PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.12.2010**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2012**

(Věstník č. 11/2012)

(21) Číslo dokumentu:

2010-929

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/48	(2006.01)
G01N 33/52	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)
H01J 49/02	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:

Volný Michael Ph.D., Praha 4, CZ
Novák Petr Ph.D., Dolní Břežany, CZ
Havlíček Vladimír Doc. Dr. Ing., Praha 4, CZ
Pompach Petr Ph.D., Mratín, CZ

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., Patentové a licenční služby, Národní 1009/3, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie

(57) Anotace:

Podstatou vynálezu je způsob provedení modifikace pevných substrátů pro účinnou povrchovou prekoncentraci fosfopeptidů ze složitých peptidických směsí před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Předmětem ochrany je způsob modifikace povrchů používaných jako substráty pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Metoda je založena na elektronebulizaci (elektrosprejování) roztoku organokovových sloučenin prvků skupiny 4B a to zirkonia, hafnia a titanu. Vzniklý nabitý elektrosprej je vysušen v reálném čase průchodem vyhřívaným prostorem a dopadá na povrch, na který se pevně naváže ve formě oxidu. Takto modifikovaný povrch potom může být použit pro prekoncentraci fosfopeptidů z peptidových směsí s následnou analýzou desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií.

CZ 2010 - 929 A3

PV 2010-929

Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie

Oblast techniky

Fosfoproteomika; modifikované povrchy pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Modifikace pevných substrátů pro účinnou povrchovou prekoncentraci fosfopeptidů ze složitých peptidických směsí před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii.

Dosavadní stav techniky

Chemické změny proteinů v buňce, takzvané posttranslační modifikace, jsou důležitým projevem složitých biochemických procesů a jsou přímo spojené s biologickým stavem buňky. Proto jsou posttranslační modifikace spojené s celou řadou onemocnění, včetně onkologických. Jejich poznání je proto nutnou podmínkou k vývoji nové generace cílených terapií. Jednou z nejčastěji studovaných posttranslačních modifikací je připojení fosforečnanové skupiny kovalentní vazbou, takzvaná fosforylace. Její důležitost je dána tím, že fosforylace je používána k zapínání a vypínání většiny biologických procesů v buňce. Standardní proteomické postupy (Aebersold, 2001), založené na kombinaci kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s kolizí indukovanou disociací, nejsou ve většině případů schopny odlišit posttranslačně fosforylované peptidy ve směsi s ostatními peptidy. Důvodem je záporný náboj na fosfoskupině, který brání efektivní ionizaci v pozitivním elektrosprejovém módu a diskriminuje tak fosfopeptidy oproti nefosforylovaným peptidům. Proto je obvykle zapotřebí zredukovat složitost směsi oddělením fosfopeptidů a do stanovení tak musí být zařazen další identifikační krok. Metody používané pro odlišení fosfopeptidů od peptidů nefosforylovaných mohou být rozděleny do dvou skupin na chemické a afinitní (Bodenmiller, 2007). Chemické metody jsou založeny na beta eliminaci fosforečnanové skupiny, přičemž vzniklá dvojná vazba může dále reagovat s různými nukleofilními činidly a nově vzniklá funkcionalizace umožní selektivní isolaci takto modifikovaného fosfopetidu. Mezi důležité chemické metody patří například metoda PAC (*phosphoramidate chemistry*) (Zhou, 2001). Afinitní metody jsou založené na oddělení fosfopeptidů ze směsi pomocí afinitní interakce s pevným substrátem. Patří sem zejména *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) a/nebo oddělení na oxidu titaničitém, zirkoničitém nebo hlinitém (Bodenmiller, 2007). Všechny výše uvedené metody se používají

ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a to buď přímo on-line spojením jako další dimenze chromatografické separace, nebo off-line, přičemž oddělené frakce jsou potom sbírány a stanovovány pomocí elektrosprejové hmotnostní spektrometrie nebo pomocí *matrix assisted laser desorption ionization mass spektrometry* (MALDI-MS). Hlavními nevýhodami takového přístupu je nemožnost automatizace a problémy při práci s malými objemy. Proto se začalo experimentovat s obohacováním fosfopeptidů před analýzou pomocí metody MALDI-MS přímo na povrchu, ze kterého je provedena ionizace. V těchto experimentech je povrch, ze kterého mají být analyzovány fosfopeptidy, předem upraven nanesením vrstvy afinitního činidla, které přednostně zadrží fosfopeptidy ze směsi. Po omytí ostatních peptidů jsou potom afinitně vázané fosfopeptidy analyzovány pomocí standardního provedení metody MALDI-MS. Tento způsob je výrazně jednodušší než spojení s elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií (ať již v on-line nebo off-line režimu) a navíc dosahuje lepších limitů detekce. Problémem však zůstává nalezení vhodného způsobu přípravy modifikovaného MALDI povrchu. Nejpoužívanějším modifikovaným povrchem pro analýzu fosfopeptidů je vrstva oxidů titanu nebo zirkonia. Tato vrstva je připravovaná různými způsoby, které s sebou přináší řadu nevýhod, a to jak v samotné přípravě, tak při provádění analýz fosfopeptidů. Například dva v literatuře nedávno popsané způsoby trpí značnými nedostatky. Blacken (Blacken 2007, 2009) použil metodu takzvaného *reactive landing*. Tento způsob úpravy povrchu se odehrává ve vakuu a povrch je bombardován desolvatovanými ionty, respektive iontovými klastry (Løver, 1997), které byly získány měkkou ionizací alkoxidů stabilních prvků 4B skupiny. Nabité klastry alkoxidů stabilních prvků 4B skupiny, které v metodě *reactive landing* podle Blackena narážejí do povrchu a modifikují jej, se pohybují v prostředí s dostatečně dlouhou střední volnou dráhou na to, aby mohly být externím elektrostatickým polem urychleny na výrazně hypertermální energii (Blacken 2007, 2009) až napětím 15V, což by při dopadu odpovídalo více než tisícinásobku normální interní energie při laboratorní teplotě). K modifikaci tak dojde v důsledku rozbití urychlených původních iontů o povrch – jedná se tedy o kinetickou energií indukovanou reakci. Metoda poskytuje kvalitní a mechanicky stálou modifikaci povrchu schopného akumulovat fosfopeptidy. Nevýhodou tohoto postupu je nepřiměřená délka celého procesu přípravy povrchu – až několik hodin. K provedení je navíc zapotřebí zkonstruovat speciální přístroj, do kterého se vloží povrch určený k modifikaci. Přístroj se potom vypumpuje tak, aby v něm bylo vakuum, které se musí udržovat po celou dobu modifikace. Po dosažení vakua se na povrch střílí ionty o vysoké energii po dobu přibližně tří hodin, ty se rozbíjejí a vytváří na povrchu vrstvu oxidu. V přístroji tak lze připravit jen několik vzorků denně a tomu odpovídá i potenciální cena

jedné modifikace. Druhým známým způsobem je pulsní laserová depozice oxidu titaničitého (Torta, 2009), zcela odlišná technika, která však poskytuje horší a méně kvalitní pokrytí a která je rovněž nákladná. Další alternativou je standardní depozice pomocí vlhkého elektrospreje. Ten lze využít například pro depozici oxidu zirkoničitého na horký povrch. Teplota povrchu vede k rozkladu deponovaných kapiček, což má ovšem za následek nestabilní pokrytí s popraskanou vrstvou depozitu (Blacken 2009 a vlastní experimenty). Jinou možností je přímo elektrosprejová depozice oxidu titatiničitého (Niklew, 2010). Tento postup je však stížen tím, že oxid titaničitý je zcela nerozpustná látka, a je tedy třeba sprejovat jeho suspenzi. To je spojeno s technickými problémy (mechanické ucpávání sprejeru, nestabilita sprejovacího proudu). Další příklady řešení jsou citovány na obr. 5 a obr. 6 v tabulkách, ze kterých je patrné, že v analýze fosfopetidů kaseinu mají svá omezení.

Literatura

Aebersold R, Goodlett DR: CHEMICAL REVIEWS (2001) 101, 2, 269-295.

Blacken, GR; Volny, M; Diener, M, et al.: JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY (2009) 20, 6, 915-926.

Blacken, GR; Volny, M; Vaisar, T, et al.: ANALYTICAL CHEMISTRY (2007) 79, 14, 5449-5456.

Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R: NATURE METHODS (2007) 4, 3, 231-237.

Lover T, Henderson W, Bowmaker GA, Seakins JM, Cooney RP: JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY (1997) 7, 8, 1553-1558.

Niklew ML Analytical Chemistry 2010, *82,* 1047-1053

Torta F, Fusi, Casari CS, Bottani CE, Bachi A: JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH (2009) 8, 4, 1932-1942.

Zhou HL, Watts JD, Aebersold R: NATURE BIOTECHNOLOGY (2001) 19, 4, 375-378.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je nová metoda modifikace povrchů pro účinnou separaci fosfopeptidů ze směsi, která je poměrně snadná, nenáročná na přístrojové vybavení a připravený modifikovaný povrch je stabilní a kvalitní. Modifikace je dosaženo elektrosprejováním roztoků alkoxidů titanu, zirkonia nebo hafnia při atmosférickém tlaku v bezvodém alkoholu v přítomnosti nosného plynu, kterým může být kterýkoliv inertní plyn nebo kyslík. Sprejem je vytvářen aerosol, který je nebulizován nosným plynem a vysušen při

průchodu libovolně vyhřívaným prostorem, odkud je vlivem vysokého napětí přiváděn na povrch určený k modifikaci. K modifikaci povrchu dochází nalepením vzniklého oxidu titaničitého, zirkoničitého nebo hafničitého.

Modifikován může být kterýkoliv pevný povrch alespoň s minimální vodivostí až do měrného elektrického odporu (rezistivity) přibližně 10^{20} Ω•m. Použitými materiály mohou být veškeré tepelně stálé kovy, s výhodou nerezová ocel, zlato, hliník, dále je použitelné sklo, syntetický polymer, vrstva křemíkových nanostruktur, uhlíkových nanotrubiček, atp. Modifikace je viditelná pouhým okem a její mikrostruktura je demonstrována pomocí elektronové skenovací mikroskopie (obr.3).

Nesporné výhody řešení jsou v tom, že modifikace je prováděna za atmosferického tlaku, povrch pro modifikaci i elektrosprejovaný roztok jsou při laboratorní teplotě a kapičky jsou zahřívány při průchodu vyhřívaným prostorem. V důsledku toho jsou na povrch napařovány horké nabité částečky, nikoliv studené kapičky. Efektivnějšího fokusování částeček k povrchu je možné dosáhnout vlivem vysokého elektrického potenciálu z externího zdroje opačné polarity než nabité částečky, na kterém je držen povrch pro modifikaci nebo maska umístěná v maximální vzdálenosti 3 mm před povrchem. Získá se mechanicky stabilní vrstva depozitu oxidu titanu, zirkonia nebo hafnia kvalitní houbovité struktury s mikropóry, která se neporuší při nanášení vzorku, a je vhodná pro použití za účelem prekoncentračního obohacování fosfopeptidů.

Pro modifikaci povrchu bylo použito zařízení (obr. 1), které se skládá z elektrosprejovací části, vyhřívaného prostoru a koncové části obsahující povrch pro modifikaci. Elektrosprejovací část obsahuje rozdělovník ve tvaru T, který je napojen na stříkačkovou pumpu. Stříkačková pumpa vyvíjí tlak na píst v ní umístěné stříkačky, která je naplněná zásobním roztokem alkoxidu o koncentraci v rozmezí 0,001 až 0,5 mol/l. Tlakem na píst stříkačky dochází k pumpování roztoku do teflonové hadičky směrem do rozdělovníku (obvyklá průtoková rychlost 5 až 10 µl/minutu). Rozdělovník je zakončen sprejovací jehlou. Dále je k rozdělovníku připojen přívod nosného plynu, přičemž tlak jeho ventilu je v rozmezí 0,2 až 0,8 MPa. Součástí elektrosprejové části je zdroj vysokého napětí [± (1000 až 8000)V], který je připojený v libovolném vodivém místě na elektrosprejovací část. Vyhřívaný prostor je externě vyhřívaný na teplotu 50 až 350°C. Koncová část obsahuje povrch pro modifikaci. Dále jako součást koncové části může být před povrchem pro modifikaci umístěna maska uzemněná nebo připojená na druhý zdroj vysokého napětí (až do ±8000V). V případě, že maska není použita, může být napětí připojeno rovnou na povrch pro modifikaci. Vzdálenost

masky od výstupu z vyhřívaného prostoru je méně než 15 mm a méně než 3 mm od povrchu pro modifikaci. V případě, že maska není použita, tak vzdálenost povrchu od výstupu z vyhřívaného prostoru je méně než 20 mm.

Proces modifikace probíhá následujícím způsobem: zdroj vysokého napětí je připojen na elektrosprejovací část. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) je pod tlakem zaváděn do proudu stlačeného nosného plynu. V důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu je roztok sloučeniny alkoxidu (A) elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Ten je následně zaveden do vyhřívaného prostoru, kde dojde k vysušení aerosolu.

Takto vybuzený aerosol se mění v suchý aerosol respektive dým nabitých částeček (C). Suché nabité částice (C) mohou být navíc fokusovány pomocí vysokého napětí opačné polarity než je napětí na elektrospreji přivedeného na masku nebo přímo na samotný povrch a díky energii získané rapidním ohřevem jsou přilepeny na modifikovaný povrch, kde vytvoří makroskopicky homogenní otisk oxidu, jehož tvar a velikost je definován tvarem a velikostí otvorů na masce. Pokud není maska použita, pak je velikost a tvar otisku definován průřezem vyhřívaného prostoru. Takto modifikovaný povrch může pak být použit přímo pro prekoncentraci fosfopeptidů z peptidové směsi a po nanesení ionizační matrice mohou být fosfopeptidy analyzovány desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií (například pomocí MALDI). Obrázky modifikovaných povrchů získané pomocí elektronové mikroskopie jsou na obr. 3.

Tento způsob modifikace povrchu pro analýzu fosfopeptidů poskytuje kvalitní povrch prostý prasklin a jiných makroskopických nehomogenit.

Modifikovaný povrch připravený v příkladech 1~~2~~3 byl použit pro analýzu fosfopeptidů získanou standardním tryptickým rozkladem kaseinu. Získaná data byla porovnána s dosud publikovanými výsledky. Za použití modifikovaného povrchu připraveného podle vynálezu bylo identifikováno 20 fosforylovaných peptidů kaseinu. Pomocí publikovaných metod bylo identifikováno pouze 2 až 8 peptidů (Obr 5 a 6). S povrchem připraveným podle vynálezu je tedy dosahováno mnohem lepší analýzy fosfopeptidů.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1

Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním

roztokem A, hadičku 5, sprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, vyhřívaný prostor 10, povrch 12 pro modifikaci a masku 13, zdroj vysokého napětí 11 pro povrch připojený na masku 13. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol (B), který se při průchodu vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/dým (C).

Obr. 2

Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním roztokem A, hadičku 5, sprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, vyhřívaný prostor 10, povrch 12 pro modifikaci, zdroj vysokého napětí 11 pro povrch připojený na povrch pro modifikaci 12. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol B, který se při průchodu vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/dým C.

Obr. 3

Obrázky modifikovaných povrchů získané pomocí elektronové mikroskopie A) povrch získaný postupem z příkladu č.1, B) povrch získaný postupem z příkladu č.2, C) povrch získaný postupem z příkladu č.3. Elektronová mikroskopie demonstruje kvalitní pokrytí houbovitým oxidem. Povrch je prostý prasklin a jiných makroskopických nehomogenit.

Obr.4

Srovnání výsledků analýzy téhož vzorku směsi tryptických peptidů kaseinu na povrchu podle vynálezu a na povrchu bez jakéhokoli obohacení. Šipkami jsou označeny nalezené (identifikované) peptidy. A) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu za normálních podmínek. B) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č.1. C) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č.2. D) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č.3.

Obr. 5

Tabulka porovnání výsledků vynálezu s literaturou demonstrovaného na beta kaseinu. První sloupec ukazuje číslo píku ve spektru dle obr. 4B (povrch připraven v příkladu č.1). Druhý ukazuje m/z detekovaných iontů (v závorce jejich náboj), třetí odpovídající sekvenci, včetně

fosforylačních míst, čtvrtý sloupec ukazuje počet fosforylací a pátý podjednotku kaseinu, na které se příslušný peptid nalézá. Šestý až desátý sloupec ukazují porovnání s výsledky dosaženými v literatuře:

2 = Eriksson A., et al., Anal. Chem. 2010, 82, 4577 * 4583

3 = Bi H., et al., Anal. Chem. 2009, 81, 1177 * 1183

4 = Torta F. et al., Journal of Proteome research, 2009, 8, 4, 1932*1942

5 = Larsen R.M. et al., Molecular&Cellular Proteomics, 2005, 4, 873*886

6 = Hoang T. et al., Anal. Chem. 2010, 82, 219 * 228

Znak "+" znamená, že fosfopeptid byl detekován, znak "-", že nebyl.

Obr. 6

Tabulka porovnání výsledků vynálezu s literaturou demonstrovaného na alpha S1 kaseinu. První sloupec ukazuje číslo píku ve spektru dle obr. 4B. Druhý ukazuje m/z detekovaných iontů (v závorce jejich náboj), třetí odpovídající sekvenci, včetně fosforylačních míst, čtvrtý sloupec ukazuje počet fosforylací a pátý podjednotku kaseinu, na které se příslušný peptid nalézá. Šestý až desátý sloupec ukazují porovnání s výsledky dosaženými v literatuře:

1 = Blacken R.G. et al., Anal. Chem. 2007, 79, 5449 * 5456

2 = Eriksson A., et al., Anal. Chem. 2010, 82, 4577 * 4583

4 = Torta F. et al., Journal of Proteome research, 2009, 8, 4, 1932*1942

5 = Larsen R.M. et al., Molecular&Cellular Proteomics, 2005, 4, 873*886

6 = Hoang T. et al., Anal. Chem. 2010, 82, 219 * 228

Znak "+" znamená, že fosfopeptid byl detekován, znak "-", že nebyl.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 15 minut podle následujícího postupu:

Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost pumpy 2: 5μL/min

Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část 9 stříkačky 4 : 3500V

Teplota vyhřívaného prostoru ve tvaru trubičky 10: 130°C

Napětí ze zdroje 11 na masce 13: -5 000V
Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,5 MPa
Typ nosného plynu: dusík
Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 1 mm

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem propoxidu zirkoničitého v 2-propanolu o koncentraci 0,02 mol/l (Roztok A). Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla hadičkou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhřívaného prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl z nerezové oceli. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 1,5 μmol propoxidu zirkoničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (1 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

Příklad 2

Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 15 minut podle následujícího postupu:
Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:
Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 8 μL/min
Napětí ze zdroje 8 přivedené na sprejovací jehlu 6: -3000V
Teplota vyhřívaného prostoru ve tvaru trubičky 10: 100°C
Napětí ze zdroje 11 přivedené na masku 13: +6 000V
Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,4 MPa
Typ nosného plynu: argon
Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 0,5 mm

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem propoxidu zirkoničitého v 1-propanolu o koncentraci 0,03 mol/l (Roztok A) a propojena hadičkou 5 s rozdělovníkem Zdroj vysokého

napětí 8 byl připojen na sprejovací jehlu 6. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhřívaného prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl ze skla.. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 3,6 μmol propoxidu zirkoničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (0,5 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

Příklad 3

Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 20 minut podle následujícího postupu:
Hodnoty na aparatuře z obr. 2 byly nastaveny následujícím způsobem:
Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 6 μl/min
Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část stříkačky (9): +3000V
Teplota vyhřívaného prostoru ve tvaru trubičky 10: 120°C
Napětí ze zdroje 11 přivedené na povrch 12: -4 500V
Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,5 MPa
Typ nosného plynu: oxid uhličitý

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem propoxidu titaničitého v 1-butanolu o koncentraci 0,05 mol/l (Roztok A). Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla hadičkou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhřívaného prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel až na povrch 12 pro modifikaci, který byl z hliníku.. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 6 μmol propoxidu titaničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého měla tvar kruhu s průměrem daným

průměrem vyhřívaného prostoru (5 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

Příklad 4

Příprava směsi fosfopeptidů z kaseinu a koncentrační obohacení na modifikovaných površích připravených v příkladech 1, 2 a 3.

Kasein (10 μg, Sigma-Aldrich) byl separován pomocí SDS-PAGE na prefabrikovaném gradientovém gelu (Invitrogen). Získaný gel byl po separaci obarven pomocí CBB-R250 a vizualizovaný protein byl spolu s gelem vyříznut a gel obsahující protein byl dále rozřezán na malé kostičky (~1 mm^3). Poté byl protein v gelu odbarven, redukován (50 mM TCEP, pH 8), alkylován (55 mM iodoacetamid, pH 8) a natráven trypsinem. Výsledné peptidy a fosfopeptidy byly z gelu extrahovány, odsoleny na obracené fázi (microtrap, Michrom), usušeny a nasledně použity jako testovací směs pro analýzu na modifikovaných površích. Připravený povrch byl třikrát omyt metanolem, a dále pětkrát DHB pufrem (20 mg/mL kyseliny dihydroxybenzoové ve směsi acetonitril/voda/kyselina trifluoroctová v poměru 50:49.9:0.1 (v/v)). Vzorek peptidů získaných trypsinací kaseinu dle výše uvedeného postupu byl rozpuštěn ve 40 μL DHB pufru a 0,7 μL bylo dávkováno na povrch. Nanesený povrch byl ponechán při pokojové teplotě. Po uschnutí byl povrch se vzorkem pětkrát omyt DHB pufrem a potom vložen na 3 minuty do směsi acetonitril/voda/kyselina trifluoroctová v poměru 80:19.9:0.1 (v/v) (aby se povrch zbavil nefosforylovaných peptidů, které nebyly navázány). Na povrch bylo kápnuto 0,5 μL 400 mM roztoku amoniaku a po kompletním uschnutí bylo přidáno 0,5 μL 2% kyseliny trifluorooctové. Po uschnutí bylo na povrch naneseno 0,5 μL roztoku ionizační matrice (20 mg/mL kyseliny dihydroxybenzoové ve směsi acetonitril/voda/kyselina fosforečná v poměru 50:49: 1 (v/v) a peptidy byly analyzovány standardní technikou MALDI-MS. Výsledná spektra jsou na obr. 4B

Zpracování dat a vyhodnocení informace o přítomnosti fosfopetidů

Na panelu A obrázku 3 je MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu za normálních podmínek. Na panelu B je výsledné MALDI-MS spektrum získané po provedení obohacení na povrchu dle příkladů 1, 2 a 3. Ze srovnání spekter je vidět, že signály ve spektru o nominálních hodnotách 1031, 1562, 1661, 1833, 1864, 1928, 1944, 1952, 2062, 2556, 2560, 2577, 2640, 2657, 2720, 2737, 2966, 2962, 3042, 3122 (viz obr 5 a 6) jsou relativně zvýšeny

na panelu B (spektrum po obohacení na povrchu) oproti panelu A (standardní spektrum). Z této informace lze tedy správně určit, že tyto signály přislušejí fosforylovaným peptidům, protože byly navýšeny po provedení povrchového obohacení. Stejně by se postupovalo při vyhodnocování spekter na panelech C a D.

Průmyslová využitelnost

Instrumentální biologická analýza bílkovin, konkrétně fosfoproteomika.

09.09.11

PV 2010-429

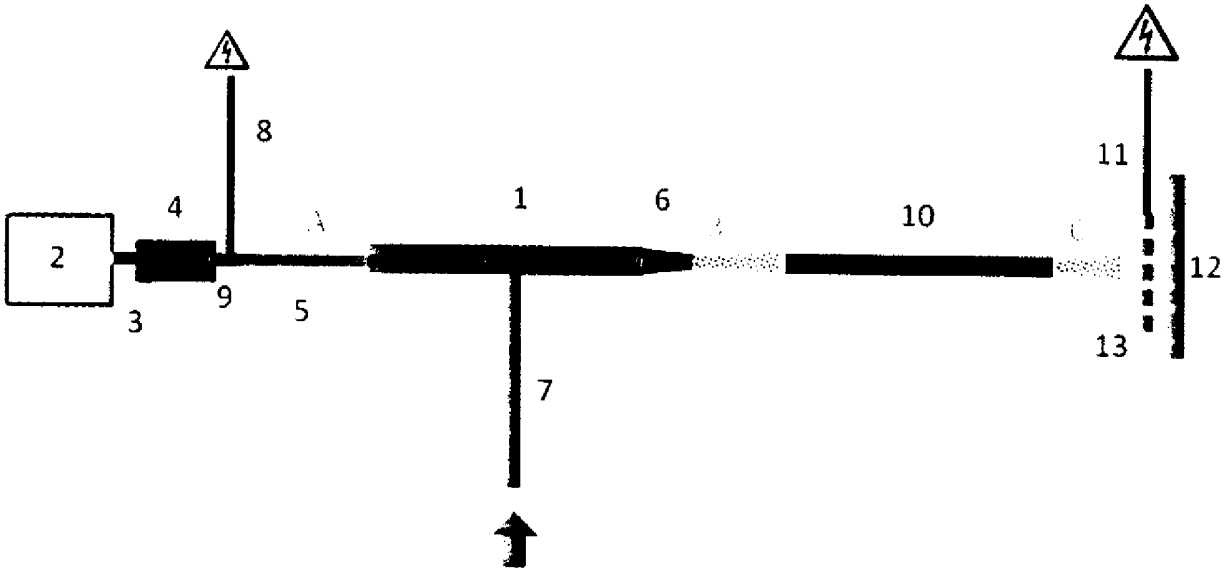
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie, vyznačující se tím, že do uzavřeného prostoru, který je pod napětím [± (800-8000) V] je pod tlakem 0,2 až 0,8 MPa přiváděn nosný plyn a alkoholický roztok alkoxidu zirkoničitého/ titaničitého/ hafničitého, přičemž vzniklý nabitý aerosol vycházející z elektrospreje je zaváděn do vyhřívaneho prostoru (10), vyhřívaného na 50 až 250°C a vycházející vysušený aerosol je zaváděn na povrch (12) pro modifikaci, který je umístěn za vyhřívaným prostorem (10).
2. Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie podle nároku 1, vyznačující se tím, že povrch (12) pro modifikaci je vodivý s měrným odporem suchého materiálu menším než 10^{20} Ω•m a je pod napětím [± (500÷10000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.
3. Způsob modifikace povrchu podle nároku 1, vyznačující se tím, že mezi vyhřívaným prostorem (10) a povrchem (12) pro modifikaci je ve vzdálenosti do 3 mm od povrchu (12) pro modifikaci umístěna maska (13), která je pod napětím [± (500÷10000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.

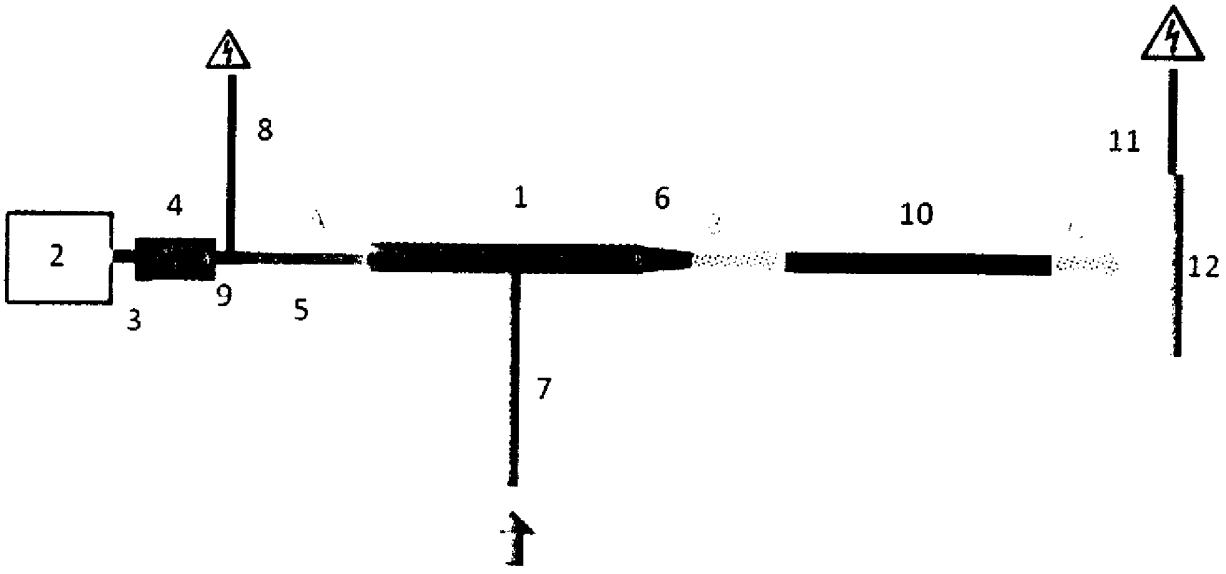
4. Způsob modifikace povrchu podle nároků 1 nebo 2 nebo 3, vyznačující se tím, že jako nosný plyn je použit oxid dusný nebo dusík nebo oxid uhličitý nebo plyn z 8.A skupiny periodické tabulky prvků nebo kyslík.

5. Způsob modifikace povrchu podle nároků 1 nebo 2 nebo 3, vyznačující se tím, že povrch (12) pro modifikaci je z tepelně stabilního kovu, skla, křemíkových nanostruktur, uhlíkových nanotrubiček, tepelně a mechanicky stabilního syntetického polymeru.

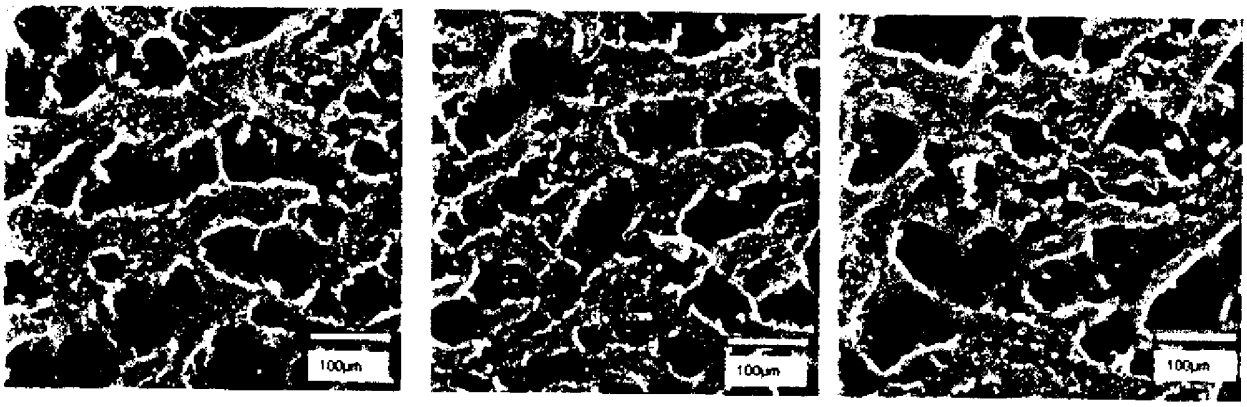
Obr.1


8
11
4
1
6
10
2
12
9
5
3
13
7
Nosný plyn

Obr.2

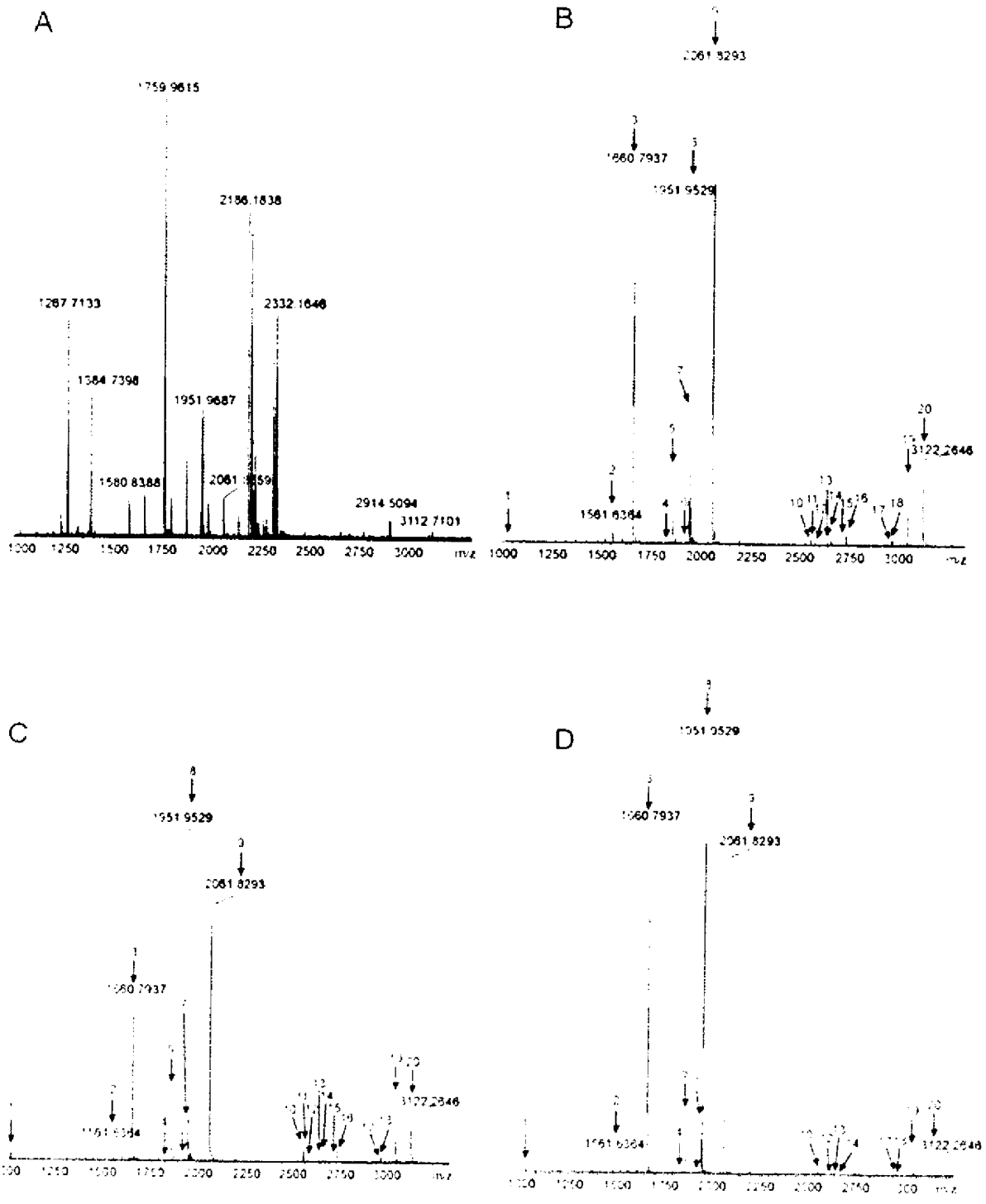

8
11
4
1
6
10
2
12
9
5
3
7
Nosný plyn

Obr. 3



A B C

Obr. 4


A
1759.9615
2186.1838
1267.7133
2332.1646
1384.7398
1951.9687
1580.8388
2914.5094
3112.7101
1000 1250 1500 1750 2000 2250 2500 2750 3000 m/z
B
2061.8293
1660.7937
1951.9529
1561.6364
3122.2646
1000 1250 1500 1750 2000 2250 2500 2750 3000 m/z
C
1951.9529
2061.8293
1660.7937
3122.2646
D
1951.9529
1660.7937
2061.8293
1561.6364
3122.2646

Obr. 5

Číslo píku	m/z (náboj)	peptid	počet fosforylací	kasein	2	3	4	5	6
1	1031.42440 (2+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDK	1	beta	+	-	-	-	-
2	1561.63686 (2+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	-	-	-	-
9	2061.82930 (1+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDK	1	beta	+	+	+	+	+
10	2556.08588 (1+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDKIHPF	1	beta	+	+	+	-	+
17	2966.19345 (1+)	ELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	-	-	+	-
18	2962.37302 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-SSEESITR	2	beta	-	-	-	-	-
19	3042.27711 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-SEESITR	3	beta	-	-	-	-	-
20	3122.26464 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	+	+	+	+

Obr. 6

Číslo píku	m/z (náboj)	peptid	počet fosforylací	kasein	1	2	4	5	6
3	1660.79372 (1+)	VPQLEIVPN-pS-AEER	1	alpha S1	+	+	+	+	+
4	1832.85326 (1+)	YLGEYLIVPNSAEER	1	alpha S1	-	-	+	+	-
5	1863.71919 (1+)	DIG-pS-ESTEDQA-oxM-EDIK	1	alpha S1	-	-	-	-	-
6	1927.69375 (1+)	DIG-pS-E-pS-TEDQAMEDIK	2	alpha S1	-	-	-	+	+
7	1943.68659 (1+)	DIG-pS-E-pS-TEDQA-oxM-EDIK	2	alpha S1	-	-	+	-	-
8	1951.95287 (1+)	YKVPQLEIVPN-pS-AEER	1	alpha S1	+	+	+	+	+
11	2559.94371 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-SEEIVPNSVEQK	3	alpha S1	-	-	-	-	-
12	2576.99571 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-SEEIVPNSVEQK	3	alpha S1	-	-	-	-	-
13	2639.93462 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPNSVEQK	4	alpha S1	-	-	-	-	-
14	2656.95603 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPNSVEQK	4	alpha S1	-	-	-	-	-
15	2719.90729 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPN-pS-VEQK	5	alpha S1	-	-	-	-	-
16	2736.92778 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPN-pS-VEQK	5	alpha S1	-	-	-	-	-