоты.

Примеры масс-спектрометрического анализа, который может быть улучшен с помощью способов и композиций в соответствии с изобретением, включают, но не только, определение последовательности нуклеиновых кислот, генотипирования или анализа нуклеиновой кислоты метилированием. Анализ может быть качественным или количественным, осуществляемым посредством масс-спектрометрии.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан масс-спектр, полученный с использованием 17-звенного (мономерного) синтетического олигонуклеотида (GTG GTG GTG GTG GTG GT), точечно нанесенного непосредственно на стандартную немодифицированную матрицу. На фигуре идентифицировано присутствие аддукта аммония (высота пика составляет приблизительно 12% от исходного пика при 5335 Da).

На фиг. 2 показан масс-спектр, полученный с использование такого же 17-звенного синтетического олигонуклеотида (GTG GTG GTG GTG GTG GT), точечно нанесенного непосредственно на матрицу, модифицированную аскорбиновой кислотой. Как можно видеть на фигуре, аддукт аммония больше не присутствует.

На фиг. 3 показан масс-спектр, полученный для продукта удлиненного гена, точечно нанесенного на стандартную немодифицированную матрицу, в результате чего был получен удлиненный пик при 7571 Da и пик аддукта (NH₃+K) +55 Da при 7626 Da. Пик аддукта вызывает ложный отклик позитивной вставки (инсекции) (отношение S/N: 2; вероятность: 88%).

На фиг. 4 показан масс-спектр, полученный для продукта удлиненного гена, точечно нанесенного на матрицу, модифицированную аскорбиновой кислотой, в результате чего получают удлиненный пик при 7571 Da, но без пика аддукта +55 Da. Ложный отклик позитивной вставки исключается (отношение S/N: 0; вероятность: 0%).

Подробное описание

Масс-спектрометрия позволяет очень точным и чувствительным образом измерять молекулярную массу анализаторов, таких как нуклеиновые кислоты и пептиды. Масс-спектрометрия тем самым представляет собой мощный инструмент для анализа молекул, которые другим образом трудно измерить. Однако присутствие таких нежелательных продуктов, как аддукты, может затруднить точное детектирование и анализ анализа, особенно при его малом количестве или малой массе. Проблема также усугубляется, когда несколько анализаторов детектируются в одном масс-спектре, как части мультиплексированной реакции.

Аддукты образуются, когда ионы, обычно катионы, связываются с биомолекулами в условиях проведения масс-спектрометрии, создавая тем самым нежелательные пики масс. Любая часть процесса обработки пробы (например, биохимия, манипуляция пробой, распределение пробы и т.д.), очистка пробы (например, добавление смолы), ионизация пробы или детектирование пробы может способствовать образованию аддуктов.

В случае MALDI масс-спектрометрии источником образования аддуктов может служить сам матричный материал. Например, смесь 3-гидроксициклической кислоты (3-ГПК) и диаммонийцитрата (ДАЦ) часто используется в качестве эффективной УФ-матрицы для анализа нуклеиновой кислоты посредством MALDI масс-спектрометрии. Соли аммония (например, ДАЦ) присоединяются к матрицам, и в особенности к 3-ГПК, так как они, как известно, снижают образование катиона аддукта до однонитевой ДНК (онДНК) (Wu, J.K., et al., *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1993, 7, 191; Pieles, et al., *Nucleic Acid Research*, 1993, 21, 14, 3191). Однако полученные здесь результаты показывают, что ДАЦ является главным источником образования аддукта амиака (NH_3). Например, на фиг. 1 показано присутствие пика массы аддукта NH_3 при +17 Da в масс-спектрах.

Другим источником, участвующим в образовании амиачного аддукта, является амиачная катионообменная смола, которая может использоваться для обессоливания анализа перед анализом MALDI (Nordhoff, E., et al., *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1992, 6, 771). Как описано в нижеприведенных примерах, амиачные аддукты преимущественно образуются с гуаниновыми и тиминовыми основаниями. Таким образом, эти аддукты больше проявляют себя в анализах, где анализы в виде нуклеиновых кислот обогащены этими основаниями.

Помимо этого, амиачная катионообменная смола может не полностью удалить все ионы натрия из главной цепи ДНК. Это недостаточное удаление приводит к присутствию пика массы аддукта иона натрия при +22 Da. Другие аддукты могут возникать из матричного материала и могут быть обычными в присутствии тиминовых оснований. Например, когда 3-гидроксициклическая кислота используется как матрица, пики масс аддуктов находятся при 94, 138 и 188 Da. Совместно все эти пики аддуктов могут привести к неправильному истолкованию результатов масс-спектрометрии. Таким образом, композиции и процессы, которые чрезвычайно сильно уменьшают количество и частоту присутствия аддуктов, особенно щелочных и амиачных аддуктов, полезны для улучшения точности, чувствительности и производительности анализа посредством масс-спектрометрии. Присутствие добавки, уменьшающей содержание аддуктов, может снизить или исключить пик аддукта, который будет присутствовать при анализе анализа без добавки, уменьшающей содержание аддукта. Как здесь показано, добавление аскорбиновой кислоты привело к уменьшению среднего количества образовавшегося аддукта (определенного здесь) до 40%, если сравнивать со стандартной матрицей, обработанной смолой, при сравнимых интенсивностях продукта удлинения (см. примеры 1-3). Кроме того, матрица, модифицированная добавкой аскорбиновой кислоты, как оказалось, является физически и химически стабильной в течение периода в 6 месяцев (см. пример 4), что позволяет предварительно обрабатывать подложки аскорбиновой кислотой во время их производства.

Аналит.

Изобретение позволяет улучшить анализ масс-спектрометрией таких анализаторов, как нуклеиновые кислоты (например, олигонуклеотидов и полинуклеотидов), белки, пептиды и липиды, включая их конкретные аналоги и коньюгаты, такие как гликопротеины или липопротеины. Другими веществами, которые могут быть подвержены MALDI анализу в рамках настоящего описания, являются малые молекулы, метаболиты, натуральные продукты и фармацевтические вещества. Способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением особенно пригодны для полинуклеотидов, включающих в себя большую долю гуанинов и тиминов, так как эти полинуклеотиды более чувствительны к образованию амиачных аддуктов.

Используемый в настоящем описании термин "нуклеиновая кислота" относится к однократным полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК), а также к аналогам или производным либо РНК, либо ДНК. Также в термин "нуклеиновая кислота" входят такие аналоги нуклеиновых кислот, как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), фосфоротионат ДНК, ациклические нуклеотиды и другие подобные аналоги и производные или их комбинации.

Нуклеотидные аналоги, содержащиеся в полинуклеотиде, могут быть, например, нуклеотидами с модифицированной массой, которые позволяют проводить дифференциацию полинуклеотидов по массе; нуклеотиды, содержащие маркер для их детектирования, например флуоресцентный, радиоактивный, люминесцентный или хемилюминесцентный маркер, который позволяет обнаруживать полинуклеотид;

или нуклеотиды, содержащие реактивную группу, такую как биотин, или тиоловую группу, которые облегчают иммобилизацию полинуклеотида на твердой подложке. Полинуклеотид также может содержать одну или больше связей главной цепи, которые избирательно разрываются, например, химически, ферментативно или фотолитически. Например, полинуклеотид может включать в себя один или больше дезоксирибонуклеотидов, затем один или больше рибонуклеотидов, за которыми может следовать один или больше дезоксирибонуклеотидов, при этом такая последовательность разрывается у рибонуклеотидной последовательности посредством основного гидролиза.

Полинуклеотид может также содержать одну или больше связей, которые являются сравнительно стойкими к разрыву, например химерный олигонуклеотидный праймер, который может включать в себя нуклеотиды, связанные пептидными связями нукleinовой кислоты, и по меньшей мере один нуклеотид у 3' конца, который связан фосфодиэфирной связью или т.п. и способен удлиняться посредством полимеразы.

Проба.

Используемый в настоящем описании термин "проба" относится к композиции, содержащей аналит, для проведения анализа. В определенных воплощениях проба относится к "биологической пробе". Биологическим материалом обычно считается любой материал, полученный из живого источника (например, человека, животного, растения, бактерий, грибов, протиста, вируса). Биологическая проба может находиться в любой форме, включая твердые материалы (например, ткани, дебризы и биопсии) и биологические жидкости (например, моча, кровь, слюна, амниотическая жидкость и промывка рта (содержащая щечные клетки)). Предпочтительно твердые материалы смешиваются с жидкостью.

Матрица.

Матричный материал используют в некоторых видах масс-спектрометрии, например, в такой как масс-спектрометрия MALDI. Матричный материал служит для отделения молекул аналита друг от друга, для поглощения энергии, сообщенной лазерными фотонами, и для передачи энергии молекулам аналита, чтобы тем самым привести к их десорбции и ионизации. Как только аналит ионизируется, масс-спектрометр, такой как времепролетный анализатор (TOF=ВП), может использоваться для измерения масс ионов.

Выбор матричного материала для масс-спектрометрического анализа часто зависит от типа анализируемого биомолекул. Например, для анализа нукleinовой кислоты методом масс-спектрометрии в качестве матрицы часто используется смесь 3-гидроксициклической кислоты (3-ГПК) и диаммонийцитрата (ДАЦ). Другим матричным материалом, используемым для облегчения ионизации проб анализаторов, является 2,5-дигидроксибензойная кислота (ДГБ). ДГБ также подвержена образованию аддуктов и возникновению химических шумов, которые мешают анализу проб. Альфа-циано-4-гидроксиоричная кислота (α -ЦГЦК) является примером широко используемой матрицы для ионизации анализаторов с протеинами и белками в MALDI TOF масс-спектрометрии. Однако аддукты альфа-ЦГЦК являются распространеными, и они могут препятствовать возможности точного детектирования имеющихся в незначительных количествах анализаторов с малой массой. Добавочные матричные материалы, которые могут использоваться с поглощающими свободные радикалы добавками, описанные здесь для усовершенствованного масс-спектрометрического анализа, рассмотрены Li et al. (Rapid Comm. Mass Spectrom. 12; 993-998 (1998)), M.C. Fitzgerald and L.M. Smith (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 1995. 24: 117-40), and Nordhof et al. (Mass. Spectrometry Reviews, 1996, 15, 67-138; которые все здесь приведены в ссылках), и примеры матриц включают без ограничений 2,4,6-тригидроксицетофеноны (ТГАФ), антракеновую кислоту, никотиновую кислоту, салициламид, 1-изохинолинол, Т-2-(3-(4-трет-бутилфенил)-2-метил-2-пропенилиден)малононитрил (DCTB), синапиновую кислоту (СК), дитранол (ДИТ), 3-аминохинолин, транс-3-индолакриловую кислоту (ИАК), 2-(4-гидроксифенилазо)бензойную кислоту (ГАБК), янтарную кислоту, 2,6-дигидроксицетофеноны, феруловую кислоту, кофейную кислоту, глицерин и нитроанилин.

Матричный материал может быть соединен с добавкой (добавками) или анализатором (анализаторами) перед тем как или после того как матрицу осаждают на подложку. Когда анализаторы введены в матрицу из поглощающего свет материала, матрица обычно присутствует в избытке по отношению к анализатору. Введение молекул аналита в некоторой форме обычно в кристаллические матричные материалы во время их кристаллизации или, по меньшей мере, в поверхности раздела между малыми матричными кристаллами, является предпочтительным для процесса MALDI. В некоторых воплощениях добавку сначала смешивают с матричным материалом в растворе и совместный раствор матричный материал/добавка осаждают на подложку, где он кристаллизуется.

В различных воплощениях матрица осаждается на подложку для образования дискретных зон посредством растворения матрицы в растворе, включающем в себя аскорбиновую кислоту и подходящий растворитель, например, такой как вода. Полученный раствор осаждают на MALDI подложку и подложка может быть помещена в вакуумную камеру, так чтобы раствор матрицы/аскорбиновой кислоты сушился под вакуумом. В одном воплощении аскорбиновая кислота служит в качестве матричного материала - или одного, или в комбинации с другими матрицами.

Различные способы могут быть использованы для осаждения матрицы, добавки или анализатора на подложку. В одном воплощении нанесение каждого элемента делается на отдельных этапах. Например,

матричный материал может быть предварительно нанесен на подложку и аналит может быть добавлен через некоторое время с использованием соответствующего аппарата для нанесения жидкости (например, пьезоэлектрических, штырьковых дозирующих устройств). В некоторых воплощениях элементы осаждаются в комбинации. Например, матрица и добавка могут сначала быть соединены (т.е. растворены в растворителе) и осаждены вместе, а после этого добавляют аналит. В некоторых воплощениях матрице или осажденной комбинации матрицы и добавки дают высохнуть на подложке, в результате чего образуются кристаллы матрицы, когда растворитель испарится. Последующее осаждение раствора аналита поверх высохшей матрицы приводит к частичному растворению осажденной сухой матрицы и совместной кристаллизации повторно растворенной матрицы с аналитом.

В определенных воплощениях добавка, уменьшающая содержание аддуктов, непосредственно используется в качестве матричного материала, и в некоторых воплощениях добавка, уменьшающая содержание аддуктов, используется в качестве компонента матричного материала. Матричный материал в некоторых воплощениях включает в себя добавку, уменьшающую содержание аддуктов, и один или больше масс-спектрометрических матричных материалов, описанных здесь (например, одно или несколько веществ из числа 3-ГПК, ДАЦ, ДГБ, ЦГЦК, ТГАФ, ДСТВ, ДИТ, СК, ИАК, ГАБК). Для воплощений, в которых добавка, уменьшающая содержание аддуктов, используется с одним или несколькими масс-спектрометрическими матричными материалами, добавка, уменьшающая содержание аддуктов, составляет от 99 до 1 мас.% от всей массы матричного материала (например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90 или 95 мас.% от всей массы матричного материала), и иногда добавка, уменьшающая содержание аддуктов, составляет в мольном отношении (т.е. в молях добавки к молям масс-спектрометрической матрицы), например, около 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2.

Добавка.

Используемый в настоящем описании термин "добавка, уменьшающая содержание аддуктов" означает вещество, добавляемое к любому одному или нескольким компонентам или реагентам, которые требуются для анализа посредством масс-спектрометрии. Эти компоненты или реагенты включают пробу, аналит, матричный материал, подложку или их комбинации. В определенных воплощениях добавкой, уменьшающей содержание аддуктов, является аскорбиновая кислота или ее любое производное, по существу, с такими же эффектами по уменьшению содержания аддуктов.

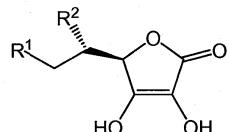
В определенных воплощениях добавкой, уменьшающей содержание аддуктов, является поглотитель свободных радикалов. Может быть использован любой поглотитель свободных радикалов, подходящий для использования в масс-спектрометрическом анализе, и в некоторых случаях, подходящий для использования в масс-спектрометрическом анализе нуклеиновых кислот. Примеры поглотителей свободных радикалов, включают, но не только, аскорбиновую кислоту, ретинол, токотриенол, токоферол, коэнзим Q10, мелатонин, ликопен, лютеин, альфа-каротин, бета-каротин, зеаксантин, астаксантин, канаксантин, флавоны (например, лутеолин, апигенин, тангеритин), фавонолы (например, кверцетин, кэмферол, мирицетин, изорхамнетин, проантоцианидины), фаваноны (например, хасперитин, наригенин, эриодиктиол), изофлавонфитоэстрогены (например, генистеин, даидзеин, глицистеин), стилбеноиды (например, ресвератрол, птеростилбен), антоцианины (например, цианидинг, дельфинидин, малвидин, пеларгонидин, пеонидин, петунидин), фенольные кислоты и эфиры (например, элагиновая кислота, галлоевая кислота, салициловая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, хлорогеновая кислота, цикориевая кислота, галлотанины, эллагитанины), нефалвоноидные фенольные соединения (например, куркумин, ксантонены, силимарин, эвгенол) и органические антиоксиданты (например, лимонная кислота, щавелевая кислота, фитиновая кислота, лигнан, мочевая кислота, N-ацетилцистеин). Специалист средней квалификации в этой области может легко идентифицировать поглотители свободных радикалов, которые являются подходящими в качестве добавки или матрицы для масс-спектрометрии, обычным тестированием таких поглотителей посредством параллельных анализов, как показано здесь в примерах.

В некоторых воплощениях добавка, по существу, свободна от загрязнений и поэтому не нуждается в очистке. Если добавка, уменьшающая содержание аддуктов, не является, по существу, чистой, ее следует очистить способами, известными в этой области, для удаления загрязнений, например, очисткой ионообменными смолами.

Добавка может быть раствором в жидкой форме (например, растворена в воде) и затем осаждена на предварительно осажденную матрицу или прямо осаждена на подложку без предварительно осажденной матрицы. Альтернативно добавка может быть соединена с матрицей перед осаждением на подложку. Добавка и матрица могут быть соединены для получения концентрации матрицы от 1 до около 20 мг/мл и концентрации добавки от около 5 до около 50 мг/мл. Использование недостаточных количеств добавки значительно не уменьшит образование аддуктов, в то время как использование слишком большого количества добавки может подавить исходные сигналы в масс-спектрах. Специалисты в этой области могут определить без каких-либо нежелательных экспериментов подходящее количество добавки для оптимизации анализа конкретного аналита путем изменения количества добавки и определения его влияния на спектральные характеристики.

В некоторых воплощениях добавка, уменьшающая содержание аддуктов, может быть использована одна или в комбинации с другими веществами, которые уменьшают или исключают присутствие нежелательных аддуктов. Добавка из аскорбиновой кислоты может комбинироваться с другими добавками, способными снизить фоновые шумы в масс-спектрах. Другие известные подходящие добавки включают смолу, летучие соли аммония, особенно летучие солиmonoаммония, диаммония и триаммония. Предпочтительно, чтобы добавки солей не были слишком основными и не мешали анализу пробы. Добавки могут быть одноосновными фосфатами и сульфатами (например, одноосновным фосфатом аммония) и двухосновными цитратами (например, двухосновным цитратом аммония) и трехосновными цитратами (например, трехосновным цитратом аммония).

В определенных воплощениях добавкой, уменьшающей содержание аддуктов, является аскорбиновая кислота, аскорбат, ее соль, ее таутомер или аналог аскорбиновой кислоты (включая аналогичные соли и таутомеры), имеющие структуру, соответствующую следующей формуле:



где R^1 и R^2 независимо являются OH, галогеном, R^3 , OR^3 , азидо, циано, CH_2R^3 , CHR^3R^4 , SR^3 , NR^3R^4 ;

R^3 и R^4 независимо являются H, алкилом, ацетиленом, или циано, или возможно замещенной арилкарбоциклической структурой, арилгетероциклической структурой, не арильной карбоциклической структурой или не арильной гетероциклической структурой. Используемые здесь аналоги аскорбиновой кислоты обычно являются поглотителями свободных радикалов, и способность аналога аскорбиновой кислоты к поглощению свободных радикалов может быть определена специалистом средней квалификации в этой области (например, титрованием с окислителем, таким как 2,6-дихлофенол-индофенол (ДХФИФ), иод, иодат и иодидные смеси или N-бромсукцинимид).

Термин "возможно замещенный", используемый в настоящем описании, указывает, что описываемая конкретная группа или группы могут не иметь неводородных заместителей, или группа или группы могут иметь один или несколько не водородных заместителей. Если не указано иначе, общее число таких заместителей, которые могут присутствовать, равно числу атомов H, присутствующих на незамещенной форме описываемой группы. Там, где возможный заместитель присоединен двойной связью, например, через карбонильный кислород (=O), группа забирает две свободные валентности, поэтому общее число заместителей, которое может быть введено, уменьшается в соответствии с числом свободных валентностей.

Аскорбиновая кислота и ее аналоги могут иметь ионизируемые группы, чтобы можно было получить соли. В этом случае, какие бы ссылки не делались на соединение, следует понимать в этой области техники, что также может быть использована фармацевтически доступная соль. Эти соли могут быть кислыми добавляемыми солями, относящимися к неорганическим или органическим кислотам, или эти соли в случае кислых форм соединений по изобретению могут быть приготовлены из неорганических или органических оснований. Часто соединения готовят или используют как фармацевтически приемлемые соли, приготовленные как продукты присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты и основания хорошо известны в этой области, например хлористо-водородная, серная, бромисто-водородная, уксусная, молочная, лимонная или муравьиная кислоты для получения солей присоединения кислот, и гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, кофеин, различные амины и т.п. для получения солей оснований. Способы получения соответствующих солей хорошо освоены в этой области техники. В некоторых случаях соединения могут содержать как кислую, так и основную функциональную группу, в этом случае они могут иметь две ионизированные группы, но все же не иметь суммарного заряда.

Аналоги аскорбиновой кислоты часто имеют один или несколько хиральных центров. Изобретение включает в себя каждую из изолированных стереоизомерных форм, а также смеси стереоизомеров в различных степенях хиральной чистоты, включая рацемические смеси. Оно также включает в себя различные диастереомеры и таутомеры, которые могут быть получены. Соединения по изобретению могут также существовать более чем в одной таутомерной форме; приведенное здесь изображение одного таутомера только для удобства, и понятно также, что оно охватывает и другие таутомеры показанной формы.

Используемые в настоящем описании термины "алкил", "алкенил" и "алкинил" включают радикалы с прямой цепью, разветвленной цепью и циклические моновалентные гидрокарбильные радикалы и их комбинации, которые содержат только C и H, когда они не замещены. Примеры включают метил, этил, изобутил, циклогексил, циклопентилэтил, 2-пропенил, 3-бутинил и т.п. Иногда в данном изобретении указывается общее число атомов углерода в каждой такой группе, например, когда группа может содержать до десяти атомов углерода, то оно может быть указано, как 1-10C, или как C₁-C₁₀, или C₁₋₁₀. Когда гетероатомам (обычно N, O или S) дают возможность заменять атомы углерода, например как в гетероалкильных группах, числа, описывающие группу, хотя все еще написанные, как, например, C₁-C₆, пред-

ставляют собой сумму числа атомов углерода в группе плюс число таких гетероатомов, которые включены как заменяющие атом углерода в главных цепях описываемых циклах или незамкнутых цепях.

Обычно алкиловые, алкениловые или алкиниловые заместители по изобретению содержат один 10С (алкил) или два 10С (алкенил или алкинил). Предпочтительно они содержат один 8С (алкил) или два 8С (алкенил или алкинил). Иногда они содержат один 4С (алкил) или два 4С (алкенил или алкинил). Одна группа может включать в себя больше одного типа множественной связи или больше одной множественной связи; такие группы включены в термин "алкенил", когда они содержат по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, и включены в термин "алкинил", когда они содержат по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод.

Алкиловая, алкениловая и алкиниловая группы часто являются возможно замещенными в той степени, в какой замещение имеет химический смысл. Типичные заместители включают, но не только, галоген, =O, =N-CN, =N-OR, =NR, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R, NRCONR₂, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR и NO₂, при этом каждый R независимо является H, C₁-C₈-алкилом, C₂-C₈-гетероалкилом, C₁-C₈-ацилом, C₂-C₈-гетероацилом, C₂-C₈-алкенилом, C₂-C₈-гетероалкенилом, C₂-C₈-алкинилом, C₂-C₈-гетероалкинилом, C₆-C₁₀-арилом или C₅-C₁₀-гетероарилом, и каждый R является возможно замещенным галогеном, =O, =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'SO₂R', NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR' и NO₂, при этом каждый R' является независимо H, C₁-C₈-алкилом, C₂-C₈-гетероалкилом, C₁-C₈-ацилом, C₂-C₈-гетероацилом, C₆-C₁₀-арилом, или C₅-C₁₀-гетероарилом. Алкиловая, алкениловая и алкиниловая группы также могут быть замещены C₁-C₈-ацилом, C₂-C₈-гетероацилом, C₆-C₁₀-арилом или C₅-C₁₀-гетероарилом, при этом каждая из них может быть замещена заместителями, которые являются подходящими для конкретной группы.

"Ацетиленовыми" заместителями являются 2-10С алкиниловые группы, которые возможно, но не обязательно, становятся заместителями, и имеют формулу -C=C-Ra, где Ra является H или C₁-C₈-алкилом, C₂-C₈-гетероалкилом, C₂-C₈-алкенилом, C₂-C₈-гетероалкенилом, C₂-C₈-алкинилом, C₂-C₈-гетероалкинилом, C₁-C₈-ацилом, C₂-C₈-гетероацилом, C₆-C₁₀-арилом, C₅-C₁₀-гетероарилом, C₇-C₁₂-арилалкилом, или C₆-C₁₂-гетероарилалкилом, и каждая Ra группа возможно замещена одним или больше заместителями, выбранными из галогена, =O, =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'SO₂R', NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR', и NO₂, где каждая R' является независимо H, C₁-C₆-алкилом, C₂-C₆-гетероалкилом, C₁-C₆-ацилом, C₂-C₆-гетероацилом, C₆-C₁₀-гетероарилом, C₇-C₁₂-арилалкилом или C₆-C₁₂-гетероарилалкилом, каждый из которых возможно замещен одной или несколькими группами, выбранными из галогена, C₁-C₄-алкила, C₁-C₄-гетероалкила, C₁-C₆-ацила, C₁-C₆-гетероацила, гидрокси, амино и =O; и где два R' связаны с образованием 3-7-членного цикла, возможно содержащего до трех гетероатомов, выбранных из N, O и S. В некоторых воплощениях Ra из -C=C-Ra является H или Me.

"Гетероалкил", "гетероалкенил" и "гетероалкинил" и т.п. определяются таким же образом, как и соответствующие гидрокарбильные (алкильные, алкенильные и алкинильные) группы, но термин "гетеро" относится к группам, которые содержат от одного до трех таких гетероатомов, как O, S или N, или их комбинаций внутри остатка главной цепи; таким образом, по меньшей мере, атом углерода соответствующей алкильной, алкенильной или алкинильной группы замещен одним из указанных гетероатомов с образованием гетероалкильной, гетероалкенильной или гетероалкинильной группы. Типичные и предпочтительные размеры гетероформ алкильной, алкенильной и алкинильной групп обычно такие же, как и для соответствующих гидрокарбильных групп, и заместители, которые могут присутствовать на гетероформах, являются такими же, как и описанные выше для гидрокарбильных групп. По причинам химической стабильности следует также понимать, что, если не будет указано иначе, такие группы не включают в себя больше двух смежных гетероатомов, кроме случая, когда оксогруппа присутствует на N или S, как в нитро- или сульфонильной группе.

Хотя термин "алкил", как он используется в настоящем описании, включает в себя циклоалкильную и циклоалкилалкильную группы, термин "циклоалкил" может здесь использоваться для описания карбоциклической не ароматической группы, которая присоединена через атом углерода в цикле, термин "циклоалкилалкил" может здесь использоваться для описания карбоциклической не ароматической группы, которая присоединена к молекуле посредством алкильного линкера. Аналогичным образом термин "гетероциклик" может использоваться для описания не ароматической циклической группы, которая содержит по меньшей мере один гетероатом в качестве элемента цикла и который присоединен к молекуле через атом цикла, которым может быть С или N; и термин "гетероцикликалкил" может быть использован для описания такой группы, которая присоединена к другой молекуле посредством линкера. Размеры и заместители, которые подходят для циклоалкильной, циклоалкилалкильной, гетероцикликальной и гетероцикликалкильной групп являются такими же, как и описанные выше для алкильных групп. Эти используемые в настоящем описании термины также включают в себя циклы, которые содержат одну двойную связь или две, когда цикл не является ароматическим.

Используемый в настоящем описании термин "ацил" охватывает группы, включающие в себя алкильный, алкенильный, алкинильный, арильный или арилалкильный радикал, присоединенный к одной из двух свободных валентных позиций углеродного атома карбонила, и термин "гетероацил" относится к

соответствующим группам, в которых по меньшей мере один углерод, но не карбонильный углерод, заменен гетероатомом, выбранным из N, O и S. Таким образом гетероацил включает в себя, например, -C(=O)OR и -C(=O)NR₂, а также -C(=O)-гетероарил.

Ацильная и гетероацильная группы связаны с любой группой или молекулой, к которой они присоединены посредством свободной валентности углеродного атома карбонила. Обычно они являются C₁-C₈-ацильными группами, которые включают в себя формил, ацетил, пивалоил и бензоил, и C₂-C₈-гетероацильными группами, которые включают в себя метоксиацетил, этоксикарбонил и 4-пиридиноил. Гидрокарбильные группы, арильные группы и гетероформы таких групп, которые включают ацильную или гетероацильную группу, могут быть замещены описанными здесь заместителями, как вообще подходящими заместителями для каждого соответствующего компонента ацильной или гетероацильной группы.

Термины "ароматическая" часть или "арильная" часть относятся к моноциклической или к конденсированной бициклической части, имеющей хорошо известные ароматические характеристики; примеры включают фенил и нафтил. Аналогичным образом термины "гетероароматический" и "гетероарильный" относятся к таким моноциклическим или конденсированным бициклическим кольцевым системам, которые содержат в качестве элементов кольца один или больше гетероатомов, выбранных из O, S и N. Введение гетероатома обеспечивает ароматичность в 5-членных циклах, а также в 6-членных циклах. Типовые гетероароматические системы включают моноциклические C₅-C₆-ароматические группы, такие как пиридил, пиримидил, пиразинил, тиенил, фуранил, пираполил, пиразолил, тиазолил, оксазолил и имидазолил и конденсированные бициклические части, образованные конденсацией одной из этих моноциклических групп с фенильным кольцом или с любой из гетероароматических моноциклических групп для формирования C₈-C₁₀-бициклической группы, такой как индолил, бензимидазолил, индазолил, бензотиазолил, изохинолил, хинолил, бензотиазолил, бензофуранил, пиразолопиридил, хиназолинил, хиноксанлинил, циннолинил и т.п. Любая моноциклическая или конденсированная кольцевая бициклическая система, которая имеет характеристики ароматичности в виде распределения электронов во всей кольцевой системе, включена в это определение. Оно также включает бициклические группы, где, по меньшей мере, цикл, который непосредственно присоединен к остатку молекулы, имеет характеристики ароматичности. Обычно кольцевые системы содержат кольцевые элементы из 5-12 атомов. Предпочтительно моноциклические гетероарилы содержат 5-6 кольцевых членов и бициклические гетероарилы содержат 8-10 кольцевых членов.

Арильная и гетероарильная части могут быть замещены самыми различными заместителями, включая C₁-C₈-алкил, C₂-C₈-алкенил, C₂-C₈-алкинил, C₅-C₁₂-арил, C₁-C₈-ацил и их гетероформы, каждая из которых сама также может быть замещена; другие заместители для арильной и гетероарильной частей включают галоген, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R, NRCONR₂, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR и NO₂, где каждый R независимо является H, C₁-C₈-алкилом, C₂-C₈-гетероалкилом, C₂-C₈-алкенилом, C₂-C₈-гетероалкенилом, C₂-C₈-алкинилом, C₂-C₈-гетероалкинилом, C₆-C₁₀-арилом, C₅-C₁₀-гетероарилом, C₇-C₁₂-арилалкилом или C₆-C₁₂-гетероарилалкилом, и каждый R может быть замещен, как описано выше для алкильных групп. Замещающие группы на арильной или гетероарильной группе могут, конечно, быть дополнительно замещены описанными здесь группами, как подходящими для каждого типа таких заместителей и для каждого компонента заместителя. Таким образом, например, арилалкильный заместитель может быть замещен на арильной части заместителями, описанными здесь, как типовые для арильных групп, и он может быть еще дальше замещен на алкильной части заместителями, описанными здесь, как типовые или подходящие для алкильных групп.

Аналогичным образом, термины "арилалкил" и "гетероарилалкил" относятся к ароматическим или гетероароматическим кольцевым системам, которые связываются с их точкой присоединения посредством сшивающей группы, такой как алкилен, включающей замещенные или незамещенные, насыщенные или ненасыщенные, циклические или ациклические линкеры. Обычно линкером является C₁-C₈-алкил или его гетероформа. Эти линкеры могут также включать карбонильную группу, тем самым, делая их способными обеспечить заместители, такие как ацильная или гетероацильная часть. Арильный или гетероарильный цикл в арилалкильной или гетероарилалкильной группе может быть замещен теми же заместителями, описанными выше для арильных групп. Предпочтительно арилалкильная группа включает фенильное кольцо, возможно замещенное группами, определенными выше для арильных групп, и C₁-C₄-алкиленом, который не замещен или замещен одной или двумя C₁-C₄-алкильными группами или гетероалкильными группами, где алкильные или гетероалкильные группы могут возможно зациклиться с образованием кольцевого соединения, такого как циклопропан, диоксолан или оксациклопентан. Аналогичным образом гетероарилалкильная группа предпочтительно включает в себя C₅-C₆-моноциклическую гетероарильную группу, которая возможно замещена группами, описанными выше, как заместителями, типовыми на арильных группах и C₁-C₄-алкиленом, который не замещен или замещен одной или двумя C₁-C₄-алкильными группами или гетероалкильными группами, или он включает в себя возможно замещаемый фенильный цикл или C₅-C₆-моноциклический гетероарил и C₁-C₄-гетероалкилен, который является незамещенным или замещенным одной или двумя C₁-C₄-алкильными или гетероалкильными группами, где алкильные или гетероалкильные группы могут возможно зациклиться с образованием кольце-

вого соединения, такого как циклопропан, диоксолан или оксациклопентан.

Там, где арилалкильная или гетероарилалкильная группа описана, как возможно замещенная, заместители могут быть или на алкильной либо гетероалкильной части, или на арильной либо гетероарильной части группы. Заместители, возможно присутствующие на алкильной или гетероалкильной части, являются такими же, как и в целом описанные выше для алкильных групп; заместители, возможно присутствующие на арильной или гетероарильной части, являются такими же, как и в целом описанные выше для арильных групп.

"Арилалкильными" группами, как здесь используется, являются гидрокарбильные группы, если они незамещенные, и они описываются общим числом атомов углерода в цикле и алкиленом или аналогичным линкером. Таким образом, бензильная группа является C_7 -арилалкильной группой, фенилэтил является C_8 -арилалкилом.

Термин "гетероарилалкил", описанный выше, относится к части, включающей в себя арильную группу, которая присоединена посредством линкера (сшивающей группы) и отличается от "арилалкила" тем, что по меньшей мере один атом цикла арильной части или один атом в сшивающей группе является гетероатомом, выбранным из N, O и S. Гетероарилалкильные группы описываются здесь в соответствии с общим числом атомов в цикле в сочетании с линкером, и они включают арильные группы, связанные посредством гетероалкильного линкера; гетероарильные группы, связанные посредством гидрокарбильного линкера, такого как алкилен; и гетероарильные группы, связанные посредством гетероалкильного линкера. Таким образом, например, C_7 -гетероарилалкил будет включать в себя пиридилметил, фенокси и N-пирролилметокси.

Термин "алкилен", как он используется здесь, относится к двухвалентной гидрокарбильной группе; так как она является двухвалентной, то может быть связана с двумя другими группами. Обычно она обозначается как $-(CH_2)_n-$, где n составляет 1-8, предпочтительно n составляет 1-4, хотя там, где это задано, алкилен может также быть замещен другими группами и может быть другой длины, и свободные валентности не обязательно должны быть на противоположных концах цепи. Таким образом $-CH(Me)-$ и $-C(Me)_2-$ также могут относиться к алкилену, как и такая циклическая группа, как циклопропан-1-1-диил. Там, где алкиленовая группа замещена, заместители включают такие, которые обычно присутствуют на алкильных группах, как здесь описано.

Вообще любая алкильная, алкенильная, алкинильная, ацильная или арильная или арилалкильная группа или любая гетероформа одной из этих групп, которая содержится в заместителе, сама может быть, но не обязательно, замещена дополнительными заместителями. Природа этих заместителей аналогична природе заместителей, описанных относительно самих первичных заместителей, если эти заместители не описываются иначе. Таким образом, там, где воплощение, например, R7 является алкилом, то этот алкил возможно может быть замещен остальными заместителями, перечисленными, как воплощения для R7, где это имеет химический смысл и где это не нарушает предельные размеры для самого алкила; например алкил, замещенный алкилом или алкенилом, просто приведет к удлинению верхнего предела атомов углерода для этих воплощений и не будет включен. Однако алкил, замещенный арилом, амино, алкокси, =O и т.п. будет включен в объем изобретения, и атомы этих замещающих групп не будут подсчитываться для числа, используемого для описания алкильной, алкенильной и т.д. группы, которая описывается. Там, где не задается число заместителей, каждая такая алкильная, алкенильная, алкинильная, ацильная или арильная группа может быть замещена количеством заместителей, соответствующим свободным валентностям; в частности, любая из этих групп, например, может быть замещена атомами фотона у любой или у всех свободных валентностей.

Термин "гетероформа", как он используется в настоящем описании, относится к производному группы, такой как алкильная, арильная или ацильная, где по меньшей мере один атом углерода обозначенной карбоциклической группы был замещен гетероатомом, выбранным из N, O и S. Таким образом, гетероформами алкила, алкенила, алкинила, ацила, арила и арилалкила являются соответственно гетероалкил, гетероалкенил, гетероалкинил, гетероацил, гетероарил и гетероарилалкил. Понятно, что обычно последовательно присоединяются не больше двух атомов N, O или S, за исключением случая, когда оксогруппа присоединена к N или S с образованием нитро- или сульфонильной группы.

Термин "галоген", как он используется в настоящем описании, включает в себя группу фтор, хлор, бром и йод. Фтор и хлор часто являются предпочтительными. Термин "амино", как он используется в настоящем описании, относится к NH_2 , но там, где группа амино описывается как "замещенная" или "возможно замещенная", этот термин включает в себя $NR'R''$, где каждый R' или R'' независимо является H или алкильной, алкенильной, алкинильной, ацильной, арильной или арилалкильной группами, или гетероформой одной из этих групп, и каждая из алкильной, алкенильной, алкинильной, ацильной, арильной или арилалкильной групп или гетероформы одной из этих групп является возможно замещенной заместителями, описанными здесь, как подходящие для соответствующей группы. Этот термин также включает в себя формы, в которых R' и R'' связываются между собой с образованием 3-8-членного кольца, которое может быть насыщенным, ненасыщенным или ароматическим, которое содержит 1-3 гетероатома, независимо выбираемых из N, O и S в качестве членов кольца, и которое возможно замещено заместителями, описанными, как подходящие для алкильных групп, или, если $NR'R''$ является аромати-

ческой группой, то она возможно замещена заместителями, описанными как типовые для гетероарильных групп.

Используемый в настоящем описании термин "карбоциклический" относится к циклическому соединению, содержащему только атомы углерода в кольце, в то время как термин "гетероциклический" относится к циклическому соединению, включающему в себя гетероатом. Карбоциклическая и гетероциклическая структуры охватывают соединения, имеющие моноциклическую, бициклическую или полациклическую системы. Используемый в настоящем описании термин "гетероатом" относится к любому атому, который не является углеродом или водородом, такому как азот, кислород или сера. Иллюстративными примерами гетероциклических соединений являются, но не только, тетрагидрофуран, 1,3-диоксолан, 2,3-дигидрофуран, пиран, тетрагидропиран, бензофуран, изобензофуран, 1,3-дигидроизобензофуран, изоксазол, 4,5-дигидроизоксазол, пиперидин, пирролидин, пирролидин-2-он, пиррол, пиридин, пиримидин, октагидро пиррол[3,4b]пиридин, пиперазин, пиразин, морфолин, тиоморфолин, имидазол, имидазолидин-2,4-дион, 1,3-дигидробензимидазол-2-он, индол, тиазол,ベンゼチアゾル, тиадиазол, тиофен, тетрагидротиофен-1,1-диоксид, диазепин, триазол, гуанидин, диазабицикло[2,2,1]гептан, 2,5-диазабицикло[2,2,1]гептан, 2,3,4,4a,9,9a-гексагидро-1Н-бетакарболин, оксиран, оксетан, тетрагидропиран, диоксан, лактоны, азиридин, азетидин, пиперидин, лактамы, и могут также охватывать гетероарилы. Другими иллюстративными примерами гетероарилов являются, но не только, фуран, пиррол, пиридин, пиримидин, имидазол,ベンゼミダゾル, и триазол.

Подложка.

Используемый в настоящем описании термин "подложка" относится к нерастворимому носителю, на который осаждают анализ и на нем анализируют. Подложки могут включать, но не только следующее: диоксид кремния, стекло (например, стекло с контролируемой пористостью (СКП)), найлон, смола Уанга, смола Мери菲尔да, Сефадекс, Сефароз, целлюлоза, магнитные шарики, Дайнабидс, металлическая поверхность (например, стали, золота, серебра, алюминия, кремния и меди), пластиковый материал (например, полиэтилен, полипропилен, полиамид, полиэфир, поливинилиденфторид (ПВВФ), или штырьки (например, группа регулярно расположенных штырьков, подходящая для комбинаторного синтеза или анализа, или шарики в ямках с плоскими поверхностями, такими как пластины (например, кремниевые пластины) с пластинками или без них. Твердый носитель может быть любой нужной формы, включая, но не только, шарик, чип, капилляр, пластинку, мемброну, пластину, гребенку, штырек, пластину с ямками, существенно плоскую поверхность, регулярную группу штырьков или нанолитровых ямок или других геометрий и форм, известных специалистам в этой области. Предпочтительными носителями являются плоские поверхности, предназначенные для приема или связывания проб на дискретных участках. Наиболее предпочтительными являются плоские поверхности с гидрофобными областями, окружающими гидрофильные участки для приема, хранения или связывания пробы. Подложечные материалы могут быть инертными по отношению к действию устройства или реагентов, используемых в процессе, включая матричные материалы и растворители, типичные для MALDI масс-спектрометрии.

На подложке зоны матрицы, или матрицы/добавки, или матрицы/аналита/добавки часто имеют определенные характеристики. Каждая зона на подложке может иметь диаметр от около 200 мкм до около 1 мм. Диаметр зон часто, по существу, одинаков и разброс диаметров от зоны к зоне часто является минимальным (например, около 20 мкм). Может использоваться любое расстояние от центра к центру для зон на подложке, применяемой для масс-спектрометрии, например такие межцентровые расстояния, как 2,25 или 1,125 мм, и межцентровое расстояние между зонами на подложке часто является существенно одинаковым. Зоны (ячейки) на подложке могут иметь толщину от около 10 до около 100 мкм. Толщина каждой зоны на подложке часто, по существу, одинакова и разброс толщины от зоны к зоне часто является минимальным (например, около 30 мкм).

Целевой участок.

Используемый в настоящем описании термин "целевой участок" относится к определенному месту на подложке, на котором материал, такой как матричный материал, матричный материал с добавкой, или анализ, может быть осажден идержан. Подложка может содержать один или больше целевых участков, которые могут быть расположены произвольно, или в упорядоченной структуре, или в другой структуре. Когда целевой участок используется для масс-спектрометрического анализа, такого как MALDI-анализ, то он или полученный участник с осажденным материалом предпочтительно равен по размеру или меньше лазерного пятна, которое фокусируется на подложке для осуществления десорбции. Таким образом, целевой участок может являться, например, выемкой или углублением, штырьком или шариком, или физическим барьером, который расположен на поверхности твердого носителя, или их комбинацией, такой как шарики на чипе, чипы в ямках или т.п.

Целевой участок может быть физически размещен на подложке, может быть вытравлен на поверхности подложки, может быть "столбиком", который остается после травления вокруг участка, или может быть определен такими физико-химическими параметрами, как относительная гидрофильность, гидрофобность, или любым другим параметром химии поверхности, которая удерживает жидкость в нем или на нем.

Платформа.

Способы и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы совместно с источником ионизации, включая химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД), химическую ионизацию (ХИ), бомбардировку электронами (БЭ), электрораспылительную ионизацию (ЭРИ), бомбардировку быстрыми атомами (ББА), автоэлектронную (полевую) десорбцию/полевую ионизацию (ПД/ПИ), MALDI ионизацию (MALDI) и термораспылительную ионизацию (ТРИ). В определенных воплощениях источником ионизации является MALDI или ЭРИ.

Способы и композиции по изобретению могут быть использованы совместно с любым масс-анализатором. Имеется целый ряд доступных масс-анализаторов, из которых лучше известны времяяпролетные (ВП) квадрупольные анализаторы с магнитными секторами, и масс-анализаторы как с ионными ловушками на преобразовании Фурье, так и с квадрупольными ионными ловушками. Помимо этого анализаторы могут использоваться в тандеме, как тандемные масс-спектрометры (МС-МС). В некоторых воплощениях масс-анализатором является ВП анализатор.

В определенных воплощениях аналиты анализируются посредством масс-спектрометрического анализа и не анализируются спектроскопическим способом. В некоторых воплощениях аналиты не анализируются инфракрасной спектроскопией (например, инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье), посредством которой в общем случае измеряется частота колебаний некоторых молекул, и она вообще не включает ионизацию анализаторов и измерение массы ионизированных анализаторов.

Примеры

Следующие примеры не являются ограничивающими и иллюстрируют некоторые воплощения изобретения.

Пример 1. Добавка к анализатору.

В следующем примере анализ от Sequenom IPLEX™ реакции смешивали с наночистой водой или с добавкой из аскорбиновой кислоты для определения влияния добавки на образование аддуктов. Пластиинки обрабатывали параллельно по протоколу Sequenom IPLEX™, как описано в Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI-TOF mass spectrometry: versatile tool for high performance DNA analysis. Mol. Biotechnol., 26, 147-164 (2004); and Oeth, P. et al., IPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators. SEQUE-NOM Application Note (2005). Обе эти статьи приведены здесь в ссылках. Во время этапа разбавления/кондиционирования 9 мкл раствора анализа смешивали с 25 мкл наночистой воды, как диктует протокол стандарта, а другую пластиинку также смешивали с аскорбиновой кислотой для получения окончательной концентрации аскорбиновой кислоты 20 мМ.

Для удаления остаточных катионов из аскорбиновой кислоты и исключения любого возможного влияния аммониевой катионообменной смолы запасные растворы аскорбиновой кислоты обессоливали посредством 1 г/мл протонированной смолы. В зависимости от последовательности операций добавку можно смешивать или непосредственно с анализатором, или дополнительно разбавлять и затем добавлять к пробе. В этом конкретном примере этап разбавления завершался на автоматизированном устройстве подачи жидкости, при этом разбавленный раствор хранился в 50 мл кювете при отношении объемов 1/25 перед его добавлением к раствору анализа.

После соответствующих этапов разбавления/кондиционирования обе пластиинки распределяли при 10 нл/домен в предматричный стандартный SpectroChip™ (300 мМ 3-ГПК/25 мМ ДАЦ) с использованием устройства подачи Sequenom Nanodispenser и анализировали на анализаторе типа Sequenom MassArray® Analyser Compact.

Результаты.

Использование аскорбиновой кислоты приводит к большему на 8% числу откликов для проб, обработанных аскорбиновой кислотой. Натриевые и аммониевые аддукты подавлялись до предела обнаружения в пробах, обработанных аскорбиновой кислотой. Это привело к тому, что не стало ложных позитивных откликов из-за аммониевого и/или натриевого аддуктов для проб, обработанных аскорбиновой кислотой, тогда как аммониевые аддукты кондиционированных в воде пробах потребовали еще одного анализа, чтобы повторно определить гетерозиготу (ложный позитивный отклик).

Пример 2. Добавка к матрице.

В следующем примере было показано, что новая матричная композиция, содержащая аскорбиновую кислоту (АК), уменьшает образование аддукта и тем самым улучшает качество спектра.

Матричные растворы.

Готовили матричные комбинации из следующих исходных растворов и наночистой воды (исходные растворы различных матричных компонентов обрабатывали катионнообменной смолой в соответствии с функциональной группой компонентов: кислоты - ионнообменной смолой в H⁺ форме, а аммониевые соли - смолой в NH₄⁺ форме:

3-ГПК: 350 мМ в 30% водном ацетонитриле;

АК: 1 М в водном растворе;

ДАЦ: 226 мг 1 М водного раствора.

Стандартную матрицу готовили с 300 мМ 3-ГПК и 25 мМ ДАЦ, а новую матрицу готовили с 300 мМ 3-ГПК, 20 мМ NH₄-оксалата и 20 мМ аскорбиновой кислоты. См. табл. 1. Конечные матрицы наносили на SpectroChip по 15-20 нл с использованием наносящего устройства Gesim Nanoplotter.

Таблица 1

Тип матрицы	Матричная композиция (концентрации в мМ)
Стандартная, без смолы	300 ГПК/25 ДАЦ
Стандартная, со смолой	300 ГПК/25 ДАЦ
Новая матрица	300 ГПК/20 АК/20 NH ₄ -оксалата

Пробы синтетических олигонуклеотидов.

Были проведены два эксперимента с использованием синтетических олигонуклеотидов, точечно нанесенных непосредственно на матрицы по табл. 1. В первом эксперименте 17-звенный синтетический олигонуклеотид (GTG GTG GTG GTG GTG GT) тестировали как на "старой" матрице, обработанной смолой, так и на "новой" матрице, модифицированной аскорбиновой кислотой. На фиг. 1 (старая матрица) ясно, что присутствует аммониевый аддукт (высота пика составляет приблизительно 12% от исходного пика при 5335 Da), тогда как аммониевый аддукт на фиг. 2 (новая матрица) не присутствует. Новая матрица может также называться "Матрица 63С".

Во втором эксперименте 17-звенный синтетический олигонуклеотид (5044 Da) малой массы и 28-звенный синтетический олигонуклеотид (8436 Da) большой массы тестировали на образование аддуктов и депуринизацию. В обоих экспериментах аналиты из синтетических олигонуклеотидов наносили на матрицы по табл. 1 по 10 нл на ячейку, используя устройство для нанесения Gesim nanoplotter. Результаты для олигонуклеотидов малой и большой массы приведены соответственно в табл. 2 и 3.

Таблица 2А

17-Звенные аддукты

Аддукты 17-звенные, 5044Da размер пробы: 48	Стандартная матрица, не обработанная смолой	Стандартная матрица, обработанная смолой	Новая матрица
NH3 (+17Da)	0,4*2,3=0,9 3%	0	0
HPA (+138Da)	0,17*1,8=0,3 3%	0	0
ГПК декарбоксилированный 1 (+94Da)	0,48*2,4=1,2 4%	0	0,13*1,6=0,2 2%
ГПК декарбоксилированный 2 (+188Da)	0,98*5=4,9 7%	1*10,2=10,2 9%	1*8,9=8,9 11%
Калий (+38Da)	0,46*2,5=1,2 4%	0	0
Натрий (+22Da)	0,52*3,4=1,8 5%	0	0
Угольная кислота (+62Da)	0,08*1,4=0,1 2%	0	0,06*1,3=0,08 2%
Среднее число образовавшихся аддуктов	1,5	1,5	1,3
Депуринизация	0	0	0

Таблица 2В

Высота 17-звенного зонда и отношение сигнала к шуму (ОСШ)

Зонд	Стандартная матрица, не обработанная смолой	Стандартная матрица, обработанная смолой	Новая матрица
Высота зонда (средн./стандартн.)	69/19	110/24	79/26
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	241/57	388/71	313/77

Таблица 3А

28-Звенные аддукты

Аддукты 28-звенные, 8436 Da размер проб: 48	Стандартная матрица, не обработанная смоловой	Стандартная матрица, обработанная смоловой	Новая матрица
NH3 (+17Da)	1*3, 8=3, 8 19%	1*3, 9=3, 9 14%	0, 46*2, 1=1 7%
HPA (+138Da)	0, 35*1, 2=0, 42 6%	0, 6*1, 6=1 6%	0, 67*1, 1=0, 74 4%
ГПК декарбоксилированная 1 (+94Da)	0, 35*1, 3=0, 46 7%	0, 6*1, 7=1 6%	0, 46*1, 7=0, 78 6%
ГПК декарбоксилированная 2 (+188Da)	0, 35*1, 3=0, 46 7%	0, 65*2, 6=1, 7 9%	1*3, 5=3, 5 11%
калий (+38Da)	0, 39*1, 3=0, 5 7%	0, 58*1=0, 58 4%	0, 4*0, 9=0, 36 3%
натрий (+22Da)	0, 46*2, 4=1, 1 12%	0, 6*1, 8=1, 1 6%	0, 46*1, 1=0, 51 4%
Угольная кислота (+62Da)	0, 31*0, 8=0, 2 4%	0, 31*0, 8=0, 2 3%	0, 17*0, 8=0, 14 3%
Среднее число образовавшихся аддуктов	1	1, 4	1
Число депуринизаций: замещение G: -133Da исключение G:-150Da замещение A: -117Da	0, 29*0, 6=0, 2 0 0	0, 46*0, 8=0, 4 0 0	0, 46*1, 2=0, 6 0 0

Таблица 3В

Высота 28-звенного зонда и отношение сигнала к шуму (ОСШ)

Зонд			
Высота зонда (средн./стандартн.)	20/5	28/7	31/7
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	93/19	134/27	164/31

Сравнение матриц основано на относительной сравнительной высоте пика аддукта и пика депуринизации и на высотах зондов и ОСШ. Число образований аддуктов было введено для учета относительной частоты столбиков, которые превышают пороговую величину числа пиков в анализе:

Число образований аддуктов = (относительной частоте столбиков, превышающих пороговую величину)×(средняя высота пика аддукта).

Термин "столбики" и "зоны" на подложке взаимозаменямы. Стандартные отклонения для средних высот пиков аддуктов были низкими и сравнимыми для всех матриц и не приведены в таблицах.

Для 17-звенной (мономерной) синтетики среднее число образований аддуктов было на 13% меньше на новой матрице (табл. 2А), и для 28-звенной синтетики среднее число образований аддуктов было на 29% меньше на новой матрице (табл. 3А) в сравнении со стандартной матрицей, обработанной смоловой.

Пробы, удлиненные праймером.

Были проведены дополнительные эксперименты с использованием рекомендованных Sequenom анализов генотипов, направленных на установление полиморфизма в RhD и AMG генах. Эти анализы проводили с использованием iPLEX™ теста и MassARRAY® технологии (Jurink, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI TOF mass spectrometry: versatile tool for high-performance DNA analysis. Mol. Biotechnol., 26, 147-164 (2004); and Oeth, P. et al., iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators. Sequenom Application Note (2005), обе эти статьи здесь приведены в ссылках). Вкратце говоря, целевая область, окружающая SNP, сначала амплифицируют посредством PCR. Затем олигонуклеотидный праймер ренатурируют до PCR продукта и удлиняют аллель специфично одним олигонуклеотидом с использованием смеси нуклеотидов с 4 терминаторами и ДНК полимеразы. Продукты удлинения переносятся в миниатюрную структуру на чипе и анализируются посредством MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Определение молекулярной массы продуктов удлинения обеспечивает безусловную идентификацию SNP-аллели, присутствующей в пробе. Отношение пиковых площадей сигналов массы позволяет оценить относительное изобилие аллелей в данной пробе.

В этом эксперименте использовалась на 20% более высокая энергия лазера (в сравнении с выше-приведенными экспериментами с синтетическими олигонуклеотидами) на 7316 Da AMG праймерных продуктах удлинения, точечно нанесенных на матрицы по табл. 1. Как показано в табл. 4 и 5, наблюдается уменьшенное среднее число образований аддуктов для продуктов удлинения, нанесенных на новую матрицу, в сравнении со стандартной матрицей (40-50% уменьшение), и повышенная энергия лазера не оказала отрицательного влияния на образование аддуктов.

Таблица 4А

Аддукты в AMG анализе (7316 Da)-стандартная энергия лазера

Эмбриональный квантификатор Аддукты для зонда при 7316Da Размер пробы: 96	Стандартная матрица, не обработанная смолой	Стандартная матрица, обработанная смолой	Новая матрица
NH3 (+17Da)	1*2,5=2,5 16%	1*2,1=2,1 11%	0,94*1=0,94 6%
Натрий (+22Da)	0,91*1,7=1,5 11%	0,98*0,9=0,9 5%	0,25*0,5=0,13 3%
Калий (+38Da)	0,9*1,2=1,1 8%	0,96*1,1=1,1 6%	0,89*0,8=0,7 4%
Угольная кислота (+62Da)	0,9*1,2=1,1 8%	0,98*1,3=1,3 7%	0,98*1,4=1,4 8%
Среднее число образовавшихся аддуктов	1,6	1,4	0,8

Таблица 4В

Высота и отношение сигнала к шуму (ОСШ) зонда в AMG анализе

Зонд			
Высота зонда (средн./стандартн.)	16/14	19/5	18/6
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	54/11	65/14	66/19

Таблица 5

Аддукты в AMG анализе (7316 Da) - повышенная энергия лазера

Эмбриональный квантификатор Аддукты в зонде при 7316Da Размер пробы: 96	Стандартная матрица, обработанная смолой На 20% увеличенная энергия лазера	Новая матрица На 20% увеличенная энергия лазера
NH3 (+17Da)	1*1,7=1,7 11%	0,55*0,85=0,47 5%
Натрий (+22Da)	0,98*1,1=1,1 7%	0,06*0,51=0,03 3%
Калий (+38Da)	0,1*0,1=0,04 0,3%	0,41*0,75=0,31 3%
Угольная кислота (+62Da)	0,98*1,5=1,5 9%	0,97*1,6=1,6 8%
Среднее число образовавшихся аддуктов	1,1	0,6
Зонд		
Высота зонда (средн./стандартн.)	16/4	19/4
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	65/14	69/13

Чтобы проверить эффективность новой матрицы в присутствии более значительных количеств аналита, анализировались на матрице по табл. 1 повышенные количества (10, 15 и 20 нл) 7528 Da AMG праймерных продуктов удлинения. См. нижеприведенную табл. 6. Средние числа образований аддуктов на новой матрице меньше при 10 и 15 нл объемах аналита; в то время как при 20 нл наблюдалось то же число (0,6) для обеих матриц.

Таблица 6

Аддукты при AMG анализе (7528 Da) - увеличенная проба аналита на матрице

Эмбриональный квантитикатор Аддукты в зонде при 75280Da Размер пробы: 24	Стандартная матрица, обработанная смолой			Новая матрица		
	10	15	20	10	15	20
NH ₃ (+17Da)	0,92*1,3=1,2 8%	0,92*0,8=0,7 3 8%	0,92*0,6=0,5 5 10%	0,96*0,9=0,8 6 4%	0,88*0,6=0,5 3 4%	0,88*0,3=0,2 6 4%
Натрий (+22Da)	0,92*1=0,92 6%	0,92*0,7=0,6 4 7%	0,92*0,6=0,5 5 10%	0	0,21*0,3=0,0 6 2%	0,5*0,3=0,15 4%
Калий (+38Da)	0,67*0,8=0,5 5%	0,92*0,7=0,6 4 7%	0,92*0,7=0,6 4 12%	0,83*1,2=1 6%	1*1,1=1,1 7%	1*1,2=1,2 15%
Угольная кислота (+62Da)	1*1,6=1,6 10%	1*1,2=1,2 12%	0,92*0,7=0,6 4 12%	1*1,9=1,9 9%	0,96*1,3=1,2 5 9%	1*0,8=0,8 10%
Среднее число образований аддуктов	1,1	0,8	0,6	0,9	0,7	0,6
Зонд						
Высота зонда (средн./стандартн.)	16/4	10/3	6/3	21/5	15/5	8/3
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	85/19	56/17	30/14	103/21	68/22	37/10
Сравнительное уменьшение ОСШ	34%	46%		34%	46%	

Улучшенные масс-спектры.

Важность уменьшенных образований аддуктов для исключения ложных позитивных откликов ясно проиллюстрирована на фиг. 3 и 4, которые показывают результаты для анализа на генотип RHD-4-psi 3-i. Пик при 762 Da является не вставкой, как сообщается для стандартной матрицы (фиг. 3), а аддуктом 55 Da (NH₃+K) для продукта удлинения при 7571 Da. Этот аддукт полностью исключается в новой матрице (фиг. 4).

Пример 3. Добавка к матрице и аналиту.

Новую модифицированную аскорбиновую кислотой матрицу также тестировали совместно с аскорбиновой кислотой, добавляемой к раствору аналита (продукт удлинения AMG-праймера при 8289 Da). Как видно в примере 1 и табл. 2-6 примера 2, аскорбиновая кислота, добавляемая к аналиту, или в комбинации со стандартной матрицей, значительно снижала количество аммониевых и натриевых аддуктов. См. нижеприведенную табл. 7. Наблюдалось 43% уменьшение для аналита, обработанного аскорбиновой кислотой, на стандартной матрице, и 57%-ное уменьшение для аналита, обработанного аскорбиновой кислотой, нанесенного на новую матрицу (в сравнении с необработанным аналитом, нанесенным на необработанную матрицу).

Таблица 7

Аскорбиновая кислота, добавляемая к аналиту и матрице

Эмбриональный квантитикатор Аддукты в зонде при 8289Da Размер пробы: 24	Стандартная матрица, обработан- ная смолой	Стандартная матрица, обработан- ная смолой	Новая матрица	Новая матрица
Конечная концентрация ингибитора в аналите	0	20 мМ	0	20 мМ
NH ₃ (+17Da)	1*1,4=1,4 18%	1*0,6=0,6 10%	1*0,6=0,6 8%	0,92*0,5=0,46 8%
Натрий (+22Da)	0,96*0,7=0,67 9%	0,63*0,3=0,19 5%	0,17*0,3=0,05 4%	0,29*0,1=0,03 2%
Калий (+38Da)	0,21*0,3=0,06 4%	0,13*0,1=0,01 2%	0,17*0,2=0,03 3%	0,17*0,2=0,03 3%
Угольная кислота (+62Da)	0,96*0,8=0,77 10%	1*0,7=0,7 12%	1*0,9=0,9 11%	0,96*0,8=0,77 13%
Среднее число образующихся аддуктов	0,7	0,4 (43%)	0,4	0,3 (25%)
Зонд				
Высота зонда (средн./стандартн.)	8/2,3	6/3	8/3	6/2
ОСШ зонда (средн./стандартн.)	35/8	32/11	36/12	30/7

Пример 4. Проверка стабильности.

За период 6 месяцев было проведено 4 проверки стабильности для определения долговременных свойств аскорбиновой кислоты в отношении уменьшения количества аддуктов. Не было никаких указаний, что рабочие характеристики испытываемых матриц ухудшались со временем. Вместо этого полученные ОСШ и соответствующие числа образований аддуктов для аммониевых и щелочных аддуктов подтвердили стабильность 3-ГПК и добавок ДАЦ, NH₄-оксалата в комбинации с аскорбиновой кислотой.

Полнота каждого патента, патентной заявки, публикации и документа, ссылка на который здесь приведена, устанавливается ссылкой. Цитирование вышеприведенных патентов, патентных заявок, публикаций и документов не является допущением, что любой из вышеприведенных документов относится к известному уровню техники, и также оно не является любым допущением в отношении содержания или даты этих публикаций или документов.

В вышеприведенные могут быть внесены изменения, не отступая от базовых аспектов изобретения. Хотя изобретение было описано очень подробно со ссылкой на одно или больше специфичных воплощений, специалисты средней квалификации в этой области техники осознают, что изменения могут быть внесены в воплощения, специально раскрыты в этом изобретении, однако эти модификации и улучшения находятся в пределах объема и сути изобретения.

Иллюстративно описанное здесь изобретение подходящим образом может быть реализовано на практике в отсутствии какого-либо элемента (элементов), специфично не раскрытое в нем. Таким образом, например, здесь в каждом случае любой из терминов "включающий в себя/содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен другими двумя терминами. Термины и выражения, которые применялись, используются как термины, описывающие, а не ограничивающие, и использование таких терминов и выражений не исключает каких-либо эквивалентов показанных и описанных отличительных особенностей или их частей, и возможны различные модификации в пределах заявленного объема изобретения. Единственное число может относиться к одному или ко многим модифицируемым элементам (например, "устройство" может означать одно или больше устройств), если из контекста не ясно, описывается ли один из элементов или больше чем один из элементов. Используемый здесь термин "около" относится к величине в пределах 10% от величины данного параметра (т.е. на 10% больше или меньше), и использование термина "около" в начале перечисления величин, изменяет каждую из величин (т.е. "около 1, 2 и 3" означает около 1, около 2 и около 3). Например, "масса около 100 г" может включать в себя массы между 90 и 110 г. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение было специально раскрыто посредством представительных воплощений и возможных отличительных особенностей, модификации и изменения концепций, здесь раскрытых, может быть использовано специалистами в этой области, и такие модификации и изменения рассматриваются в пределах объема этого изобретения.

Воплощения изобретения изложены в нижеприведенной формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ масс-спектроскопии пробы, содержащей аналит, включающий этап добавления в пробу, перед анализом аналита, добавки, уменьшающей количество аддуктов, которая содержит аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.

2. Способ по п.1, в котором добавка, уменьшающая количество аддуктов, дополнительно содержит оксалат аммония.

3. Способ по п.1, в котором аналитом является нуклеиновая кислота.

4. Способ по п.3, в котором нуклеиновой кислотой является дезоксирибонуклеиновая кислота.

5. Способ по п.3, в котором нуклеиновой кислотой является рибонуклеиновая кислота.

6. Способ по п.3, в котором анализ посредством масс-спектрометрии (МС) выбирается из группы, состоящей из масс-спектрометрии с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы, лазерной десорбционной масс-спектрометрии, электрораспылительной масс-спектрометрии, масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса и масс-спектрометрии с преобразованием Фурье.

7. Способ масс-спектрометрии пробы, содержащей аналит, включающий этап добавления в матрицу, перед анализом аналита, добавки, уменьшающей количество аддуктов, которая содержит аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.

8. Способ по п.7, дополнительно включающий также этап добавления добавки, уменьшающей количество аддуктов, к аналиту перед анализом аналита посредством масс-спектрометрии.

9. Способ по п.7 или 8, в котором добавка, уменьшающая количество аддуктов, дополнительно содержит оксалат аммония.

10. Способ по п.7 или 8, в котором матричная композиция содержит 3-гидроксипиколиновую кислоту (3-НРА=3-ГПК).

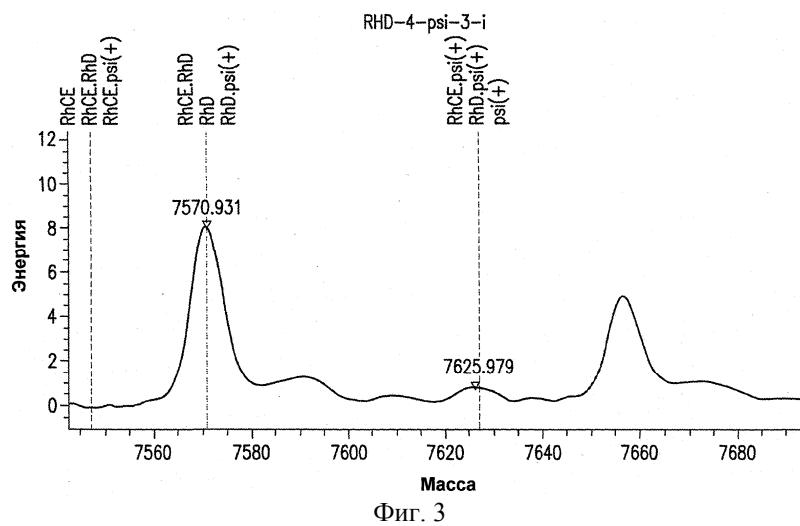
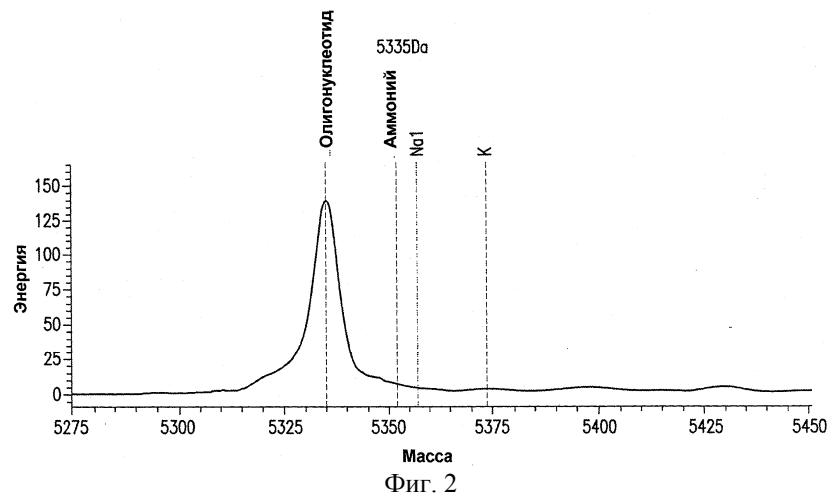
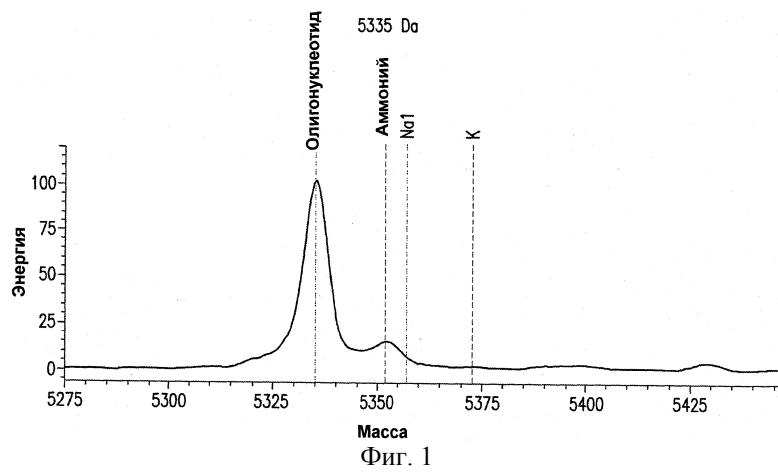
11. Способ по п.7 или 8, в котором матричная композиция содержит диаммонийцитрат (ДАЦ).

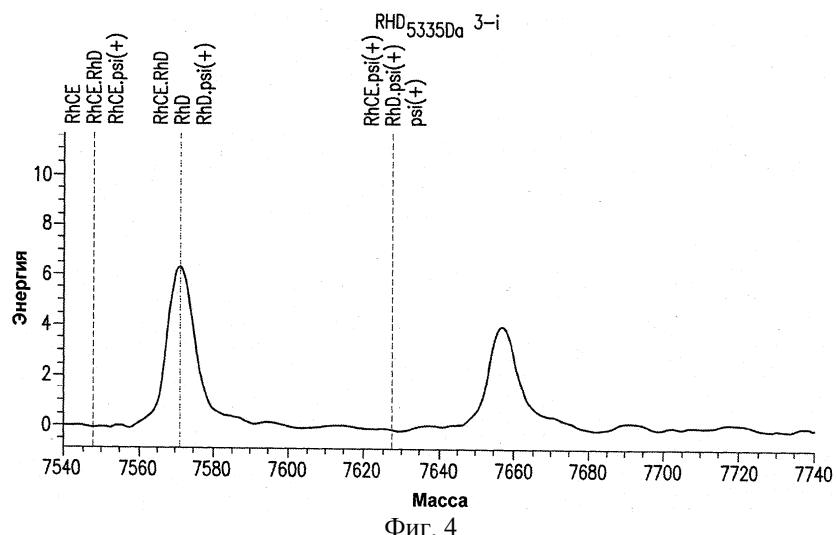
12. Способ по п.7 или 8, в котором аналитом является нуклеиновая кислота.

13. Способ приготовления подложки, подходящей для применения в масс-спектрометрии, вклю-

чающий в себя этап осаждения на подложку матричного материала, содержащего добавку, уменьшающую количество аддуктов, при этом добавка, уменьшающая количество аддуктов, содержит аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий в себя этап герметизации подложки.
15. Способ по п.13, дополнительно включающий в себя этап обработки подложки агентом или газом для уменьшения оксидирования.
16. Способ по п.13, в котором подложка включает в себя диоксид кремния.
17. Способ по п.13, в котором добавка, уменьшающая количество аддуктов, дополнительно содержит оксалат аммония.
18. Композиция для анализа посредством масс-спектрометрии, включающая в себя аналит и добавку, уменьшающую количество аддуктов.
19. Композиция по п.18, в которой добавка, уменьшающая количество аддуктов, содержит аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.
20. Композиция по п.19 дополнительно содержит оксалат аммония.
21. Композиция для анализа посредством масс-спектрометрии, включающая в себя матричную композицию и аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.
22. Композиция для анализа посредством масс-спектрометрии, включающая в себя матричную композицию, аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог и оксалат аммония.
23. Композиция, пригодная для анализа посредством масс-спектрометрии, включающая в себя аналит и добавку, уменьшающую количество аддуктов, при этом добавка содержит аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог и оксалат аммония.
24. Композиция для масс-спектрометрии, включающая в себя подложку и добавку, уменьшающую количество аддуктов и содержащую аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог и оксалат аммония.
25. Композиция по п.24, дополнительно включающая в себя матричный материал.
26. Способ приготовления аналита для масс-спектрометрического анализа, включающий в себя контактирование раствора, содержащего аналит, с композицией, содержащей аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог, чтобы тем самым приготовить пробу для масс-спектрометрического анализа.
27. Способ по п.26, в котором композиция включает в себя оксалат аммония.
28. Способ по п.26, в котором аналитом является нуклеиновая кислота.
29. Способ по п.28, в котором нуклеиновой кислотой является дезоксирибонуклеиновая кислота.
30. Способ по п.28, в котором нуклеиновой кислотой является рибонуклеиновая кислота.
31. Способ по п.26, в котором анализ посредством масс-спектрометрии (МС) выбирается из группы МС, состоящей из масс-спектрометрии с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы, лазерной десорбционной масс-спектрометрии, электрораспылительной масс-спектрометрии, масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса и масс-спектрометрии с преобразованием Фурье.
32. Способ анализа аналита посредством масс-спектрометрии, который включает в себя приготовление пробы, при этом проба содержит аналит и аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог; и анализ пробы посредством масс-спектрометрии.
33. Способ по п.32, в котором проба дополнительно содержит оксалат аммония.
34. Способ по п.32, в котором аналитом является нуклеиновая кислота.
35. Способ по п.34, в котором нуклеиновой кислотой является дезоксирибонуклеиновая кислота.
36. Способ по п.34, в котором нуклеиновой кислотой является рибонуклеиновая кислота.
37. Способ по п.32, в котором анализ посредством масс-спектрометрии (МС) выбирается из группы, состоящей из MALDI-TOF МС, LD МС, ES МС, ICR МС и МС с преобразованием Фурье.
38. Подложка, содержащая регулярную группу зон, в которой каждая зона включает в себя (i) матрицу для масс-спектрометрии MALDI и (ii) аскорбиновую кислоту или ее соль, таутомер или аналог.
39. Подложка по п.38, в которой каждая зона дополнительно содержит оксалат аммония.
40. Подложка по п.38, в которой одна или больше зон дополнительно содержит аналит.
41. Подложка по п.40, в которой аналитом является нуклеиновая кислота.
42. Подложка по п.41, в которой нуклеиновой кислотой является дезоксирибонуклеиновая кислота.
43. Подложка по п.41, в которой нуклеиновой кислотой является рибонуклеиновая кислота.
44. Подложка по п.38, в которой матрица содержит 3-гидроксипиколиковую кислоту.
45. Подложка по п.38, являющаяся чипом.
46. Подложка по п.45, в которой чип представляет собой кремниевый чип.





Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2