

Massenytt

Norsk Selskap for
Massespektrometri

Nyhetsbrev for medlemmer av NSMS
Nr 1, 2007, 4. årgang



Innholds- fortegnelse

<i>Organisasjonen NSMS</i>	2
<i>Lederen har ordet</i>	3
<i>Nytt i navnet, men ikke i gavnet: Den internasjonale massespektrometri- stiftelsen</i>	3
<i>17th International Mass Spectrometry Conference</i>	5
<i>Moving belt</i>	6
<i>Alt du vil vite om tollaboratoriet og ikke tør spørre om</i>	7
<i>Møter, konferanser, messer og seminarer</i>	8
<i>DART en ny massespektrometri teknikk som medgir analys uten prøveoppren- sning</i>	9
<i>Den 13. Nordiske massespektrometri- konferansen</i>	11
<i>Massespektrometri av bakterier II: Proteiner</i>	12
<i>Et eldgammelt kornslag</i>	15

Norsk Selskap for Massespektrometri (NSMS) er en nasjonal forening som ønsker å ivareta faget massespektrometri. Vi er en frittstående forening som ikke har underavdelinger. Norsk selskap for massespektrometri er tilknyttet det internasjonale MS-miljøet ved at vi er medlem av "International Mass Spectrometry Society" og vi har en valgt representant i "International Scientific Committee (ISC)".

Vi avholder nasjonale seminarer i massespektrometri hvert annet år. Disse blir avholdt på steder der vi har mulighet for både å gå og stå på ski, med andre ord vi kombinerer det faglige med det sosiale. Dette gjør at vi får en fin atmosfære rundt det hele og nye kontakter dannes mens gamle pleies.

NSMS arrangerer også noe som vi kaller MS-brukermøter. Disse møtene skal arrangeres på tider som ikke kolliderer med våre ordinære vintermøter. Ideen med disse møtene er å få ms-intereserte til å diskutere faget på et mer praktisk grunnlag. Vi ønsker å ta opp praktiske problemer og utfordringer, for på den måten å kunne hjelpe hverandre med små og store problemer på MS-laboratoriet.

Massenytt

Ansvarlig redaktør

Dag Ekeberg, tlf. 64 96 58 74
e-post: Dag.Ekeberg@umb.no

Redaksjonsmedarbeider

Hanne Devle, tlf. 64 96 58 12
e-post: Hanne.Devle@umb.no

Trykkeri

Zoom Grafisk AS, Drammen
Tlf: 32 26 64 50

ISSN 1504-2359

Medlemskap i NSMS

Alle med interesse for massespektrometri kan bli medlem av Norsk Selskap for Massespektrometri. Kontingenten er for tiden kr. 100,- pr. år. og innmelding vil du kunne gjøre på våre internettsider. <http://www.nsms.no/innmelding.html> eller ved å sende en mail til lederen av nsms, leder@nsms.no

Lederen har ordet

Dag Ekeberg, NSMS

Mange laboratorier i Norge har blitt velsignet med nye og avanserte MS-instrumenter de siste årene. Årets MS-vintermøte hadde et rekordhøyt antall deltagere. Vi har faktisk ikke sett oss i stand til å ta imot alle bidrag og det var heller ikke mulig å oppdrive nok hotellrom. Dette har skjedd i en tid der våre undervisningssteder opplever færre studenter innen realfag. Vi har også fått kuttet våre budsjetter kraftig og da er reisebudsjettene noe av det som går først. Slike kutt har nok alle erfart. En tredje faktor kan være at stillinger ved norske universiteter og høyskoler spares inn etter hvert som de blir ledige. En del av oss antok at NSMS kunne fange interessen hos en del mennesker fra andre fagfelt siden MS har gjort et kraftig innhogg i andre fagfelt som f.eks. innen bioteknologi. Dette er meget tilfredsstillende og inspirerende for videre arbeid i NSMS.

Så vil jeg benytte anledningen til å oppklare noen uklårheter i forbindelse med Massenytt og den reklame vi av og til presenterer. Utgangspunktet for at jeg tar opp dette er at det har kommet kommentarer som går på at vi ødelegger det økonomiske grunnlaget for bladet Kjemi ved at vi har reklame i vårt medlemsblad, og at vi har reklamert for undervisningstilbud der lederen selv har interesser.

Dette er det 6. nr av massenytt og vi har forsøkt å få dekket de økonomiske omkostningene ved utgivelse ved å ha noe reklame. Dette har selvsagt ikke latt seg gjøre da det er større utgifter å mangfoldiggjøre en papirutgave og sende den med postverket ut til alle våre lesere, enn hva vi får av inntekter.

De første utgavene stod vi selv for produksjon og distribusjon, men så kom redaktøren av bladet Kjemi med en meget god idé og et bra tilbud. For en sum penger så legger vi Massenytt inn som et midtsideblad i Kjemi. Alle syntes dette var bra inntil noen så et par reklamesider i Massenytt. Vi har bl.a. hatt reklame for UMB og IKBM. Dette skyldes en avtale som er knyttet opp til utsendelse av to brev til våre medlemmer i forbindelse med årets vintermøte. Vi utgir Massenytt to ganger pr år, vi er nødt til å ha noe inntekter pga omkostningene og så langt har vi gått i dundrende underskudd. En kommentar på reklame for egeninteresse har jeg også fått, men jeg kan berolige våre lesere med at denne reklamen er det betalt for.

For å unngå komplikasjoner vil jeg helle til det standpunkt at vi skal vurdere meget sterkt om vi heller skal gå over til å utgi Massenytt som pdf, sende det ut via mail og gjøre det tilgjengelig på våre hjemmesider. På den måten er vi ikke avhengig av inntekter. En bivirkning er at vi ikke når ut til det store antall vi i dag gjør.

Nytt i navnet, men ikke i gavnet: Den internasjonale massespektrometristiftelsen

Einar Uggerud, UiO



Ved den siste internasjonale massespektrometrikonferansen i Praha i slutten av august, ble det besluttet å endre navnet på moderorganisasjonen fra

Det internasjonale masse-spektrometriselskapet (IMSS) til Den internasjonale massespektrometristiftelsen (IMSF). Det kan virke som et pussig påfunn, men har sin naturlige årsak. Da selskapet i sin tid ble stiftet, ble det opprettet som en stiftelse i Den Haag, delvis fordi to av de daværende styrem-

edlemmene var nederlendere, og delvis fordi den nederlandske regjeringshovedstad har en viss internasjonal aura (jfr. de internasjonale domstoler). Dette har vært en grei ordning helt til de nederlandske skattemyndighetene begynte å blande seg inn. Selskapet måtte finne seg i, på alle punkter, å oppfylle kravene til en stiftelse, ellers måtte det betale en klekkelig utbytteskatt hvert år fremover. Vårt relativt fattige selskap fant det hensiktsmessig å tilpasse seg det skjerpede regimet. De nødvendige endringene ble gjort i Praha. De innbefattet i tillegg til navneforandringen, også endringer i statuttene. Bortsett fra det nye navnet, vil nok ikke omgivelsene merke så mye. Statuttene er nå blitt delt i to, regler (articles) og vedtekter (by-laws) IMSF har ett formål, nemlig å fremme massespektrometrien internasjonalt. Den viktigste praktiske oppgaven er å sikre kontinuitet og kvalitet i de treårige internasjonale massespektrometrikonferansene, som nå altså sist ble arrangert i Praha.

Om tre år, i 2009, holdes det i Bremen, og om ytterligere tre år i Kyoto. Da vil det bli første gang konferansen holdes utenfor Europa—et gjennomslag for dem som mener at en sann internasjonal organisasjon og konferanse ikke skal være begrenset til gamle Europa.

Ved møtet i Praha ble det også holdt valg. Det nye styret er:

Leder: John C. Traeger, Australia

Avgått leder: John J. Monaghan, Storbritania

Nestleder (organisasjon): Marcos Eberlin, Brasil

Nestleder (konferanse): Jürgen Grottemeyer, Tyskland

Kasserer: Dietmar Kuck, Tyskland

Sekretær: Catherine E. Costello, U.S.A.

*Styremedlemmer: Einar Uggerud (Europa), Yoshi-
nao Wada (Asia), Paul M. Mayer, (Amerika).*

Forøvrig bør den oppmerksomme leser merke seg at stiftelsen støtter deltakelse av studenter ved de internasjonale massespektrometrikonferansene. Ta en titt på stiftelsens nettsider: <http://www.imss.nl>.



17th International Mass Spectrometry Conference

Anders Holm, UiO/Rikshospitalet

Det var praktfulle Praha, hovedstaden i den Tsjekiske Republikk, som satte rammene rundt den 17. IMSC. Dette er en viktig internasjonal konferanse som arrangeres hvert tredje år og som samler mellom 1000 og 1500 deltakere hver gang. Norge var representert ved en fin liten gjeng fra Universitetet i Oslo, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Rikshospitalet og GE Healthcare.



Konferansen er veldig omfattende og spenner over alt fra det grunnleggende som f. eks "Gas Phase Ion Chemistry", "Activation and Dissociation" og de ulike instrumentelle prinsippene til noe mer applikasjonsrettet som f.eks "Peptidomics and Pro-

teomics", "Drug Discovery", "Metabolomics" og "Imaging MS". Komplett oversikt over de ulike temaene kan sees på <http://www.imsc2006.org/sci-prg.php>. Foredragene ble presentert i fire parallelle sesjoner i tillegg til noen utvalgte plenarforedrag, og det ble presentert ca. 850 postere. Møtet holder en veldig høy vitenskapelig kvalitet og det er absolutt verdt å kikke gjennom sammendragene som ligger på <http://www.imsc2006.org>.

På konferansens første dag holdt Ole N. Jensen et meget interessant foredrag om protein modifikasjoner og hvordan disse modulerer proteinets funksjon og distribusjon i celler og vev. Han beskrev også ulike strategier på hvordan disse modifikasjonene kan karakteriseres ved MS/MS. Det påfølgende innlegget var av en av hans kolleger fra Odense, Martin R. Larsen, og omhandlet selektiv opprensing av fosfopeptider på TiO_2 . Analyse av fosfopeptider er som kjent en utfordring og selektiv opprensing er derfor et høyst nødvendig verktøy for alle som jobber innen dette feltet.

Tirsdagen ble innledet med et meget godt plenarforedrag av Donald F. Hunt fra University of Virginia, USA, som tok for seg en av de virkelig store tekniske nyvinningene innen peptid fragmentering – Electron Transfer Dissociation (ETD). Denne teknikken kan brukes til å lese sekvensen av store peptider (opp til 40 aminosyrer!), og egner seg veldig godt til analyse av post-translasjonelle modifikasjoner. Noe han viste med eksempler fra

bl.a. fosforylering av proteiner involvert i celle migrasjon og modifisering av histoner i forbindelse med uttrykkning av gener. Ett annet høydepunkt denne dagen var Einar Uggerud fra Universitetet i Oslo som ga foredraget "Theory and Experiment in Mass Spectrometry" som omhandlet den komplekse sammenhengen mellom teori og eksperiment i vitenskapen.

Det vitenskapelige programmet på onsdagen var tonet litt ned til fordel for sosiale aktiviteter, som jo også er en veldig viktig del av alle konferanser. Uansett fikk vi med oss en sesjon dedikert til "Nanotechnology" hvor miniatyrisering av analytisk instrumentering ble satt i fokus. Denne sesjonen inneholdt naturligvis fremskritt innen chip-baserte systemer, og hvilke fordeler man oppnår, særlig når prøvemengden er ekstremt begrenset. På ettermiddagen hadde konferansens deltakere muligheten til å bli med på en guidet tur gjennom Prahas gamle bydel som er full av attraksjoner.

Torsdagen startet med et plenarforedrag som omhandlet "Recent Progress in Prion Biology, før Vicky H. Wysocki innledet sesjonen "Peptide Fragmentation" med et detaljert foredrag om peptid-fragmentering og struktur av b_2 -ionet. På ettermiddagen fikk vi servert en sesjon dedikert til "Imaging MS" hvor man bruker MALDI MS til å bestemme distribusjon og forandring i mengde over tid av ulike molekyler i biologiske materialer som f.eks. utsnitt av hjernevev.

Før avreise på fredag fikk vi høre et interessant plenarforedrag med tittelen "Probing our Origins: The Expanding Role of Mass Spectrometry for Laboratory Simulations for In Situ Exploration of Space Environments" av Jack Beauchamp. Utviklingen av ny instrumentering og nye metoder gjør at MS spiller en stadig viktigere rolle i utforskningen av verdensrommet. Dette ble vist med eksempler fra analyse av kosmisk støv, rester av kometer og av ulike organiske molekyler fra Titan (Saturns største måne).

Instrumentleverandørene var selvfølgelig tilstede og presenterte sine nyheter. Det som etter mitt skjønn fikk mest oppmerksomhet var Electron Transfer Dissociation (ETD) i kombinasjon med Ion Trap MS(n) for fragmentering av peptider. Det unike med denne teknikken er at peptidene fragmenterer kun i peptidbindingene og modifikasjoner og sidekjeder forblir intakte. Dette er veldig gode



Katja B. Prestø Elgstøen og Anders Holm på underholdning i Praha.

nyheter for alle som jobber med modifikasjoner av peptider og proteiner. I tillegg kan man sekvensere peptider opp til 40 aminosyrer hvilket muliggjør top-down sekvensering av små proteiner. Videre presenterte Thermo sin forholdsvis nye LTQ-Orbitrap, som i følge dem selv er det første fullstendig nye massespektrometeret på 20 år. Dette er et relativt kompakt instrument som gir massenøyaktighet og oppløsning på nivå med FT-ICR MS.

Som nevnt er det sosiale en viktig del av enhver vitenskapelig konferanse, og i så måte er Praha et veldig fint sted å være. Byen er full av hyggelige restauranter og barer hvor kveldene ble tilbrakt. Konferansemiddagen ble arrangert på Villa Dreucici som er et hyggelig lite middelaldersk "slott" litt utenfor Praha sentrum hvor vi ble servert mat og god drikke samt underholdning av ymse slag.

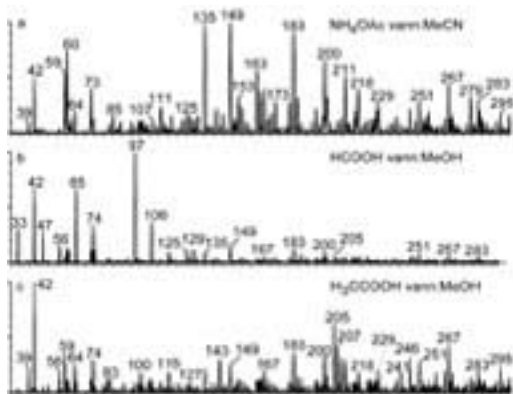


Dette referatet vil naturligvis bære noe preg av at jeg til daglig jobber med LC-MS og proteomikk, og for meg var dette en veldig utbytterik konferanse både faglig og sosialt sett. Denne konferansen dekker som sagt alle sider ved bruk av MS og bør være høyst relevant for alle MS-brukere, uansett fagfelt. Den 18. IMSC arrangeres i Bremen i 2009 (<http://www.imsc-bremen-2009.de/>) og jeg vil oppfordre alle MS interesserte til å ta turen dit.



Mortens Hjørne

Ionekilden er nyrenset, penger er svidd av på løsningsmiddel av HPLC-kvalitet, vannrensesystemet er nylig overhaldt, glassutstyret er rent, du er i dytten og har vinden og sola i ryggen. Likevel, når instrumentet skal tunes, ses mye kjemisk støy (fig. 1).



Figur 1. Løsningene (a) 0,1% NH_4OAc i vann: MeCN, (b) 0,1% HCOOH i vann:MeOH og (c) 0,1% CH_3COOH i vann:MeOH, ble infusert ved $10 \mu\text{l}/\text{min}$ på et velbrukt QuattroLC-instrument.

Kjemisk støy kan påvirke analysen negativt fordi ESI ikke er selektiv mht hva som ioniseres av polare stoffer og fordi dette kan gi ionesuppresjon og dårlig signal til støyforhold og dermed redusert følsomhet. Forvirrende MS/MS resultat kan fås hvis den kjemiske bakgrunnen er isobarisk med analytter som undersøkes. Hva er kildene til den kjemiske bakgrunnen? Guo et al. (RCM, 2006, 20, 3145) har studert dette nærmere.

Mobilfasen bidrar gjennom clusterer av typen $[\text{nLM} + \text{mH}_2\text{O} + \text{kpH} + \text{M}]^+$, der LM er løsningsmiddel (MeOH, MeCN, osv), pH er pH modifikator tilsatt løsningen (HCOOH , NH_4OAc , osv) og M er det som gir ladning (H^+ , NH_4^+ , Na^+ , K^+ , osv). Feks kan eddiksyre danne di- til heksamere. Ionene m/z 39, 42, 59 og 60 (fig. 1a), m/z 33, 42, 47, 65 og 97 (fig. 1b) og m/z 39, 42, 83 og 143 (fig. 1c), mfl, kan alle tilskrives mobilfasen. Men det er også andre kilder til kjemisk støy, som vil bli diskutert nedenfor. Fra GC/MS kjenner mange til m/z 149 (ftalater). Ftalaterne er overalt, og i fig. 1a er m/z 149 base peak. Plastboksen NH_4OAc ble tatt fra var uåpnet og det ble tatt krystaller som lå i lokket. Ftalater benyttes

som stabilisatorer for plastikkmaterialer. Andre stoffer som brukes til samme formål er sebacater, adipater og fenylfosfater. Figur 2 viser noen ioner som kan observeres i LC-MS fra disse stoffklassene. Det er mange mulige kilder til disse stoffene; materialer i ionekilden, engangsutstyr fra prøveopparbeidelse, laboratoriestøv, HPLC-instrumentet (tubing, pakninger), pH-modifikatorer og beholdere til løsningsmidler. En annen kjenning fra GC/MS er silikoner som gir m/z 267 og 73. Som vi ser av fig. 1 er disse ionene til stede uansett mobilfase. Dessverre er stoffene som nevnt svært mye brukt og de er vanskelige å bli kvitt. Vi må nok slite videre med dem, men nå vet vi i det minste hva de er.



Figur 2. Familietrær til vanlige kontaminanter i ESI-MS (modifisert fra Guo et al.).

Alt du vil vite om tollaboratoriet og ikke tør spørre om

Harry G. Jensen, Trine-Line Nilsen og Siv Marie Engen, Tollaboratoriet

De fleste tror at tollvesenet først og fremst kontrollerer reisende for ulovlig import av sprit og tobakk i bagasjen, men dette er bare en myte.



Alkoholbeslag.

Tollvesenets hovedoppgaver er imidlertid å kontrollere og innkreve toll og avgifter på import og eksport av varer og tjenester til Norge, samt å ha en samfunnsbeskyttende rolle i forbindelse med matvaresikkerhet og smugling av illegale varer.



Stort beslag av Valium tabletter.

Siden 1890-årene har tollaboratoriet bidratt for å hjelpe tollerne med å klassifisere (bestemme toll og avgifter) varer etter innhold og sammensetning og identifisere ukjente materialer. Slik har man sikret en rettferdig saksbehandling. Gamle tollere har fortalt om besøk på tollaboratoriet. De har hatt stor tilfitt til og beundring for kjemikerne der. Dersom de kom med et mystisk hvitt pulver var bestyrer Klüver (193?-1954) god å ha. Han spyttet på pekefingeren, stakk den så vidt bort i pulveret og førte fingeren til tungen, enkelt og greit. Surt, søtt, salt, beskt, basisk og uløselig var fort unnagjort. Ved å se, lukte og brenne pulveret, kunne det bestemmes og klassifiseres som mat, legemiddel eller kjemikalie. Var

det rart at kjemikerne på laboratoriet ble beundret og betraktet som rene trollmenn (eller trollkjerringer)? Tollkjemikere var eksperter på slike lettvinde metoder og de virket utmerket i forhold til det norske klassifiseringssystemet som gjaldt før 1954. Siden den gang har tolltariffen endret seg mye, og kravet til kvalitet og nøyaktighet har økt.

Vi er i dag 7 allsidige kjemikere med variert bakgrunn. Spesielle fordi tolltariffen er vårt fagfelt, og det er vi alene om i Norge. Vi har samarbeidspartnere ellers i Europa og verden som også er tollkjemikere.



Torbjørn Moe, LeAnh Tran, Harry G. Jensen, Ingvar Åkesson, Lene Karlstad og Siv M. Engen.

Våre oppdragsgivere er i hovedsak tollerne ute som sender inn prøver til analyse. Oppdragene og analysene varierer, noe som gjør at ingen dager er like hos oss. Vanlige analyser kan være kjeks for å bestemme fuktighet eller sjokolade innhold, sylteagurker for å bestemme innholdet av eddik eller juice for å analysere om den er tilsatt ekstra sukker. Vi analyserer også melkeproteiner, tilsatt merkestoff i landbruksdiesel, tekstiler, alkoholprosent, denaturerings middel i alkohol, fett, oljer og plast. En annen stor del av prøvemassen vår er legemidler, doping, planter og frø som både er tatt i kontroll og kommer tilsendt i brev/pakker. I tillegg bistår vi når tollvesenet har aksjoner sammen med for eksempel mattilsynet. Da analyserer vi gjerne alkohol tatt på barer for å undersøke om det er ekte vare, tilsatt vann eller til og med metanol.

Laboratoriet disponerer i dag:

1 stk. Perkin-Elmer FTIR-spektrofotometer, Spectrum 1000

1 stk. HewlettPackard Kapillærelektroforese-instrument, 3D CE, GE 1600 A

2 stk. Hewlett-Packard Gasskromatografer, GC 5890 og GC 6890

1 stk. Shimadzu UV-spektrofotometer, UV-160A

1 stk. Shimadzu HPLC, LC 10 AD

1 stk. Shimadzu GCMS, QP2010 med AOC 5000 autoinjektor



Le Anh ved vår GCMS.

I tillegg har vi en del mindre og enklere analyseapparatur (refraktometer, densimeter, Kjeldahl, gelelektroforese m.m.) til å supplere våre mangfoldige analyser med.

Vår GCMS er som sagt fra Shimadzu, og er et singel quadrupol instrument. Programvaren er utviklet av Shimadzu og til virkestoffsøk har vi bibliotekene NIST 27 og NIST 147. I tillegg er instrumentet utstyrt med en egen port for direkte injeksjon av tørre stoffer og pulvere. Denne blir brukt ytterst sjelden da den sliter sterkt på ionekilden, men i vanskelige tilfeller er det en effektiv analyse for identifikasjon av innhold. Sammen med SPME-applikasjonen gjør dette oss i stand til å undersøke både væsker, gasser og tørre stoffer, noe som er nødvendig med det store mangfoldet vi har på våre vareundersøkelser.

Møter, konferanser, messer & seminarer

2007

Pittcon 2007

11.03 - 16.03.2006, New Orleans, Louisiana

www.pittcon.org

55th ASMS Conference on Mass Spectrometry

03.06 - 07.06.2007, Indianapolis, Indiana

www.asms.org

The 13th Nordic Mass Spectrometry Conference

28.08 - 31.08.2007, Savonlinna, Finland

www.nordicms2007.fi

Lab 07

16.10 - 18.10.2007, Norges Varemesse, Lillestrøm

2008

Pittcon 2008

02.03 - 07.03.2008, New Orleans, Louisiana

www.pittcon.org

56th ASMS Conference on Mass Spectrometry

01.06 - 05.06.2008, Denver, Colorado

www.asms.org

2009

The 18th International Mass Spectrometry Conference

Bremen, Germany

57th ASMS Conference on Mass Spectrometry

31.05 - 04.06.2009, Philadelphia, Pennsylvania

www.asms.org

DART en ny masse-spektrometri teknikk som medgir analys uten prøve-opprensning

Jan Nordin, Chemalys

Inledning

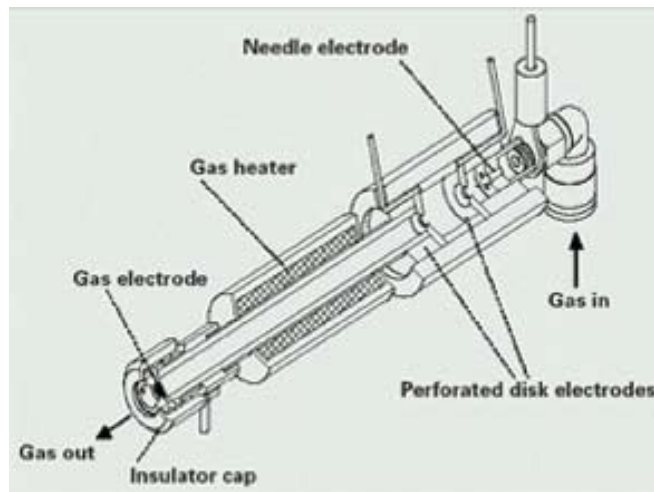
Vart tionde år brukar det komma en helt ny teknik inom masspektrometri.

Nu är den här DART som står för "Direct Analysis in Real Time" en helt ny jonisationsteknik där man kan analysera vätskor, gaser eller fast material vid atmosfärstryck utan föregående upparbetning. Dart har utvecklats av Jeol som i sitt koncept erbjuder Dart tillsammans med ett Time of Flight instrument, AccuTOF. Med detta koncept så kan man snabbt bestämma elementarsammansättningen på olika ämnen. Dart går även att använda till andra masspektrometrar än Jeol's exempelvis MS/MS instrument.

Hur fungerar DART?

Provet förs bara in i gasströmmen, de exciterade He-atomer joniserar provet enligt nedan:

- Penning Ionization (+)
Provet joniseras direkt genom energiöverföring från metastabila (M^)*
- Proton Transfer (+)
o He^ joniserar vatten som finns i luften*
o Joniserade vattenkluster överför protoner till provet
- Electron Capture (-)
o Penning elektroner blir snabbt termaliserade
o Oxygen fångar upp elektronerna
o O_2^- joniserar provet



En gas, vanligtvis helium leds in i en kammare där en elektrod (needle electrode) exciterar He till en He-plasma.

De laddade partiklarna tas sedan bort i ett galler (perforated disk electrodes) så att endast exciterad He-plasma strömmar ut mot provet.

Med ett element (gas heater) så kan man öka jonisation för prover med dåligt ångtryck (vapor pressure).

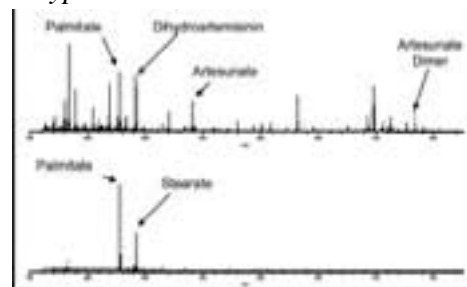
Applikationsområden

Dart togs ursprungligen fram som en teknik för "forensic sciences" och FBI i USA har idag ca 12 instrument som används inom vitt skilda områden. Bland annat har man använt tekniken kvantitativt med lysande resultat på olika droger och dess metaboliter från kroppsvätskor. Dessa resultat har väckt ett stort intresset är för tekniken inom de flesta applikationsområden.

Tull, Polis, Kriminal Tekniska och Rättskemiska Laboratorier och Civil Försvar

Många av dessa frågor går i varandra men i och med den ökade handeln på Internet så har behovet av snabba och enkla analyser aktualiserats.

Exempelvis säljs läkemedel på Internet som sägs vara av en viss typ men är istället bara bulkvara.



Genom att bara föra in det som skall analyseras i gasströmmen så kan man påvisa olika ämnen.

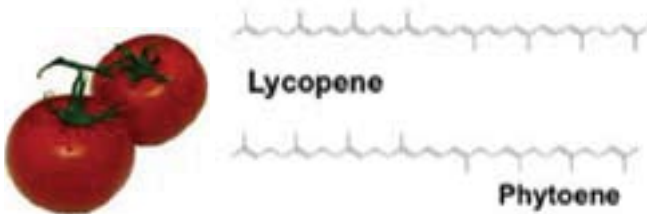
Exempelvis analyserade vi olika sedlar på MS konferensen i Prag. Norska sedlar innehöll en del plastmaterial men ingen narkotika, dollarsedlar från USA däremot påvisade både kokain och narkotika preparat såväl som kosmetika och bekämpningsmedel mot ohyra.

Med alla dessa hot från terrorister så har ju behovet av att upptäcka sprängmedel inte minst från självmordsbombare ökat.

- Genom att föra ett klädesplagg eller tygstycke in i Dart så kan sprängämnen krutrester mm. detekteras.
- I jordprover, lervatten och betongbitar har man påvisat sprängämnen och kemiska stridsmedel.

Fingeravtryck, narkotikapreparat i saliv eller urinprover är andra applikationsområden för Dart.

Livsmedel, miljövård



En bit av ett tomat skal placeras framför DART och positiva joner detekterades.

lycopene [M+H]⁺ C₄₀H₅₇
m/z 537,4460

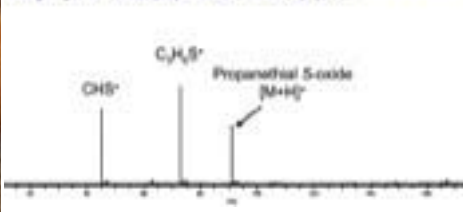
phytoene [M+H]⁺ C₄₀H₆₅
m/z 545,5086

I olika typer av livsmedelsapplikationer har DART använts såsom:

- Bestämning av sammansättning i oliv-olja konfirmering av Oleoanthal
- Ethyl Palmiat
- Atrazine (Propazine 1% och Simazine 0,2%)
- Elementarsammansättning på spårämnen i te
- Glucose via flow-injection
- Opiater i vallmofrön
- Fördelning av Capsaicin i Chilipeppar



Vid som framkallar tårar är ett par enzymer på ett cysteine derivat som skiftligen ger en form av propanedial S-oxide (C₃H₆O).



Momentan detektion av de ämnen som framkallar tårar från nyskuren lök.

Inom analys av livsmedelsanalys så kan man med lätthet ta en bit av det man vill analysera ex. ett apfelsinskal, tomat, lök eller dylikt och bara föra in det i gas strömmen.

Inom miljövård så kan man göra på samma sätt:



- bara placera exempelvis en växt i gas strömmen
- ta ett jordprov för direktanalys.
- Vi har också analyserat partiklar från exempelvis bilavgaser och stadsluft.
- Kontroll av livsmedel såsom Coca Cola, vatten och Olivolja är andra applikationsområden.
- Svambekämpningsmedel i apfelsinskal

Läkemedel

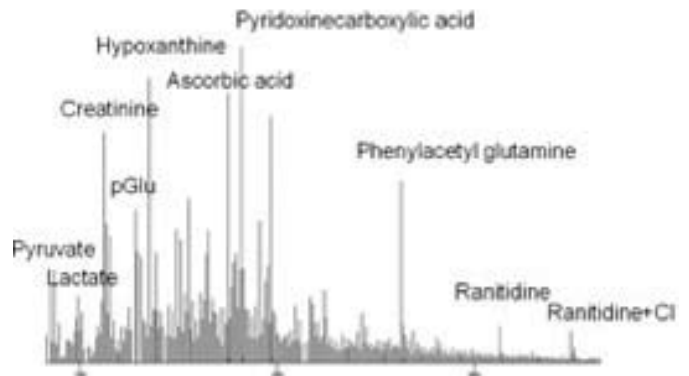
Intresset för Dart inom läkemedelsindustrin är stort, dock behöver man system som är både automatiserade och där man kan analysera både kvalitativt och kvantitativt.

Genom att utrusta Dart med en autoinjektor som positionerar provet på samma ställe hela tiden så har man påvisat kvantitativa bestämningar med både god linjaritet och känslighet.

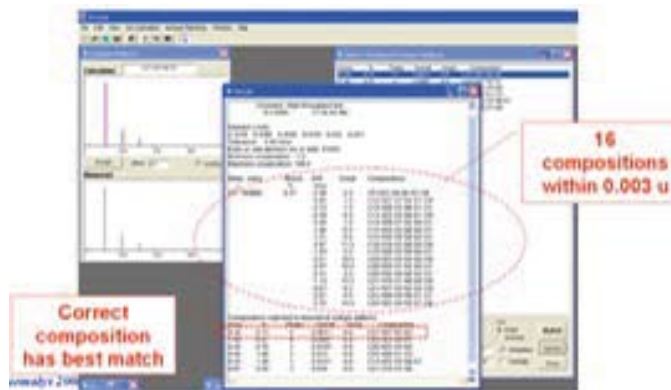


20 prover i minuten från en 96-hålsplatta är ingen omöjlighet

Genom analys av olika kroppsvätskor så som saliv, urin och plasma kan man bestämma enskilda ämnen i komplext sammansatta prover



Med hjelp av Jeol's datasystem så kan de enskilda substanserna i ett komplext urinprov automatisk detekteras. Eftersom Dart inte ger någon addukt-bildning så får man MH+ och datasystemet plockar fram rätt substans genom att matcha elementarsammansetningen (exakta masstalet) och isotopförhållandet.



Datasystemet väljer sedan ut rätt substanser namnger och listar dessa.

Med en snabbkannande TOF kan analyserna automatiseras för HTS.

I kombination med multivariat dataanalys så kan komplexa data behandlas.

Jan.Nordin@chemalys.se

Den 13. Nordiske massepektrometrikonferansen

Dag Ekeberg, NSMS

Det er ikke lenge igjen til vi skal møtes i Finland på den nordiske MS-konferansen. Vi vil her få anledningen til å høre mer om instrumentering som f.eks Chip-aplikasjoner, FTMS, IMS-MS, farmasøytisk/klinisk analytisk kjemi til biologisk massespektrometri (proteomik, proteininteraksjoner, MS imaging, miljøanalyser og analyser på mat.



Stedet våre finske venner har valgt å holde konferansen er et sted som heter Savonlinna. Stedet, som ligger ca 30 mil fra Helsinki, er et populært reisemål. Det er bygget opp omkring et gammelt slott fra 1475.

Lederen for møtet er Paula Vanninen og hun oppfordrer oss alle til å melde seg på med foredrag eller plakater. De nordiske møtene har pågått noen år nå og det er en hyggelig måte å bygge de nordiske relasjoner både faglig og sosialt. Selv om stedet er meget gammelt betyr ikke det at de ikke har moderne fasiliteter som vi vet å sette pris på. Både konferansestedet og omgivelsene rundt er verdt et besøk.

Så jeg vil som leder av NSMS bare oppfordre dere alle til å vurdere å melde dere på. Lag gjerne en liten presentasjon i form av et foredrag eller en plakat så er du en enda bedre representant for din arbeidsgiver og landet du kommer fra. Trenger du informasjon går du enten inn på NSMS sine nettsider eller direkte til møtets nettside:

<http://www.nordicms2007.fi>



Massespektrometri av bakterier II: Proteiner

Morten K. Moe og Kaare M. Nielsen, UiT

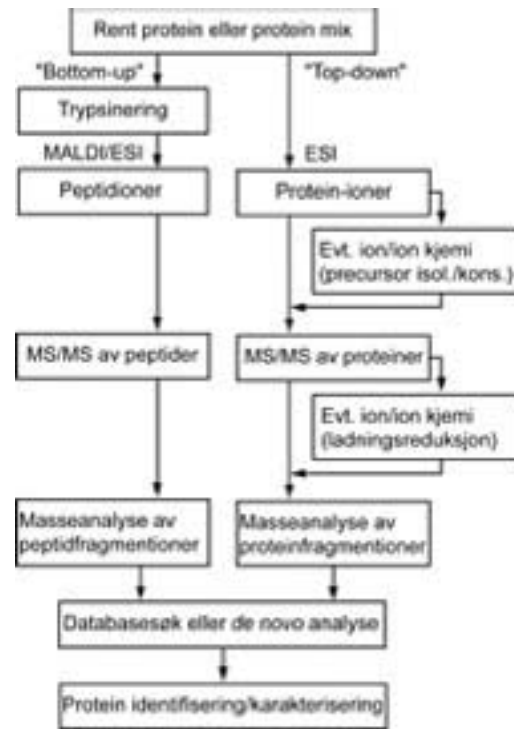
Denne artikkelen vil gi en liten oversikt over generell proteinanalyse ved hjelp av massespektrometri (MS) og deretter beskrive prinsippene for hvordan denne metodologien kan anvendes på bakterier. MS kan gi raskere identifisering av bakterier enn metodene som benyttes i dag og det kan være nyttig innen diagnostikk både klinisk og i ”kampen mot terrorisme”. Videre kan MS benyttes til en rekke andre formål innen mikrobiologisk forskning, slik som innsikt i bio-kjemiske prosesser, evolusjons- og resistensstudier, samt fylogenetisk tilordning.

Introduksjonen av elektropray ionisering (ESI) og matriseassistert laserdesorpsjon/ionisering (MALDI) på slutten av 1980-tallet, samt videreutvikling av flygetidsmasse-analysatorer (TOF) har åpnet for å anvende MS til analyse av nær sagt alle typer molekyler. Svært mange molekyler i levende organismer befinner seg i vann og er naturligvis godt vannløselige. I pre-ESI/MALDI-tida måtte polare forbindelser derivatiseres før de ble satt på et gasskromatografi (GC)-MS instrument. Det ble gjort mye god kjemi i forbindelse med GC-MS analyse, men derivatiseringsreaksjoner kan være vanskelige å få til og det er alltid en risiko for tap av prøve. ESI og MALDI har derfor gjort analyser av polare forbindelser enklere og mer effektiv. Koblingen mellom væskechromatografi (HPLC) og ESI er uvurderlig innen legemiddelanalyse og i proteomikk er både HPLC-ESI-MS og MALDI-MS godt etablerte og allment aksepterte teknikker. I denne artikkelen skal vi gi en kort generell beskrivelse av proteinanalyse og deretter se nærmere på hvordan dette kan benyttes innen analyse av bakterieproteiner.

Proteinanalyse

Det er to strategier for proteinanalyse ved hjelp av MS; (a) top-down og (b) bottom-up (figur 1). Intakte proteiner ioniseres og fragmenteres for å gi peptidsekvensen ved top-down, men denne strategien fordrer helst FT-MS [Han]. Intakte proteiner kan også analyseres vha ’ion mobility spectrometry’ (IMS)-TOF. IMS gir muligheten for å skille ulike konformere av intakte proteiner [McLean]. Top-down proteinanalyse er en attraktiv strategi,

men det kreves ytterligere metode-utvikling (og billigere instrumenter?) før den blir allemannseie. Bottom-up proteinanalyse benytter proteiner kløvet til peptider vha en protease (f.eks. trypsin) før prøvene utsettes for MS. Peptidene analyseres enten på MALDI-TOF og/eller ESI-QTOF (Figur 1 og 2). MALDI krever peptider fra få proteiner for å gi fornuftige resultater og outputen er peptide mass fingerprints (PMF).

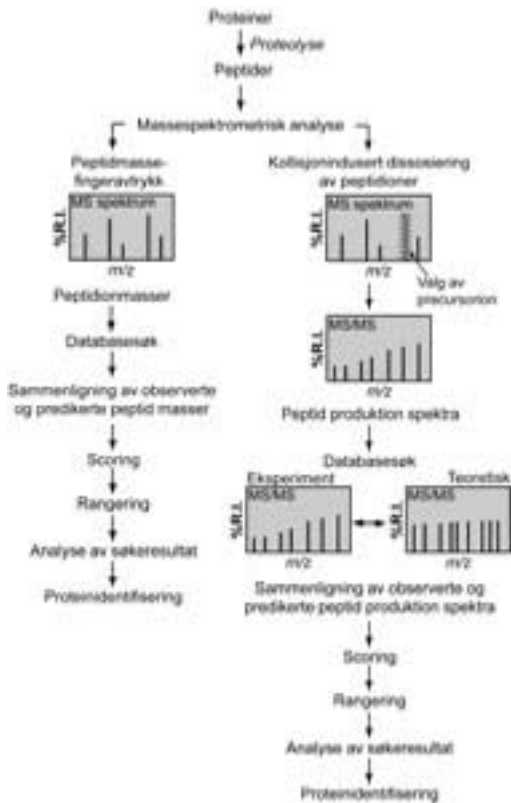


Figur 1. Prinsipp for bottom-up (venstre) og top-down (høyre) strategier for proteinidentifisering vha MS.

ESI-QTOF gir mulighet for MS/MS av peptidioner og aminosyresekvensen i peptidene oppnås. MALDI kan også benyttes til MS/MS (post-source decay, PSD). PMF, MS/MS og PSD matches mot store databaser i utlandet (NCBI, Swissprot, osv) og proteiner kan identifiseres. Søkeresultatene angir også sannsynligheten for at peptidet kommer fra det foreslåtte proteinet.

En fordel med top-down strategien er at hele proteinet blir introdusert i massespektrometeret, mens bottom-up som regel kun vil gi peptider som tilsvarende 40-90% av peptidsekvensen i det proteolyserte proteinet. Eventuelle modifiseringer i de delene av proteinet som ikke observeres under MS vil det derfor være vanskelig å si noe om.

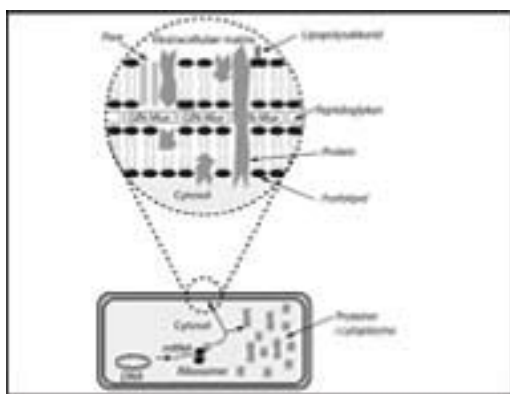
For videre innblikk i MS og proteinanalyse anbefales artikkel av Domon og Aebersold.



Figur 2. Flytskjema for PMF (venstre) og MS/MS (høyre) identifikasjon av proteiner.

Proteinsyntese i bakterier

Bakteriers ultrastruktur ble beskrevet i Massenytt 1/2006 (www.nsms.no/info/massenytt1-06.pdf). Figur 3 viser proteinsyntese i bakterier. Fra DNA dannes mRNA (transkripsjon) som bindes til ribosomer, hvor proteiner dannes (translasjon). Ferdigdannede proteiner ender enten opp i cytosolen eller i cellemembranen via ulike mekanismer [Economou].



Figur 3. Proteinsyntese og lokalisering i bakterier. Figuren viser en Gram-negativ bakterie.

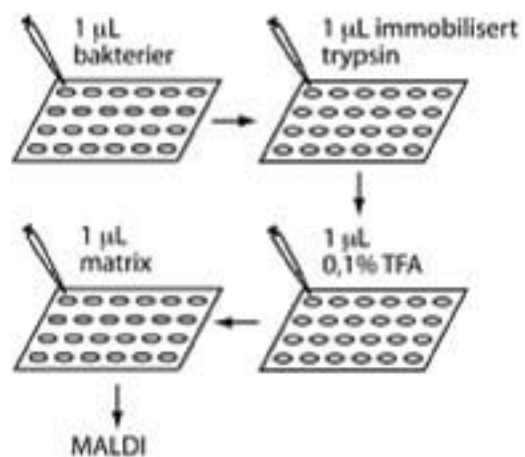
Mikrobiell proteomikk

For å forstå biokjemiske prosesser i bakterier må disse analyseres på proteinnivå. Analyser på genomnivå (feks DNA-microarrays) gir et ufull-

stendig bilde fordi bare en fraksjon av genomet transkriberes til mRNA. Analyse av transkriptomet (totalt mRNA) kan også gi gale konklusjoner siden det ikke er noen lineær sammenheng mellom mengde transkribert mRNA og translateret protein. I bakterier forekommer posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) i langt mindre grad enn i eukaryoter, men skjer vha enkelte peptidaser [Gonzales og Robert-Baudouy]. PTM vil heller ikke identifiseres ved microarrays. Protein-analyse gir derfor et mer komplett bilde av protein-sammensetning i en celle enn den mer indirekte transkriptomanalysen.

Bakterielle proteiner kan analyseres på flere nivå: (1) sekreterte proteiner, (2) membranbundne overflateproteiner, (3) membranproteiner og (4) vannløselige celleproteiner.

(1). Proteiner som sekreteres ut av cellene er gjerne toksiske enzymer og kan bestå av kollagenaser, hemo-lysiner, nukleaser og proteaser. Mange bakterier skiller dessuten ut glyko-lipo-proteiner som er nyttige for adhesjon og opptak av næringsstoffer fra miljøet. Sekretproteiner isoleres gjerne ved å la bakteriene gro i en minimalt medium, noe som vil stimulere bakteri-ens sekresjon av disse proteinene. Bakteriene fjernes deretter fra løsningen og proteinene isoleres og analyseres.



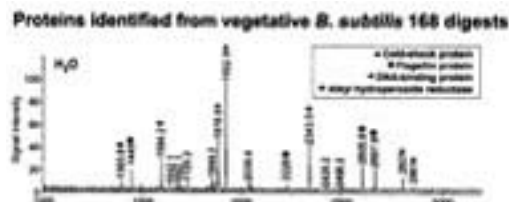
Figur 4. Prosedyre for å identifisere overflateproteiner fra bakterier [Pribil].

(2). Analyse av overflateproteiner kan gjøres ved enzymatisk proteolyse direkte på en MALDI-plate (figur 4). Slike proteiner vil bestå av både hydrofobe og hydrofile deler. Det er kun de hydrofile delene som vil bli trypsinert dersom prosedyren i figur 4 følges.

Gjennom PMF eller PSD vil proteinene kunne identifiseres og dermed også bakterien. For at metoden

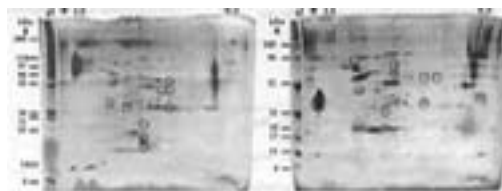
skal fungere optimal er det en fordel å ta bakterier som har vokst i kultur og ikke på agarskål.

Bakterier vil ha et begrenset antall typer proteiner på celleoverflaten og spektrene som er relativt enkle (figur 5). Proteinene er unike for ulike arter og denne strategien kan benyttes til artsidentifisering. Videre kan dette benyttes til å måle bakteriens respons på endring i miljøfaktorer, forutsatt at disse endringene fører til endringer i bakteriens overflateegenskaper.



Figur 5. Proteiner identifisert fra *Bacillus subtilis* opparbeidet etter prosedyren i Figur 4. Spektrumet er tatt opp av Fenselau et al., Univ. Maryland.

(3). Totalt membranprotein fra bakterier kan også analyseres ved at bakterien lyses og cellemembranen isoleres [Pessione]. Dette er en slags 'extended version' av metoden beskrevet i Figur 4, hvor proteiner fra begge membraner i Gram negative bakterier (figur 3) vil bli isolert. Antallet ulike proteiner vil nå være for stort til at proteinene kan analyseres direkte ved MALDI-MS, og et separasjonstrinn må utføres. Separasjonen skjer enten ved to-dimensjonal gelelektroforese (2D) eller omvendt fase HPLC-ESI-MS/MS av trypsinerte proteiner. Ved 2D separeres intakte proteiner, og en oversikt over antallet membran-proteiner i bakterien oppnås. Pga oppløsningsevnen (maksimalt 1500 proteiner kan teoretisk separeres) og følsomheten til 2D, vil bare en viss andel (25-45%) av proteinene detekteres. Ved direkte trypsinering og HPLC-separasjon av peptidene fås denne oversikten først når MS-analysen er utført. Det er en viss risiko at ikke alle proteinene vil bli detektert ved HPLC-tilnærmingen som følge av at det kan være kun små mengder av enkelte proteiner som er uttrykt i cellen. 2D (figur 6) gir derimot et mer oversiktlig bilde av tilstedeværende proteiner og proteiner som ønskes videre analysert klippes ut av gelen, ekstraheres, trypsineres og overføres til en MALDI-plate. 2D vil også gi et visuelt inntrykk av hvordan bakterier responderer på ytre stimuli ved å sammenligne proteinuttrykk før og etter stimuleringen.



Figur 6. 2DE av avirulent (venstre) og virulent (høyre) *Aeromonas veronii* [Shoemaker].

(4) Cytosoliske proteiner kan analyseres ved at cellen lyses og restene av cellemembranen fjernes fra løsningen. De fleste proteinene i en bakterie vil finne seg i cytosolen og en frittlevende bakterie har rundt 5000 gener. Hvilke proteiner som er uttrykt og i hvilken grad de er uttrykt vil være avhengig av ytre miljøfaktorer, og de egenskapene ulike bakteriestammer har. Det siste kan være nyttig for å studere mekanismer innen antibiotika-resistens. Proteomet til et følsomt og et erytromycin (et makrolid antibiotikum) resistent isolat av *Streptococcus pneumoniae* viste at sistnevnte hadde langt større uttrykk av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), noe som kanskje ikke hadde blitt identifisert ved DNA-analyse [Cash]. Det ble konkludert at GAPDH økte mengden NADH i cellen, som i sin tur sørger for energi til aktiv transport av erytromycin ut av cellen.

Uansett valg av metode for bakterie-proteinanalyse vil proteinuttrykket i cellene være avhengige av en rekke forhold, som bakteriens vekstfase, type vekstmedium, tilgang på nærings-stoffer, bakterienes alder, prøveopp-arbeidelsesteknikk og matrix til MALDI-analyse.

Som det framgår av denne artikkelen vil ikke proteinanalyse av bakterier skille seg vesentlig fra øvrig proteinanalyse. Unntaket er muligheten for rask artsidentifisering ved karakterisering av overflateproteiner (figur 4). Når det gjelder protein-analyse (bottom-up) er det viktigste arbeidet det som gjøres før og etter MS-analyse. Det er utenfor målet med denne artikkelen å diskutere ulike prøveopparbeidelsesteknikker for proteiner. Bioinformatikk-aspektet ved bakterieproteinanalyse er heller ikke diskutert. Vi håper likevel at leserne av Massenytt sitter igjen med inntrykket at det kan gjøres mye spennende massespektrometri også med bakterier.

Takk til:

FUGE-N for finansiering av tur til USA og NFR for finansiering av Postdoc-stilling (MKM).

Referanser

- A. Fox, S. Hofstadler, J. Jackman, J. Reilly, S. Russell, J. Shoemaker, G. Siuzdak, K. Wahl og Wilkins, foredragsholdere ved Fall workshop: "Characterization of Microorganisms by Mass Spectrometry", Catamaran Resort Hotel, San Diego, CA, 8.-9. desember 2005, i regi av American Society for Mass Spectrometry. Organisatorer: J. Shoemaker og K. Wahl.
- Cash, P, Argo, E, Ford, L, Lawrie, L., McKenzie, H. Electrophoresis, 1999, 20, 2259.
- Domon, B., Aebersold, R., Science, 2006, 312, 212.
- Douglas, JF. Kapittel 26 i "Molecular microbiology", Persing, DH (Ed.), ASM Press, Washington, DC, USA, 2004. ISBN 1-55581-221-X
- Economou, A, Christie, PJ, Fernandez, RC, Palmer, T, Plano, GV, Pugsley, AP. Mol. Microbiol., 2006, 62, 308.
- Gonzales, T, Robert-Baudouy, J. FEMS Microbiol. Rev., 1996, 18, 319.
- Han, X., Jin, M., Breuker, K., McLafferty, FW. Science, 2006, 314, 109.
- McLean, JA, Ruotolo, BT, Gillig, KJ, Russell, DH. Int. J. Mass Spectrom., 2005, 240, 301.
- Pessione, E, Giuffrida, MG, Prunotto, L, Barello, C, Mazzoli, R, Fortunato, D, Conti, A, Giunta, C. Proteomics, 2003, 1070.
- Pribil, P, Fenselau, C. Anal. Chem., 2005, 77, 6092.
- Simpson, RJ (Ed.). "Proteins and Proteomics. A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2003. ISBN 0-87969-554-4.

Et eldgammelt kornslag

Ann Katrin Holtekjølen, Matforsk AS

BYGG, et eldgammelt kornslag som er i ferd med å få tilbake anerkjennelse etter århundrer som et lite verdsatt korn - forvist til dyrefôr. Lykken ser ut til å snu og tiden som dyrefôr kan kanskje bli historie.



Hvorfor? Jo, bygg er sunt, men det er også viktig å huske på at bygg som mat er ikke noe nytt. Bygg har tidligere hatt lange tradisjoner innen norsk matkultur, og med dagens økende fokus på helse og helserelevante utfordringer er byggets verdi i ferd med å gjenoppstå. Bygg har ikke akkurat vært populær på middagsbordet de siste tiårene. Vi kjenner uttrykk som: "Bygg til maten? Spise dyrefôr?", eller "Nei takk, den bitre, beske smaken kan du ha for deg selv!". Men hva går vi faktisk glipp av? Hva skjuler seg egentlig bak dette gylne ytre som blafrer i vinden og som nikker mot oss med varsel om den kommende innhøstingen? Hva er det egentlig dyra har nytt godt av i lang tid, men som vi mennesker har gått glipp av? Jo, et høyt innhold av kostfiber, viktige mineraler, vitaminer og lite fett sender bygg oppover verdiskalaen igjen og gjør bygg til et sunt alternativ til dagens hvete.

Bygg er en rik kilde på viktige helsekomponenter også antioksidanter (fenoliske komponenter). Disse bidrar blant annet til smak og farge og kan virke positivt på helsen. Antioksidanter i bygg kan eksistere som "frie" eller bundet til fiber komponenter. I hovedsak, er de frie fenoliske komponentene i bygg flavanoler (proanthocyanidiner) og tokoferoler, mens de bundne er fenoliske syrer. Selv om innholdet virker lite ($\mu\text{g/g}$ eller mg/kg) er viktigheten desto høyere. Disse fenoliske komponentene bidrar også til andre egenskaper enn bare å være gunstig for helsen. De har viktige funksjonelle egenskaper

og vil påvirke produktkvalitet. Både brødkvalitet samt for eksempel ølets kvalitet vil påvirkes av disse stoffene. Innholdet av fenoliske komponenter er høyere enn tidligere antatt. I tillegg kan mengden variere fra sort til sort. Dette vil igjen påvirke blant annet smaken, noe som gjør at noen byggsorter kan smake forskjellig fra andre.



En kartlegging av disse stoffene i bygg er derfor viktig og Matforsk har erfaring fra analyser på forskjellige byggsorter. Et viktig hjelpemiddel for kvantifisering og identifisering av antioksidanter i korn er HPLC-DAD-MSⁿ. Før identifisering og kvantifisering ekstraheres ofte de frie fenolene med metanol- og/eller acetone-løsninger. De bundne forbindelsene trenger derimot litt ”røffere” behandling for å bryte bindingene til fiber komponentene. Behandling med base frigjør fenolsyre før de ekstraheres med etylacetat etter surgjøring. Opprensing og oppkonsentrering er nødvendig på grunn av de små mengdene. Fast fase ekstraksjon benyttes ofte på de frie komponentene, mens de bundne dampes inn og reløses før analyse på HPLC-DAD-MSⁿ. Spesifikke og følsomme teknikker som HPLC-DAD-MSⁿ er viktige ved analyser av stoffer med lave konsentrasjoner. I tillegg gjør bruken av DAD (UV-Diode-Array-Detektor) det mulig å kvantifisere de forskjellige forbindelsene samtidig. Dette, fordi kromatogrammet registreres ved flere bølgelengder. Identifiseringen skjer ved hjelp av MSⁿ og dets resulterende fragmenteringsmønstre.

De store variasjonene detektert i byggsorter viser at valg av byggsort vil være viktig for å inkorporere mer bygg i kostholdet. Ikke minst siden totalmengden av fenoliske komponenter kan være to ganger høyere i noen byggsorter sammenlignet med andre. Hoveddelen av disse forbindelsene sitter i de ytre delene av kornet noe som gjør at avskalling

vil også ha mye å si for den totale mengden. Så, å finne den rette sorten, samt å optimalisere prosessene slik at de viktige helsekomponentene bevares, er og vil alltid være viktige utfordringer i jakten på nye samt bedre utnyttelser av dette kornet.



Bygg er nemlig ikke bare bygg. La oss stjele litt tilbake fra dyrene og nyt godt av dette gyldne, sunne kornet som vaier i vinden. Spis mer bygg!!