

A tömegspektrometria újabb alkalmazásai

Kappelmayer János
Debreceni Egyetem, OEC

1946. TOF
1985. MALDI
2002. biológiailag fontos makromolekulák analízise

Can we teach elephants to fly?

John Fenn



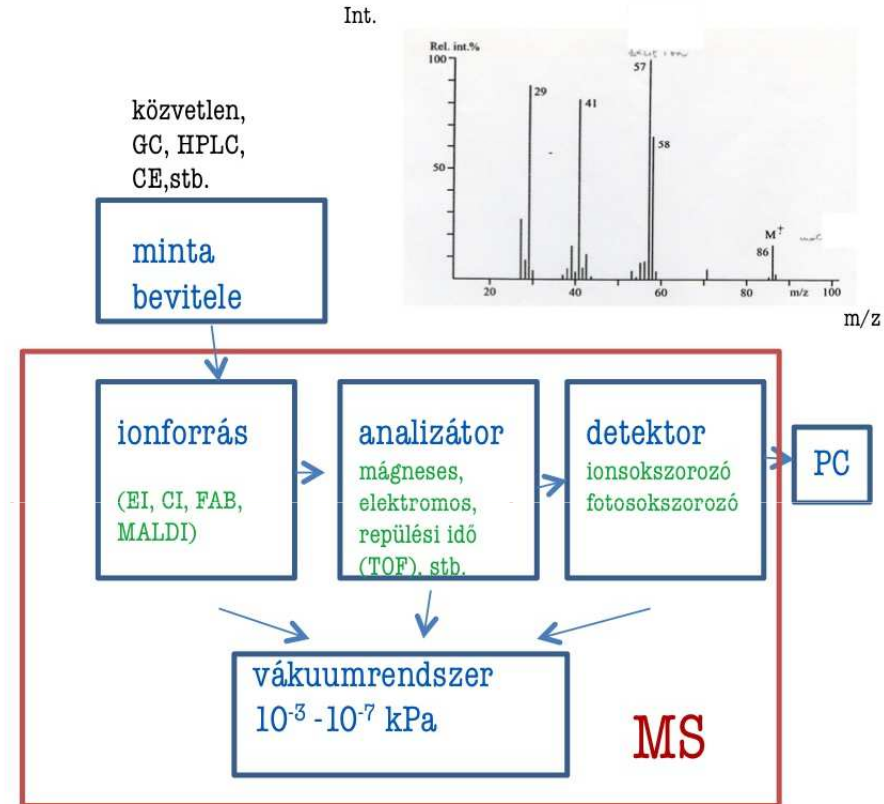
Oh yes !
Nobel prize in Chemistry
(2002)



John B. Fenn

Mi a tömegspektrométer?

- Olyan vizsgálati eszköz, amellyel **ionos részecskéket választunk el fajlagos tömegük /töltésegységre eső tömegük (m/z) szerint** csökkentett nyomáson.
- Az elválasztott **ionok intenzitását folyamatosan mérjük**, és egy ionáram intenzitás – fajlagos tömeg függvénykapcsolathoz, az ún. **tömegspektrumhoz** jutunk (fingerprint)
- Ionforrás: a vizsgálandó molekulából valamilyen gerjesztő energia (fény, kinetikus, elektromos, kémiai, stb.) segítségével ionokat hoz létre, melyeket azonos kinetikus energiával, egy nyalábban juttatja az analizátorba



Analizátor: elválasztja az ionforrásból nagy sebességgel érkező ionokat fajlagos töltésük szerint

Detektor: az egyes ionok számával arányos intenzitású jelet szolgáltat

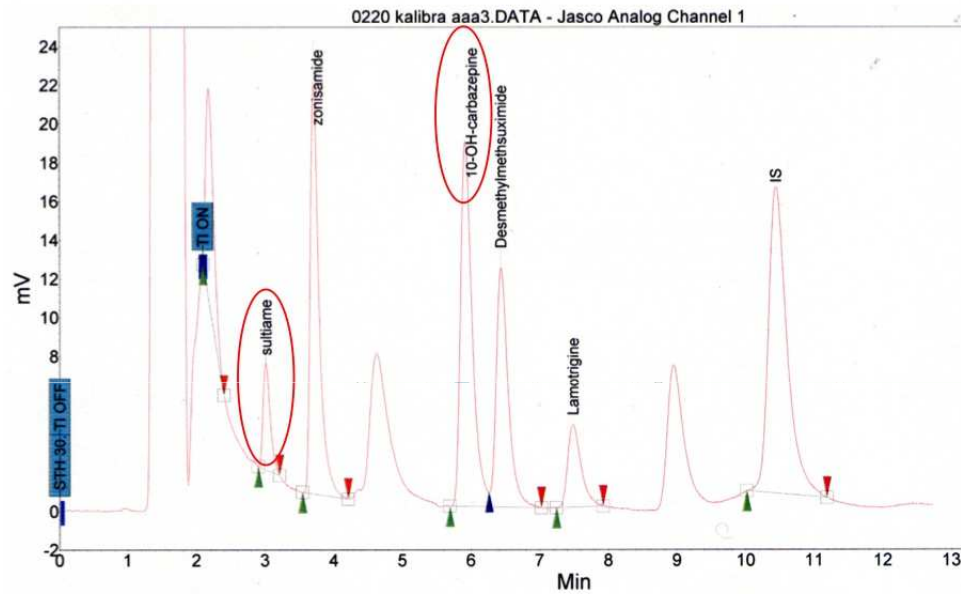
A HPLC metodika “korlátja” egy extrém gyógyszerkoncentráció esetén

S.D. (2006), 2 éve kezelés alatt álló epilepsziás kislány. Az elmúlt napokban terápia-rezisztenssé vált, miután görcsei nem oldódtak az eddig alkalmazott kombinált antiepileptikum terápia (Keppra, Depakine, Ospolot) hatására sem. A DEOEC Gyermekklinika Intenzív Osztályára került, és status epilepticus miatt egy 3 napos barbiturat komát indukáltak a kisbetegnek. Ennek felfüggesztése után a phenobarbital dózisát fokozatosan csökkentették, és ennek során a laborunk naponta mért phenobarbital szintet HPLC készüléken. A csúcskoncentráció értéke a 3. nap végére elérte a 434,2 mg/L-t (ter. tart.: 15-30 mg/L). Emellett továbbra is kapott Sultiam-ot (18,5 mg/L) (ter. tart.: 0,5-12,5 mg/L).

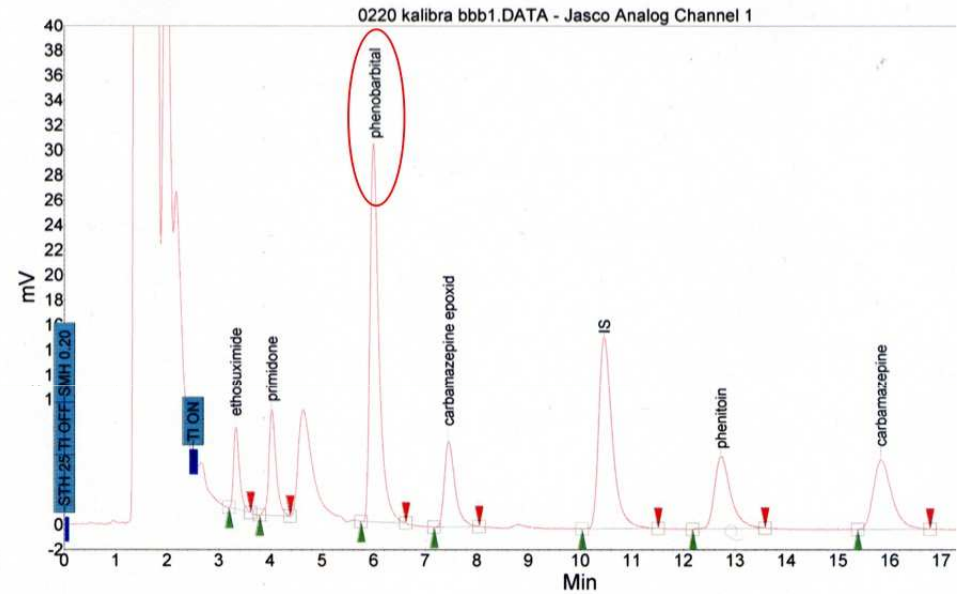
Abl&Jasco HPLC készüléken, Bio-Rad antiepileptikum kittel mértünk. A phenobarbital koncentrációt a B-kalibrátor-soron, míg a Sultiam koncentrációt az A-kalibrátor-soron analizáltuk.

A beteg mintájának HPLC-s vizsgálata előtt mindkét kalibrátor-sor lemérésre került

A-kalibrátor-sor



B-kalibrátor-sor



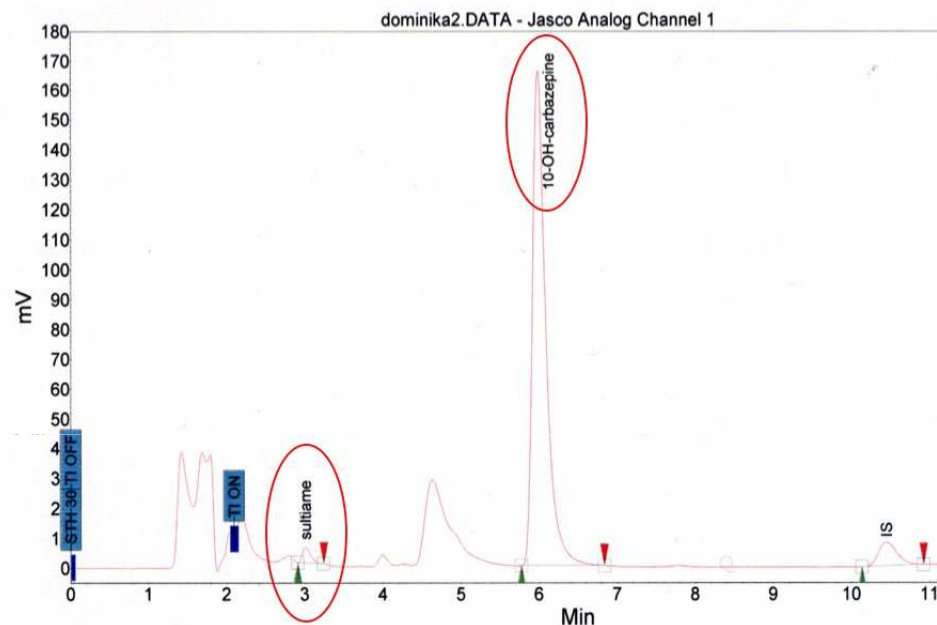
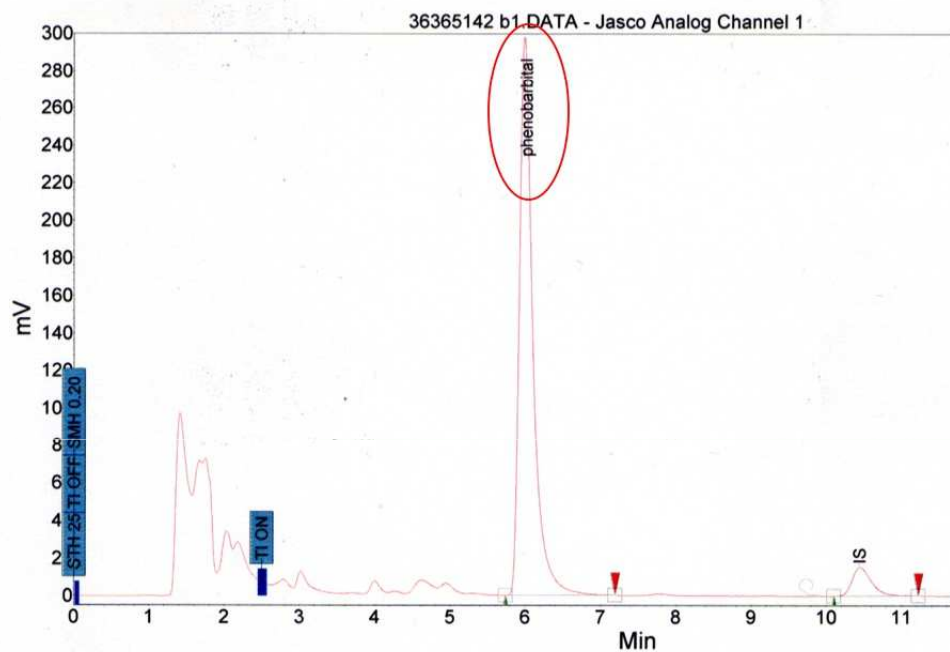
Peak results :

| Index | Name | Start [Min] | Time [Min] | End [Min] | Ret. time Offset [Min] | Quantity [ug/ml] | Height [mV] | Area [mV.Min] | Area % [%] |
|-------|-----------------------|-------------|------------|-----------|------------------------|------------------|-------------|---------------|------------|
| 1 | UNKNOWN | 2.093 | 2.177 | 2.400 | 0.000 | 0.00 | 10.9 | 1.4 | 8.212 |
| 2 | sultiame | 2.897 | 3.005 | 3.207 | 0.005 | 6.75 | 5.6 | 0.7 | 3.767 |
| 3 | zonisamide | 3.541 | 3.702 | 4.204 | -0.098 | 23.09 | 21.2 | 3.2 | 18.211 |
| 4 | 10-OH-carbazepine | 5.691 | 5.913 | 6.260 | -0.087 | 12.01 | 18.8 | 3.7 | 21.256 |
| 5 | DesmethyImethsuximide | 6.260 | 6.433 | 7.021 | -0.067 | 19.49 | 12.4 | 2.5 | 14.349 |
| 6 | Lamotrigine | 7.241 | 7.482 | 7.920 | -0.018 | 4.35 | 4.3 | 1.0 | 5.514 |
| 7 | IS | 10.018 | 10.443 | 11.186 | -0.357 | 0.00 | 15.8 | 5.0 | 28.691 |
| Total | | | | | | 65.68 | 88.9 | 17.5 | 100.000 |

Peak results :

| Index | Name | Start [Min] | Time [Min] | End [Min] | Ret. time Offset [Min] | Quantity [ug/ml] | Height [mV] | Area [mV.Min] | Area % [%] |
|-------|----------------------|-------------|------------|-----------|------------------------|------------------|-------------|---------------|------------|
| 1 | ethosuximide | 3.195 | 3.320 | 3.613 | -0.180 | 103.00 | 6.6 | 0.9 | 4.454 |
| 2 | primidone | 3.787 | 4.017 | 4.377 | -0.183 | 9.70 | 8.5 | 1.4 | 7.088 |
| 3 | phenobarbital | 5.748 | 5.987 | 6.618 | -0.013 | 42.00 | 30.4 | 6.1 | 31.953 |
| 4 | carbamazepine epoxid | 7.163 | 7.442 | 8.043 | -0.158 | 5.00 | 6.9 | 1.7 | 8.616 |
| 5 | IS | 10.036 | 10.458 | 11.506 | -0.142 | 0.00 | 15.4 | 4.7 | 24.572 |
| 6 | phenitoin | 12.174 | 12.723 | 13.581 | -0.077 | 19.40 | 5.8 | 2.1 | 11.185 |
| 7 | carbamazepine | 15.378 | 15.823 | 16.783 | 0.023 | 10.00 | 5.5 | 2.3 | 12.131 |
| Total | | | | | | 189.10 | 79.1 | 19.2 | 100.000 |

A HPLC a beteg mintában az A-soron a Sultiam mellett 10-OH-carbazepint is kimutatott



Peak results :

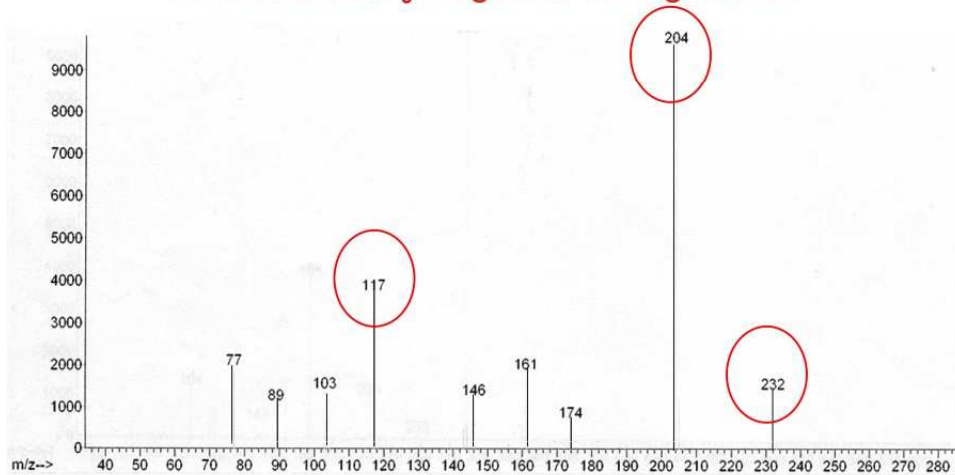
| Index | Name | Start [Min] | Time [Min] | End [Min] | Ret. time Offset [Min] | Quantity [ug/ml] | Height [mV] | Area [mV.Min] | Area % [%] |
|-------|---------------|-------------|------------|-----------|------------------------|------------------|-------------|---------------|------------|
| 1 | phenobarbital | 5.737 | 5.980 | 7.193 | -0.020 | 434.17 | 297.8 | 62.1 | 93.076 |
| 2 | IS | 10.099 | 10.440 | 11.221 | -0.160 | 0.00 | 15.4 | 4.6 | 6.924 |
| Total | | | | | | 434.17 | 313.2 | 66.7 | 100.000 |

Peak results :

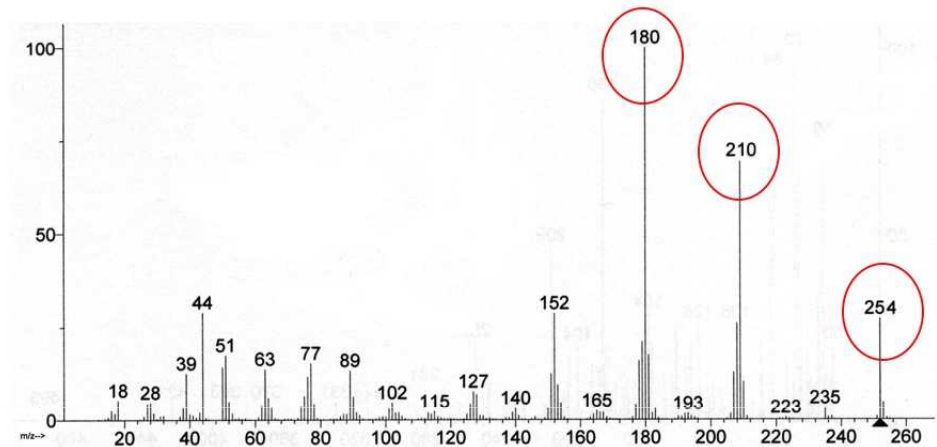
| Index | Name | Start [Min] | Time [Min] | End [Min] | Ret. time Offset [Min] | Quantity [ug/ml] | Height [mV] | Area [mV.Min] | Area % [%] |
|-------|-------------------|-------------|------------|-----------|------------------------|------------------|-------------|---------------|------------|
| 1 | sultiame | 2.907 | 3.003 | 3.237 | 0.003 | 15.19 | 5.3 | 0.7 | 1.832 |
| 2 | 10-OH-carbazepine | 5.770 | 5.980 | 6.834 | -0.320 | 240.65 | 166.1 | 32.9 | 91.972 |
| 3 | IS | 10.134 | 10.445 | 10.924 | -0.355 | 0.00 | 8.1 | 2.2 | 6.196 |
| Total | | | | | | 255.84 | 179.5 | 35.7 | 100.000 |

A GC-MS (Agilent Technologies) tisztázta, hogy a minta 10-OH-carbazepin nem tartalmazott

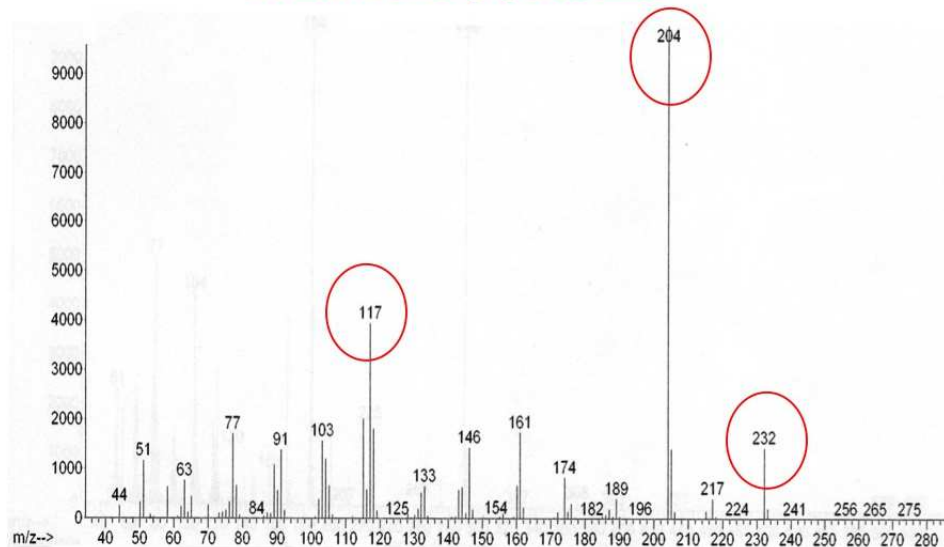
Phenobarbital jellegzetes tömegszámai



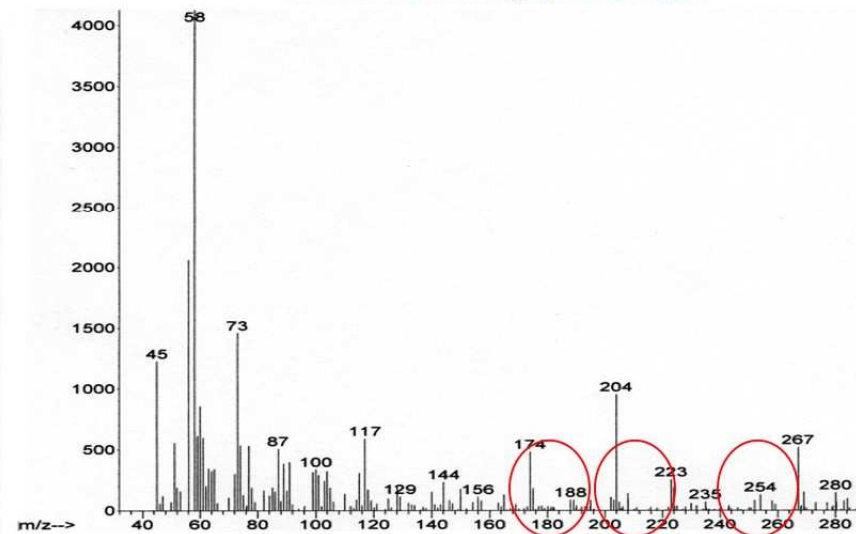
10-OH-carbazepin jellegzetes tömegszámai



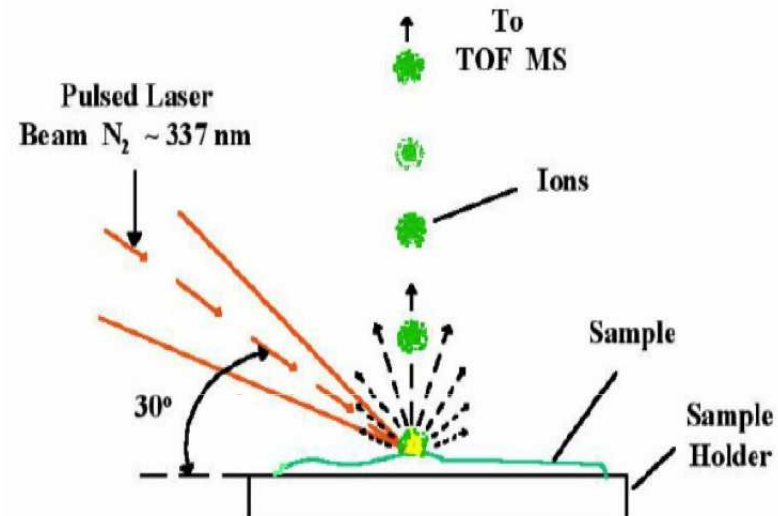
A minta tömegspektruma



A minta tömegspektruma



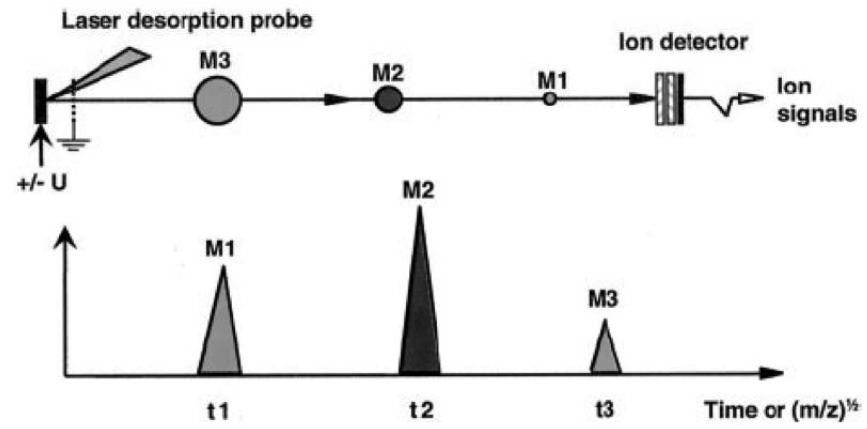
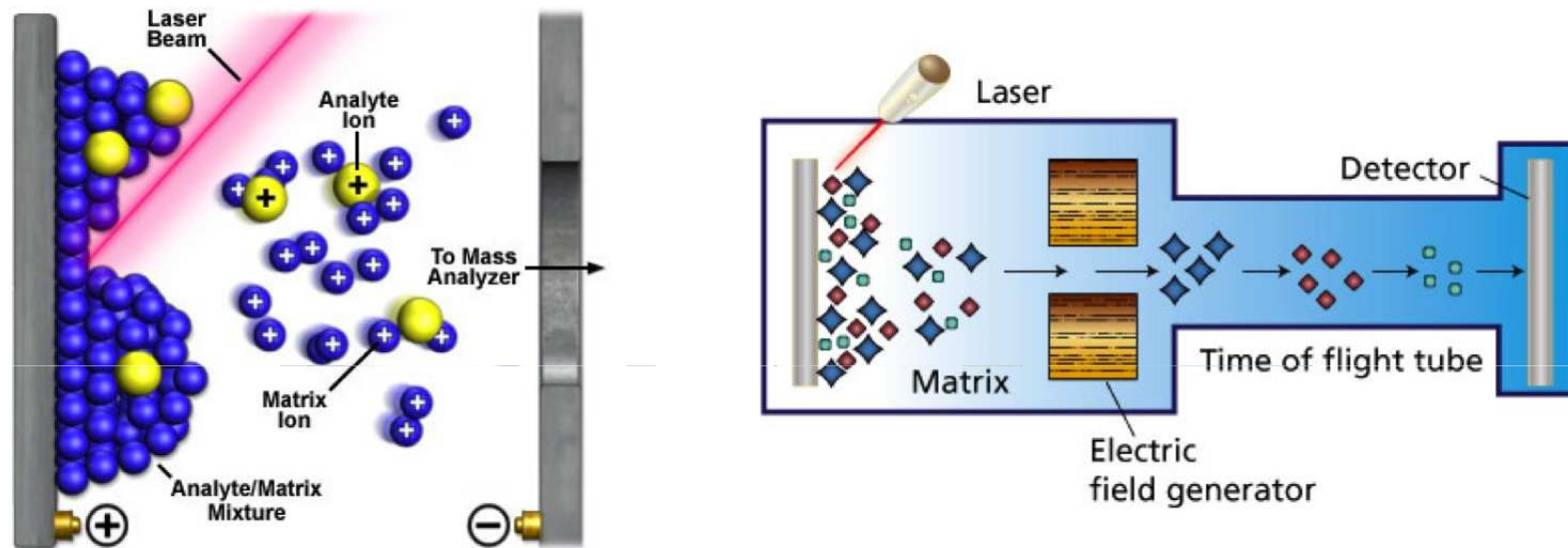
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) lágy ionizálás



- a molekula ionizálása jól szabályozható lézer fénnel történik, szilárd fázisú matrixban
- az energiaátadás közvetett, így kíméletes a molekulához, alig van fragmentáció, a tömegspektrum egyszerű
- a szilárd mátrix és a pulzáló lézer fény lehetőséget biztosít a termikusan érzékeny anyagok mérésére
- TOF analizátorral kombinálva igen jó felbontóképességű, gyors, és széles tömegtartományban használható (> 300 kDa)

MALDI-TOF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

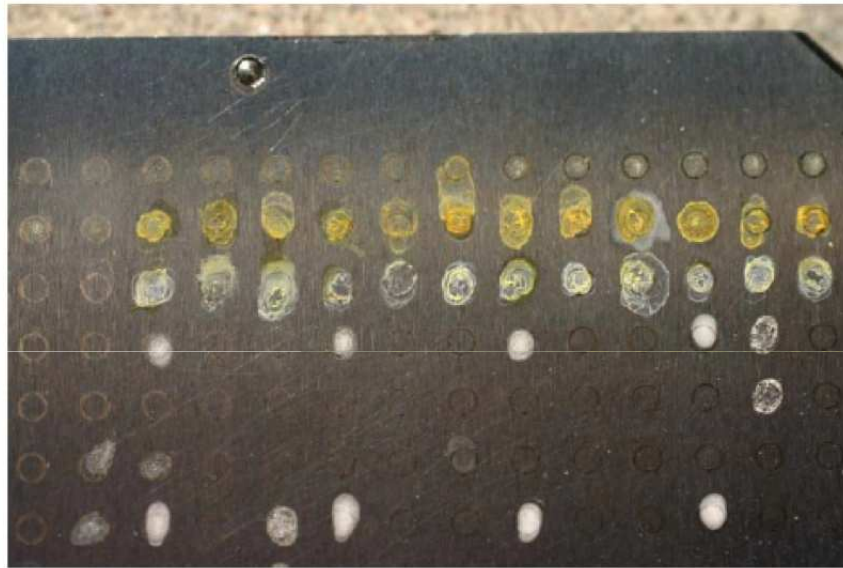


Bruker Microflex LT

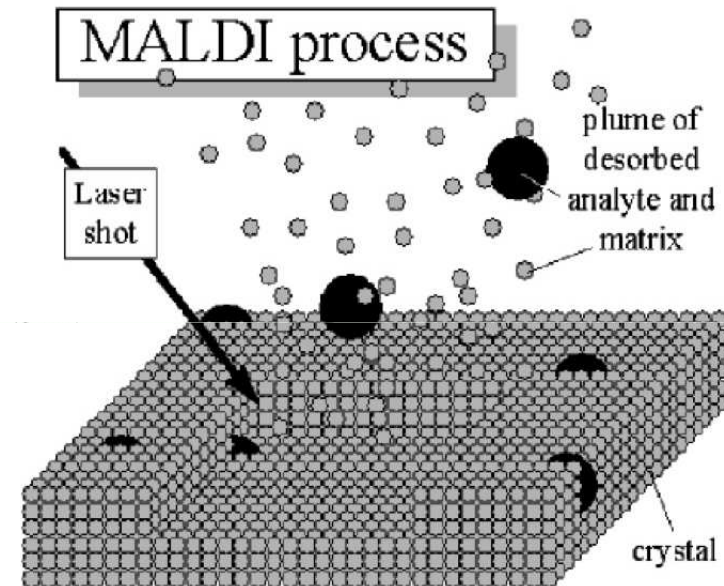


MALDI plate

- különböző minták különböző mátrixokkal



- a mátrixot meghatározza a mérendő anyag típusa, tömege, polaritása (általában benzooesav és fahéjsav származékok)
- a mátrix 100x feleslegben kerül alkalmazásra
- a mátrix abszorbeálja a lézer fényt, majd elpárologtatja és ionizálja a molekulát



Leggyakrabban alkalmazott mátrixok:

- α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav - CHCA
- 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav
- 2,6-dihidroxi-benzooesav -DHB
- 3-hidroxi-picolinsav - 3-HPC

MALDI mérésnél szempont

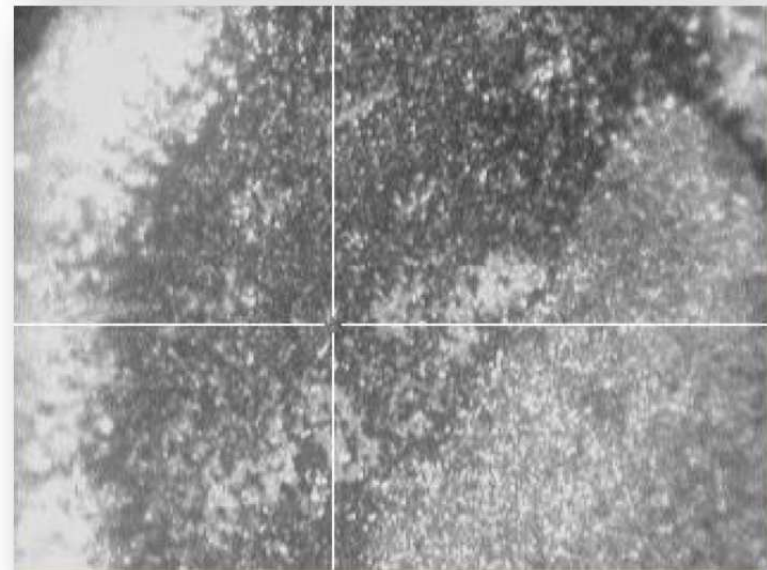
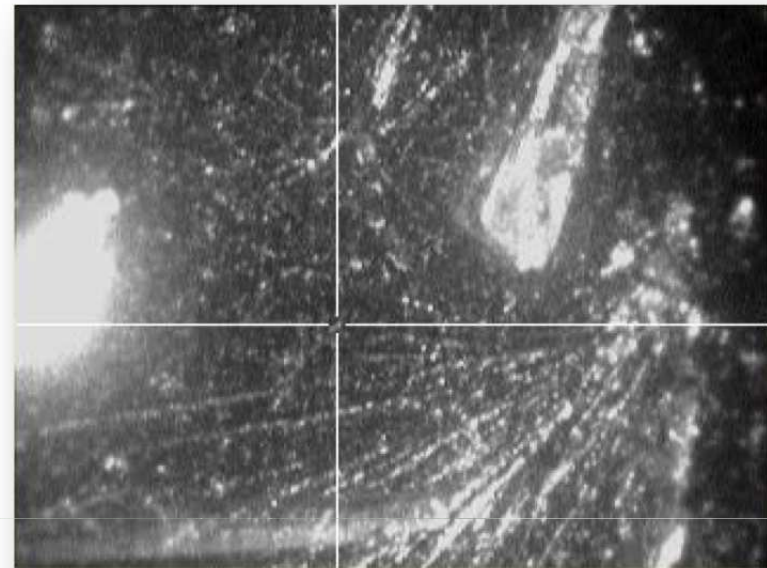
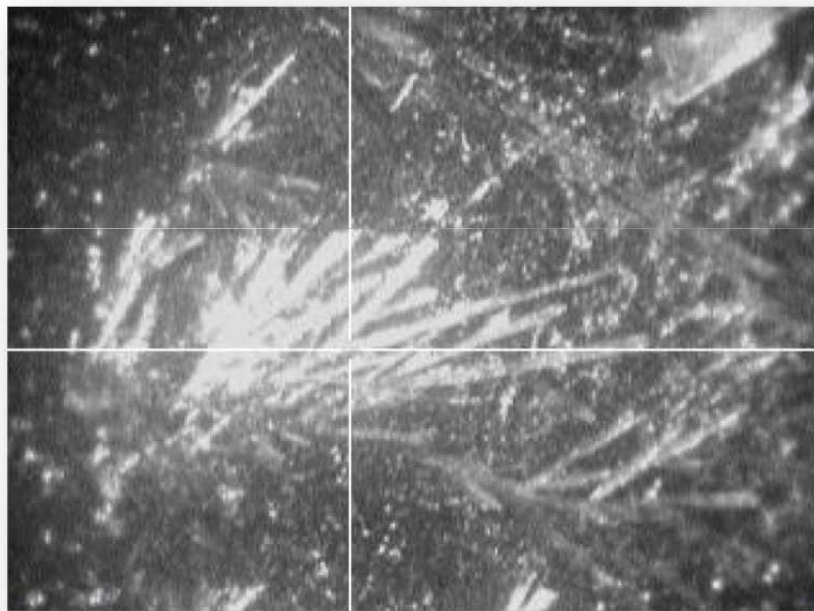
A minta nyomokban se tartalmazzon (rontja az érzékenységet)

- **Azide, SDS**
- Brij Tris base
- CHPS Triton X-100, Treated Triton X-100
- DMSO Twen
- DMF Zwittergent
- Glicerín vagy egyéb detergens
- **Foszfát puffer**
- **Só és puffer tartalom >100 mM**

Javasolt használata (érzékenység növelők)

- Ecetsav, hangyasav
- 4 M Guanidin HCl
- Hexafluoroizopropanol 40%-ig
- 10 mM Nátriumklorid
- 1 M Karbamid

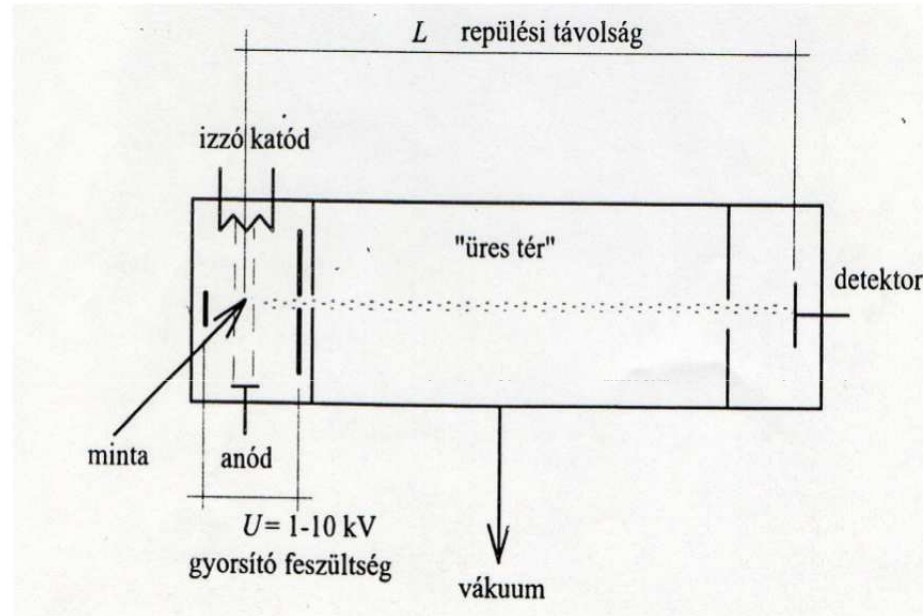
Ionok hatása a mátrix kristályosodására



TOF (Time Of Flight)

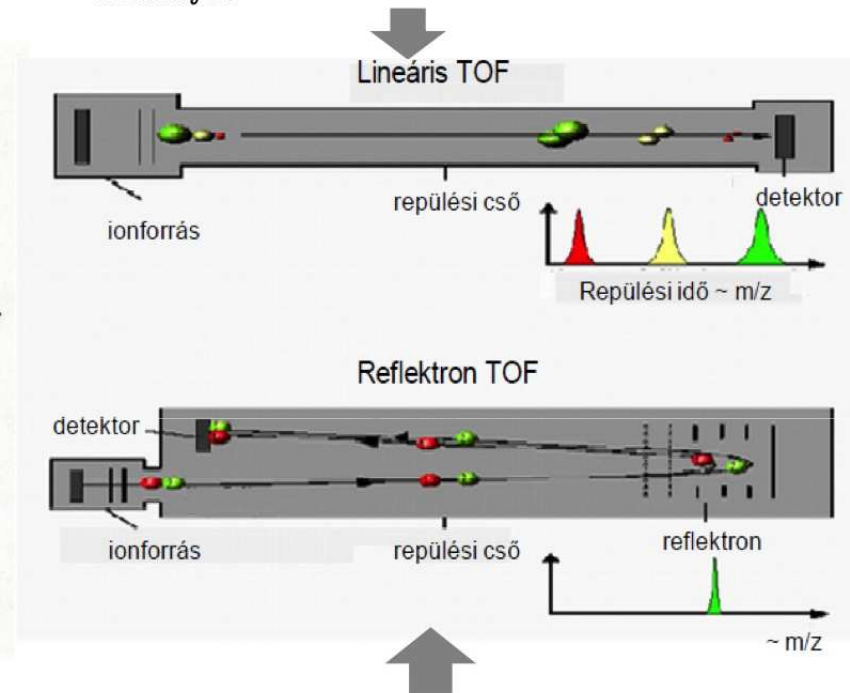
- repülési idő analitátor

- nagyon gyors, dinamikus
- az ionok repülési ideje $10^{-5} - 10^{-7}$ sec.



- a keletkezett, azonos tömegű ionok közel azonos kinetikus energiával lépnek az analizátorba
- a repülési idő adott repülési távolság és gyorsító feszültség mellett csak a tömegtől függ ($t = k \sqrt{m}$)
- A TOF kalibrálása pontosan ismert m/z értékű ionokra történik

- az azonos tömegű, de különböző kinetikus energiájú molekulák kis késéssel jutnak a detektorba, ami a csúcsok kiszélesedését eredményezi



- a nagyobb energiával rendelkező azonos tömegű molekulák jobban behatolnak a tükörbe, mint a kisebb energiával rendelkezők és így közel azonos időben kerülnek a detektorba – a csúcs keskenyebbé válik

Ha van újabb akkor tudni kell, hogy mi volt a régebbi:



- [Quantitative determination of carbamazepine in plasma by mass fragmentography.](#)
[Palmér L, Bertilsson L, Collste P, Rawlins M.](#)
[Clin Pharmacol Ther. 1973 Sep-Oct;14\(5\):827-32.](#)
- [Isotope dilution--mass spectrometry of thyroxin proposed as a reference method.](#)
[Möller B, Falk O, Björkhem I.](#)
[Clin Chem. 1983 Dec;29\(12\):2106-10](#)

- Determination of plasma propofol levels using gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring.
Stetson PL, Domino EF, Sneyd JR.
J Chromatogr. 1993 Oct 29;620(2):260-7.

Methylmalonic Acidemia.

Manoli I, Venditti CP.

In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors.

GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.

- Information overload--new technologies, can we store the data?
Wiley V, Carpenter K, Bennetts B, Wilcken B. Southeast
Asian J Trop Med Public Health. 2003;34 Suppl 3:59-62

The application of clinical proteomics to cancer and other diseases.

Clarke W, Zhang Z, Chan DW.

Clin Chem Lab Med. 2003 Dec;41(12):1562-70

- Metabolic Profiling for Detection of Staphylococcus aureus Infection and Antibiotic Resistance.
Antti H, Fahlgren A, Näsström E, Kouremenos K, Sundén-Cullberg J, Guo Y,
Moritz T, Wolf-Watz H, Johansson A, Fallman M.
PLoS One. 2013;8(2):e56971. doi: 10.1371/journal.pone.0056971. Epub 2013 Feb 25

MALDI-TOF MS felhasználási területei

Proteomika:

- Egyéb technikákkal (SDS PAGE, affinitás- vagy méretkizárásos kromatográfia, 2D gélelektroforézis) elválasztott fehérjék azonosítása
- Aminosav szekvenciák meghatározása

Szerves kémia:

- Molekula szintézis QC
- Polimerek tömegeloszlásának vizsgálata

Mikrobiológia:

- Pathogének azonosítása

Molekuláris genetika

- Oligo QC
- SNP genotyping és mutáció detektálás

In Vitro
Diagnosztikai
Tömb
DE OEC

Review Article

Clinical Microbiology

Ann Lab Med 2013;33:14-27

<http://dx.doi.org/10.3343/alm.2013.33.1.14>

ISSN 2234-3806 · eISSN 2234-3814

ANNALS OF LABORATORY MEDICINE

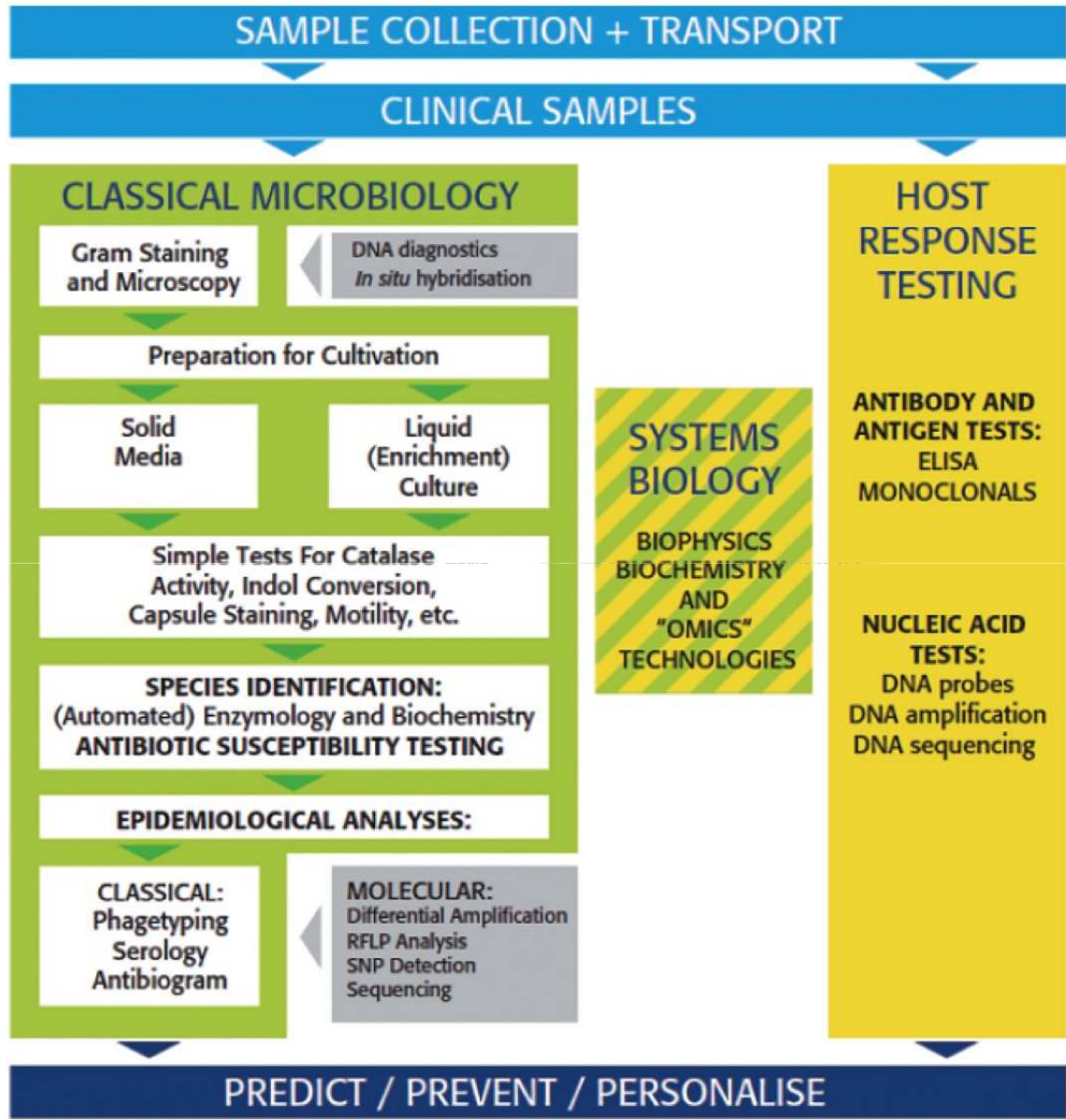
Rapid Clinical Bacteriology and Its Future Impact

Alex van Belkum, Ph.D.¹, Géraldine Durand, M.D.¹, Michel Peyret, Ph.D.¹, Sonia Chatellier, Ph.D.¹, Gilles Zambardi, Ph.D.¹, Jacques Schrenzel, M.D.², Dee Shortridge, Ph.D.³, Anette Engelhardt, Ph.D.³, and William Michael Dunne Jr, Ph.D.³

BioMérieux SA¹, Unit Microbiology, R&D Microbiology, La Balme Les Grottes, France; Geneva University Hospitals², Laboratory of Bacteriology and Genomic Research Laboratory, Geneva, Switzerland; BioMérieux Inc.³, Unit Microbiology, Franchise ID/AST, St. Louis, MO, USA

Clinical microbiology has always been a slowly evolving and conservative science. The sub-field of bacteriology has been and still is dominated for over a century by culture-based technologies. The integration of serological and molecular methodologies during the seventies and eighties of the previous century took place relatively slowly and in a cumbersome fashion. When nucleic acid amplification technologies became available in the early nineties, the predicted “revolution” was again slow but in the end a real paradigm shift did take place. Several of the culture-based technologies were successfully replaced by tests aimed at nucleic acid detection. More recently a second revolution occurred. Mass spectrometry was introduced and broadly accepted as a new diagnostic gold standard for microbial species identification. Apparently, the diagnostic landscape is changing, albeit slowly, and the combination of newly identified infectious etiologies and the availability of innovative technologies has now opened new avenues for modernizing clinical microbiology. However, the improvement of microbial antibiotic susceptibility testing is still lagging behind. In this review we aim to sketch the most recent developments in laboratory-based clinical bacteriology and to provide an overview of emerging novel diagnostic approaches.





Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry.

Holland RD, Wilkes JG, Raffi F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO Jr.

Food and Drugs Administration, National Center for Toxicological Research, Jefferson, AR 72079, USA.

The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.

Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB.

Department of Biological Sciences, Manchester Metropolitan University, UK.



DE OEC, OMI
napi rutindiagnosztika: 2012

?

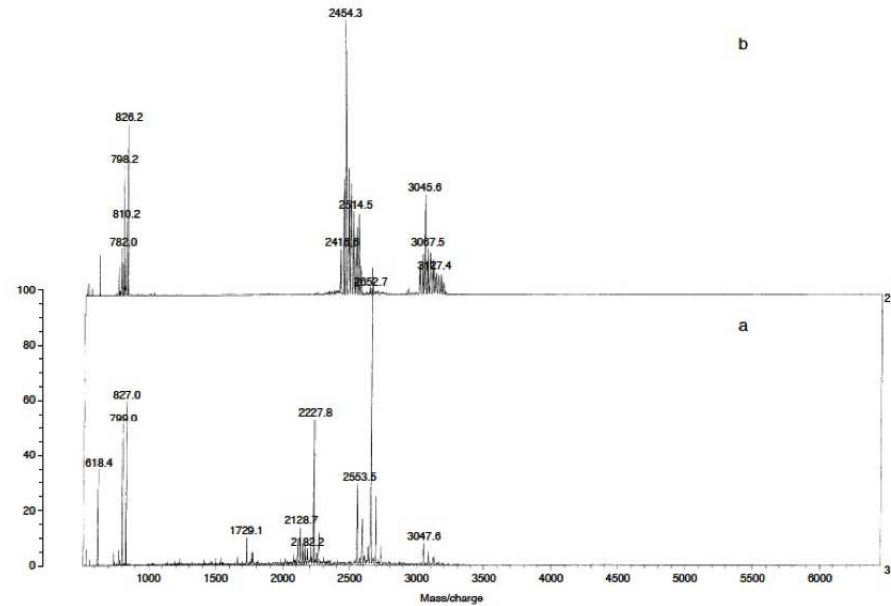


TECHNICAL NOTE

Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry

VALERIE EDWARDS-JONES*, M. A. CLAYDON*, D. J. EVASON*, J. WALKER†, A. J. FOX*† and D. B. GORDON*

*Department of Biological Sciences, Manchester Metropolitan University, Chester Street, Manchester M1 5GD and †Manchester Public Health Laboratory, Withington Hospital, Nell Lane, West Didsbury, Manchester M20 8LR

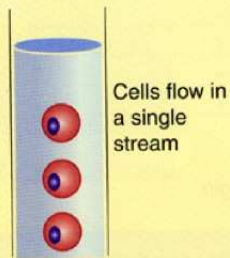


Flow cytometry for identification of cell type and assessment for cell surface markers

Expense: High

Much manual processing with moderately complex instrumentation

For identification of cell type

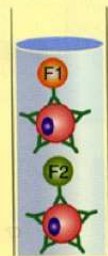


Laser beam of light onto cell

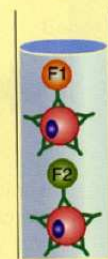


From amount of light scattered forward and to the side, cell size, shape, and granularity determined—leading to identification of cell type

For assessment of cell surface markers



Cell suspension mixed with antibodies to different cell surface markers—each of which has a unique fluorescent label (F1 is different from F2)



As cells flow in a stream within the instrument and are exposed to laser light, each fluorescent compound can be identified—fluorescent cells are positive for the cell surface marker with the specific fluorescent antibody to that surface marker

Mass spectrometry for molecular identification

Expense: High

Semi-automated with high complexity of laboratory instrumentation

A patient sample is processed to render it suitable for analysis



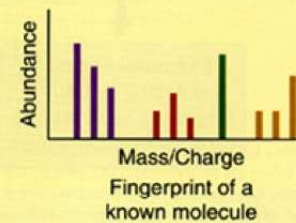
Molecular compounds of interest are isolated from other molecules in sample by liquid chromatography or gas chromatography



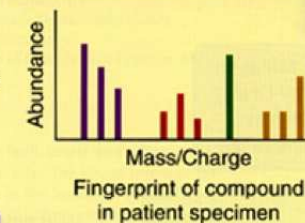
In mass spectrometer, molecule is broken into different size mass fragments creating a "fingerprint" for the molecule



The fingerprint of the molecule in the patient specimen is compared to a large library of molecular fingerprints



=



Molecule is identified because fingerprints match with very high percentage of agreement

Párhuzamosságok az áramlási citometriában és a tömegspektrometriában

Vér/csontvelő kenet



Citokémiai reakciók



Áramlási Citometria

Kenet/telepmorfológia



Biokémiai reakciók



MALDI-TOF

Helye a mikrobiológiai diagnosztikában

- Baktériumok direkt kimutatása vizsgálati anyagból, vagy előtenyésztést követően
- Species szintű meghatározás (riboszómális proteinek alapján)
- Rezisztencia meghatározás
- Filogenetikai rokonság megállapítása

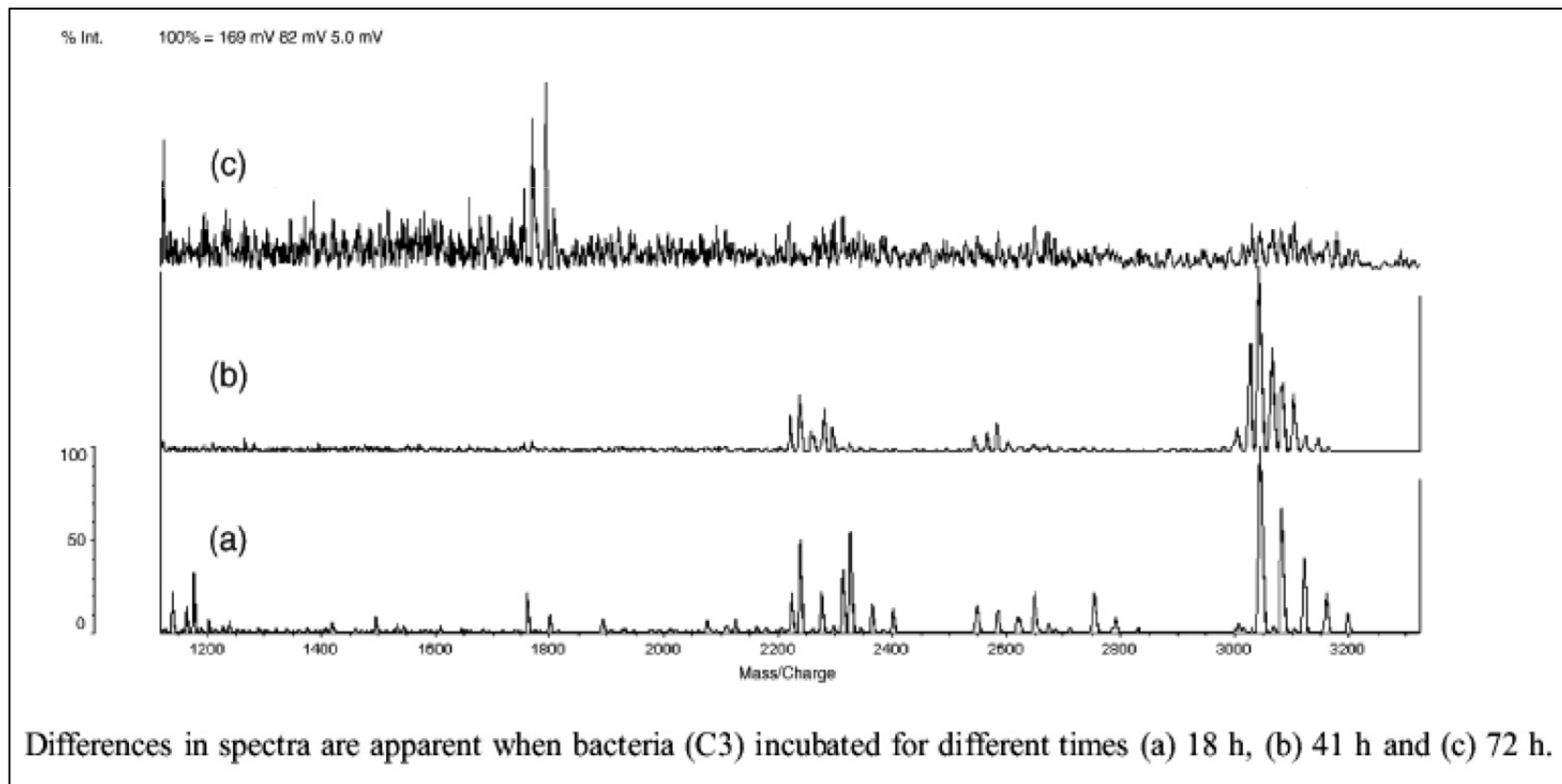
Az értékelés alapelve

- A program a mérés során kapott tömeg spektrogrammot hasonlítja az adatbázisban található (jelenleg 3260) referencia spektrumhoz (a referencia spektrumot sok százezer mérés alapján határozták meg)
- log (score) értéket számít 0-3 között
 - <1,7 nem elfogadható meghatározás
 - $\geq 1,7$ genus szintű meghatározás
 - >2,0 jó species meghatározáshoz.
- Minél magasabb az érték (minél jobban közelít a 3-hoz) annál biztosabb a meghatározás
- Standardizálás fontos

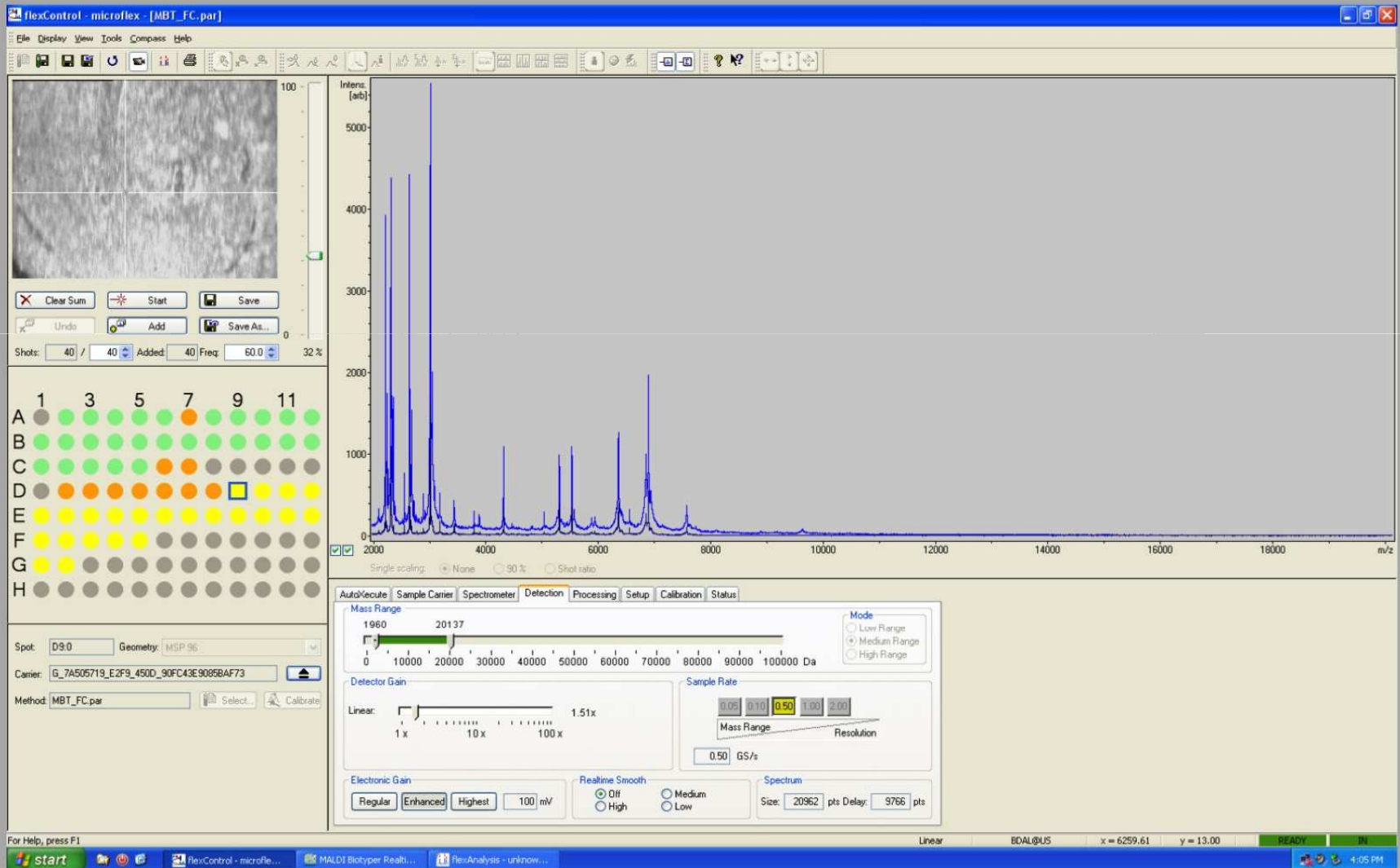
| Range | Description | Symbols | Color |
|-----------------|--|---------|--------|
| 2.300 ... 3.000 | highly probable species identification | (+++) | green |
| 2.000 ... 2.299 | secure genus identification, probable species identification | (++) | green |
| 1.700 ... 1.999 | probable genus identification | (+) | yellow |
| 0.000 ... 1.699 | no reliable identification | (-) | red |

Fontos paraméterek:

táptalaj, inkubációs idő, az átoltások száma, a mátrix oldat koncentrációja
a baktérium sejtek száradása a mátrix használata előtt, száradási idő az analízis előtt
az eredmény akkor reprodukálható, ha az inkubációs idő 18 és 24 óra közé esik



DE OEC OMI



DE OEC OMI

MALDI Biotyper Realtime Classification Project: MB20130505 B

File View Tools Help

Legend:

- Not occupied
- Prepared
- Aborted
- ◐ Measured
- ◑ Zero-line spectrum
- Measured, classified green
- ◑ Measured, classified yellow
- ◑ Measured, classified red
- ◑ Zero-line spectrum, not classified

Hide Identified

| ID | Position | Detected Species | Score | Comment | Validation |
|--------|----------|------------------------------|-------|-------------------------|---|
| 6807 | A1 | Candida albicans | 1.966 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6807 | A2 | Candida albicans | 2.067 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6881 | A3 | Candida albicans | 1.965 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6881 | A4 | Candida albicans | 1.903 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6886 | A5 | Candida_lusitanae[ana] [CL.. | 2.013 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6886 | A6 | Candida_lusitanae[ana] [CL.. | 1.838 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6887 | A7 | Candida albicans | 2.049 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6887 | A8 | Candida albicans | 2.005 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6818 | A9 | no reliable identification | 1.491 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6818 | A10 | no reliable identification | 1.558 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6842 | A11 | Candida albicans | 1.885 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6842 | A12 | no reliable identification | 1.297 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6695 | B1 | Staphylococcus epidermidis | 2.168 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6695 | B2 | Staphylococcus epidermidis | 2.023 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6784 n | B3 | Staphylococcus epidermidis | 2.247 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6784 n | B4 | Staphylococcus epidermidis | 2.111 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6784 k | B5 | Staphylococcus epidermidis | 1.752 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6784 k | B6 | Staphylococcus epidermidis | 2.057 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6790 | B7 | Staphylococcus epidermidis | 1.777 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6790 | B8 | Staphylococcus epidermidis | 2.222 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6804 | B9 | Staphylococcus epidermidis | 2.188 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6804 | B10 | Staphylococcus epidermidis | 2.047 | | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6805-1 | B11 | Escheichia coli | 1.976 | closely related to Sh.. | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |
| 6805-1 | B12 | Escheichia coli | 1.907 | closely related to Sh.. | species <input checked="" type="radio"/> genus-only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/> |

Microflex LT - flexControl

flexControl - microflex - [Oligonucleotid 1 - Miki.par]

File Display View Tools Compass Help

The interface displays a 2D ion image on the left, a mass spectrum plot in the center, and control panels at the bottom. The mass spectrum shows intensity (arb) on the y-axis (0 to 3000) and m/z on the x-axis (2000 to 9000). Two prominent peaks are visible at approximately m/z 3600 and 7400. The control panels include a mass range slider (1980-10000 Da), detector gain (1x to 3.4x), sample rate (0.05 to 2.00 GS/s), and electronic gain (Regular, Enhanced, Highest).

Shots: 100 / 100 Added: 0 Freq: 60.0 100 %

Clear Sum Start Save
Undo Add Save As...

1 3 5 7 9 11
A
B
C
D
E
F
G
H

Spot: B6.0 Geometry: MSP 96
Carrier: G_939482F0_0892_465B_AE7735186E254293
Method: Oligonucleotid 1 - Miki.par

Mass Range: 1980 10000 Da
Mode: Low Range Medium Range High Range

Detector Gain: 1x 10x 100x 3.4x
Sample Rate: 0.05 0.10 0.50 1.00 2.00 GS/s
Mass Range Resolution

Electronic Gain: Regular Enhanced Highest 100 mV
Realtime Smooth: Off High Medium Low
Spectrum: Size: 47639 pts Delay: 39162 pts

For Help, press F1

Linear BDAL@US x = 16946.34 y = 15338.03 READY IN

start FlexControl - microfle... 2:38 PM

Tömegspektrometriával potenciálisan kiváltható genetikai vizsgálatok

- V-ös faktor Leiden (R506Q) mutációinak kimutatása
 - Prothrombin 20210A allél genotipizálása
 - XIII-as faktor Val34Leu polimorfizmusának vizsgálata
 - MTHFR genotipizálás (C667T polimorfizmus)
 - ApoE genotipizálás (E2,E3, E4 allél)
 - Öröklött haemochromatosis vizsgálata (C282Y mutáció)
 - NOD2 genotipizálása (C2104T, G2722C, 3020insC)
 - COL1A1 genotipizálás (G1245T)
 - ApoB 3500 genotipizálás (R3500W, R3500Q)
 - LRRK2 Gly2019Ser mutáció kimutatása (Parkinson-kór)
 - HNPCC (MLH1, MSH2, MSH6)
 - BRCA1 mutációk (185 delAG, T300G, 5382 insC)
 - BRCA2 mutációk (6174 delT)
 - RET gén mutációinak vizsgálata (Cys 609, 611, 618, 620)
 - Cisztikus fibrózis (29 leggyakoribb mutáció)
- PCR-hibridizációs próba
- PCR-RFLP
- DNS szekvenálás
- Allélspecifikus PCR

V. Faktor - Leiden mutáció

Leggyakoribb örökletes trombofilia

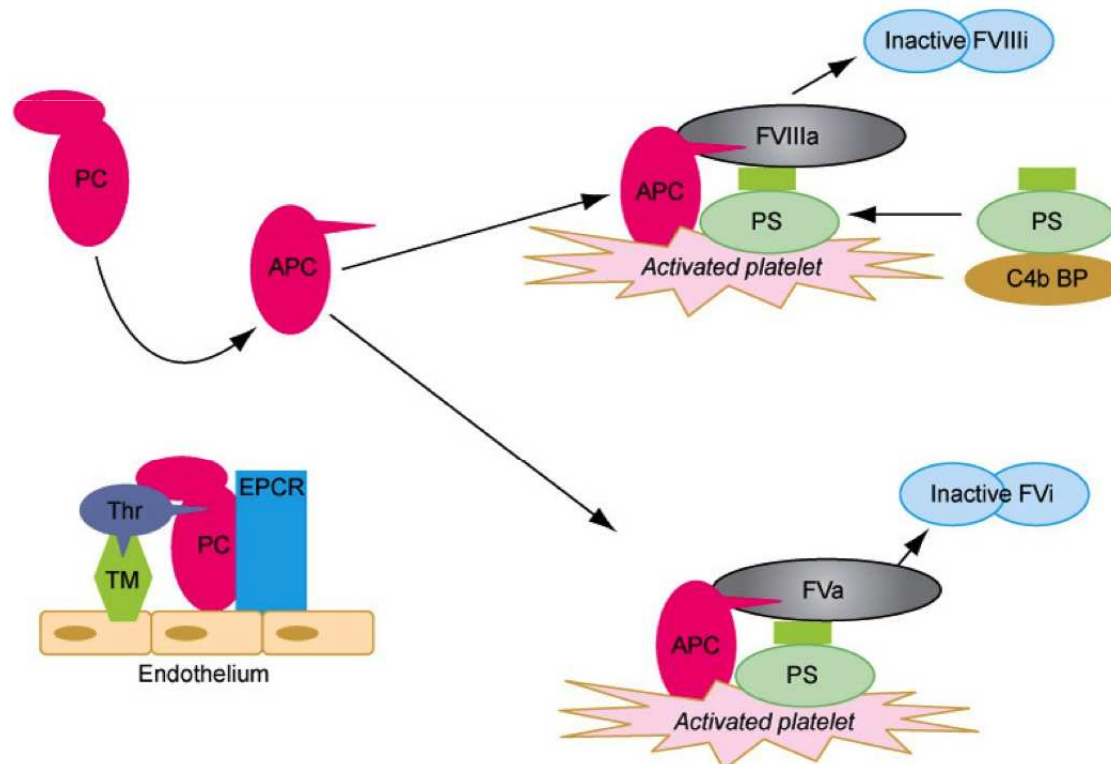
V faktor aPC rezisztencia (1994, Bertina, Leiden)

Pontmutáció: G1691A, Arg → Glu (R506Q)

Heterozigóta: 6-8-szoros

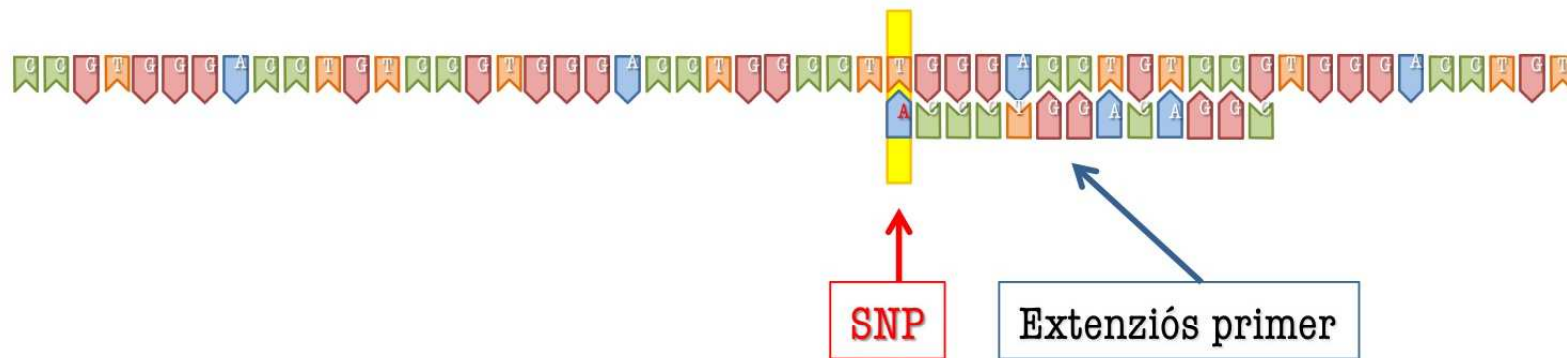
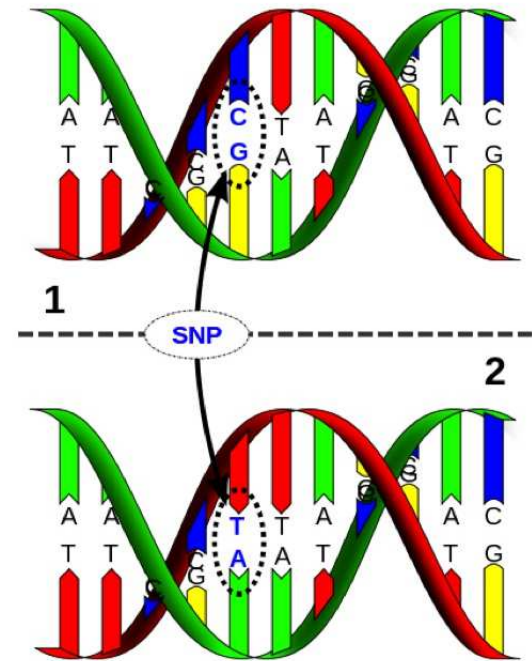
Homozigóta: kb. 80-szoros relatív rizikó a vénás trombózisok tekintetében

Gyakoriság: 8-10%



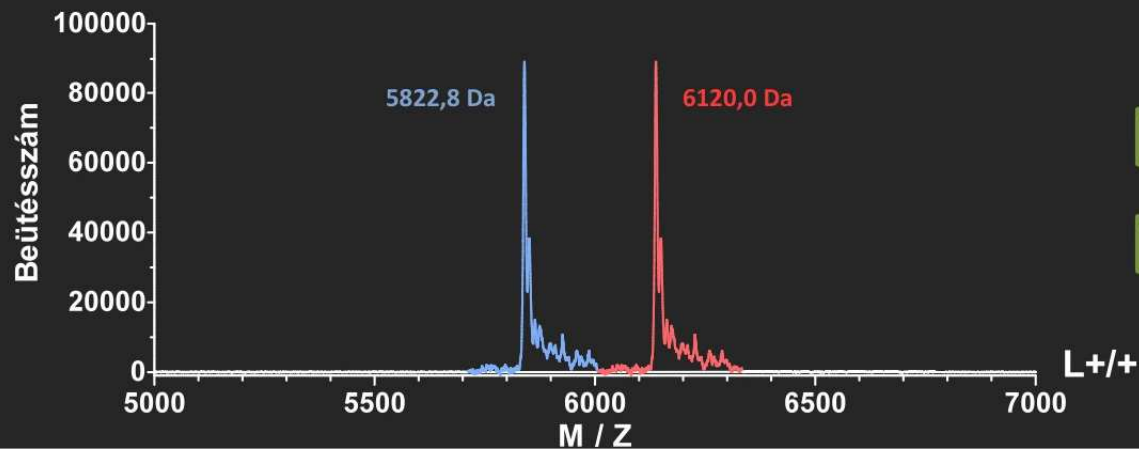
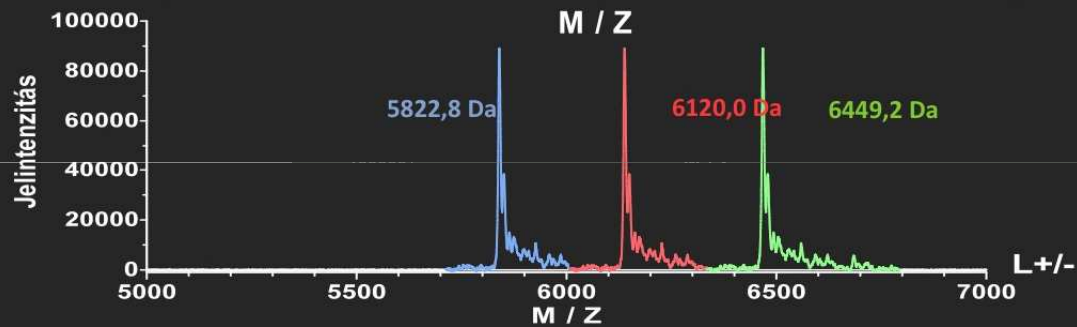
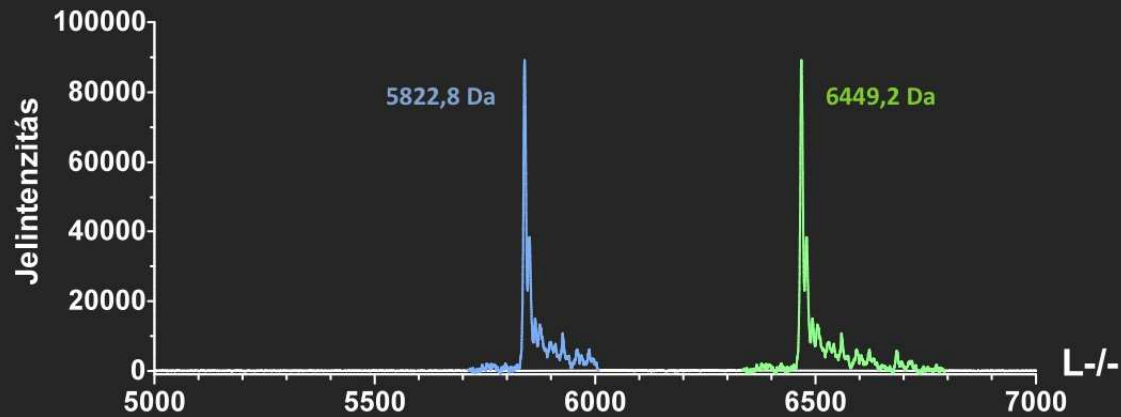
Egyedi nukleotid polimorfizmus (SNP) kimutatása

1. SNP-t tartalmazó DNS szakasz sokszorosítása
2. Termék tisztítása (dNTP eltávolítása)
3. Primer extenziós reakció (ddATP, dGTP)

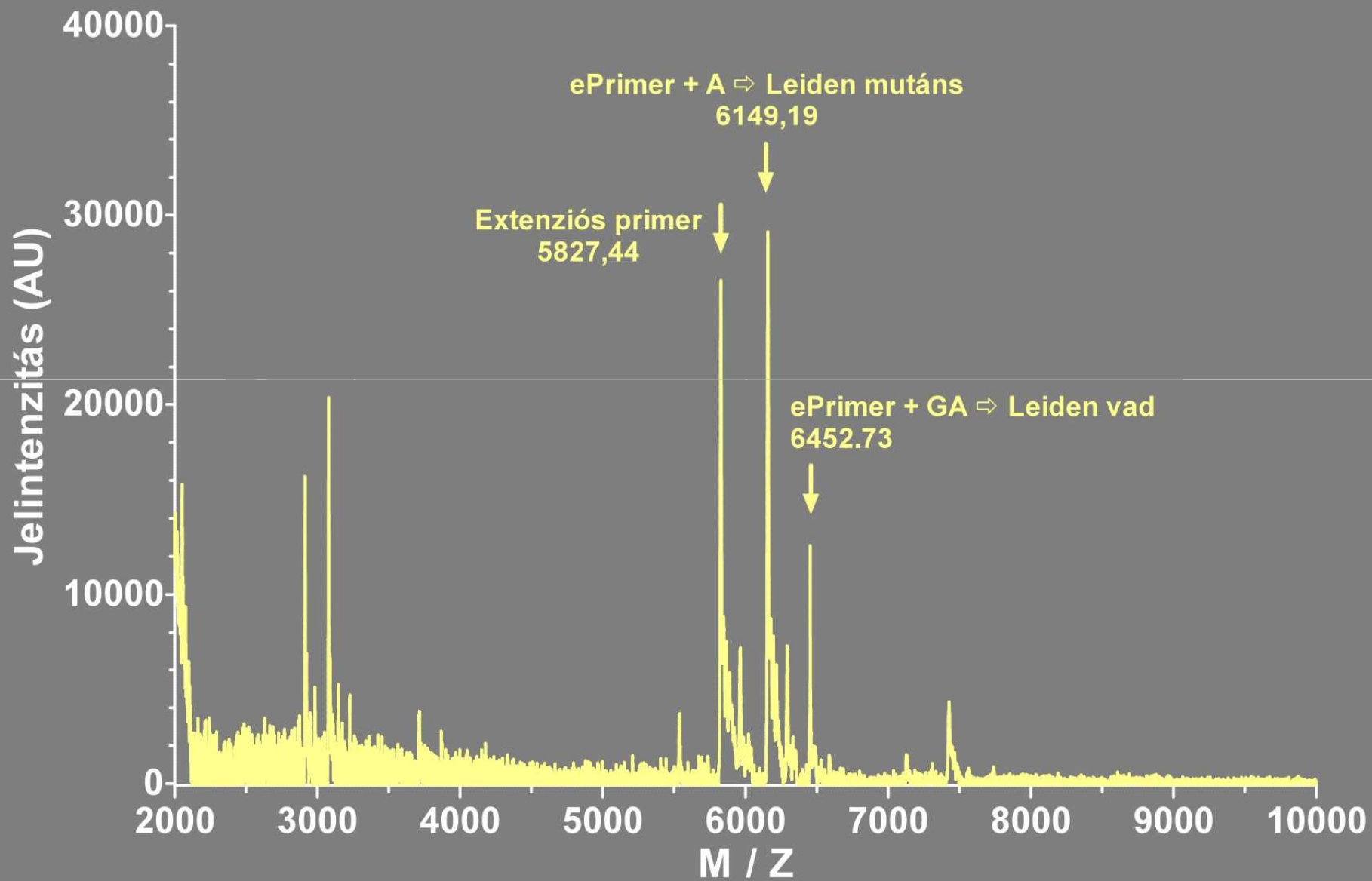


4. Extendált primerek tisztítása
5. MALDI-TOF analízis

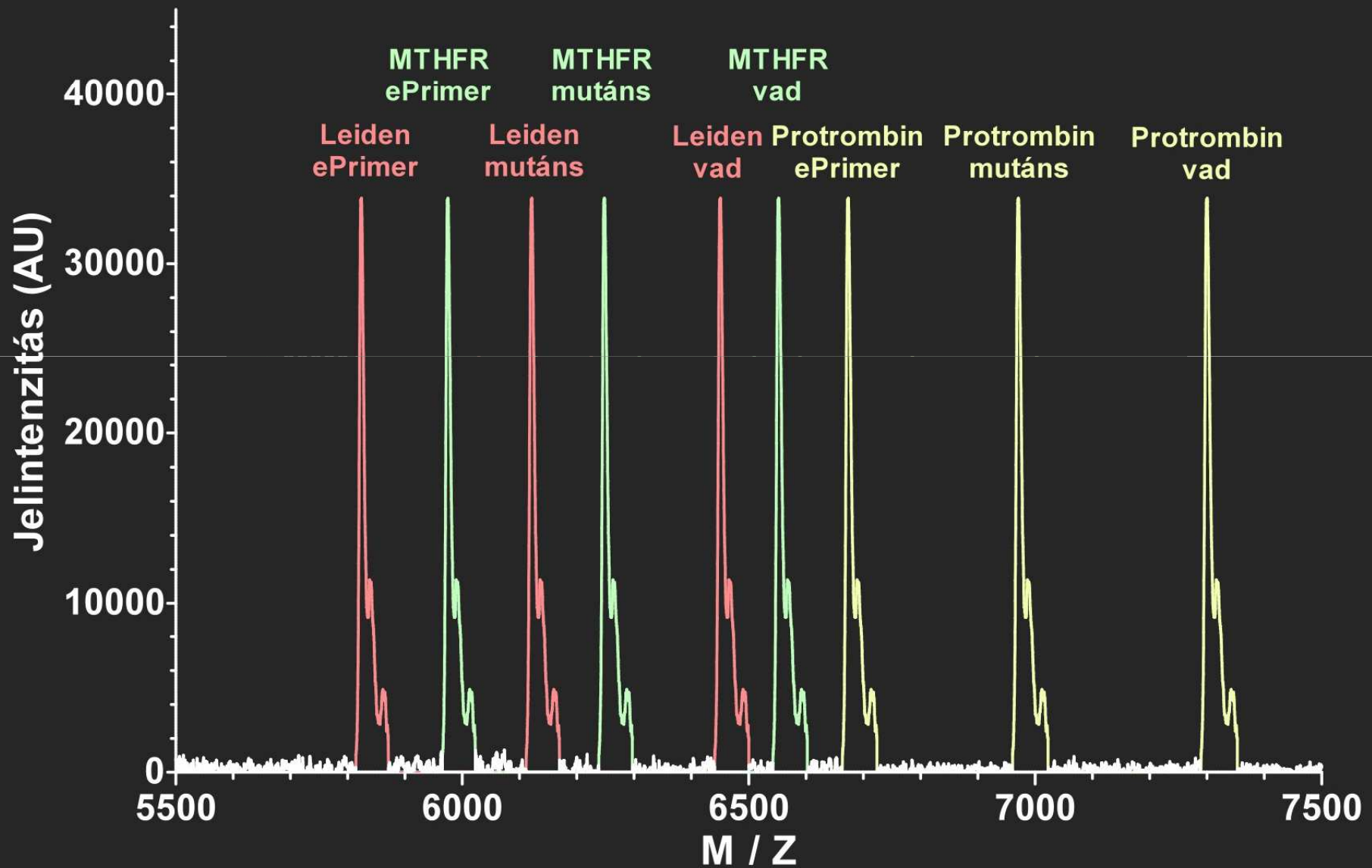
Leiden mutáció - várható termékek



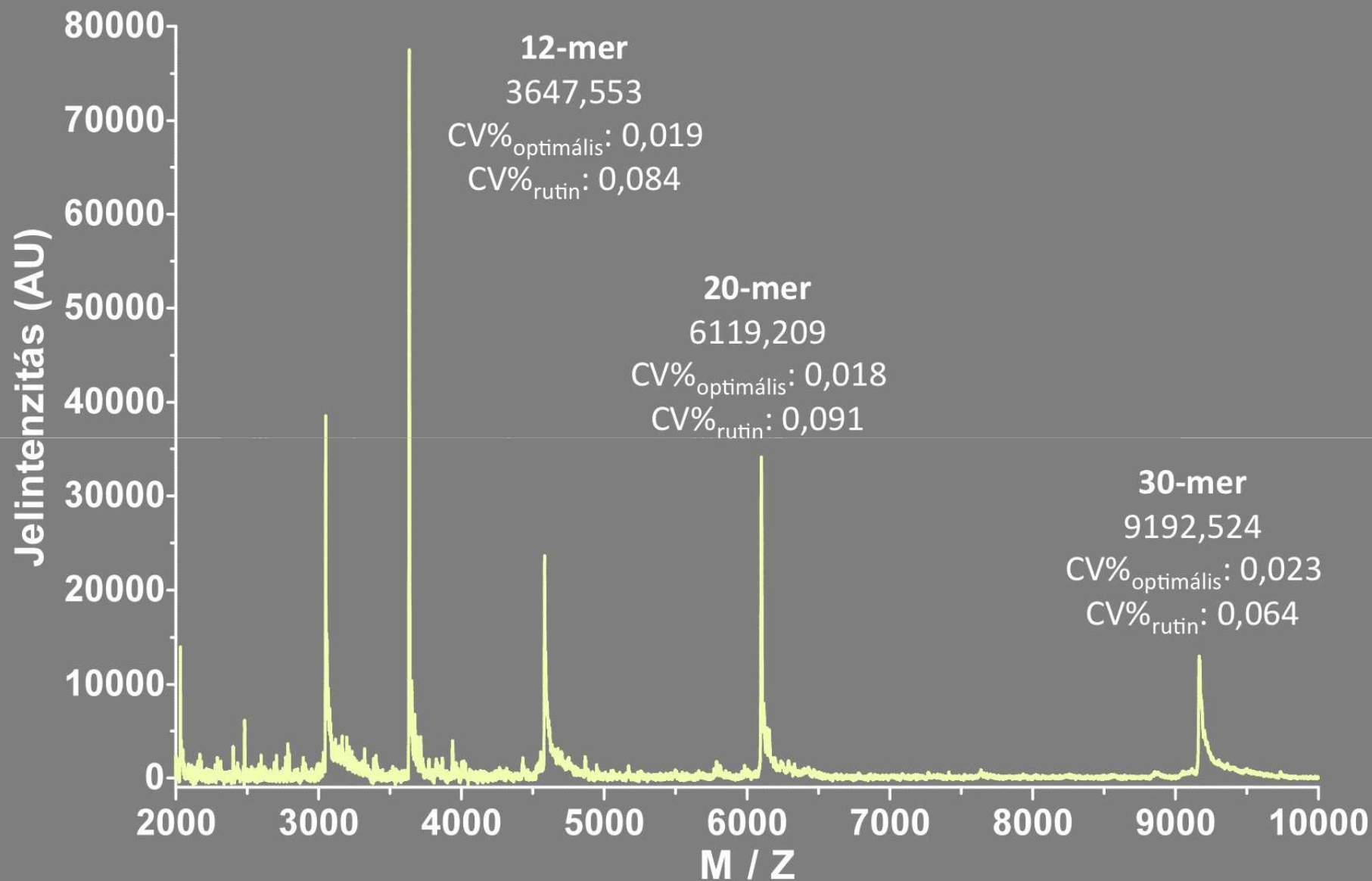
Példa - Leiden heterozigóta



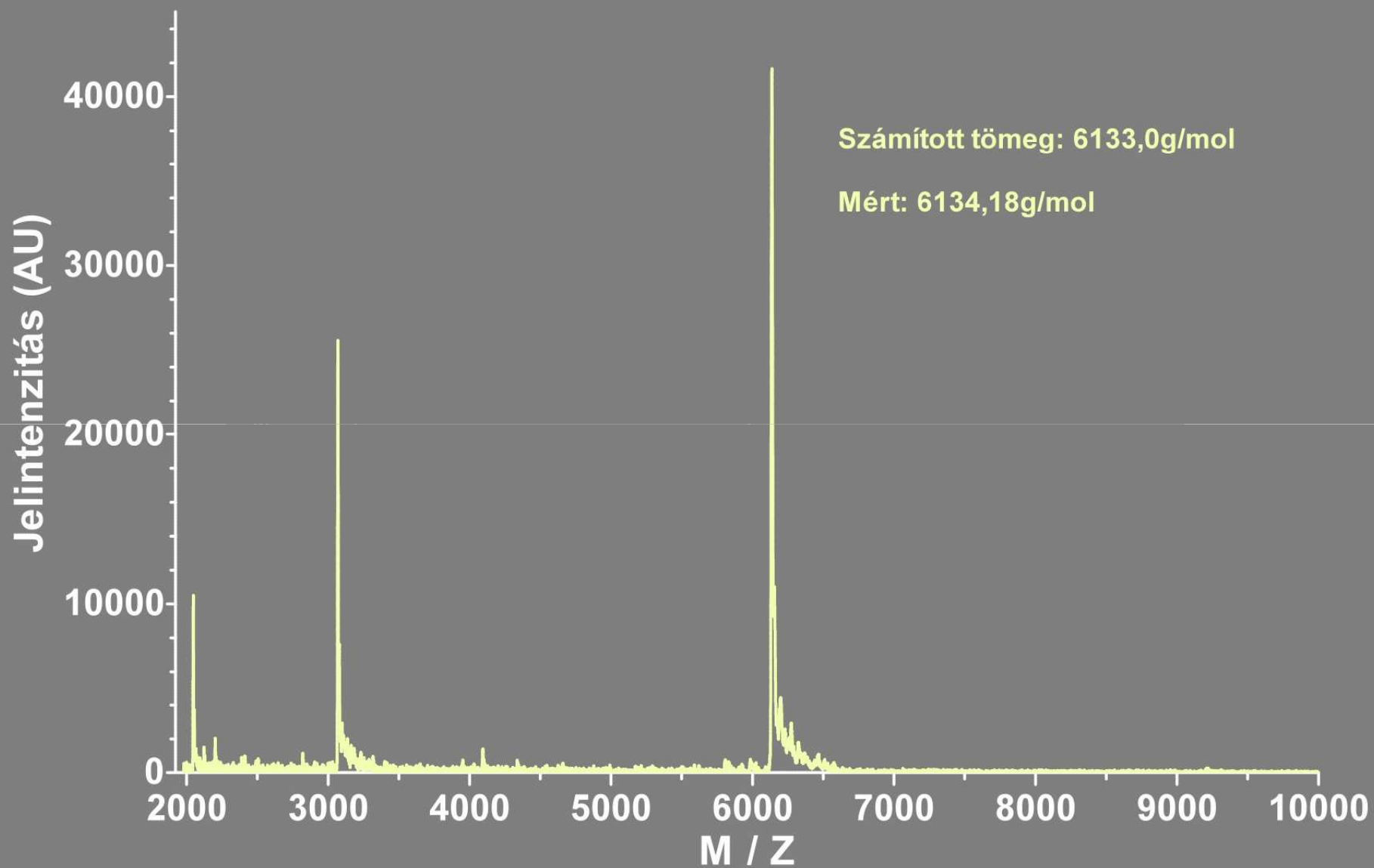
Cél: multiplex SNP kimutatás



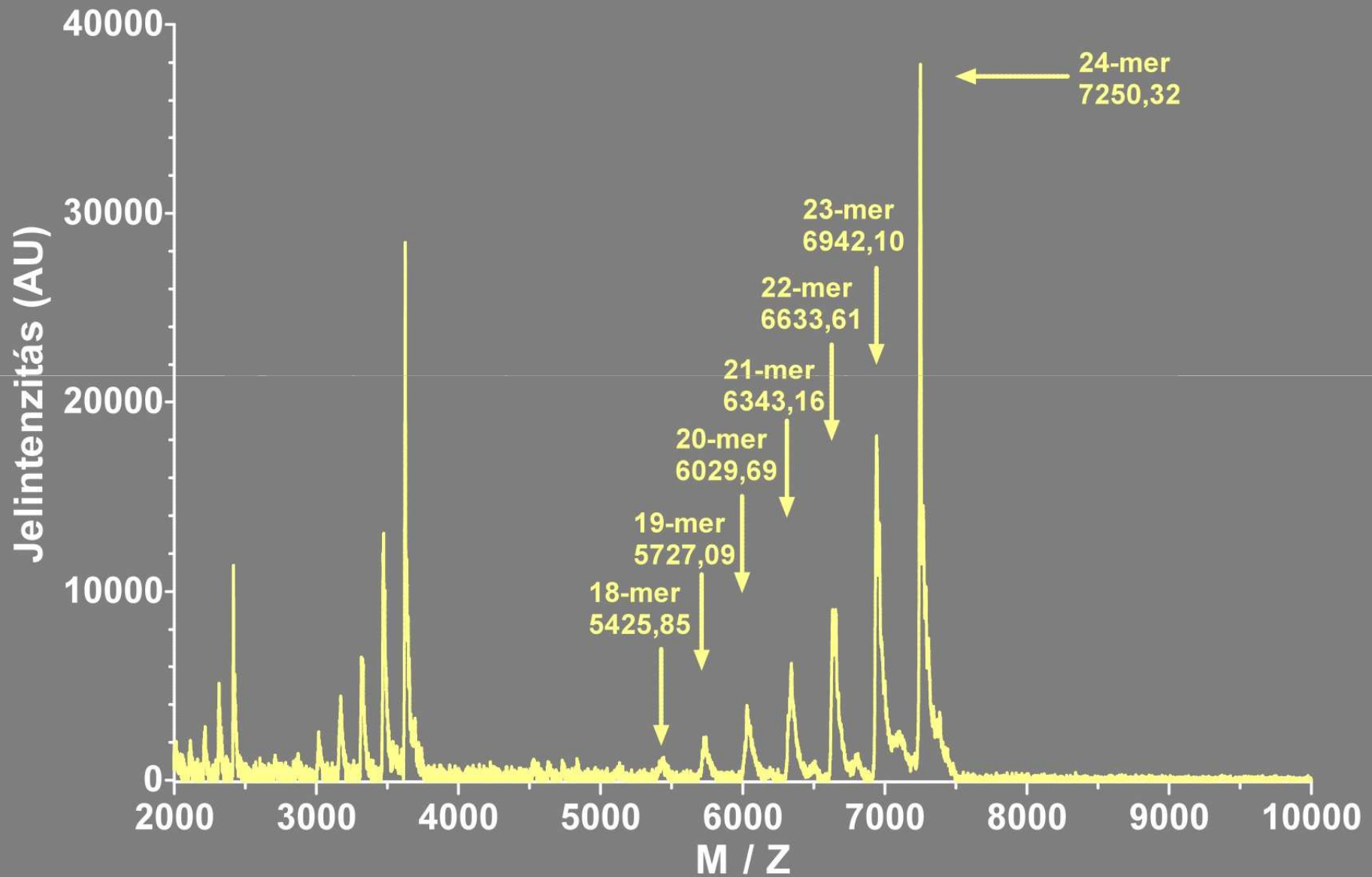
Oligonukleotid QC



Oligonukleotid QC



Rossz szintézis - Oligonukleotid QC



Rossz szintézis - Elektroferogram



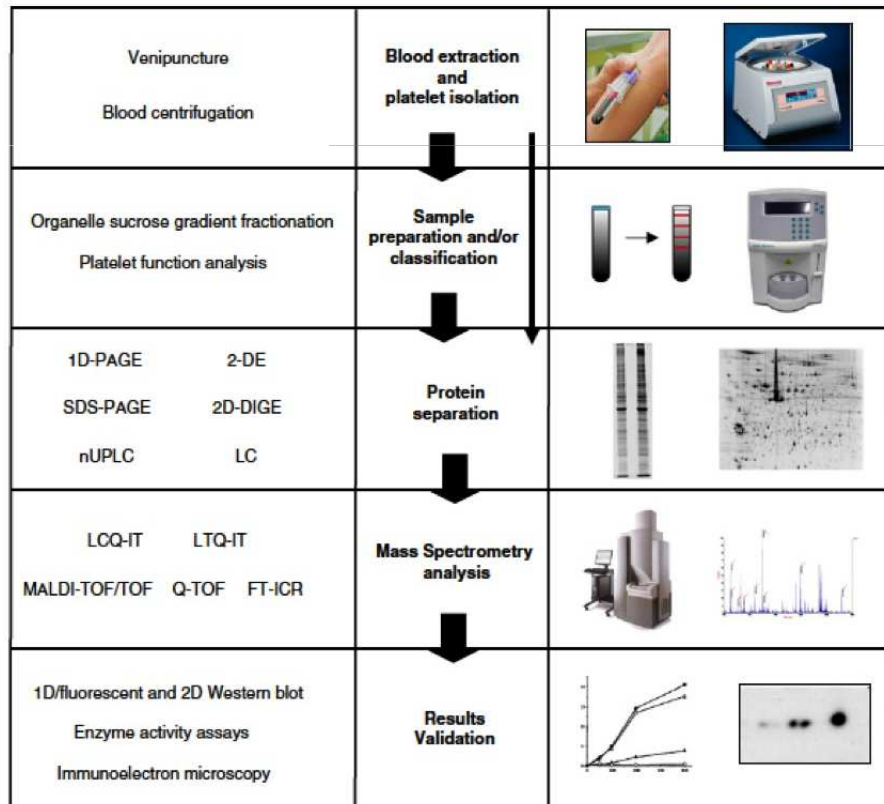
Egyéb applikációk

Review

**Proteomics applied to the study of platelet-related diseases:
Aiding the discovery of novel platelet biomarkers and
drug targets***

Andrés F. Parguñña, Isaac Rosa, Ángel García*

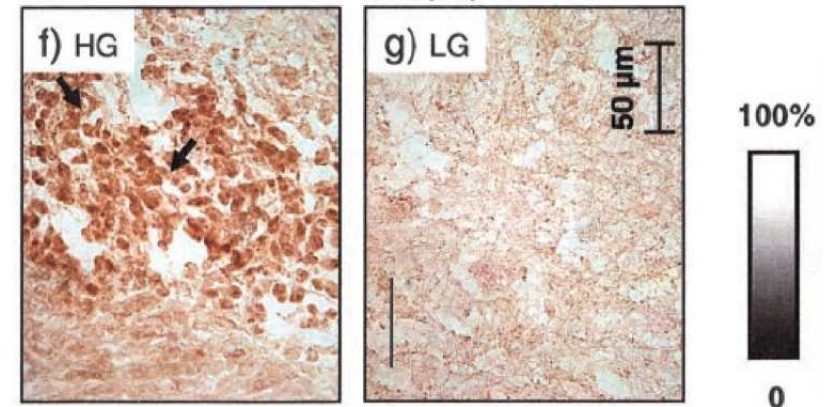
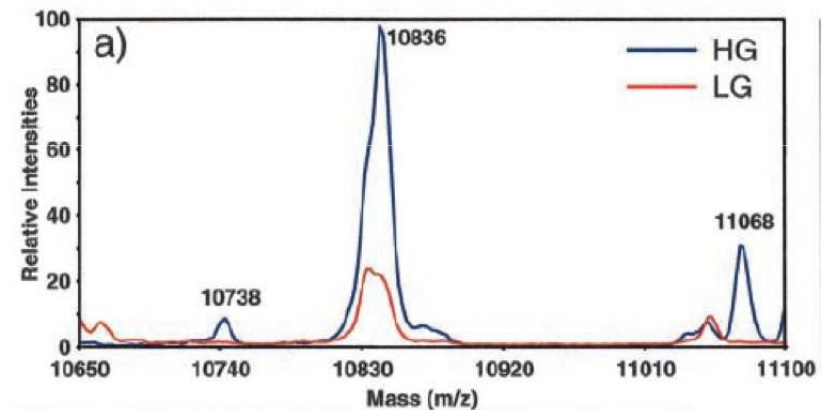
Department of Pharmacology, and Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS),
Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain



Review

Proteomics in Diagnostic Pathology

Profiling and Imaging Proteins Directly in Tissue Sections



Take-home message

- A tömegspektrometria egy költséges laboratóriumi eszköz, melynek használata jelentős előképzettséget igényel
- A mintaelőkészítés lehet bonyolultabb (HPLC, 2DEF) de egyszerű is (agaron való tenyésztés)
- Diagnosztikai alkalmazása a referencia metodikák és toxikológia módszerek mellett a MALDI-TOF készülékek mikrobiológiai applikációja
- Alkalmas molekuláris módszerek minőség ellenőrzésére és ígéretes lehet a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok multiplexálására

Köszönetnyilvánítás

Dr. Nagy Erzsébet

Dr. Szabó Judit

Dr. Fagyas Miklós

Dr. Balogh István

Ozsváth Andrea

Rácz Anita

