

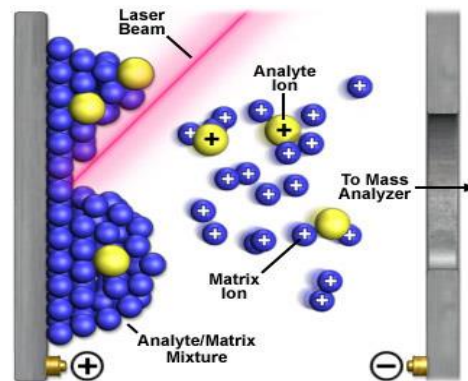
Název: Hmotnostní detekce biologicky významných
sloučenin pro biotechnologie

Školitelé: MSc. Miguel Angel Merlos Rodrigo,
Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.

Datum: 17.5.2013

MALDI

- MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization = laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
- tzv. měkká ionizační technika - převážně se tvoří molekulární ionty $[A+H]^+$ v pozitivním iontovém módu, kde A je analyt a H je atom vodíku
- energii laseru absorbuje převážně matrice (organická kyselina), která je v nadbytku nad analytem a po desorpci mu předává náboj
- vhodná ionizační metoda pro analýzu celých molekul peptidů, proteinů, oligonukleotidů a dalších



<http://prescottbiochem09.wikispaces.com/How+does+MALDI-TOF+work%3F> (cit. 16.5.2013)

TOF (TIME-OF-FLIGHT)

- průletový hmotnostní analyzátor - analyzuje hmotnosti iontů na základě jejich doby letu od iontového zdroje k detektoru

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

m je hmotnost, z je náboj, e je elementární náboj, U je vložené napětí, t je doba letu, L je délka driftové zóny

- po každém pulsu laseru je vždy zaznamenáno celé hmotnostní spektrum, nemusí se proto dělat sken
- analýza molekul o velmi vysoké hodnotě m/z ; rozsah je teoreticky neomezený
- krátká doba záznamu jednoho spektra - to umožňuje měřit několik set spekter z jedné skvrny a tyto spektra pak zprůměrovat
- vysoká citlivost díky dobré propustnosti iontů
- vysokého rozlišení lze dosáhnout díky použití reflektoru (iontového zrcadla) a zpožděné extrakce
- reflektor - zvyšuje rozlišení díky zaostřovacímu efektu, kdy ionty s větší kinetickou energií pronikají hlouběji do reflektoru a tím dochází k prodloužení jejich doby letu oproti iontům s menší kinetickou energií, ale se stejným poměrem m/z .
- zpožděná extrakce - urychlovací napětí se aplikuje krátce po desorpci a ionizaci molekul analytu, díky tomu dochází v určité míře k vyrovnání rozdílů v počátečních rychlostech iontů vzniklých při desorpci.

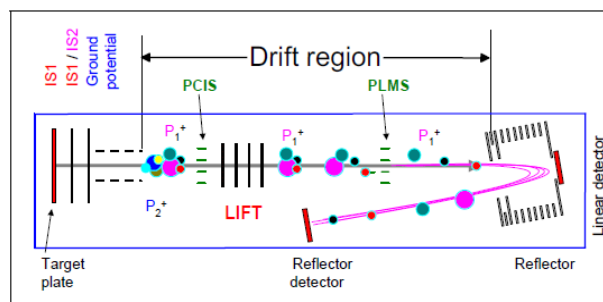


Schéma TOF analyzátoru z návodu k Bruker ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF

Příprava analytu a matrice

- nejčastěji používané matrice: kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová; DHB), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová; SA), 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (THAP), kyselina 3-hydroxypikolinová (3-HPA), dithranol (DIT), kyselina trans-3-indolakrylová (IAA)

Analyt	Používaná matrice
peptidy (< 10 kDa)	HCCA, DHB
peptidy, proteiny (> 10 kDa)	SA, DHB
oligonukleotidy (< 3 kDa)	THAP
nukleové kyseliny (> 3 kDa)	HPA
syntetické polární polymery	DHB
syntetické nepolární polymery	DIT, IAA
sacharidy	DHB, CHCA, THAP

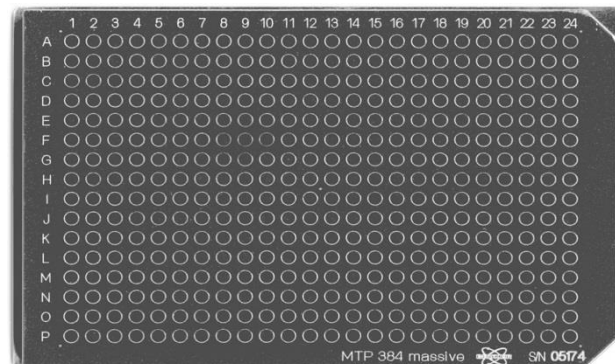
Základní aspekty:

- matrice musí být v nadbytku nad analytem; $c_{\text{matrice}} \geq 1000c_{\text{analytu}}$
- roztok matrice by se měl připravit vždy čerstvý pro daný den
- pH roztoku matrice musí být kyselé pro analýzu v pozitivním módu; pro okyselení se používá např. kyselina trifluoroctová (TFA)
- \uparrow podíl organického rozpouštědla ... \uparrow rychlejší odpaření rozpouštědla ... \downarrow méně času pro tvorbu krystalků matrice s analytem
- analyt se musí kompletně rozpustit a měl by být čirý, případně se provede jeho purifikace (odsolením,...)
- MALDI destička musí být čistá

Nanášení na MALDI destičku

Mezi hlavní metody nanášení patří:

- *dried-droplet* - roztok analytu se smíchá s roztokem matrice v poměru 1:1 a vzniklá směs se nanese na destičku
- *quick and dirty* - roztok analytu se s roztokem matrice smíchá až přímo na destičce; většinou se jako první nanese roztok matrice, poté roztok analytu a nakonec se pomocí špičky mikropipety smíchají
- *overlayer* - nejprve se na destičku nanese roztok matrice v koncentrovaném organickém rozpouštědle (nejčastěji acetonu), pak se nanese směs roztoku analytu s roztokem matrice
- *sandwich* - jako první se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, poté se nanese roztok analytu a nakonec se nanese roztok matrice s menším obsahem organického rozpouštědla
- *fast evaporation* - nejprve se nanese roztok matrice s vysokým obsahem organického rozpouštědla, počká se, až se rozpouštědlo vypaří, a poté se nanese roztok analytu
- *vacuum drying* - postup je stejný jako u fast evaporation, akorát se rychlost vypařování rozpouštědla urychlí pomocí sníženého tlaku



Kalibrace

- osa x se kalibruje většinou na směsi standardů peptidů či proteinů; nejčastěji se využívají tyto standardy:

Peptid	[M+H] ⁺ , monoizotopická m/z [Da]	[M+H] ⁺ , průměrná m/z [Da]
Bradykinin 1-7	757.3992	757.86
Angiotensin II	1046.5418	1047.19
Angiotensin I	1296.6848	1297.49
Substance P	1347.7354	1348.64
Bombesin	1619.8223	1620.86
Renin Substrate	1758.9326	1760.03
ACTH clip 1-17	2093.0862	2094.43
ACTH clip 18-39	2465.1983	2466.68
Somatostatin 28	3147.4710	3149.57

Protein	[M+H] ⁺ , Průměrné m/z [Da]
Insulin	5734.51
Ubiquitin I	8565.76
Cytochrom C	12360.97
Myoglobin	16952.30
Trypsinogen	23982
Protein A	44613
Albumin-hovězí (BSA)	přibližně 66.5 kDa

Bruker new ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF

- 2 kHz smartbeam™ II laser v TOF módu a 1 kHz v TOF/TOF módu
- umožňuje zaostřit laserový paprsek na do průměru až 10 μm - to je vhodné pro MALDI Imaging a jeho vysoké prostorové rozlišení
- rozlišení až 40000 a přesnost určení hmotnosti je 1 ppm
- unikátní metoda samočistění iontového zdroje pomocí infračerveného laseru (jiný laser než je použitý pro ionizaci) - zvyšuje životnost a udržuje potřebný výkon přístroje



Fotky přístroje ultrafleXtreme v celku a po otevření krytu

Štěpení proteinu v gelu (z 1D nebo 2D gelové elektroforézy)

- 1) Připraví se 0.02 mg/ml trypsin z 0.1 mg/ml trypsinu - k 20 μ l 0.1 mg/ml trypsinu se přidá 80 μ l 50 mM NH_4HCO_3 .
- 2) Ke vzorku gelu (gel je odbarvený a vysušený) s ukotveným proteinem se přidá 50 μ l 0.02 mg/ml trypsinu, směs se promíchá a nechá se 60 minut inkubovat při pokojové teplotě. Občas se směs lehce promíchá.
- 3) Mikrozkušavka se vloží do termostatu a nechá se 2 hodiny inkubovat při 45 °C.
- 4) Supernatant se opatrně odsaje mikropipetou do nové mikrozkušavky (I) a sníží se jeho hodnota pH pod 4 pomocí kyseliny octové.
- 5) Ke kouskům gelu se přidá 50 μ l extrakčního roztoku (5% kyselina octová v 75% ACN) a 15 minut se směs nechá jemně třepat.
- 6) Supernatant se odsaje do nové mikrozkušavky (II) a zopakuje se bod č. 5 s dalším přídatkem 50 μ l extrakčního roztoku.
- 7) Roztoky v mikrozkušavkách (I) a (II) se nechají při sníženém tlaku (nebo v dusíkové odparce) zkoncentrovat na objem přibližně 25 μ l.
- 8) Z každé mikrozkušavky se odebere 10 μ l do mikrozkušavek určených pro purifikaci pomocí ZipTip™.
- 9) Purifikace pomocí ZipTip™ špiček a následné nanesení purifikovaných vzorků na MALDI destičku.

Peptidové mapování (PMF = peptide mass fingerprinting)

- po selektivním štěpení proteinu trypsinem, který štěpí peptidové vazby za lysinem (K) nebo argininem (R), pokud po nich nenásleduje prolin (P), se získá směs peptidů, jejichž hmotnosti získané pomocí MALDI-TOF poslouží k identifikaci výchozího proteinu
- identifikace probíhá na základě srovnání získaných hmotností peptidů s hmotnostmi peptidů uloženými v databázi (SwissProt, NRDB, TrEMBL, aj.)
- k porovnání dat slouží různý software (např. Mascot)
- pravděpodobnost správné identifikace původního proteinu závisí na několika faktorech, jako např. na poměru nalezených/zadaných peptidů (expectation factor) nebo na procentu pokrytí sekvence - v případě Mascotu nám definuje pravděpodobnost určení tzv. $\log(\text{score})$, který když je ≥ 70 , tak poukazuje na to, že daný výsledek je signifikantní na zvolené hladině pravděpodobnosti

Následující obrázek ukazuje identifikaci lysozymu C podle jeho štěpů:

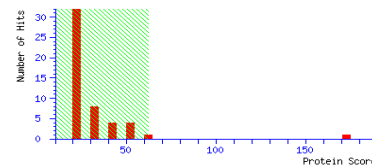
MASCOT Peptide Mass Fingerprint

(MATRIX) SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : SwissProt 2012_08 (537505 sequences; 190795142 residues)
Timestamp : 20 Sep 2013 at 16:13:21 GMT
Protein hits : [LYSC_COLVI](#) Lysozyme C OS=Colinus virginianus GN=LYZ PE=1 SV=2

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 62 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

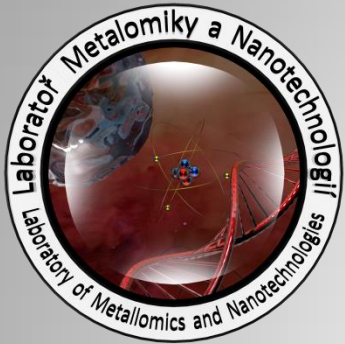


Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide	
<input type="checkbox"/>	22	2002.2235	2001.2162	2001.0400	0.1762	0	30	85	2	U	--KVFGRCLEAAAMKRHGLD.N
<input checked="" type="checkbox"/>	26	2116.2735	2115.2662	2115.0829	0.1832	0	40	9.2	1	U	--KVFGRCLEAAAMKRHGLDN.Y
<input checked="" type="checkbox"/>	30	2279.3535	2278.3462	2278.1463	0.1999	0	49	0.94	1	U	--KVFGRCLEAAAMKRHGLDNY.R
<input checked="" type="checkbox"/>	34	2492.4735	2491.4662	2491.2688	0.1973	0	59	0.11	1	U	--KVFGRCLEAAAMKRHGLDNYRG.Y

Shrnutí

- MALDI-TOF MS je metoda vhodná pro analýzu biomolekul; využívá se především pro identifikaci proteinů, bakterií, apod.
- Před měřením je důležitá příprava analytu a matrice; musí se zvolit vhodné rozpouštědlo a případně je nutná purifikace/izolace analytu.
- Cílem prezentace a navazujícího workshopu bylo seznámení spolupracovníků s metodou MALDI-TOF a s prací na přístroji Bruker ultrafleXtreme, což bylo splněno.

Poděkování



Laboratoř metalomiky a nanotechnologií

prof. Ing. René Kizek, Ph.D.

doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.

Podpořeno projektem:

NANOLABSYS

CZ.1.07/2.3.00/20.0148

DĚKUJI ZA VAŠÍ POZORNOST 😊

Děkuji za vaši pozornost 😊

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik

