



LC/MS kvantitativní analýza s iontovou mobilitou

Jan Buček

High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry System



High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry System

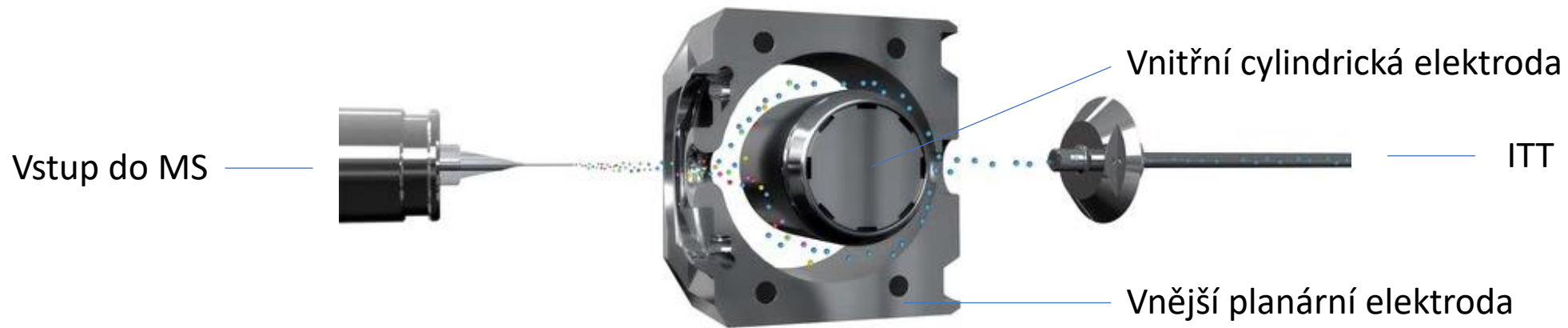
TSQ II Series

- TSQ Endura™
- TSQ Quantiva™
- TSQ Altis™
- TSQ Quantis™

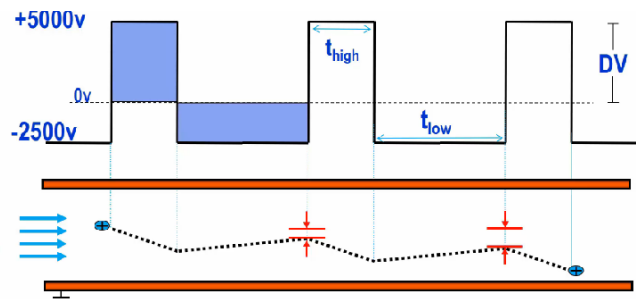
HRMS Instruments

- Tribrid Orbitrap Fusion™
- Tribrid Orbitrap Fusion Lumos™
- Tribrid Orbitrap Eclipse™
- Orbitrap Exploris (480, 240, 120)™

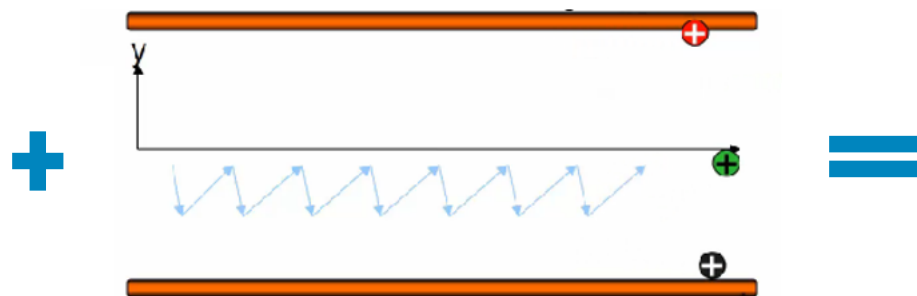
- NanoSpray Flex™
- Easy Spray™
- VeriSpray™



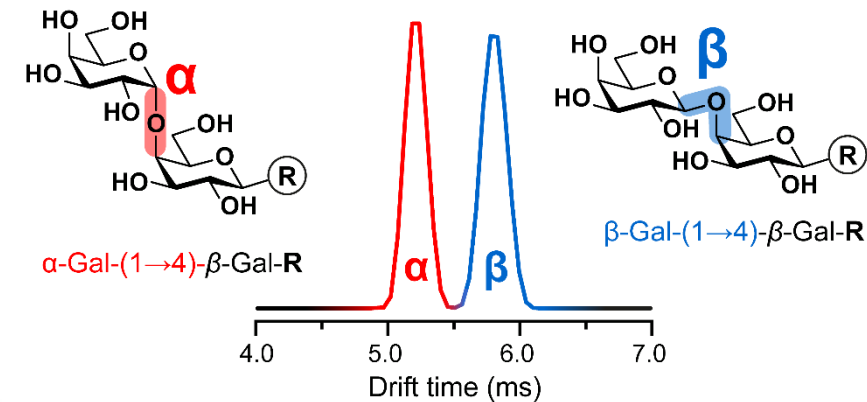
DV – Dispersion Voltage



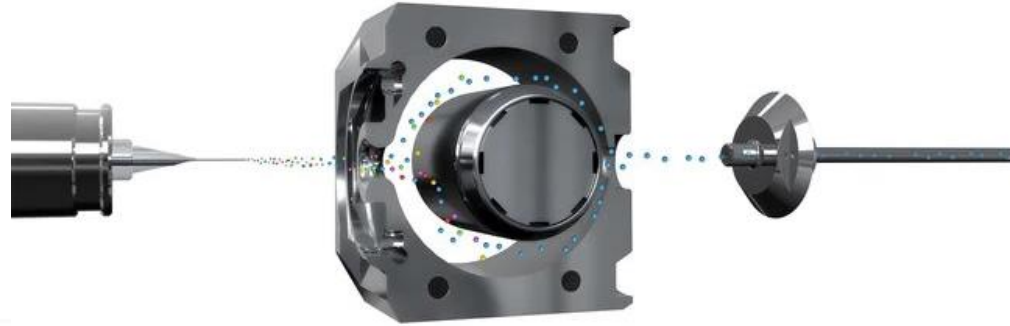
CV – Compensation Voltage



IM-MS Separation

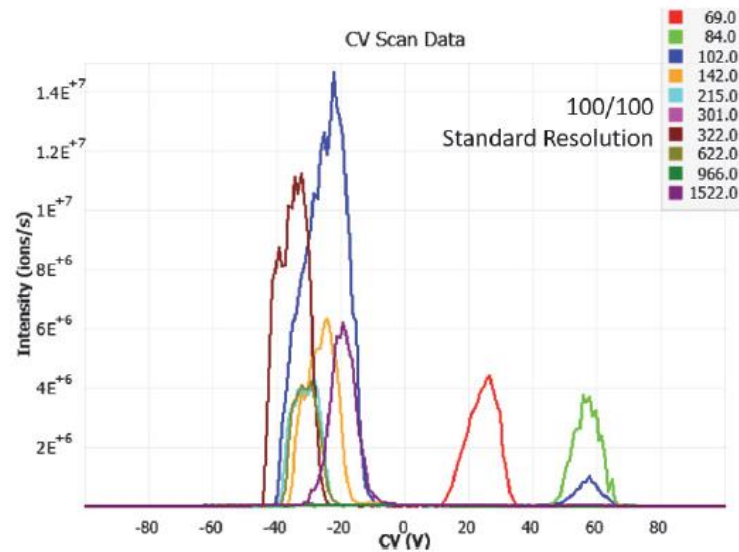


High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry System



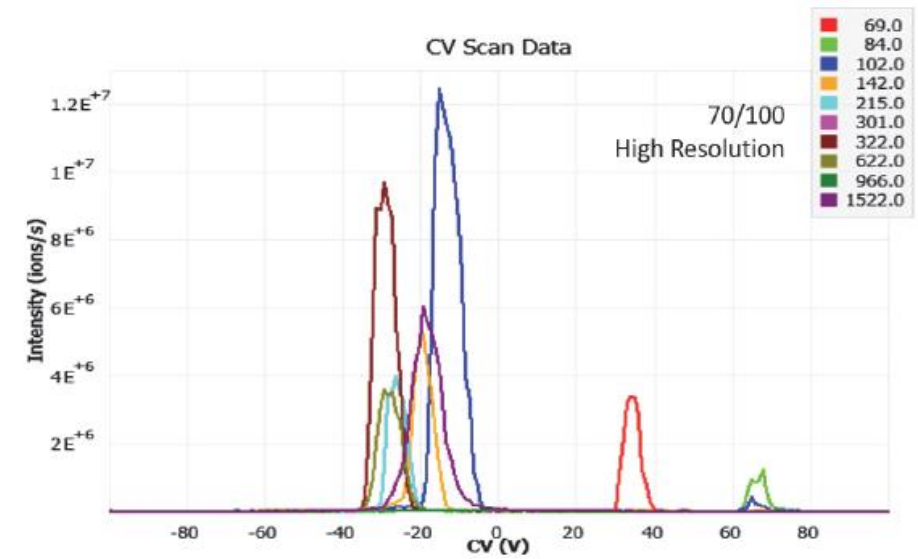
Standard Resolution Mode

zvýšená citlivost na úkor rozlišení



High Resolution Mode

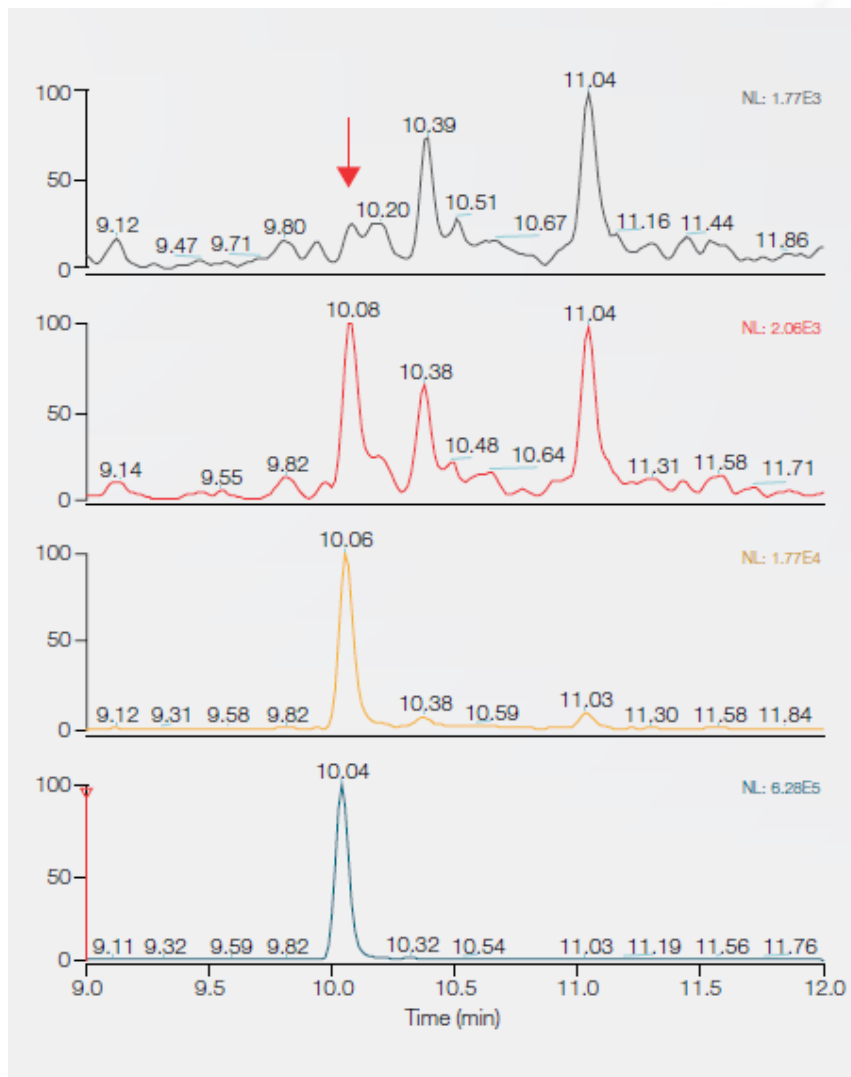
vysoké rozlišení na úkor citlivosti





- Zlepšení S/N díky selekci molekul vstupujících do MS
- Zlepšení S/N propouštěním homogenní populace molekul
- Zlepšení limitů detekce a kvantifikace (LOD, LOQ)
- Separace a kvantifikace isobarických molekul
- Zkrácení / eliminace chromatografie
- Zlepšení kvality MS dat - snadnější identifikace peptidů
- Větší „Throughput“

nLC-MS/MS



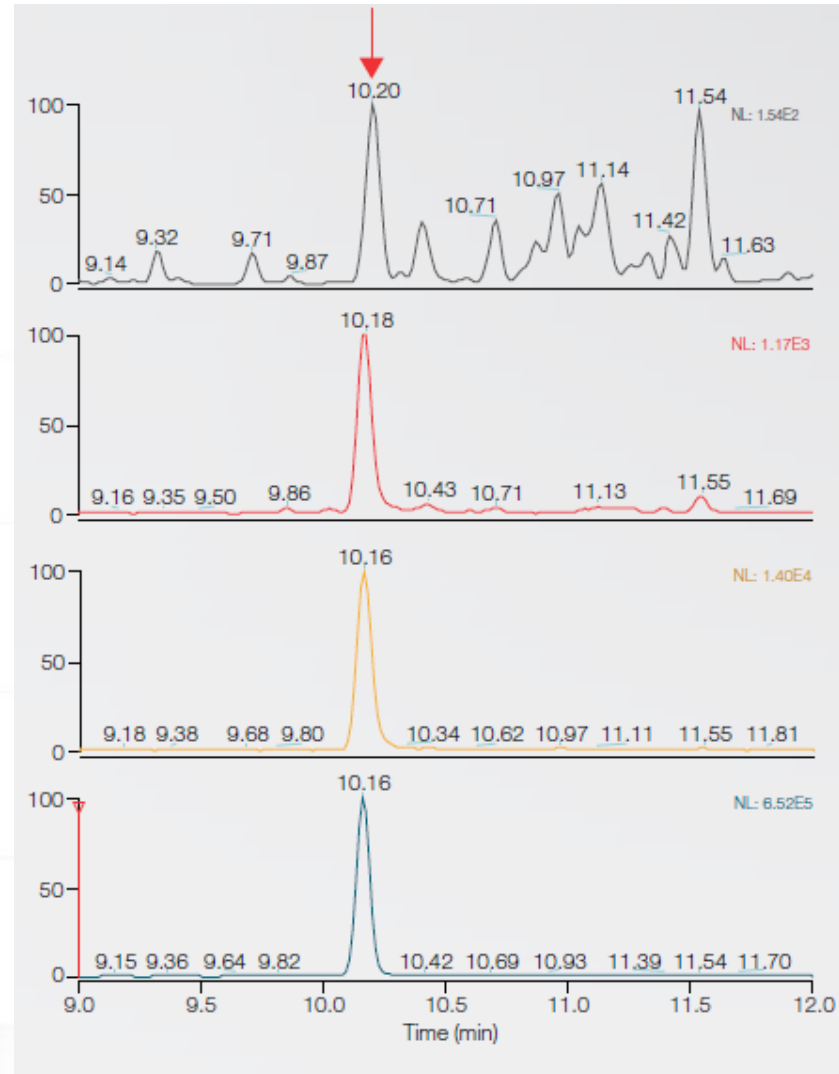
70 attomol

700 attomol

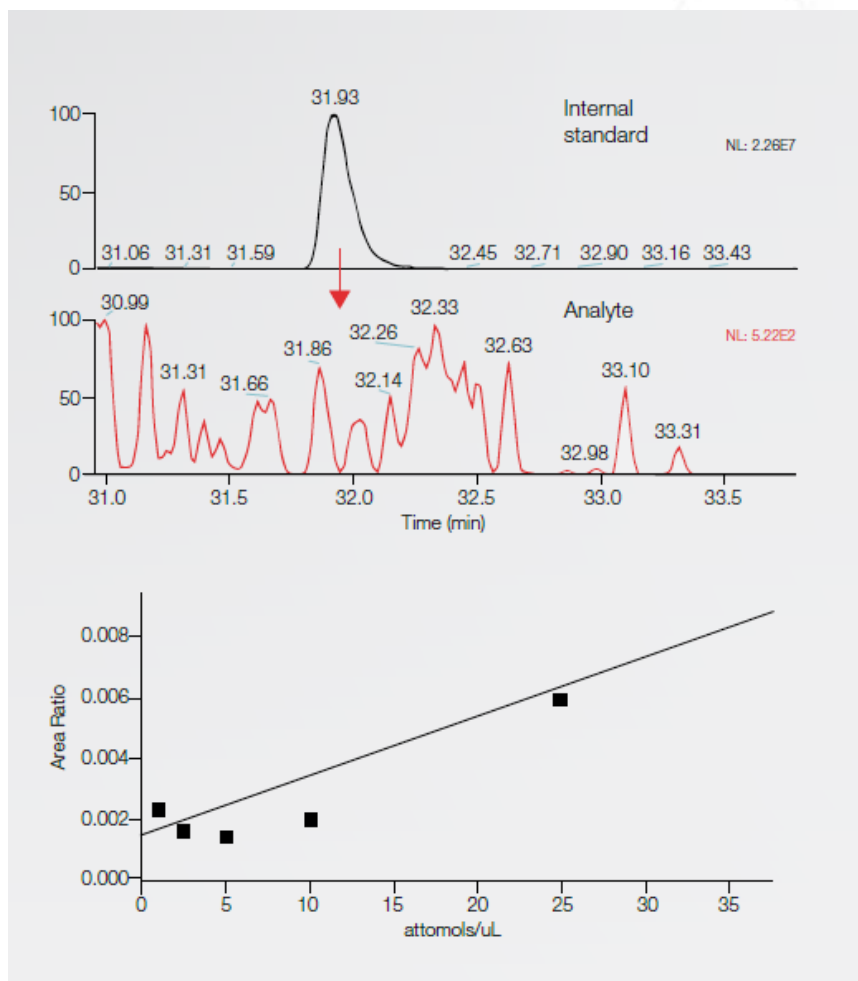
7 femtomol

700 femtomol

nLC-FAIMS-MS/MS

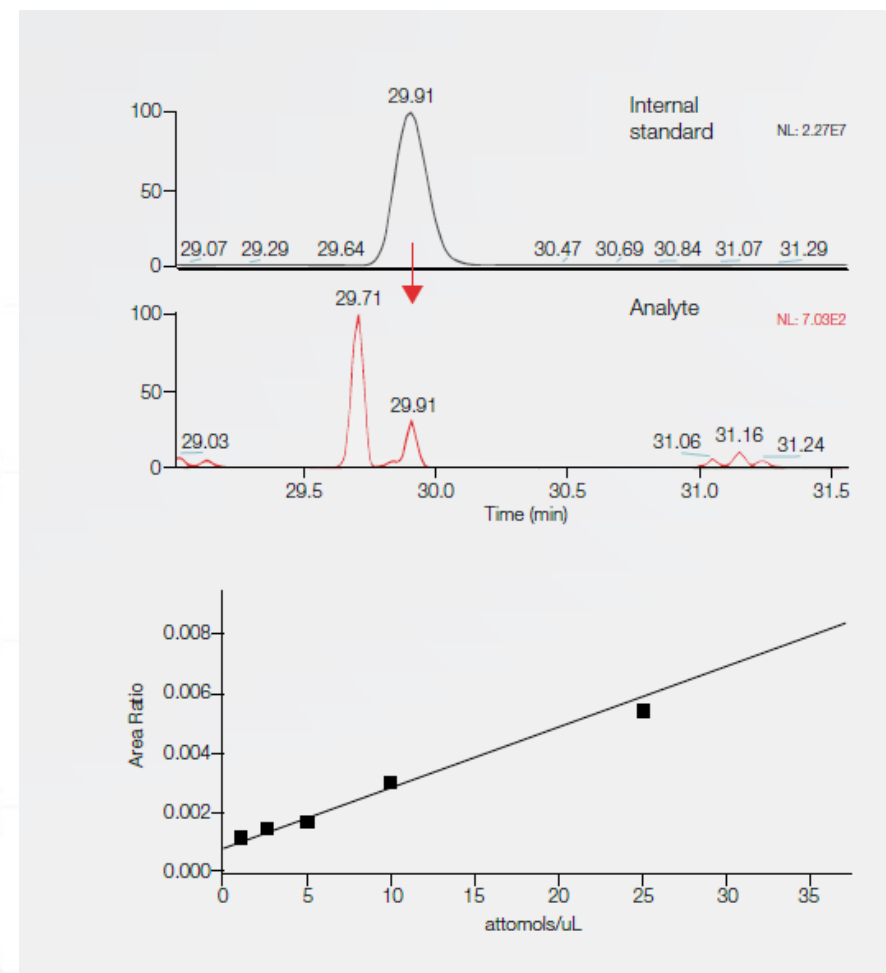


nLC-MS/MS



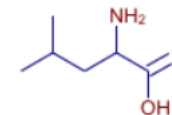
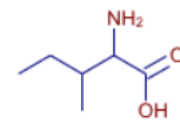
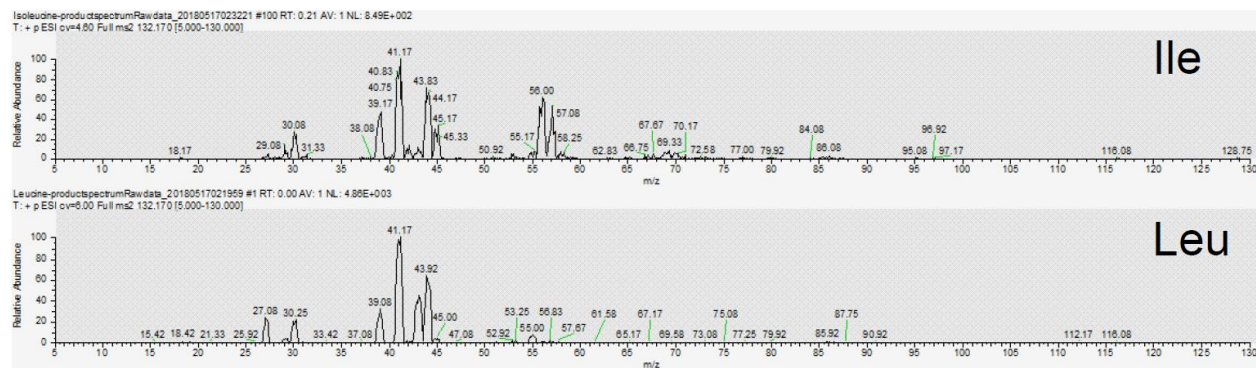
Slope = $1.94\text{E-}4$, $R^2 = 0.9975$

nLC-FAIMS-MS/MS



Slope = $2.02\text{E-}4$, $R^2 = 0.9981$

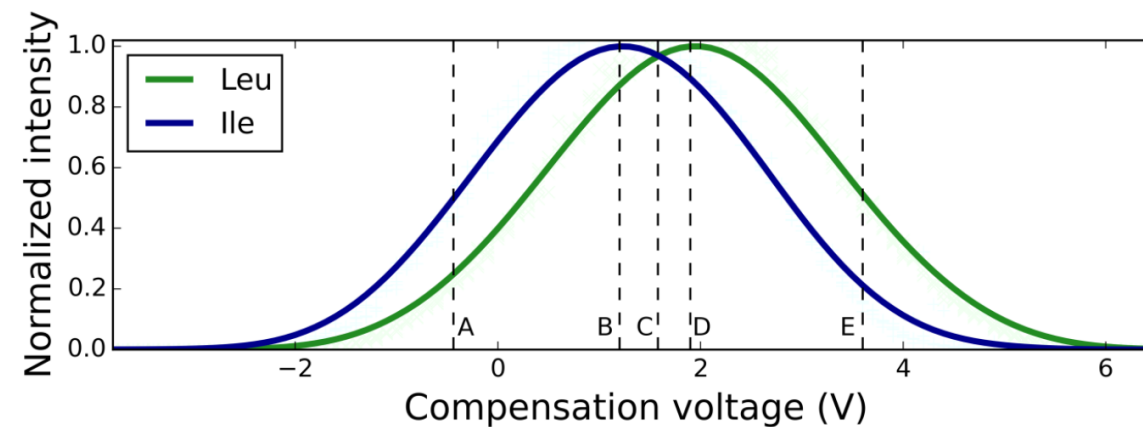
FAIMS Pro Interface – Separace a kvantifikace izobarických molekul



Monoisotopická hmotnost = 132.17

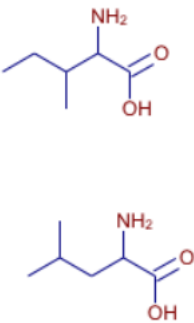
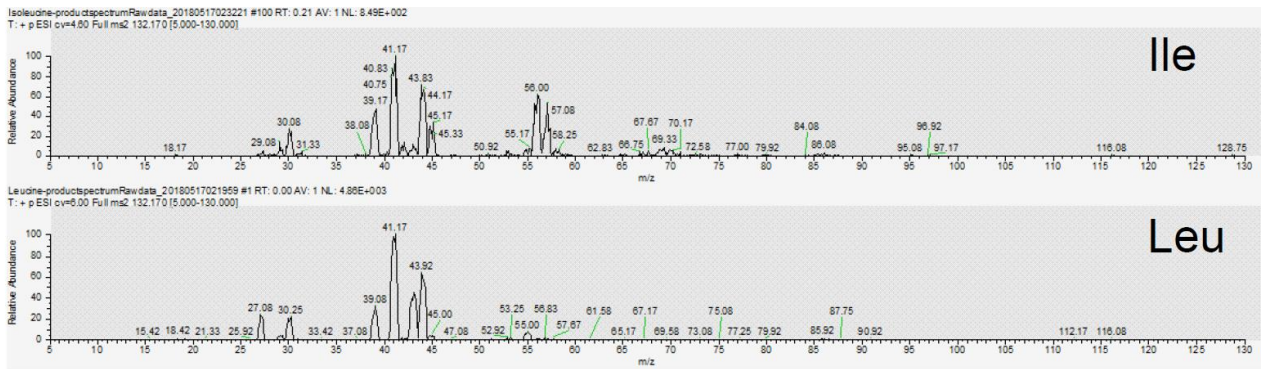
Produktové MS/MS spektra, 40eV CID, 2 m Torr

A	-0.44 V	Outer 50% Ile
B	1.2 V	Max Ile
C	1.58 V	Crossing
D	1.9 V	Max Leu
E	3.6 V	Outer 50% Leu



Zdroj: Kalafut B, Snyder AS, Quantitation of Isomers by Multi-VC FAIMS MS Scans, Thermo Scientific Application Note

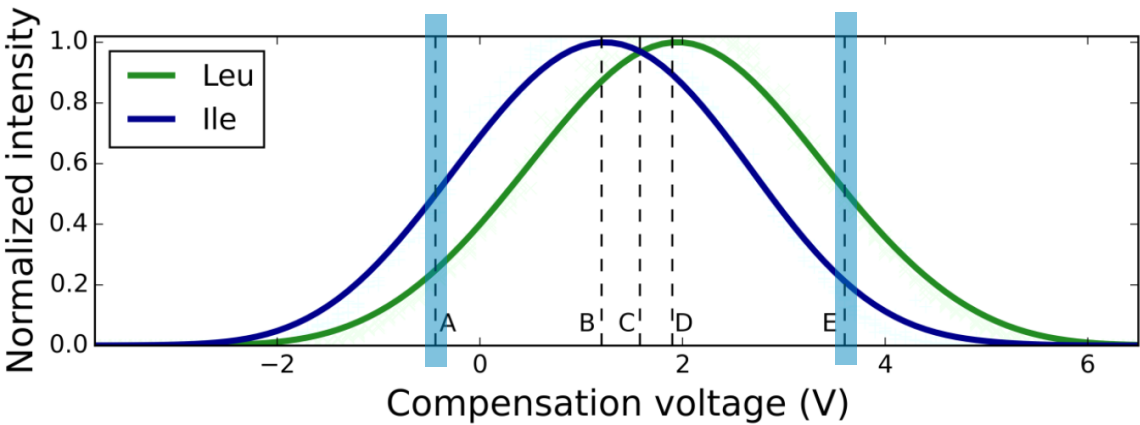
FAIMS Pro Interface – Separace a kvantifikace izobarických molekul



Monoisotopická hmotnost = 132.17

Produktové MS/MS spektra, 40eV CID, 2 m Torr

A	-0.44 V	Outer 50% Ile
B	1.2 V	Max Ile
C	1.58 V	Crossing
D	1.9 V	Max Leu
E	3.6 V	Outer 50% Leu



Zdroj: Kalafut B, Snyder AS, Quantitation of Isomers by Multi-VC FAIMS MS Scans, Thermo Scientific Application Note

7 směsí

Leu : Ile

0 : 100

10 : 90

30 : 70

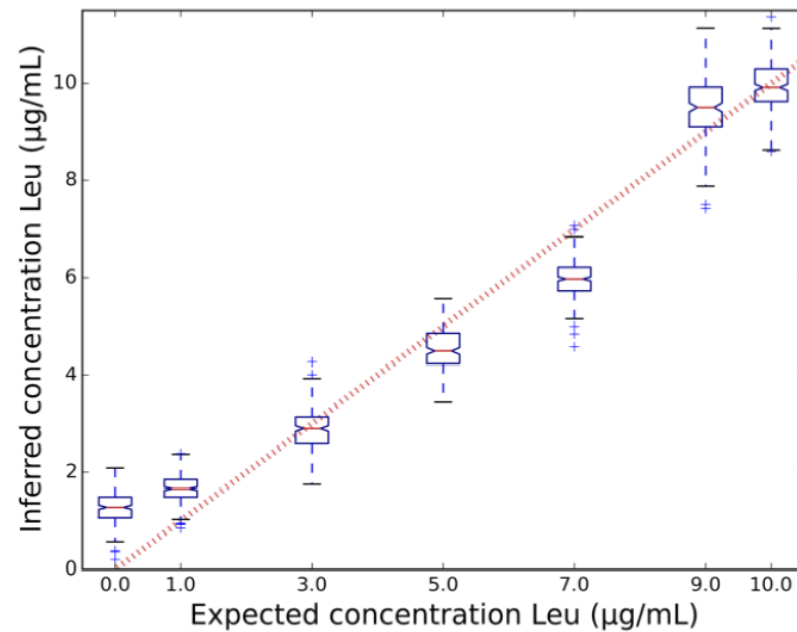
50 : 50

70 : 30

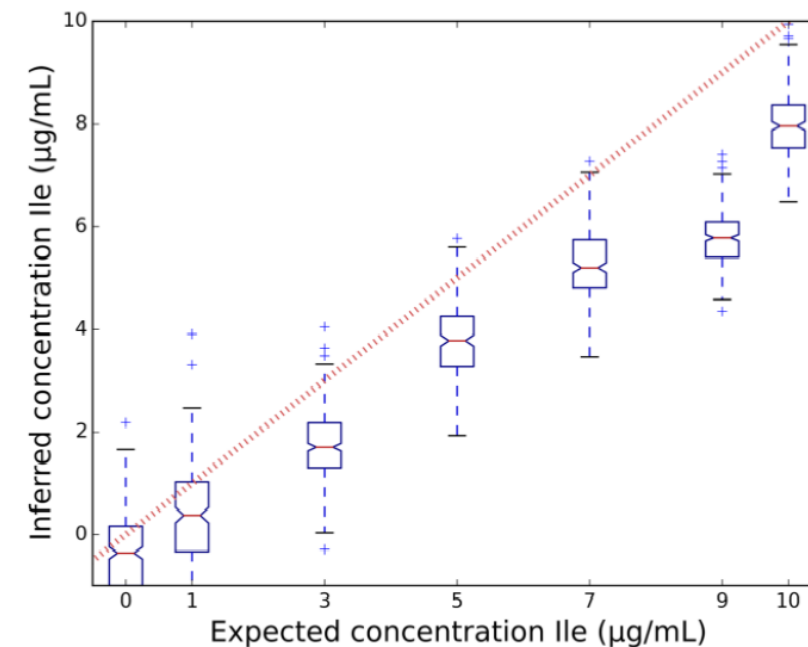
90 : 10

100 : 0

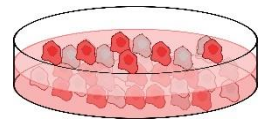
Leucin



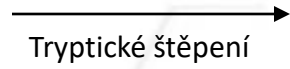
Isoleucin



No FAIMS Single Shot Proteomics Workflow



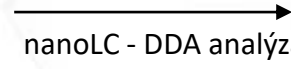
Buněčná kultura



Tryptické štěpení



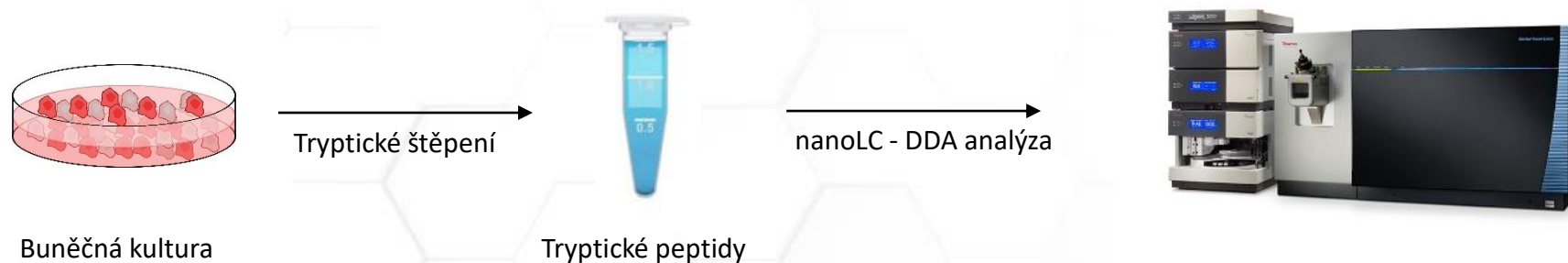
Tryptické peptidy



nanoLC - DDA analýza

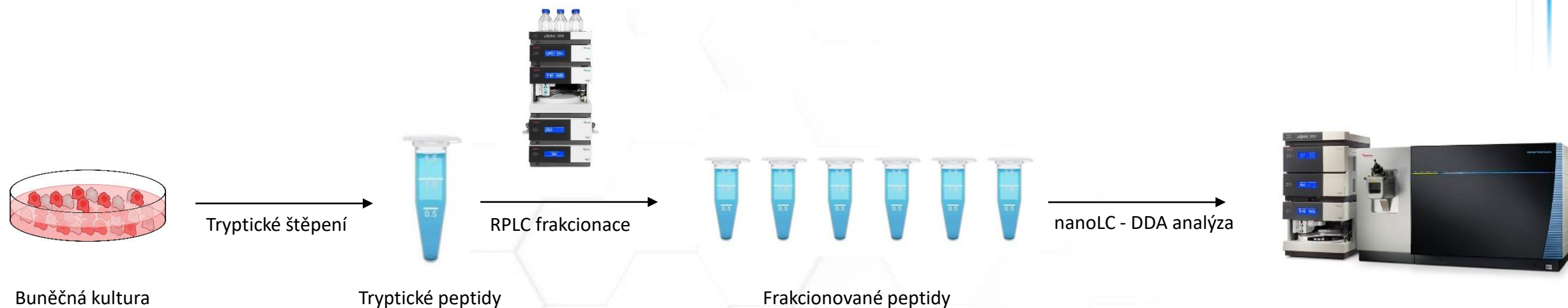


No FAIMS Single Shot Proteomics Workflow

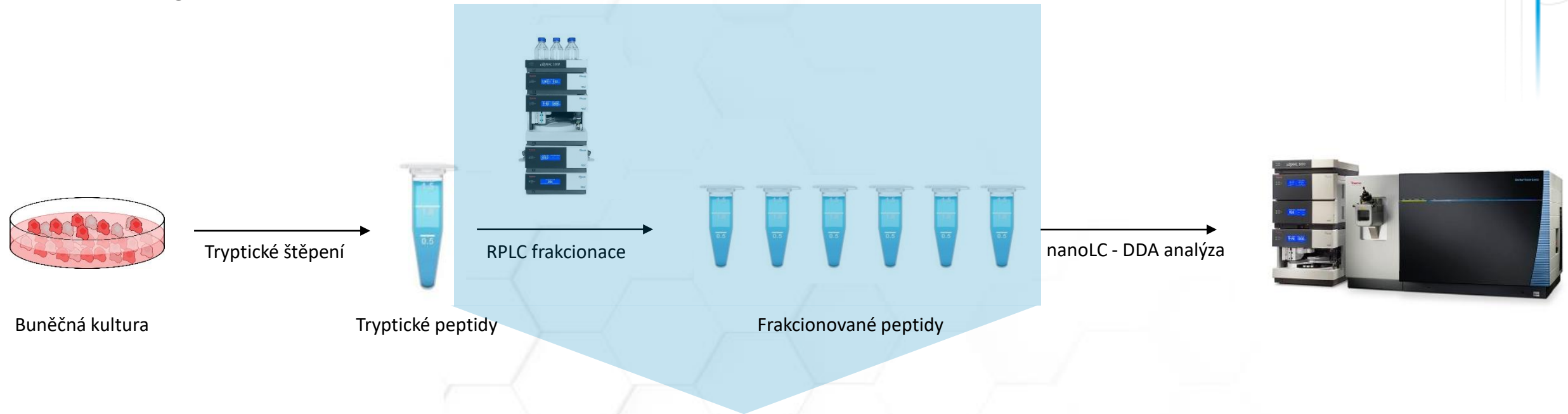


50% pokrytí celkového exprimovaného proteomu!!

No FAIMS Single Shot Proteomics Workflow

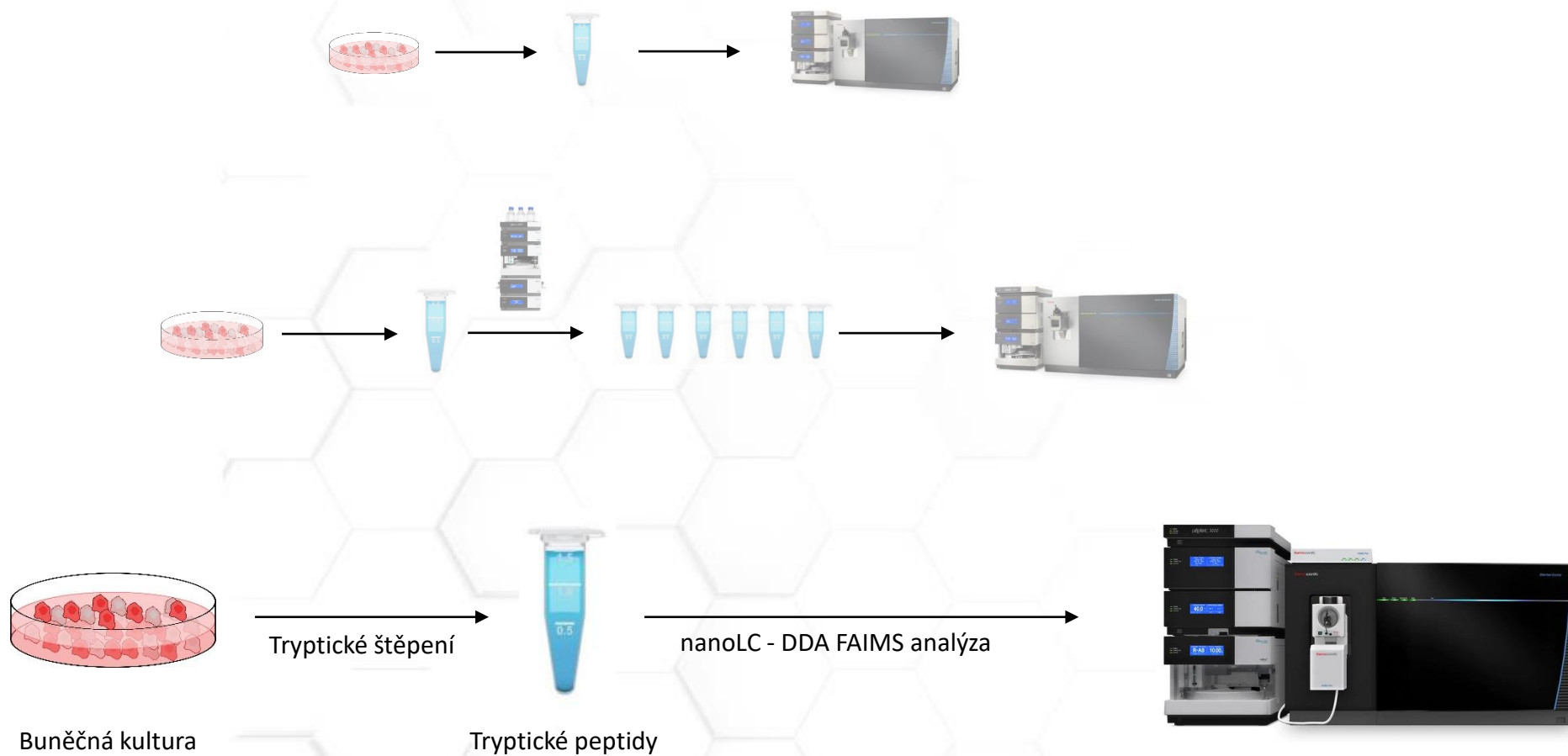


No FAIMS Single Shot Proteomics Workflow

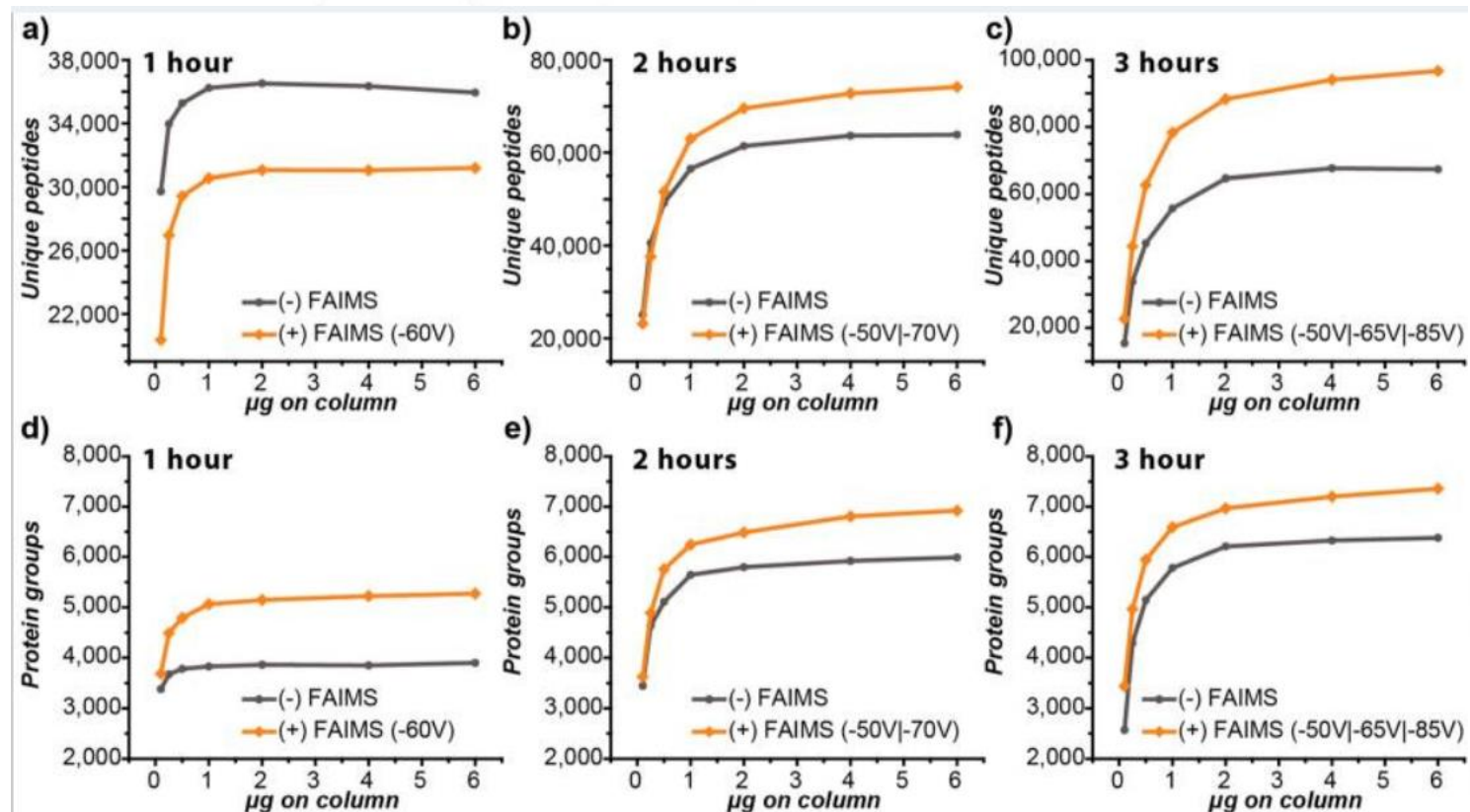


- + 1 den na přípravu vzorku
- + 1 LC systém
- větší objem vstupního vzorku
- náročnější manipulaci a větší prostor pro chybu

FAIMS Single Shot Proteomics Workflow

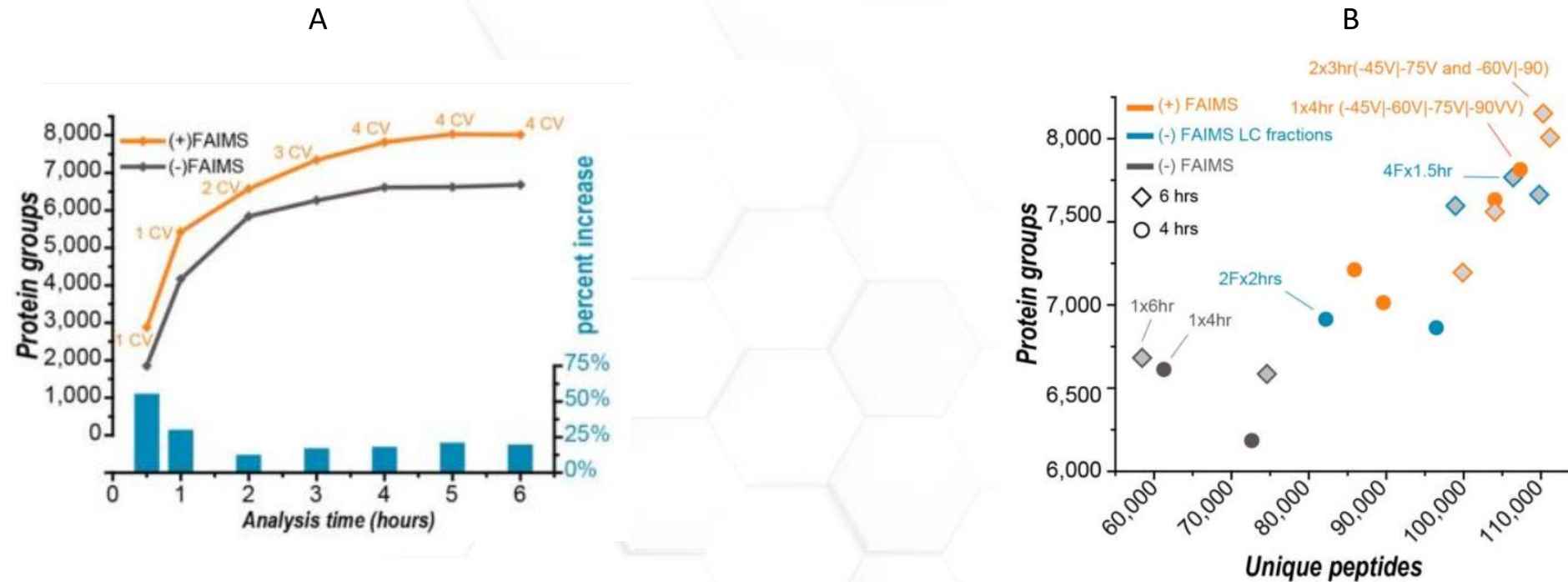


No FAIMS Workflow vs. FAIMS Workflow



Počet identifikovaných peptidů (a-c), respektive proteinů (d-f) v závislosti na délce analýzy a množství vzorku naneseného na kolonu

Zdroj: Hebert AS; Prasad S; Belford MW; Bailey DJ; McAlister GC; Abbatiello SE; Huguet R ; Wouters ER; Dunyach JJ; Brademar DR; Westphall MS; Coon JJ *Anal. Chem* 2018, 90, 9529-9537.

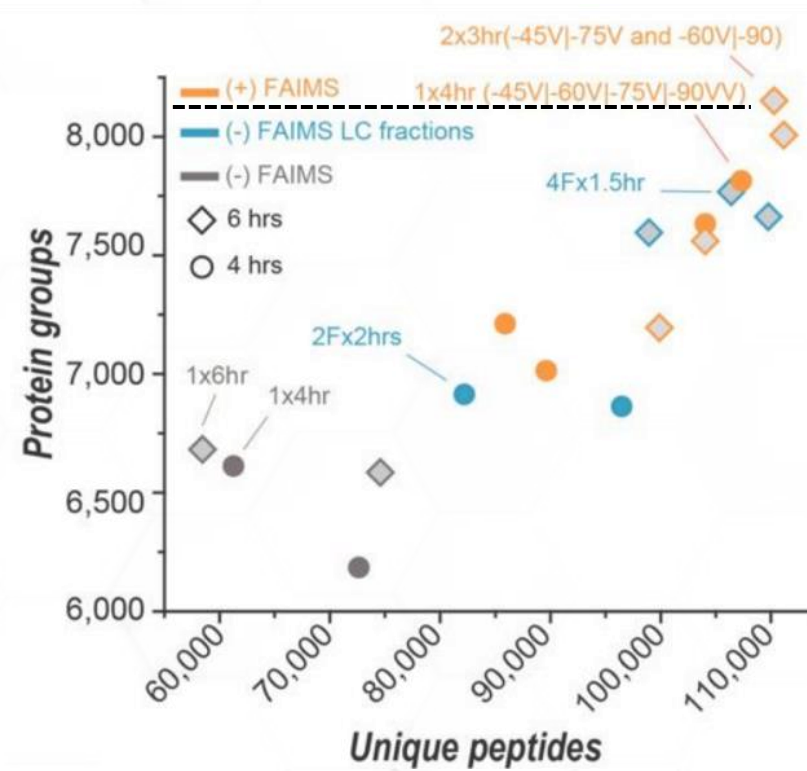


A - Počet identifikovaných peptidů v závislosti na době analýzy (0.5 – 6 h) včetně mezhodinového rozdílu

B – Počet identifikovaných peptidů / proteinů v závislosti na metodice

Zdroj: Hebert AS; Prasad S; Belford MW; Bailey DJ; McAlister GC; Abbatiello SE; Huguet R ; Wouters ER; Dunyach JJ; Brademar DR; Westphall MS; Coon JJ *Anal. Chem* 2018, 90, 9529-9537.

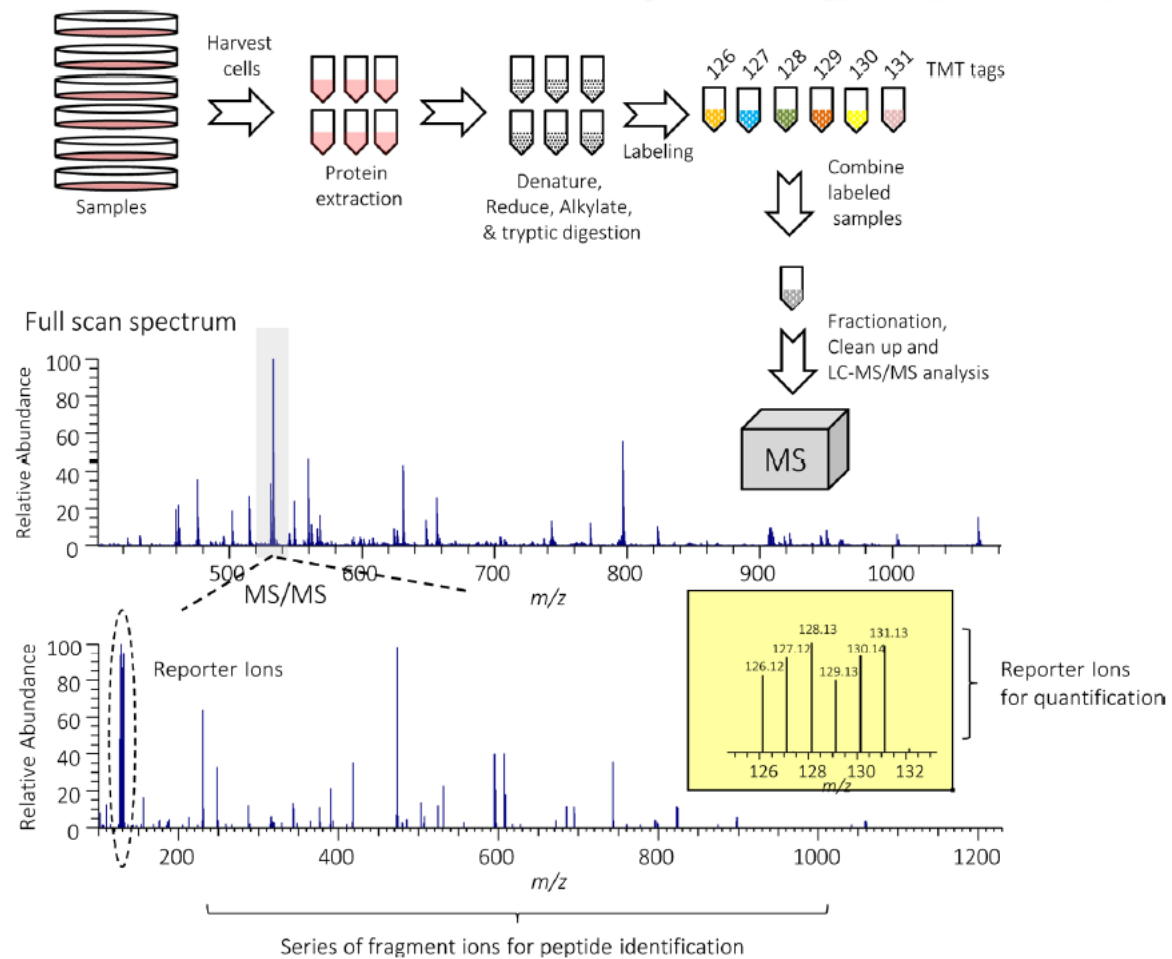
No FAIMS Workflow vs. FAIMS Workflow



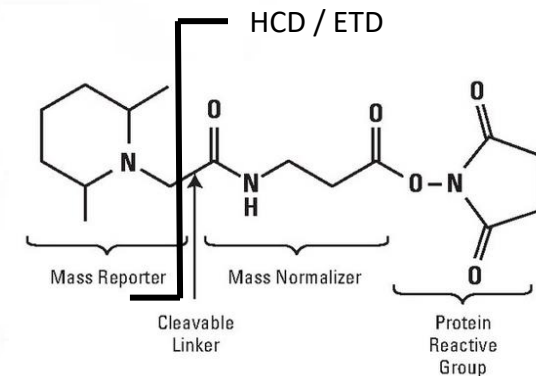
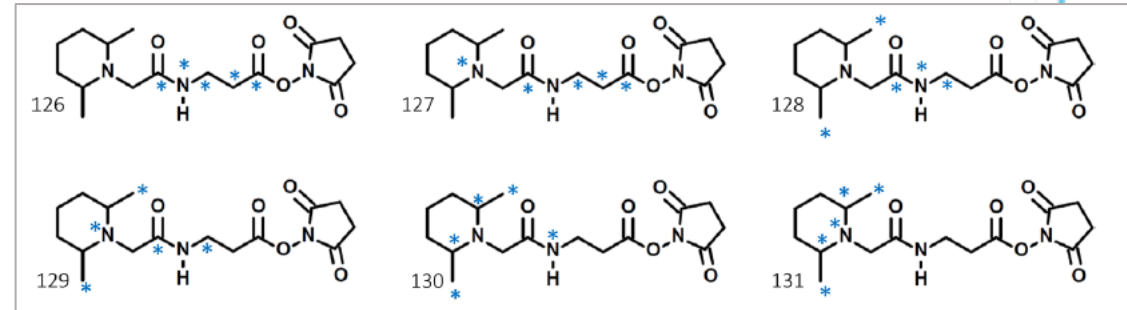
Počet identifikovaných peptidů / proteinů v závislosti na metodice

Zdroj: Hebert AS; Prasad S; Belford MW; Bailey DJ; McAlister GC; Abbatiello SE; Huguet R; Wouters ER; Dunyach JJ; Brademar DR; Westphall MS; Coon JJ Anal. Chem 2018, 90, 9529-9537.

FAIMS Pro Interface – Lepší relativní kvantifikace proteinů pomocí TMT*



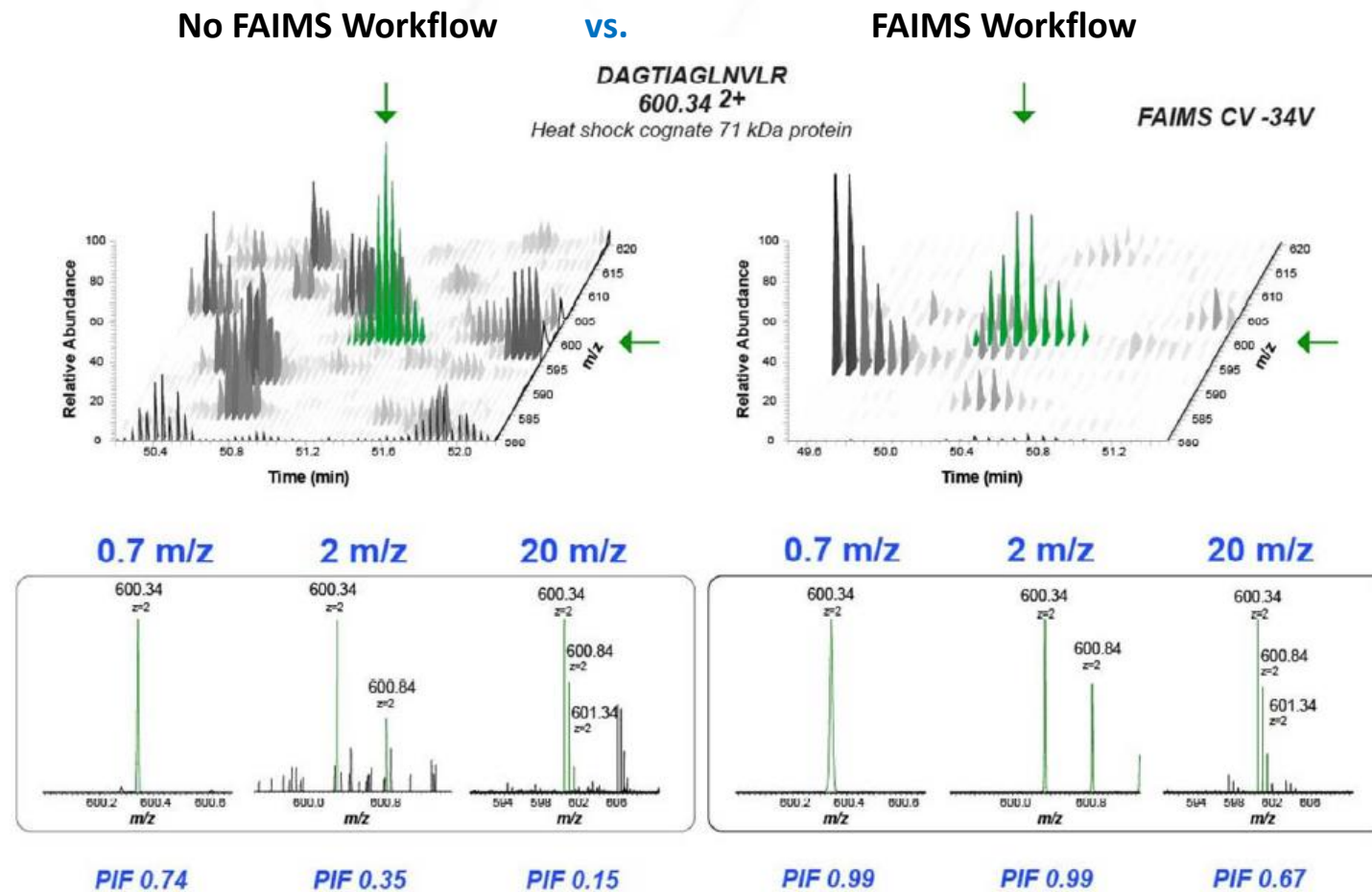
Thermo Scientific TMTsixplex™



*TMT – Tandem Mass Tag

Zdroj: Rauniyar N; Yates JR; Journal of Proteome Research 2014, 13, 5293-5309.

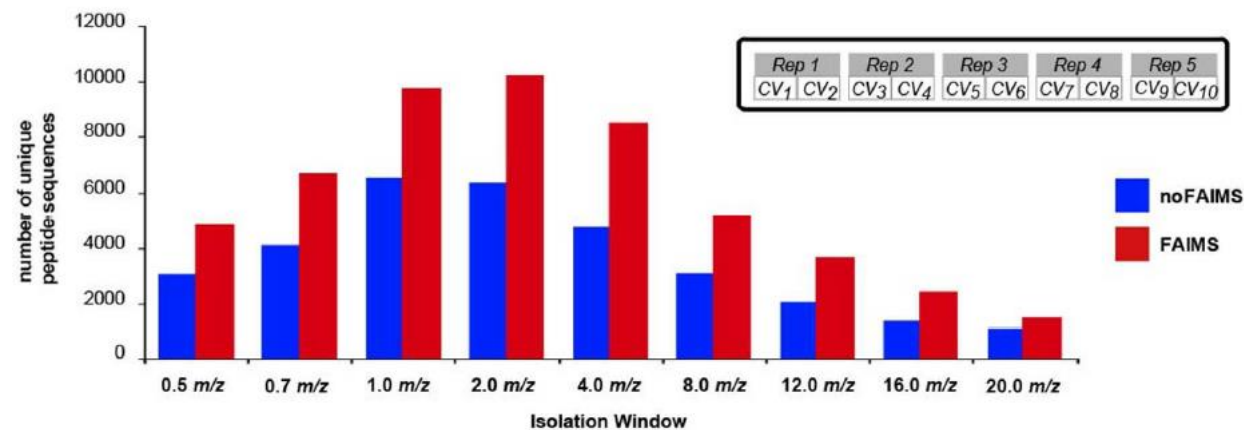
FAIMS Pro Interface – Lepší relativní kvantifikace proteinů pomocí TMT



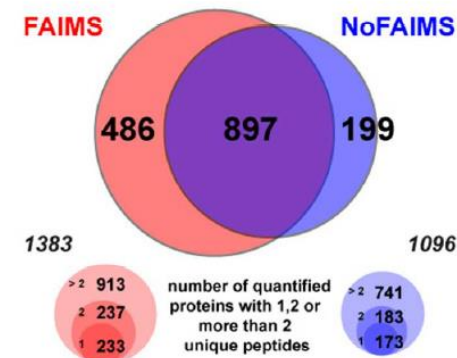
PIF – Precursor Ion Fraction - hodnota determinující kolik z celkového iontového fluxu připadá prekurzorovému iontu (0-1)

Zdroj: Phammatter S; Bobbeil E; Thibault P Journal of Proteome Research 2016, 12, 4653-4665.

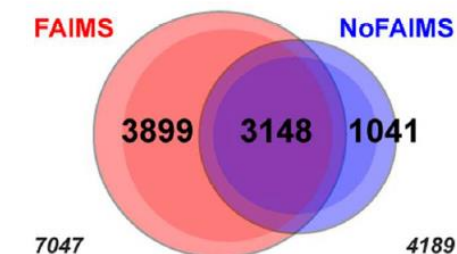
No FAIMS Workflow vs. FAIMS Workflow



Proteins



Peptides



A - Počet identifikovaných peptidů v každém izolačním okně

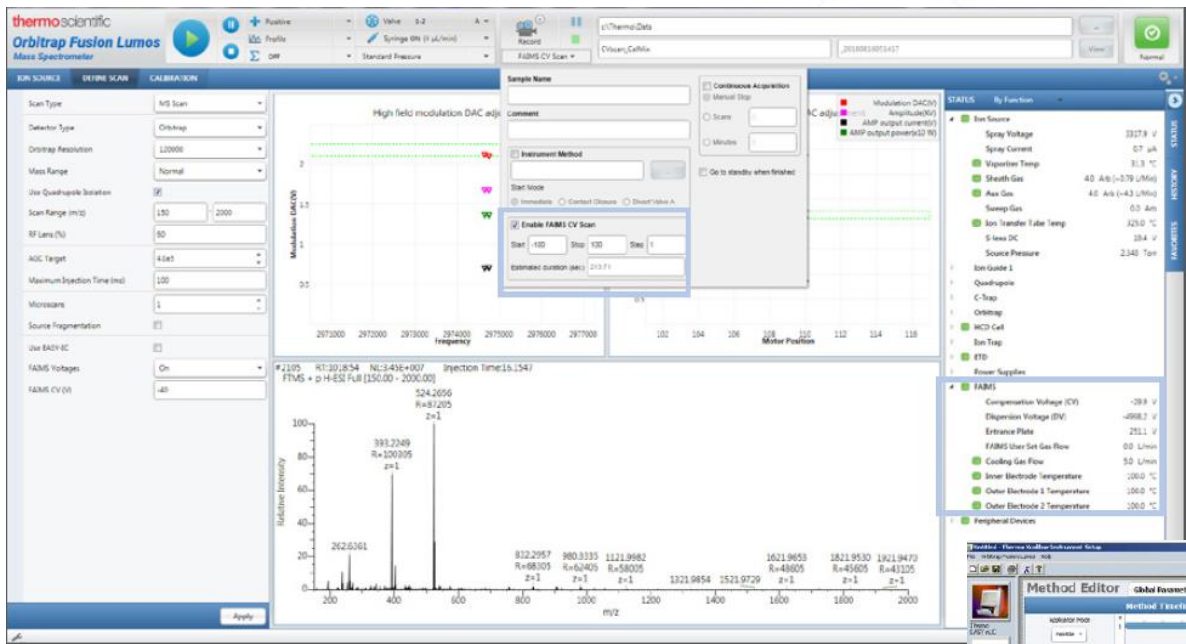
B – Vennovy diagramy počtu identifikovaných peptidů / proteinů

26 %

68 %

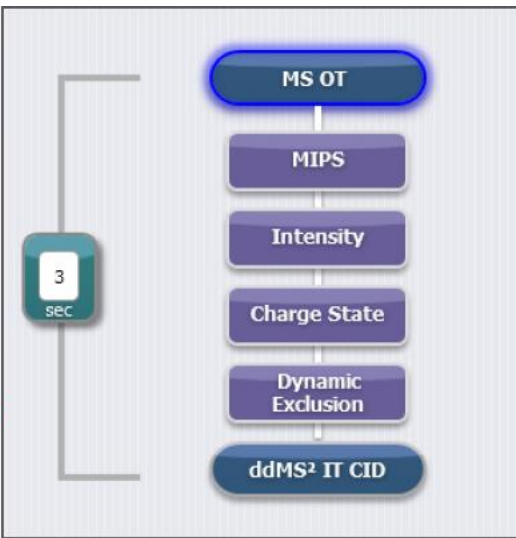
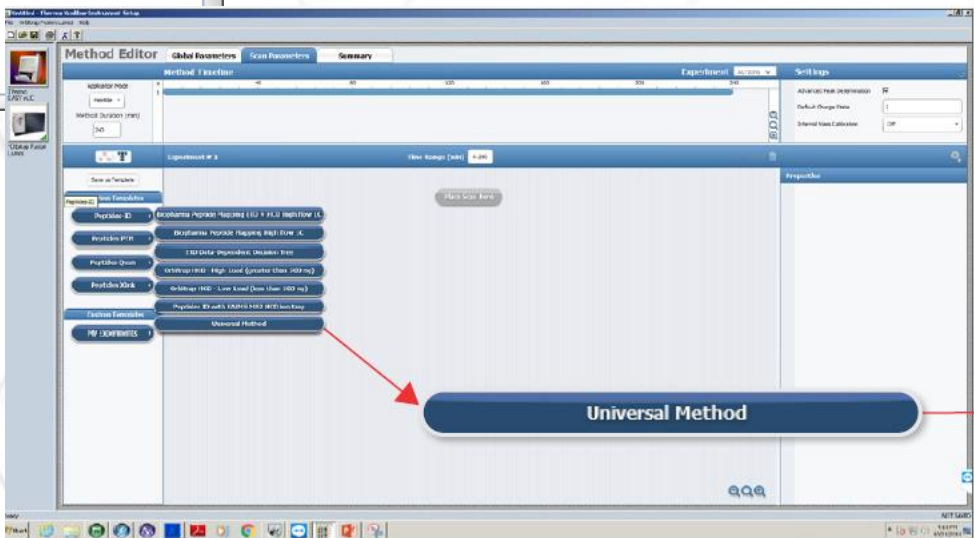
FAIMS Pro Interface – Automatická softwarová inkorporace

Automatické rozpoznání FAIMS v Tune UI



Optimalizace Compensation Voltage (CV) pro TIC, SIM, PRM

Editace přednastavených templátů instrumentových metod



VANQUISH CORE Live Show

16 06 2020

ONLINE

pragolab



Online prezentace
Vanquish Core Live Show
16. 6. 2020 od 10 hodin

VÍCE INFORMACÍ

pragolab

Děkuji za pozornost

www.pragolab.cz

bucek@pragolab.cz