

LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST A JEJÍ APLIKACE V PROTEOMICKÉ ANALÝZE

PETR VERNER

SPECTRONEX Praha, Černická 19, Praha 10
verner@spectronex.cz

Došlo 12.9.05, přijato 5.10.05.

Klíčová slova: LC-MS, lineární iontová past, Orbitrap, FT-MS, FT-ICR, hmotnostní spektrometrie, proteomická analýza.

Obsah

1. Úvod
2. Porovnání 2D a 3D iontové pasti
 - 2.1. Efektivita záchytu iontů
 - 2.2. Limit prostorového náboje
 - 2.3. Rozlišení
3. Aplikace 2D iontové pasti v proteomice
4. Spojení 2D iontové pasti s FT-ICR analyzátozem
5. Spojení 2D iontové pasti s FT-MS Orbitrap analyzátozem
6. MALDI za sníženého tlaku (vMALDI) jako iontový zdroj 2D iontové pasti
7. Závěr

1. Úvod

Lineární iontové pasti (2D) jsou již delší dobu využívány pro studium spektroskopických a dalších fyzikálních vlastností iontů. V roce 1997 bylo navrženo použití lineární iontové pasti jako procesoru kvantové informace¹ a později, v kalifornské Jet Propulsion Laboratory, byla iontová past použita jako velmi přesný časový standard, použitelný při kosmických výpravách^{2,3}. John D. Prestage ze stejné laboratoře navrhl použití lineární iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru pro analýzu plynů, použitelného díky malé hmotnosti, rozměrům a malé spotřebě energie na výzkumných kosmických sondách (více na www.nasatech.com). Uvedené aplikace jsou jen malou ukázkou širokého použití těchto přístrojů ve fyzice, astronomii a dalších oborech.

V hmotnostní spektrometrii byla lineární iontová past použita nejprve jako kolizní cela trojitého kvadrupolu⁴, později pak jako součást hybridních systémů s FT-ICR (cit.⁵), TOF (cit.⁶) popř. 3D iontovou pastí⁷ či kvadrupolem (Q-Trap).

Výhody 2D proti 3D iontové pasti popsal Syka

a spol.⁸ a spolu s Bierem také navrhl několik možných uspořádání lineární a prstencové 2D iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru⁹. Komerční hmotnostní spektrometr na bázi lineární iontové pasti byl později uveden na trh firmou Finnigan jako Finnigan LTQ.

2. Porovnání 2D a 3D iontové pasti

Teorie a principy fungování *iontových* pasti přesahují rámec této práce a jsou podrobně popsány v řadě prací^{10–12}. Omezím se tedy na porovnání některých základních parametrů těchto systémů s ohledem na později uvedené aplikace.

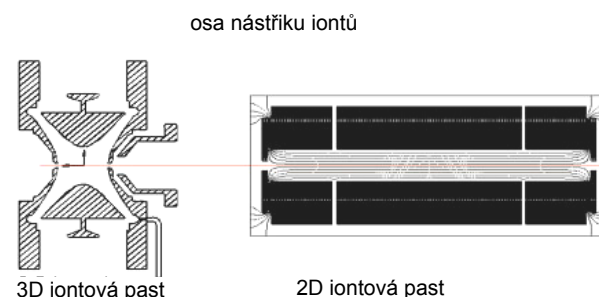
2.1. Efektivita záchytu iontů

Při nástřiku iontů, generovaných v externím zdroji, do 3D iontové pasti dochází k významné ztrátě iontů a jejich diskriminaci podle hmotnosti. Příčinou je skutečnost, že vstupující ionty musí proniknout do poměrně silného RF pole, které existuje ve směru vstupujících iontů a při vstupu mají buď příliš málo či příliš mnoho kinetické energie na to, aby odpovídající množství kolizí s přítomným heliem (buffer gas) snížilo tuto energii na hodnotu umožňující záchyt iontu v iontové pasti. Efektivita záchytu iontů v 3D iontové pasti tak je limitována na cca 5 % (cit.¹³), přičemž při záchytu iontů v širokém rozmezí m/z dochází k jejich významné diskriminaci.

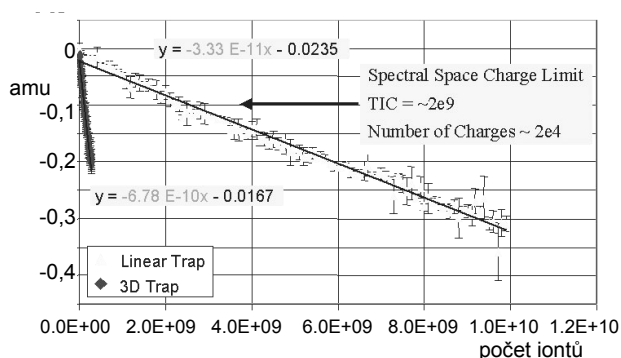
Ve 2D iontové pasti je RF pole ve směru letu (nástřiku) iontů minimální (obr. 1). Efektivita záchytu iontů tak může dosahovat až 100 % (cit.⁴), v praxi se však obvykle pohybuje mezi 50–70 %. Diskriminace iontů v závislosti na jejich m/z je minimální.

2.2. Limit prostorového náboje

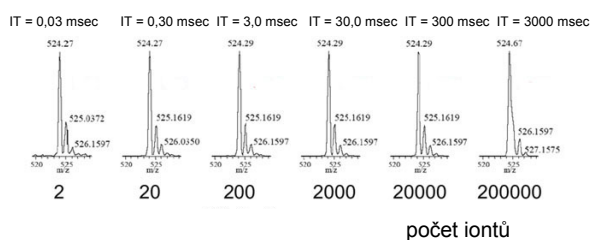
Prostorový náboj závisí na počtu iontů zachycených v iontové pasti a významně limituje vlastnosti všech analyzátorů pracujících na tomto principu, a to jak v průběhu uchování iontů (Storage space charge limit), tak při jejich



Obr. 1. Porovnání 3D a 2D iontové pasti



Obr. 2. Porovnání experimentálně naměřených hodnot posunu měřené hmotnosti na počtu iontů v analyzátoru pro 3D a 2D iontovou past



Obr. 3. Rozlišení a posun hmotnosti naměřeného spektra v závislosti na počtu iontů v 2D iontové pasti; IT – doba nástřihu iontů

Tabulka I

Porovnání některých parametrů u 3D (Finnigan LCQ) a 2D (Finnigan LTQ) iontové pasti

Parametr	Hodnota		rozdíl
	3D iontová past	2D iontová past	
Efektivita zachytu iontů, %	~ 55-70	~ 5	> 10
Efektivita detekce, %	~ 100	~ 50	1–2
Efektivita celkem, %	~ 35-55	~ 2,5	> 10
Kapacita (spektrální), počet iontů	~ 20 000	< 500	> 40
Sken. rychlost – Zoom	1100	267	4
Sken. rychlost – Ultra Zoom	27	NA ^a	NA ^a

^a NA – nejsou k dispozici

izolaci, aktivaci a získání výsledného hmotnostního spektra (Spectral space charge limit). Posledně jmenovaná hodnota má největší vliv na kvalitu získaného MS spektra (rozlišení, posun naměřené oproti skutečné).

Obr. 2 uvádí provnání experimentálně naměřených hodnot posunu měřené hmotnosti na počtu iontů v analyzátoru pro 3D a 2D iontovou past, obr. 3 pak vzhled naměřeného spektra v závislosti na počtu iontů v 2D iontové pasti.

2.3. Rozlišení

Stejně jako u 3D pastí je možné i u 2D analyzátorů získat spektra s vyšším rozlišením zpomalením rychlosti skenu a amplitudy vypuzujícího napětí. To však vede ke snížení hodnoty spektrálního limitu prostorového náboje a vyžaduje u 3D pastí průměrování několika skenů. Zvýšená kapacita 2D iontových pastí naproti tomu umožňuje akvizici kvalitního spektra s vyšším rozlišením bez tohoto průměrování.

Praktickým výsledkem výše uvedené vlastnosti 2D iontových pastí je jednak rychlejší skenování při jednotkovém rozlišení, jednak vyšší rozlišení při srovnatelné rychlosti skenu.

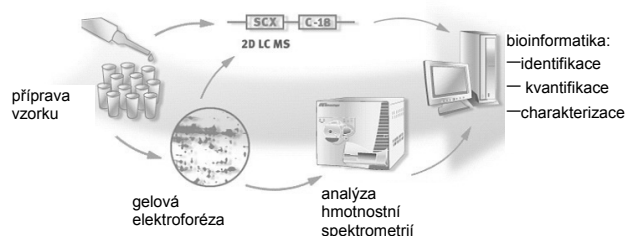
Rozlišení je v 2D iontové pasti výrazně více závislé na přesné geometrii pasti než u 3D analyzátoru. Zatímco ve 3D analyzátoru jsou ionty v době vypuzení do detektoru soustředěny v obláčku s průměrem cca 1 mm, je stejný obláček v 2D pasti „roztažen“ do cca 30 mm délky v axiálním směru. Přesná geometrie kvadrupolu tak hraje velkou roli.

Tabulka I uvádí porovnání některých parametrů u 3D (Finnigan LCQ) a 2D (Finnigan LTQ) iontové pasti.

3. Aplikace 2D iontové pasti v proteomice

Proteomická analýza současně usiluje o identifikaci všech proteinů v daném biologickém systému. Vzhledem k nesmírné složitosti těchto systémů a dynamickému rozsahu koncentrací proteinů není zatím možné beze zbytku identifikovat všechny proteiny i v jednoduchých systémech, jako jsou bakterie či kvasinky.

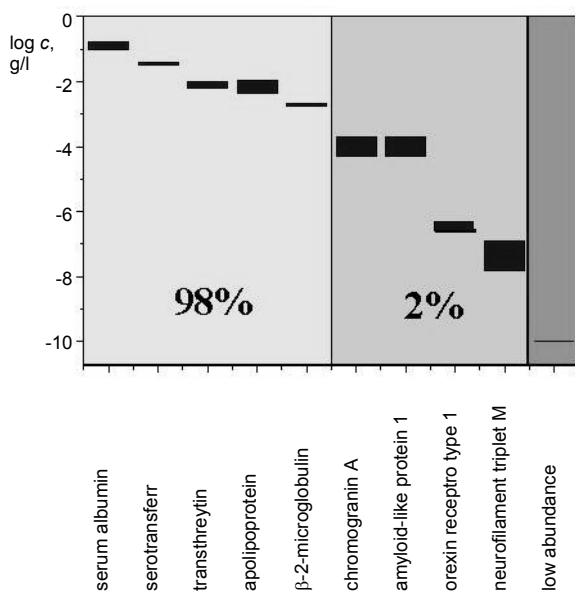
Obr. 4 ukazuje typický postup proteomické analýzy, tabulka II pak porovnává tři běžně používané metody ana-



Obr. 4. Proteomická analýza

lýzy, přičemž 3D iontové pasti jsou tradičně jedním z nejčastěji používaných MS systémů v proteomické analýze s ohledem na jejich citlivost, robustnost, snadné ovládní a vynikající poměr cena/výkon¹⁴⁻¹⁶.

2D iontové pasti dále rozšiřují možnosti 3D iontových



Obr. 5. Proteiny identifikované v CSF pomocí 2D-HPLC-MS/MS s 2D iontovou pastí; koncentrační rozsah 7 řádů

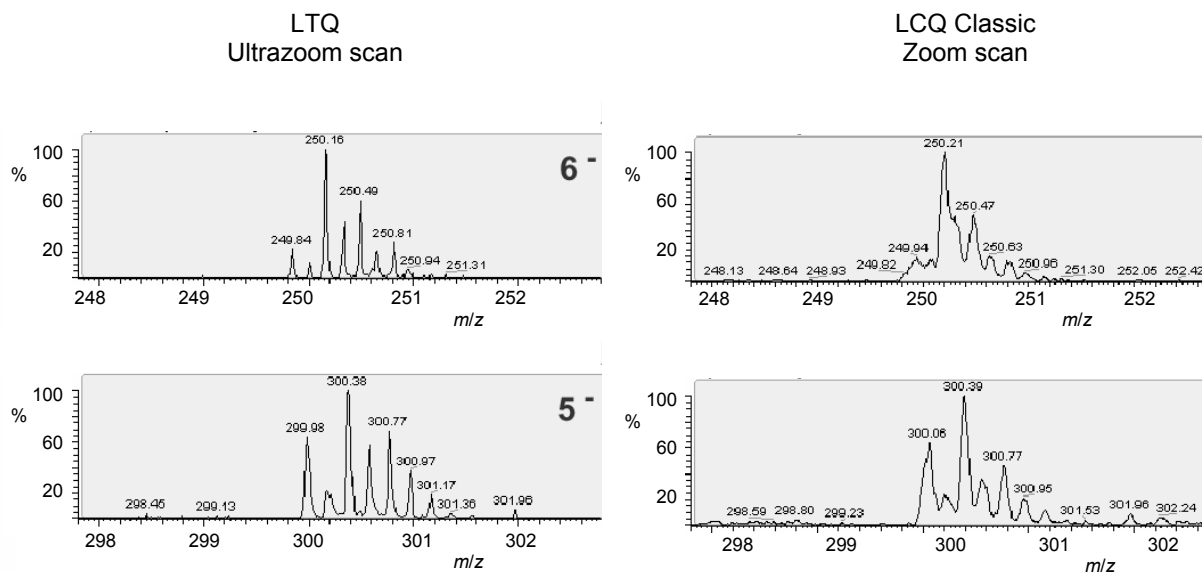
pastí a umožňují např.:

- identifikaci i nízkých koncentrací proteinů v proteomu díky větší citlivosti a většímu dynamickému rozsahu (obr. 5),
- určení počtu nábojů u vícenásobně nabitých iontů díky vyššímu rozlišení (obr. 6),
- možnost vícenásobného MSⁿ díky většímu množství iontů, jež je možné v iontové pasti akumulovat,
- zrychlení analýz popř. zvýšení množství získaných dat díky možnosti rychlejšího skenování.

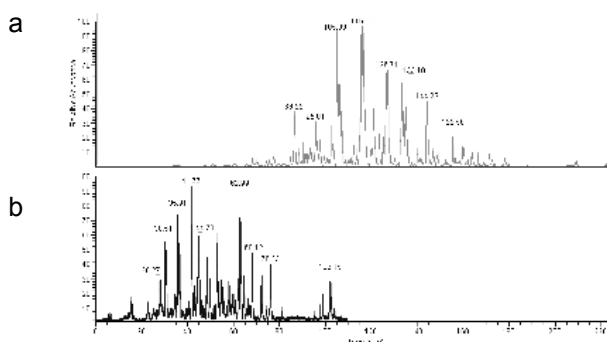
Zrychlení analýzy bylo demonstrováno např. porovnáním 3D iontové pasti (Finnigan LCQ Deca XP Plus) a 2D iontové pasti (Finnigan LTQ) na analýze peptidů vzniklých tryptickým štěpením *Mycoplasma pneumoniae*¹⁷. Směs peptidů byla nejprve podrobena SCX frakcionaci

Tabulka II
Metody proteomické analýzy

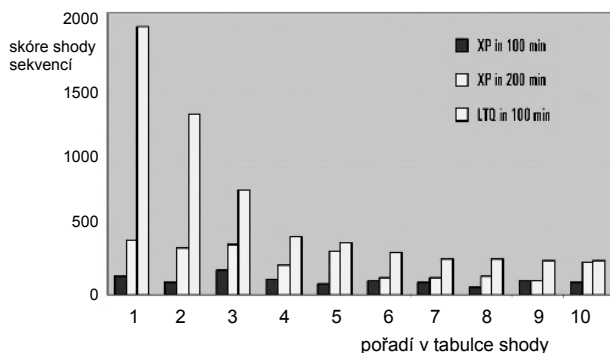
Příprava vzorku	Separace	Detekce
Precipitace ethanolem, alkylace, trypsinolýza	2D Gel IPG (pH 3-10) & 14 % T	gelová extrakce & nanosprej iontová past MS/MS
Ultrafiltrace, alkylace, trypsinolýza	1D LC (obrácená fáze)	nanosprej iontová past MS/MS
Ultrafiltrace, alkylace, trypsinolýza	2D LC (iontová výměna & obrácená fáze)	nanosprej iontová past MS/MS



Obr. 6. Porovnání rozlišení získaného technikou Zoom Scan (3D iontová past LCQ) a Ultrazoom Scan (2D iontová past LTQ)



Obr. 7. Kapilární RP-HPLC-MS/MS analýza frakce 37 na (a) Finnigan LCQ Deca XP Plus; doba analýzy 200 min, 3D iontová past a (b) Finnigan LTQ; doba analýzy 100 min, 2D iontová past

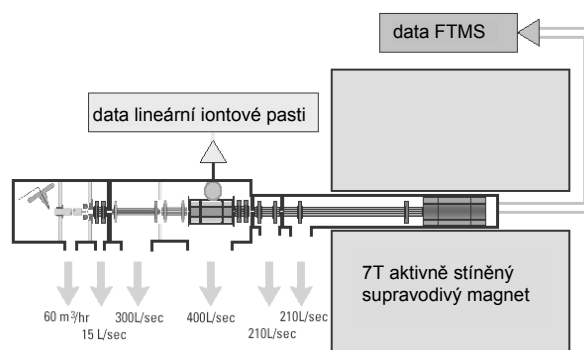


Obr. 8. Kvalita identifikace proteinů (prvních 10) vyjádřená pomocí *Sequest Consensus Score*; 1 – leucine aminopeptidase, 2 – pyruvate dehydrogenase E1 beta-subunit, 3 – molecular chaperone, 4 – DNA-directed RNA polymerase beta chain, 5 – RNA polymerase beta subunit, 6 – ribosomal protein L1, 7 – conserved hypothetical protein, 8 – PEP-dependent HPr protein kinase phosphoryltransferase, 9 – L-lactate dehydrogenase, 10 – Heat-shock protein GroEL

a jednotlivé frakce analyzovány LC/MS/MS na kapilární koloně s reverzní fází, přičemž podmínky byly zvoleny tak, aby analýza byla dvakrát kratší na LTQ (obr. 7). I při tomto dvojnásobném zrychlení analýzy bylo možné identifikovat přibližně stejné množství proteinů (548 na LTQ vs. 575 na LCQ). Přestože byla pro HPLC separaci při analýze pomocí 2D iontové pasti použita kratší HPLC kolona (5 cm proti 20 cm na 3D pasti), byla kvalita identifikace proteinů vyjádřená parametrem „Sequest Consensus Score“ na tomto přístroji výrazně lepší (obr. 8).

4. Spojení 2D iontové pasti s FT-ICR analyzátozem

Jak již bylo uvedeno výše, lineární iontovou past je možné kombinovat s dalšími MS analyzátozem. Kombinaci



Obr. 9. Schéma hybridního hmotnostního spektrometru Finnigan LTQ-FT

2D pasti s FT-ICR uvedla na trh firma Thermo Electron jako Finnigan LTQ-FT (obr. 9). Oba MS analyzátozem v tomto systému mohou pracovat paralelně, přičemž první část poskytuje MS/MS a MSⁿ spektra, FT-ICR analyzátozem pak velmi přesnou hmotnost vybraných iontů. Přesnost měření hmotnosti bývá rutinně pod 1 ppm, rozlišení FT-ICR pak podle rychlosti skenování 100 000 (1 sken s⁻¹) až 500 000 (1 sken na 4 s).

Měření velmi přesné hmotnosti v MS/MS spektrech a vysoké rozlišení se využívá k přesnější identifikaci proteinů pomocí tzv. „top-down“ ale i „bottom-up“ proteomické analýzy¹⁸.

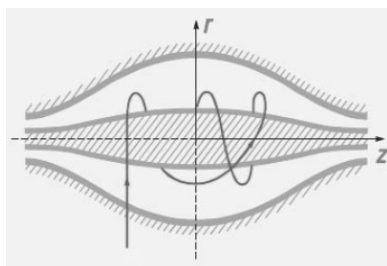
Systém 2D iontová past – ICR je velmi snadno ovladatelný a vhodný pro rutinní měření velkého množství vzorků. Příkladem může být spojení LTQ-FT s robotem Advion NanoMate 100 (automatické dávkování vzorků, ESI chip)¹⁹. 48 vzorků různých analytů (peptidy, proteiny, polymery, léčiva) různých koncentrací bylo analyzováno duplicitně (96 měření), přičemž doba analýzy vzorku byla cca 1 min. Doba jednoho cyklu (sken 200–2000 amu) byla 1 s a získané rozlišení 100 000 (FWHM) na iontu m/z 400. Pro měření přesné hmotnosti byla použita 2 dny stará externí kalibrace. Při těchto podmínkách byla přesnost stanovení hmoty ve velké většině případů pod 1 ppm.

Kromě MS/MS spekter získaných kolizí CID v iontové pasti umožňuje hybridní systém 2D iontová past – FT-ICR i další ionizační techniky v cele ICR (ECD, IRMPD) používané při proteomických analýzách a je zástupcem nové třídy přístrojů poskytujících potřebná data (MS/MS, vysoké rozlišení, přesná hmotnost, fragmentace) při zachování jednoduché obsluhy a možnosti rutinních analýz.

5. Spojení 2D iontové pasti s FT-MS Orbitrap analyzátozem

Toto spojení bylo jako komerčně dostupný systém uvedeno firmou Thermo Electron na konferenci ASMS 2005 v San Antonio, když předem publikované výsledky měření^{22,23} naznačily potenciál nového MS analyzátozem.

Podobně jako v případě FT-ICR se jedná o FT/MS



Obr. 10. Schéma Orbitrapu

analyzátor, tentokrát však s elektrostatičným polem místo magnetického. V analyzátoru jsou ionty zachyceny radiálně a oscilují kolem centrální elektrody, umístěné axiálně v dutině analyzátoru (obr. 10). Oscilace iontů v Orbitrapu jsou závislé na jejich hodnotě m/z a jsou nedestruktivně měřeny a převedeny Fourierovou transformací na hmotnostní spektra.

Stejně jako v případě spojení s FT-ICR je možné souběžně provádět MS^n experimenty v lineární iontové pasti a měření přesné hodnoty m/z vybraných iontů v orbitrapu.

Publikované parametry jsou rozlišení 150 000, přesnost měření hodnoty m/z 2–5 ppm a rozsah m/z do 6000 amu. Orbitrap zároveň vykazuje velkou kapacitu a dynamický rozsah²⁴. Velikou výhodou tohoto analyzátoru je absence rozměrného supravodivého magnetu a tím i nákladného chlazení tekutým heliem a dusíkem. Významnou výhodou může být i jednoduché ovládání.

6. MALDI za sníženého tlaku (vMALDI) jako iontový zdroj 2D iontové pasti

Kombinace MALDI ionizace a 3D iontové pasti byla použita pro rychlou identifikaci bílkovin²⁰. Zajímavé možnosti poskytuje spojení 2D iontových pastí s MALDI ionizací za sníženého tlaku (vMALDI) viz tabulka III. Toto spojení umožňuje rychlou a velmi citlivou MS/MS analýzu peptidových štěpů bílkovin po 1D nebo 2D gelové separaci, frakcí peptidů v 96 nebo 384 jamkových destičkách,

Tabulka III
Některé parametry vMALDI-LTQ

Parametr	Hodnota
Rozlišení na vstupu iontů	0,5 Da
Citlivost	250 amol digest (MS/MS s identifikací), 200 amol jeden peptid
Počet stupňů MS/MS	10
Kalibrace	stabilní, provádí se separátně
Rozsah měřených hmotností	do 4000
Přesnost měření m/z	typicky 15–85 ppm
Rychlost akvizice	1,5 s (3 pulsy laseru \times 10 průměrovaných spekter)

případně analýzu na BIOCHIPSTM firmy LCI (Fremont, CA). Získaná MS/MS spektra lze použít pro identifikaci bílkovin na základě peptidové sekvence např. programem SEQUEST. Zatímco LC/MS analýza obvykle trvá 30–60 min, analýza vMALDI-2D-IT vyžaduje jednotky minut na vzorek.

Příkladem použití této techniky může být analýza fosforylace mléčných bílkovin (kasein) po jejich separaci na 1D SDS. S využitím Data Dependent MS^3 experimentu, umožňujícího sledování neutrální ztráty 98, která v iontové pasti u většiny peptidů odpovídá ztrátě H_3PO_4 (popř. $HPO_3 + H_2O$) a s využitím prohlížeče SEQUESTTM byly identifikovány všechny čtyři mléčné kaseiny (alfa-kasein S1 a S2, beta-kasein a kappa kasein) a místa jejich fosforylace²¹.

7. Závěr

Rychlý vývoj hmotnostních spektrometrů na bázi iontové pasti v posledních letech vede k širokému nasazení těchto systémů v proteomické analýze. Umožňují rychlou a citlivou tandemovou hmotnostní spektrometrii při relativně nízké ceně instrumentace.

Uvedení lineární iontové pasti a její kombinace s ICR-FT-MS a později naprosto nového spojení lineární iontové pasti s analyzátozem na bázi orbitrapu pak ještě zvyšuje potenciál této techniky zvýšením její citlivosti, dynamického rozsahu, možnosti vysokého a velmi vysokého rozlišení a velmi přesného určení hmotnosti. Vývoj v této oblasti zřejmě zdaleka nekončí a iontové pasti budou hrát v budoucnu stále významnější roli.

LITERATURA

1. Steane M.: Appl. Phys. B. 64, 623 (1997).
2. Prestage J. D., Tjoelker R. L., Maleki L.: *TMO Progress Report 42-143*. (Joseph H. Yuen, ed.) November 15 2000, National Aeronautics and Space Administration 2000.
3. Prestage J. D., Tjoelker R. L., Maleki L.: *Proc. 1999 Joint EFTF/IEEE International Frequency Control Symposium*, str. 121. Besancon 1999.
4. Dolnikowski G. G., Kristo M. J.: Int. J. Mass Spec. Ion Proc. 82, 1 (1988).
5. Senko M. W., Hendrickson C. L.: J. Am. Soc. Mass Spec. 8, 970 (1997).
6. Collings B. A., Campbell J. M.: Rapid Comm. Mass Spec. 15, 1777 (2001).
7. Cha B., Blades M. W.: Anal. Chem. 72, 5647 (2000).
8. Schwartz J. C., Senko M. W., Syka J. E. P. A.: J. Am. Soc. Mass Spec. 13, 659 (2002).
9. Bier M. E., Syka J. E. P.: US Patent 5,420,425, 1995.
10. Todd J. F. J.: *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry*. Vol. III. CRC Press, Boca Raton 1995.
11. March R. E.: J. Mass Spectrom. 32, 351 (1997).
12. Stafford G. Jr.: J. Am. Soc. Mass Spec. 13, 589 (2002).
13. Quarmby S. T., Yost R. A.: Int. J. Mass Spec.

- 190/191, 81 (1999).
14. Pegah R. J., Chhabil D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1877 (2004).
 15. Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A.: *Anal. Chem.* 74, 4741 (2002).
 16. Chelius D., Zhang T., Wang G., Shen R. F.: *Anal. Chem.* 75, 6658 (2003).
 17. Bonilla L. E., Thakur R., Guzzetta A., Jaffe J. D.: ; Radically Improved Bottom-Up Protein Identification using a Finnigan LTQ Ion Trap Mass Spectrometer. *Chromatography and Mass Spectrometry Application Note AN 328*, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
 18. Sutton J. N.: Top-Down Analysis of the Low Molecular Weight Human Plasma Proteome Using Hybrid Ion Trap-Fourier Transform Mass Spectrometry Application Note AN 344, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
 19. Griep-Raming J., Metelmann-Strupat W.: *Fully Automated High Throughput Accurate Mass Determination Using FT-ICR Mass Spectrometry*, Application Note AN 30023, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
 20. Krutchinsky A. N., Kalkum M., Chait B. T.: *Anal. Chem.* 73, 5066 (2001).
 21. Conaway P.-M.C.: *ABRF 2005 February 5-8, 2005, Savannah, GA*. Poster P64-S, abstrakt v *J. Biomolecular Techniques* 16(1), 20 (2005).
 22. <http://www.chem.purdue.edu/cooks/Orbitrap.htm>, staženo 1.9.2005.
 23. Hardman M., Makarov A. A.: *Anal. Chem.* 75(7), 1699 (2003).
 24. Qizhi Hu: *J. Mass Spectrom.* 40, 430 (2005).

P. Verner (Spectronex, Prague): Linear Ion Trap and Its Application in Proteomic Analysis

Linear ion trap (LIT) is a successor of 3D-type ion traps in mass spectrometry. In this article, some features of both types of ion traps are compared as regards their ion capture effectivity, space charge capacity and resolution. Application of LIT in proteomic analysis is discussed using both ESI and MALDI ionisation. Combination of LIT with both FT-ICR-MS and electrostatic FT-MS (orbitrap) is then given as an example of new development in ion trap mass spectrometry analysis.